

TECHNIKI W IMMUNOLOGII KLINICZNEJ

Tłumaczenie: *Barbara Piątosza*

19.1. Wprowadzenie	337	19.7. Wykrywanie autoprzeciwciał	344
19.2. Surowice poliklonalne i przeciwciała monoklonalne wykorzystywane w laboratoriach immunologii klinicznej 338		19.7.1. W surowicy	344
19.3. Pomiar immunoglobulin i innych swoistych białek . 339		19.7.2. Materiał biopsyjny	348
19.4. Jakościowe badanie immunoglobulin	339	19.8. Testy wykrywające alergię i nadwrażliwość	348
19.4.1. Surowica	339	19.8.1. Przeciwciała klasy IgE swoiste dla antygeny	348
19.4.2. Mocz	341	19.8.2. Całkowita IgE w surowicy	349
19.4.3. Płyn mózgowo-rdzeniowy	341	19.8.3. Przeciwciała precypitujące	349
19.5. Badanie dopełniacza i zaburzeń wywołanych przez kompleksy immunologiczne	342	19.9. Ocena limfocytów	349
19.5.1. Badanie składowych dopełniacza	342	19.9.1. Ilościowa ocena limfocytów	350
19.5.2. Wykrywanie produktów rozkładu dopełniacza	343	19.9.2. Badania czynnościowe	351
19.5.3. Czynniki nefrytyczny C3	343	19.10. Ocena neutrofilii i monocytów	352
19.5.4. Badania czynnościowe	343	19.10.1. Ocena ilościowa	352
19.5.5. Badanie obecności kompleksów immunologicznych	343	19.10.2. Badania czynnościowe	352
19.6. Przeciwciała skierowane przeciw antygenom mikroorganizmów	343	19.11. Technologia rekombinacji DNA w immunologii klinicznej	353
		19.11.1. Analiza DNA	353
		19.11.2. Implikacje diagnostyczne	354
		19.11.3. Genomika i mikromacierze	355
		19.12. Badanie zgodności tkankowej	356

19.1. Wprowadzenie

Klasyfikacja badań laboratoryjnych może opierać się na ich znaczeniu dla opieki nad pacjentem. Niektóre badania mają **zasadnicze** znaczenie dla diagnostyki lub monitorowania, inne są **użyteczne** z punktu widzenia klasyfikacji chorób lub zaburzeń o różnych powikłaniach i wynikach leczenia, jeszcze inne są obecnie przedmiotem zainteresowań naukowych, ale w przyszłości mogą stać się źródłem dodatkowych informacji. Badania są niestety **bezużyteczne**, gdy zleca się je w niewłaściwych okolicznościach. Dotyczy to szczególnie bezkrytycznie wystawianych zleceń na badania przesiewowe w kierunku obecności autoprzeciwciał. Najlepiej opisał to ponad 50 lat temu dr Richard Asher¹ (patrz ramka 19.1).

Badania/testy laboratoryjne różnią się czułością i swoistością (ryc. 19.1). Dla uzyskania optymalnych wyników w każdym badaniu ustalana jest wartość punktu odcięcia, tj. taka, powyżej której wyniki uważa się za dodatnie, przy której żaden chory nie ma wyniku ujemnego (wyniki fałszywie ujemne), a możliwie najmniejsza liczba osób niechorujących ma wynik dodatni (fałszywie dodatni). **Czułość** badania wyznacza odsetek osób chorych, u których uzyskano wynik dodatni. Wynik ujemny właściwego badania o bardzo wysokiej czułości

można wykorzystać do wykluczenia choroby. Wyniki badań powinny być ujemne zarówno u osób zdrowych, jak i u osób cierpiących na inne, podobne choroby. **Swoistość badania** wyznacza odsetek osób niechorujących na daną chorobę, u których wynik badania jest ujemny. Wynik badania jest dodatni tylko u osób chorujących na daną chorobę, a badania o wysokiej swoistości – takie jak badania

Ramka 19.1. Dlaczego klinicysta zleca badanie?

