

1 Metody stanovení protilátek

Stanovení protilátek patří bezesporu mezi základní imunologická vyšetření. Rozlišujeme stanovení **kvantitativní, kvalitativní a stanovení specifických protilátek**. Při kvantitativním stanovení určujeme koncentraci celkových protilátek nebo koncentraci určitého izotypu. Kvalitativní stanovení zohledňuje druh izotypu, tedy třídu resp. podtřídu protilátek. Stanovení protilátek podle jejich specifity vůči určitému antigenu je vlastně podmožina kvalitativního stanovení, můžeme ovšem stanovit i koncentrace těchto specifických protilátek.

Protilátky se nejčastěji stanovují v séru, lze je ale stanovit v celé řadě dalších tělních tekutin např. v plazmě, moči, mozkomíšním moku, výpotcích apod.

Stanovení protilátek se dnes nejčastěji provádí nefelometricky nebo turbidimetricky. Lze také použít stanovení radiální difúzí. Specifické protilátky se nejčastěji stanovují ELISA nebo RIA metodou. Z dalších metodik používaných ke stanovení protilátek lze jmenovat:

- aglutinační metody, které jsou rychlé a nenáročné, nicméně jsou málo citlivé a obtížně reprodukovatelné. Používají se při stanovení krevních skupin a při stanovení protiinfekčních protilátek. Viz aglutinační metody.

- nepřímá imunofluorescence je metoda náročná na vybavení, profesní zkušenost i finance. Používá se v omezeném spektru indikací, kdy stanovujeme specifické protilátky proti antigenům, jež jsou součástí buněk např. antinukleární protilátky nebo protilátky proti cytoplazmě neutrofilů při autoimunitních onemocněních, nebo protilátky proti určitým patogenům (borrelie, treponemy), které se detekují přímo v lidských buňkách resp. tkáních. Základní princip spočívá v detekci protilátek specifickým antigenem, což je vlastně protilátka proti této protilátce navíc fluorescenčně značená. Imunofluorescence může být v uspořádání tzv. přímém nebo nepřímém. Vždy je k hodnocení potřeba fluorescenční mikroskop, což činí metodu velmi finančně nákladnou. Problémem je také subjektivní chyba hodnocení.

- princip RIA metod spočívá v označení protilátky radioaktivním izotopem, její vazba na antigen a následná detekce záření ve vzorku. Radioizotopové metody RIA byly velice oblíbené v 80. – 90. letech minulého století, nyní jsou nahrazovány zejména ELISA metodami a imunofluorescenčními metodami. Práce s izotopy vyžaduje speciální přístrojové vybavení, laboratoř se vzduchotechnikou a hygienickými smyčkami, pravidelně školený personál pod zdravotní kontrolou, specifické odpadové hospodářství apod.

- westernblot je metoda používaná v poslední době při průkazu specifických protilátek např. proti jednotlivým povrchovým antigenům nebo některým nukleárním antigenům. Metoda je pracná, časově náročná, je nutné realizovat několik dílčích kroků: elektroforetické rozdělení bílkovin, přenos na membránu a následnou vizualizaci protilátek reakcí s příslušnými antigeny.

V souboru imunologických metod bývá někdy samostatně vyčleňována skupina tzv. **SÉROLOGICKÝCH METOD**. Tímto pojmem se rozumí všechna stanovení protilátek v krevním séru. V širším slova smyslu zahrnuje také stanovení protilátek i v jiných tělních tekutinách, např. mozkomíšním moku. Sérologický průkaz protilátek se provádí u infekčních chorob, kdy přímý průkaz původce onemocnění je obtížný nebo nákladný. Hlavním sledovaným kritériem je přítomnost specifických protilátek. Jejich absolutní hodnota v běžných klinických testech není tolik významná, častěji se hodnotí dynamika tvorby těchto protilátek. Pro tento účel je nutné hodnotit vzorky na počátku onemocnění a po léčbě, někdy i vícekrát v průběhu léčby. V počáteční fázi infekčního onemocnění stoupá hladina IgM, které mají komplement-fixační aktivitu. V pozdější fázi se tvoří IgG, které mohou dlouhodobě přetrvávat.

Přítomnost protilátek se u vizuálně odečítaných reakcí hodnotí tzv. „na 4 křížky“ např. při aglutinačních a precipitačních reakcích. Toto křížkové hodnocení spočívá ve stanovení škály, kde

100% reakce	++++
75% reakce	+++
50% reakce	++
25% reakce	+

Méně než 25% reakce není pozitivní.

