

Obsah

1	Imunoprecipitační reakce - stanovení C1 inhibitoru, CRP	10
1.1	Princip metod	10
1.1.1	Jednoduchá radiální imunodifuze - JRID	10
1.1.2	Dvojitá (protisměrná) imunodifuze	12
1.1.3	Precipitace v tekutém prostředí (nefelometrie, turbidimetrie).....	13
1.2	Příklad: Stanovení CRP imunoprecipitací v tekutém prostředí pomocí nefelometrie.....	15
1.2.1	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření CRP.....	15
1.2.2	Postup stanovení CRP na přístroji BNII.....	16
1.2.3	Vyhodnocení výsledků stanovení CRP	16
1.2.4	Referenční a varovná rozmezí CRP	16
1.2.5	Kazuistika CRP	16
1.3	Stanovení koncentrace C1 inhibitoru metodou jednoduché radiální imunodifuze.....	17
1.3.1	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření C1 inhibitoru.....	17
1.3.2	Postup stanovení C1 inhibitoru jednoduchou radiální imunodifuzí	17
1.3.3	Vyhodnocení výsledků stanovení C1 inhibitoru	17
1.3.4	Referenční hodnoty	18
1.3.5	Kazuistika.....	18
1.4	Seznam literatury.....	18
2	Stanovení autoprotilátek.....	19
2.1	Princip metody	19
2.1.1	Princip stanovení autoprotilátek pomocí nepřímé imunofluorescence.....	19
2.1.2	Princip stanovení autoprotilátek pomocí ELISA.....	20
2.2	Stanovení ANA nepřímou imunofluorescencí	21
2.2.1	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření ANA (platné i pro anti-ENA)	24
2.2.2	Postup stanovení ANA protilátek.....	24
2.2.3	Vyhodnocení výsledků stanovení ANA	25
2.2.4	Interpretace výsledků	25
2.2.5	Referenční a varovná rozmezí ANA	31
2.2.6	Kazuistika ANA	32
2.2.7	Seznam literatury.....	33
2.3	Stanovení anti-ENA pomocí ELISA	33

2.3.1	Postup stanovení Anti-ENA soupravou ENA-6-Profile.....	34
2.3.2	Vyhodnocení výsledků stanovení anti-ENA	35
2.3.3	Interpretace výsledků	35
2.3.4	Referenční a varovná rozmezí.....	36
2.3.5	Kazuistika anti-ENA	36
2.3.6	Seznam literatury.....	37
3	FEIA metody - stanovení alergen specifických IgE metodou FEIA - CAP systém.....	38
3.1	Princip metody FEIA-CAP	38
3.2	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření	40
3.3	Postup stanovení specifického IgE pomocí FEIA PhadiaCAP	40
3.4	Vyhodnocení alergen specifického IgE.....	40
3.5	Interpretace výsledků	41
3.6	Referenční a varovná rozmezí vyšetření na PhadiaCAP.....	42
3.7	Kazuistika.....	42
3.8	Seznam literatury.....	42
4	Stanovení cirkulujících imunokomplexů (CIK)	44
4.1	Princip metody	44
4.1.1	Precipitace CIK pomocí PEG.....	44
4.1.2	Vazba CIK na C1q složku komplementu	45
4.2	Stanovení CIK pomocí precipitace PEG	45
4.2.1	Charakteristika a odběr vzorku pro stanovení CIK	45
4.2.2	Postup stanovení CIK precipitací PEG.....	46
4.2.3	Postup stanovení CIK pomocí ELISA (vazbou na C1q).....	46
4.3	Vyhodnocení	47
4.4	Interpretace výsledků	47
4.4.1	Průkaz CIK pomocí PEG	47
4.4.2	Průkaz CIK vazbou na C1q.....	47
4.5	Referenční a varovná rozmezí.....	48
4.5.1	Při průkazu CIK pomocí PEG	48
4.5.2	Při průkazu CIK vazbou na C1q.....	48
4.5.3	Kazuistika.....	48
4.6	Seznam literatury.....	49