- Zlecam badanie, ponieważ będę wierzył w wynik, jeśli będzie on zgodny z moim poglądem, a nie będę wierzył, jeśli nie będzie zgodny
- Nie rozumiem tego badania i nie mam pewności, jakie są wartości prawidłowe, ale zlecenie tego badania jest modne
- Gdy szef pyta, czy zrobiłem to lub inne badanie, lubię odpowiadać twierdząco. Dlatego zlecam możliwie dużo badań, aby uniknąć „zagięcia”
- Nie mam jednoznacznego pomysłu na poszukiwania, ale jako niepoprawny optymista mam niejasne przecucie, że coś się uda znaleźć
- Zlecam to badanie, ponieważ chcę przekonać pacjenta, że nie dzieje się nic złego, a nie sądzę, by mi uwierzył bez wyniku tego badania.

Asher R. Straight and crooked thinking in medicine. Br Med. J ii, 1954, 460-2.

¹ Dr Richard Asher jest autorem opisu zespołu Münchhausena (przyp. tłum.).

$$\text{Czułość} = \frac{\text{Liczba wyników prawdziwie dodatnich}}{\text{Liczba wyników prawdziwie dodatnich} + \text{Liczba wyników fałszywie ujemnych}} \times 100$$

$$\text{Specyficzność} = \frac{\text{Liczba wyników prawdziwie ujemnych}}{\text{Liczba wyników prawdziwie ujemnych} + \text{Liczba wyników fałszywie dodatnich}} \times 100$$

Przeciwciała przeciwjądrowe i (SLE)

Liczba przebadanych surowic	372
Wyniki prawdziwie dodatnie	90
Wyniki prawdziwie ujemne	220
Wyniki fałszywie dodatnie	60
Wyniki fałszywie ujemne	2

$$\begin{aligned} \text{Czułość dla SLE} \\ &= \frac{90}{90 + 2} \times 100 \\ &= \mathbf{98\%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Swoistość dla tocznia układowego} \\ &= \frac{220}{220 + 60} \times 100 \\ &= \mathbf{79\%} \end{aligned}$$

AMA i pierwotna marskość żółciowa wątroby

Liczba surowic przebadanych	177
Wyniki prawdziwie dodatnie	90
Wyniki prawdziwie ujemne	80
Wyniki fałszywie dodatnie	1
Wyniki fałszywie ujemne	6

$$\begin{aligned} \text{Czułość dla pierwotnej marskości żółciowej} \\ &= \frac{90}{90 + 6} \times 100 \\ &= \mathbf{94\%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Swoistość dla pierwotnej marskości żółciowej} \\ &= \frac{80}{80 + 1} \times 100 \\ &= \mathbf{99\%} \end{aligned}$$

Ryc. 19.1. Zależność czułości i swoistości testów na przykładzie badania przeciwciał przeciwjądrowych w toczniu rumieniowatym układowym (SLE) i przeciwciał przeciwmitochondrialnych (AMA) w pierwotnej marskości żółciowej.

przeciwciał przeciwmitochondrialnych (AMA) – są wykorzystywane do potwierdzenia rozpoznania klinicznego (ryc. 19.1).

Spośród badań opisanych w niniejszym rozdziale niektóre mają charakter ilościowy, a inne – jakościowy. Testy ilościowe zazwyczaj dają dokładny wynik. Badania te można najczęściej zautomatyzować, a dostępne w skali międzynarodowej preparaty wzorcowe umożliwiają standaryzację wyników. Testy jakościowe dostarczają odpowiedzi typu wynik prawidłowy/nieprawidłowy albo dodatni/ujemny. Do wykonania takich badań może być konieczne znaczne doświadczenie techniczne, a interpretacja wyników bywa subiektywna.