Při kvantitativním stanovení vyjadřujeme množství protilátek jako tzv. **titr, což je reciproká hodnota nejvyššího ředění séra, která ještě dává pozitivní reakci**. Např. titer 50 znamená, že sérum ředěné 1:50 dávalo ještě pozitivní reakci, více ředěné (např. 1:100) sérum už nikoli. Vychází se při tom z postupu zvaného titrace séra, což je postupné ředění séra (např. dvojkovou řadou) a jeho reakce se známým množstvím antigenů. Je to vlastně obdoba titrací používaných v analytické chemii, pouze se titrační činidlo (v našem případě sérum) nepřidává do reakce plynule, ale provádí se řada oddělených reakcí pro každé ředění zvlášť. Hodnocení množství specifických protilátek pomocí titru je všeobecně používané a dostačující. Většinou totiž nemáme k dispozici čisté specifické protilátky, které by umožnily sestavit kalibrační křivku a odečíst z ní hodnoty (např. v mg/ml) protilátek ve vyšetřovaných vzorcích.

Důležité pojmy z oblasti sérologie jsou:

- sérokonverze – zvýšení hladiny specifických protilátek, tento pojem zahrnuje dynamiku tvorby protilátek
- séropozitivita, séronegativita – přítomnost, resp. nepřítomnost specifických protilátek v séru
- sérorezistence – stav, kdy při léčbě zůstává séropozitivita bez klinických příznaků
- sérorecidiva – znovuobjevení positivity séra po přechodném vymizení specifických protilátek
- sérotyp (sérovar) – skupina původců onemocnění (obvykle podmnožina bakteriálního druhu), která se od jiných zástupců téhož bakteriálního druhu dá odlišit právě na základě sérologické reakce. Vykazuje tedy určitou antigenní specifitu v rámci druhu.

Jednotlivé sérologické metody se liší především způsobem vizualizace reakce antigenu s protilátkou. Důležitým faktorem pro volbu vhodné metody je její citlivost, finanční a přístrojové nároky a složitost provedení.

Příklady sérologických reakcí a způsobů vizualizace :

Aglutinace vizuálně hodnotitelný aglutinát

Precipitace vizuálně hodnotitelný precipitát

nefelometrické, resp. turbidimetrické hodnocení

Komplement fixační reakce hemolýza erytrocytů

Imunoelektroforéza precipitát antigenů nebo protilátek rozdělený v elektrickém poli

Stanovení IgE: vzhledem ke své nízké koncentraci v séru (viz tabulka) vyžaduje IgE jiné postupy stanovení než ostatní třídy imunoglobulinů. Nejčastěji se používá ELISA nebo RIA metoda podobně jako při stanovení specifických protilátek ostatních tříd. Množství IgE se nejčastěji vyjadřuje jako jednotky enzymové aktivity IU/ml nebo pomocí škály 0 – 6, kde 0 znamená nedetekovatelné množství IgE.

Stanovení monoklonální (patologické) komponenty:

Při podezření na monoklonální gamapatie se stanovuje množství mono-, bi- nebo oligoklonálních protilátek, které jsou produkty jednoho nebo několika málo patologicky zmnožených klonů B lymfocytů. Tyto protilátky se také někdy označují jako paraproteiny - nekompletní lehké řetězce protilátek.

K jejich stanovení se používá metodika imunoelektroforézy nebo imunofixace. Patologický paraprotein lze také stanovovat nefelometricky, kdy se použije protilátka proti lehkým řetězcům, ta vytvoří imunokomplexy s patologickými protilátkami a množství těchto imunokomplexů se stanoví.

Stanovení kryoglobulinů:

Kryoglobuliny jsou různorodá skupina atypických protilátek, které se ve větším množství objevují v organismu při patologických stavech různé etiologie (např. hematologické malignity, revmatoidní artritida, vaskulitidy, chronické zánětlivé stavy, vleklé infekce apod.). Precipitují spontánně za nižších teplot než je fyziologická teplota. Při vyšetření se musí krev odebírat za odlišných podmínek tak, aby nedošlo k jejímu ochlazení pod 37 °C. Poté se sleduje vznik kryoprecipitátu v chladu a porovnává se se situací za teploty 37 °C.

