

Jan Żeromski

Postępy immunodiagnostyki

Studia Ecologiae et Bioethicae 8/2, 330-334

2010

Artykuł został opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

Prof. Jan ŻEROMSKI

(Katedra Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu)

Postępy immunodiagnostyki

Immunologia, nauka o odporności jest interdyscyplinarną dziedziną wiedzy biologicznej. Jest ściśle związana z medycyną, gdyż niemal w każdej specjalności medycznej występują zjawiska o podłożu immunologicznym. Jest nauką bardzo prężną o dużym potencjale rozwojowym, o czym świadczy lista ok. 20 laureatów nagrody Nobla za osiągnięcia związane z immunologią. Nauka ta wypracowała szereg nowych technik badawczych, które znalazły zastosowanie w praktyce, a zwłaszcza w diagnostyce medycznej. Takie metody jak oznaczanie aktywności dopełniacza, ocena ilościowa immunoglobulin czy wykrywanie autoprzeciwciał, stały się rutynowymi w większości laboratoriów usługowo-diagnostycznych. W międzyczasie wraz z rozwojem medycyny powstały nowe wymagania i potrzeby immunodiagnostyki. Zaczęła się liczyć szybkość wykrycia choroby, kontaktu z chorym, a także czynnika sprawczego. W przypadku nabytego niedoboru odporności (AIDS) zarażony, a nierozpoznany i nie leczony chory nie tylko sam pogłębia swój proces chorobowy, ale nieświadomie zakaża innych. Testy immunoenzymatyczne wykrywania przeciwciał przeciw glikoproteinom otoczki wirusa (gp120, gp41) składają się z kilku etapów postępowania (testy przesiewowe, jeżeli dodatkowo – testy potwierdzenia) są czasochłonne, niekiedy wymagają powtórzeń. Badanie molekularne wykrywania RNA wirusa jest kosztowne i dostępne w nielicznych placówkach. Stąd wzięła się potrzeba opracowania testów szybkich, możliwych do wykonania w warunkach polowych bez stosowania specjalnej aparatury. Obecnie wiele firm oferuje tzw. testy paskowe pozwalające na wykrycie zakażenia w ciągu kilkunastu minut. Ich wadą jest jednak stosunkowo wysoki odsetek odczynów fałszywie ujemnych, bo ok. 19%.

Kolejnym wymogiem nowoczesnej diagnostyki jest unikanie metod inwazyjnych, polegających na pobieraniu materiału diagnostycznego od pacjenta na drodze biopsji narządowych. Znacznie łatwiej jest uzyskać do badania płyny ustrojowe, jak krew, mocz, czy nawet płyn mózgowo-rdzeniowy, a także wymazy z błon śluzowych. Ocena takiego materiału biologicznego przy użyciu nowoczesnych metod immunologicznych, jak immunofluorescencja (Imf), czy testy immunoenzymatyczne (ELISA) daje znacznie bardziej precyzyjne wyniki niż metody tradycyjne. Metoda Imf, wykorzystująca przeciwciała znakowane barwnikami fluorescencyjnymi (fluorochromami), pozwala wykryć pojedyncze komórki nowotworowe lub zakażone danym patogenem. Metodą ELISA można wykazać obecność infekcji, np. wirusem cytomegalii już w kilku kroplach badanego płynu.

Dużym postępowaniem w immunologii było opracowanie przez C. Milsteina i G. Kohlera technologii otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała te mają bardzo wysoką swoistość, skierowane są bowiem przeciwko jednej determinancie antygenowej (epitopowi) danego białka i mogą być uzyskiwane metodami przemysłowymi w dowolnych ilościach. Coraz więcej przeciwciał stosuje się obecnie w terapii różnych chorób, zwłaszcza nowotworowych i autoimmunizacyjnych. Taka immunoterapia musi być jednak monitorowana, gdyż niesie potencjalne ryzyko różnych objawów ubocznych niekorzystnych dla pacjenta a nawet zagrażających jego życiu. Monitorowanie dokonuje się przy użyciu metod immunodiagnostycznych. Podobnie chorzy nowotwór poddani chemioterapii wymagają monitorowania stanu układu immunologicznego, gdyż większość cytostatyków działa depresyjnie na ten układ. Spadek kluczowych parametrów tego układu, jak główne subpopulacje limfocytów T i B, stężenia immunoglobulin w surowicy i inne, wymaga niezwłocznego wstrzymania chemioterapii.