5	Stanovení aktivity lysozymu	50
5.1	Princip stanovení aktivity lysozymu	50
5.2	Charakteristika a odběr vzorku pro stanovení aktivity lysozymu	51
5.3	Postup stanovení aktivity lysozymu	51
5.4	Vyhodnocení	52
5.5	Referenční a varovná rozmezí	52
5.6	Kazuistika	53
5.7	Seznam literatury	53
6	Vyšetření fagocytů periferní krve - fagocytóza MSHP, chemotaxe pod agarosou, burst test... 54	
6.1	Přehled imunodeficiencí, u nichž jsou významným faktorem poruchy fagocytární funkce 59	
6.2	Princip testů fagocytární funkce	60
6.2.1	Stanovení fagocytární aktivity	60
6.2.2	Testy mikrobicidie	60
6.2.3	Testy chemotaxe	60
6.2.4	Stanovení respiračního vzplanutí fagocytů po stimulaci in vitro	60
6.2.5	Stanovení respiračního vzplanutí pomocí NBT nebo INT testu	61
6.2.6	Stanovení tvorby radikálů kyslíku chemiluminiscenčním testem	61
6.2.7	Burst test - stanovení respiračního vzplanutí oxidací dihydrorhodaminu R123	61
6.3	Postup stanovení fagocytární aktivity pomocí MSHP	62
6.3.1	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření fagocytární aktivity pomocí MSHP	62
6.3.2	Povedení metody stanovení fagocytární aktivity pomocí MSHP	62
6.3.3	Vyhodnocení fagocytární aktivity pomocí MSHP	63
6.3.4	Interpretace výsledků stanovení fagocytární aktivity	65
6.3.5	Referenční hodnoty pro fagocytózu MSHP	66
6.3.6	Možné problémy	66
6.4	Postup testování chemotaktických schopností granulocytů migrací pod agarosou	66
6.4.1	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření chemotaxe	66
6.4.2	Provedení metody stanovení chemotaxe granulocytů pod agarosou	66
6.4.3	Vyhodnocení chemotaxe granulocytů pod agarosou	69
6.4.4	Interpretace výsledků stanovení chemotaxe	70
6.4.5	Referenční hodnoty pro chemotaxi pod agarosou	70

6.4.6	Možné problémy při stanovení chemotaxe.....	71
6.5	Provedení burst testu měřením oxidace dihydrorhodaminu R123	71
6.5.1	Charakteristika a odběr vzorku k burst testu	71
6.5.2	Povedení burst testu.....	71
6.5.3	Vyhodnocení burst testu.....	72
6.5.4	Interpretace výsledků burst testu.....	73
6.5.5	Referenční hodnoty pro burst test.....	75
6.5.6	Možné problémy při provedení burst testu.....	75
6.6	Kazuistika stanovení fagocytární aktivity pomocí ingesce MSHP	76
6.7	Seznam literatury.....	76
7	Průtoková cytometrie - stanovení subpopulací lymfocytů	77
7.1	Princip barvení leukocytů a jejich analýzy pomocí průtokové cytometrie.....	83
7.1.1	Barvení lymfocytů následované lýzou erytrocytů	84
7.1.2	Lýza erytrocytů následovaná barvením lymfocytů	85
7.1.3	Separace PBMC gradientní centrifugací následovaná barvením lymfocytů	85
7.1.4	Imunoafinitní separace subpopulace leukocytů následovaná barvením.....	86
7.2	Provedení metody stanovení subpopulací lymfocytů pomocí průtokové cytometrie.....	89
7.2.1	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření subpopulací lymfocytů	89
7.2.2	Separace PBMC a granulocytů pomocí dvou gradientů hustot 1077 a 1119	90
7.2.3	Izolace B lymfocytů negativní selekcí na paramagnetických kuličkách	90
7.2.4	Barvení buněk a analýza na průtokovém cytometru	91
7.3	Vyhodnocení	92
7.4	Interpretace výsledků	94
7.4.1	Příčiny snížení zastoupení CD3 ⁺ , CD19 ⁺ , CD16 ⁺ /56 ⁺ (všech lymfocytů).....	95
7.4.2	Příčiny snížení zastoupení CD19 ⁺ (B lymfocytů)	95
7.4.3	Příčiny zvýšení zastoupení CD19 ⁺ (B lymfocytů).....	96
7.4.4	Příčiny snížení zastoupení CD3 ⁺ (T lymfocytů).....	96
7.4.5	Příčiny zvýšení zastoupení CD3 ⁺ (T lymfocytů).....	96
7.4.6	Snížení zastoupení CD3 ⁺ CD4 ⁺ (Th lymfocytů).....	97
7.4.7	Snížení zastoupení CD3 ⁺ CD8 ⁺ (Tc lymfocytů).....	97
7.4.8	Zvýšení zastoupení CD3 ⁺ CD8 ⁺ (Tc lymfocytů).....	97
7.4.9	Snížení zastoupení CD16 ⁺ /CD56 ⁺ (NK buněk).....	98

7.5	Referenční a varovná rozmezí.....	98
7.6	Kazuistiky.....	98
7.6.1	CD8 deficiencie (<i>TAP2</i> mutace).....	98
7.6.2	NK deficiencie.....	99
7.7	Možné problémy.....	99
7.8	Seznam literatury.....	99
8	ELISPOT metody - stanovení produkce IFN- γ stimulovanými lymfocyty.....	100
8.1	Princip metody	100
8.2	Provedení ELISPOT stanovení produkce IFN- γ stimulovanými lymfocyty.....	103
8.2.1	Charakteristika a odběr vzorku k vyšetření ELISPOT	103
8.2.2	Postup izolace mononukleárních buněk pomocí Ficoll-Paque gradientu.....	103
8.2.3	Počítání buněk v Bürkerově komůrce	104
8.2.4	Postup provedení ELISPOT pro stanovení produkce lidského IFN- γ	105
8.3	Vyhodnocení	105
8.4	Kontrola kvality.....	106
8.5	Kazuistika.....	107
8.6	Možné problémy.....	107
8.7	Seznam literatury.....	107
9	Seznam zkratk	109