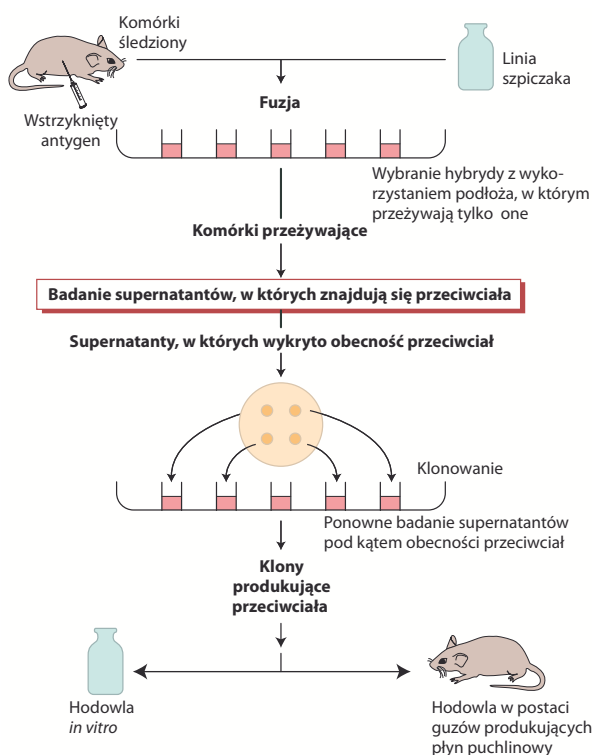
Wszystkie laboratoria dążą do zapewnienia jakości i dokładności wyników. **Kontrolę jakości** można osiągnąć poprzez udział w wewnętrznych oraz zewnętrznych programach kontroli, organizowanych na poziomie regionalnym, krajowym lub międzynarodowym.

19.2. Surowice poliklonalne i przeciwciała monoklonalne wykorzystywane w laboratoriach immunologii klinicznej

Surowice wykorzystywane w badaniach laboratoryjnych zazwyczaj są wytwarzane przez zwierzęta, którym wstrzyknięto odpowiedni antygen, na co odpowiadają produkcją **przeciwciał poliklonalnych**. Oznacza to, że powstała surowica zawiera mieszaninę przeciwciał wytwarzanych przez różne klony limfocytów B. Wszystkie przeciwciała reagują z od-

powiednim antygenem, ale poszczególne cząsteczki mają różny region zmienny.

Inaczej jest w przypadku **przeciwciał monoklonalnych**, które są produktem pojedynczej komórki oraz jej komórek potomnych i które mają identyczny zarówno region zmienny, jak i stały. Reagują one tylko z jedną determinantą (epitopem) danego antygeny. Zawiesiny komórek izolowanych ze śledziony immunizowanych myszy zawierają liczne limfocyty B zdolne do sekrecji, pochodzące z różnych klonów



Ryc. 19.2. Zasada produkcji przeciwciał monoklonalnych.

i rozpoznających odmienne epitopy. Takie limfocyty B są poddawane fuzji z niezdolnymi do sekrecji komórkami linii szpiczaka, wskutek czego powstają hybrydy posiadające zdolność produkcji przeciwciał właściwą dla macierzystej komórki B i cechę nieśmiertelności właściwą dla nowotworowo zmienionej komórki plazmatycznej. Komórki hybrydy są poddawane selekcji i klonowaniu (ryc. 19.2). Hodowle na wielką skalę mogą dostarczyć znacznych ilości czystych przeciwciał, o ściśle określonej reaktywności.

19.3. Pomiar immunoglobulin i innych swoistych białek

Pomiary stężenia immunoglobulin w surowicy mają zasadnicze znaczenie dla diagnostyki pacjentów z nawracającymi lub ciężkimi zakażeniami oraz pacjentów ze szpiczakiem i niektórymi innymi zaburzeniami limfoproliferacyjnymi. Badania te są czasem użyteczne w diagnostyce różnicowej stanów przebiegających z hipergammaglobulinemią (tab. 19.1).