W nowotworach złośliwych a zwłaszcza w chłoniakach nieziarniczych będących właściwie nowotworami układu odpornościowego, dochodzi zwykle do klonalnego rozrostu jednej subpopulacji komórek. Przy pomocy immunodiagnostyki możemy określić tę subpopulację i następnie użyć przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw danemu epitopowi tych komórek. Taka immunoterapia jest już dziś stosowana w coraz większej liczbie nowotworów, przykładem może tu być chłoniak z komórek B, w którego leczeniu stosuje się przeciwciała anty-CD20. Taka immunoterapia wymaga również monitorowania metodami immunodiagnostycznymi.

Jednym z ważnych powodów rozwoju immunodiagnostyki jest wzrastająca liczba nabytych niedoborów odporności. Dotyczy to ludzi w różnym wieku, ale dominują młodzi, częściej kobiety. Objawy chorobowe dotyczą zwykle często powtarzających się infekcji górnych dróg oddechowych, takich jak angina, zapalenia zatok bocznych nosa, zapalenia oskrzeli. Immunodiagnostyka tych stanów jest trudna i często wymaga wykonania szeregu testów dla wykrycia przyczyny. Może to być, np. niedobór jednej podklasy immunoglobuliny, czy też upośledzenie czynności bójczych granulocytów, w tym ostatnim przypadku wymagające dla wykrycia testów czynnościowych.

Nowe potrzeby i wymogi zmieniły w istotny sposób technologię immunodiagnostyki. O przeciwciałach monoklonalnych była już mowa. Istnieje jednak wiele możliwości modyfikacji tych przeciwciał, jak wiązanie z różnymi znacznikami, jak fluorochromy, enzymy i inne. Można łączyć przeciwciała o różnej swoistości, tworząc kompleksy biklonalne dla wykrywania dwóch różnych epitopów. Można także usunąć fragment Fc epitopów immunoglobuliny pozostawiając tylko fragmenty Fab, co zapobiega nieswoistemu wiązaniu przez komórki mające receptor dla fragmentu Fc, jak monocyty, makrofagi i inne. Tak zmodyfikowane przeciwciała znalazły zastosowanie w diagnostyce cytologicznej i immunohistochemicznej, immunofluorescencyjnej, itp.

Coraz rzadziej używa się w diagnostyce antygenów natywnych, tzn. izolowanych z substratów biologicznych. Zastępują je antygeny rekombinowane, uzyskiwane metodami inżynierii genetycznej. Zapewniają one większą powtarzalność wyników i są bardziej stabilne. Mają dokładnie określoną strukturę, co pozwala lepiej ocenić odpowiedź immunologiczną pod względem jakości, siły wiązania, itp.

Dostępność antygenów rekombinowanych umożliwiła wprowadzenie tzw. biochipów białkowych. Są to zestawy wielu antygenów lub alergenów umieszczone na stałym podłożu, np. na pasku bibuły czy plastyku, pozwalające w jednym badaniu znaleźć czynnik przyczyny choroby. Dzięki możliwości znakowania białek przy użyciu fluorochromów czy enzymów stała się możliwa eliminacja izotopów promieniotwórczych z laboratoriów immunodiagnostycznych. Obecnie niemal wszystkie laboratoria tego typu na świecie nie stosują izotopów w badaniach rutynowych.

Coraz więcej badań wykonuje się obecnie przy użyciu gotowych zestawów immunodiagnostycznych, w których znajduje się wszystko, co jest potrzebne do wykonania testu, włącznie ze szczegółowym opisem. Powoduje to, że wiele testów może być wykonywanych w laboratoriach o ogólnym profilu diagnostycznym przez personel nie znający podstaw immunologii, co nie zawsze daje wiarygodne wyniki.

Przełomem w immunodiagnostyce było wprowadzenie i upowszechnienie cyto(fluoro)metrii przepływowej (CP). Jest to metoda, w której przepuszcza się izolowane żywe komórki wyznakowane fluorochromami przez aparat zwany cytometrem przepływowym. W przyrządzie tym pod wpływem światła lasera komórki emitują promieniowanie w różnych kolorach fluorescencji w czasie przebywania skomplikowanej drogi. Emisja promieniowania każdej komórki jest zapisana w pamięci komputera. Przed akwizycją do aparatu komórki poddaje się reakcji z przeciwciałami monoklonalnymi znakowanymi fluorochromem, czyli bezpośredniej reakcji immunofluorescencji. Akwizycja dotyczy 10^4 do 10^6 komórek, co pozwala uzyskać obiektywne dane ilościowe. Dzięki temu można wykryć obecność antygenów na powierzchni a także w cytoplazmie komórki. Stało się możliwe szczegółowe określanie tzw. immunofenotypu czyli zestawu antygenów różnicowania obecnych na danym typie komórek. Ma to szczególne znaczenie w przypadku komórek białaczek i innych rozrostów nowotworowych układu krwiotwórczego. Dzięki fluorochromom emitującym różne kolory fluorescencji można dzisiaj w jednym badaniu określić kilkanaście różnych antygenów na jednej komórce. Ponadto CP pozwala nie tylko otrzymać wynik ilościowy w formie odsetka komórek dodatnich, tzn. mających dany antygen, ale także ocenić gęstość danego antygeny na powierzchni komórki, czyli tzw. średnią intensywność fluorescencji (MFI – mean fluorescence intensity).