Klasyczne techniki badania obejmują wytwarzanie kompleksu immunologicznego. W niskich stężeniach kompleksy te pozostają w zawiesinie w postaci drobnych cząsteczek zdolnych do rozproszenia wiązki światła, które można mierzyć za pomocą takich urządzeń, jak analizator odśrodkowy, w którym ultrawiwrowanie przyspiesza tworzenie kompleksów. W stałych stężeniach przeciwciał rozproszenie światła jest proporcjonalne do stężenia antygeny. Metoda ta jest szybka i nadaje się do automatyzacji, a precyzyjne wyniki można uzyskać w ciągu 1-2 godzin od pobrania krwi.

Do badania niektórych białek mogą być niedostępne odczynniki nadające się do wykorzystania w metodach zautomatyzowanych. W takiej sytuacji laboratorium może wykorzystać technikę immu-

nodyfuzji radialnej (RID) opisaną przez Manciniego. Zarówno RID, jak i analiza odśrodkowa, mogą zostać wykorzystane do pomiaru stężeń różnych białek obecnych w surowicy, płynie owodniowym, płynie mózgowo-rdzeniowym, ślinie i soku żołądkowym. Do białek tych należą różne składniki odpowiadzi immunologicznej, białka ostrej fazy, białka transportowe, białka układu krzepnięcia oraz tzw. „markery nowotworowe”. Wykorzystuje się standardowe preparaty wzorcowane wobec międzynarodowych standardów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Każde laboratorium szpitalne dla każdego białka określa własne zakresy wartości referencyjnych, różniące się między sobą w zależności od metody i wykorzystanej surowicy oraz pochodzenia etnicznego badanych pacjentów. Większość białek ma również zakresy wartości referencyjnych różne dla poszczególnych grup wiekowych, szczególnie dla dzieci, ale zazwyczaj 95% populacji osób zdrowych ma wyniki mieszczące się w tym zakresie.

19.4. Jakościowe badanie immunoglobulin

19.4.1. Surowica

W ilościowym oznaczaniu immunoglobulin w surowicach dorosłych pacjentów zasadnicze znaczenie ma wykonanie przesiewowych **badania elektroforetycznych** w kierunku obecności paraprotein (prążków monoklonalnych). W zbiorniku aparatu do elektroforezy rozkładana jest mokra membrana lub żel, a fazę ciągłą stanowią paski bibuły filtracyjnej. Próbkę surowicy są nanoszone na powierzchnię membrany lub błony od strony katody, a następnie poddawane działaniu prądu przez 45 minut (elektroforeza). Po zakończeniu elektroforezy prążki białka są uwidaczniane za pomocą odpowiedniego barwnika (ryc. 19.3). Dla porównania i kontroli jakości zawsze wykonywane równolegle jest badanie z surowicą prawidłową.

Dyskretne prążki monoklonalne (M), które mogą pojawić się w dowolnym miejscu paska, muszą zostać poddane dalszym badaniom. Przyczyną pojawienia się prążków fałszywie dodatnich, niespowodowanych obecnością immunoglobulin, może być hemoglobina (w próbce zhemolizowanej), fibrynogen (w próbce pochodzącej z osocza lub niedokładnie skrzepniętej) albo zagregowana IgG (w próbce przechowywanej przez jakiś czas). Dlatego ważne jest przesyłanie na to badanie świeżo skrzepniętej próbki krwi.

Charakter znalezionej w elektroforezie prążka M należy określić za pomocą immunofiksacji. Szereg próbek badanej surowicy poddawanych jest najpierw elektroforezie w żelu agarowym (ryc. 19.4). Następnie antysurowice swoiste dla IgG, IgA, IgM, łańcuchów κ lub λ są nakładane na próbki po elek-

Tabela 19.1. Przykłady poliklonalnego wzrostu stężeń immunoglobulin*

Immunoglobulina	Przykład
IgM	Pierwotna marskość żółciowa
IgA	Alkoholowa choroba wątroby
IgG	Pierwotny zespół Sjögrena Zakażenie HIV Toczeń rumieniowaty układowy
Mieszane izotypy	Gruźlica Marskość wątroby Przewlekłe zakażenia bakteryjne/ropnie utajone

*Lecz niewystarczająco swoiste do osiągnięcia wartości diagnostycznej u poszczególnych pacjentów.