CP znalazła liczne zastosowania diagnostyczne w różnych specjalnościach medycznych. Stała się metodą niemal podstawową w diagnostyce chłoniaków

i innych rozrostów układu krwiotwórczego. W przebiegu leczenia p. nowotworowego CP pozwala monitorować efekty terapii. Po uzyskaniu remisji choroby stosuje się CP dla określenia tzw. choroby resztkowej, tzn. liczby komórek nowotworowych, które nie uległy eliminacji w wyniku terapii. Dostępne są także metody oparte na CP, pozwalające ocenić ilościowo stan czynnościowy komórek jak szybkość proliferacji, cytotoksyczność, migrację czy fagocytozę.

Immunodiagnostyka IgDg w różnych działach medycyny

1. Choroby zakaźne

- HIV/AIDS: ImDg jest podstawową metodą diagnostyczną a oznaczanie komórek T CD4+ stanowi 'złoty standard' monitorowania przebiegu klinicznego choroby.
- Przewlekłe wirusowe zapalenia wątroby typu B i C – ImDg pozwala określić miana przeciwciał przeciw antygenom wirusów (HBeAg, HbsAg w B; anty HCV w C).
- Borelioza – stwierdzenie przeciwciał w klasie IgM świadczy o zakażeniu, a w klasie IgG o infekcji dawnej w stanie przewlekłym.
- Cytomegalia – interpretacja j.w.

2. Choroby autoimmunizacyjne

W wielu chorobach tego typu znana jest nie tylko obecność i klasa przeciwciał, ale także autoantygen, związki pomiędzy występowaniem przeciwciał z postępowaniem choroby.

- Dla przykładu w cukrzycy typu I (insulino-zależnej) przeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (anty GAD) i przeciwko antygenom wysepek Langerhansa potwierdzają rozpoznanie.
- W ziarniniaku Wegenera miano autoprzeciwciała typu ANCA (przeciw cytoplazmie granulocytów, faktycznie przeciwko proteinazie 3 w ziarnistościach tych komórek) wykazuje dobrą korelację z przebiegiem choroby.
- W reumatoidalnym zapaleniu stawów przeciwciała przeciw peptydowi związanemu z cykliczną cytruliną (anti Cyclic Citrullinated Peptide – a CCP) okazały się wysoce swoiste i wykrywalne we wczesnym stadium choroby.
- W autoimmunizacyjnych chorobach tarczycy (choroba Gravesa, wole Hashimoto) rozpoznanie oparte jest na immunodiagnostyce autoprzeciwciał (przeciwko peroksydazie tarczycowej i tyreoglobulinie).

3. Choroby alergiczne

- ImDg oparta jest na wykrywaniu przeciwciał klasy IgE wobec dobrze określonych antygenów *in vivo* (testy skórne) lub *in vitro* (testy paskowe z nałożonymi alergenami na podłoże stałe, np. na bibułę).

4. Patomorfologia

Diagnostyka wielu chorób zwłaszcza pochodzenia nowotworowego bazuje obecnie w dużej mierze na wykrywaniu antygenów w komórkach lub w przestrzeniach pozakomórkowych w skrawkach tkankowych przy użyciu przeciwciał i immunohistochemii/immunofluorescencji. Obie metody mogą wykrywać jednocześnie kilka różnych swoistości antygenowych dzięki odmiennym kolorom reakcji.

Podsumowanie

Postępy immunodiagnostyki są pochodną rozwoju immunologii, biochemii i w coraz większym stopniu zależą od nowych technologii powiązanych z przemysłem. Coraz więcej badań immunodiagnostycznych realizowanych jest w dużych zautomatyzowanych zestawach typu „kombajn”, sterowanych przez komputer. Proces ten jest jednak hamowany przez trudności interpretacyjne i wymogi związane z oceną funkcji żywych komórek.



Dalia