Indikace k vyšetření protilátek: vyšetření celkových protilátek je indikováno zpravidla v jiných patologických stavech než vyšetření specifických protilátek.

Celkové protilátky se stanovují při podezření na imunodeficiency, kdy očekáváme nižší hladinu (hypo- až agamaglobulinémii) a při chronických zánětech, kdy je očekávána naopak hladina vyšší – (hypergamaglobulinémie). Při autoimunitních chorobách bývají rovněž vyšší hodnoty celkových protilátek v důsledku polyklonální aktivace B lymfocytů, která je u autoimunit poměrně častá.

Fyziologické hodnoty množství protilátek v séru u člověka:

IgG	8 – 18 g/l
IgA	0,9 – 3,5 g/l
IgM	0,9 – 2,5 g/l
IgD	0,1 g/l
IgE	0,0003 g/l

Nejčastější metodou kvantitativního stanovení protilátek je dnes nefelometrie, resp. turbidimetrie. Princip obou metod je podobný. Ještě zhruba před 15 lety byla nejčastěji používanou metodou pro tento účel radiální difúze. Pro stanovení specifických protilátek se dnes nejčastěji používají ELISA metodiky.

Nefelometrie, turbidimetrie: jsou založeny na měření množství imunitních komplexů, které vznikají po reakci stanovované protilátky s přidaným antigenem. Např. chceme-li stanovit celkové IgG, použijeme protilátku anti IgG. V tomto případě je třeba ujasnit názvosloví, neboť stanovovaná protilátka se v tomto případě označuje antigen a anti IgG vystupuje jako sekundární protilátka (protilátka proti protilátce).

Reakce antigen – protilátka je základem celé řady metod v humorální, ale i buněčné imunitě. Jako antigen často vystupuje protilátka proti stanovované protilátce. Obecný princip reakce antigen – protilátka byl popsán už v roce 1929, kdy byl také popsán základní tvar precipitační křivky této reakce. Metody využívající reakci antigen – protilátka jsou obecně hodnoceny podle toho, jak si poradí s tou oblastí křivky, kdy je koncentrace antigenu v nadbytku, tvoří se malé imunokomplexy, které špatně precipitují a vysoké koncentrace antigenu tak mohou být falešně považovány za nízké, protože množství vytvořených imunokomplexů je nízké. Klasickou precipitační křivku lze pro účely stanovení rozdělit na tři oblasti:

1. oblast využitelnou pro měření – tj, oblast nadbytku protilátky, kde množství precipitátu vzrůstá s přídatkem antigenu.
2. kritický bod – tj. oblast ekvivalence, kde leží nejvyšší koncentrace antigenu, kterou lze ještě správně změřit
3. oblast za kritickým bodem, zde nelze v daném systému měřit

Nefelometrie a turbidimetrie se měří v kyvetě nebo mikrotitrační destičce. V roli antigenu zde vystupuje stanovovaná protilátka a přidáváme protilátku proti ní. V reakčním roztoku bývá dále obsažena podpurná látka, nejčastěji polyetylglykol, která zvyšuje přesnost měření. Pokud se pohybujeme v oblasti křivky využitelné pro měření, je množství precipitátu přímo úměrné koncentraci stanovované protilátky. Výsledkem reakce antigen – protilátka je precipitát, který se projeví jako zákal.

U nefelometrie se měří intenzita světla, které se odrazí od komplexů Ag – Ab. Využívá se tzv. Tyndalova efektu. Detektor není umístěn přímo proti zdroji světla, ale v určitém úhlu od laserového zdroje.

Turbidimetrie má princip podobný, jen se měří úbytek intenzity světla, které prošlo měřicí kyvetou. Opět se využívá toho, že komplexy antigen – protilátka odrážejí světlo a tím pádem dopadá na detektor méně světla. Turbidimetrie je méně citlivá než nefelometrie.

Pomocí turbidimetrie a nefelometrie lze stanovit základní bílkoviny séra: imunoglobuliny (kromě IgD) lehké řetězce imunoglobulinů, složky komplementu C3 a C4, proteiny akutní fáze zánětu – CRP = C reaktivní protein, orosomukoid, transferin, albumin aj.

Stanovení CRP nabývá v posledních letech na významu v diagnostice. Normální hodnoty CRP se pohybují okolo 2 mg/l, při zánětu jeho koncentrace stoupá velice rychle, řádově během hodin. Je to jeden z nejspolehlivějších nespecifických markerů zánětů, je poměrně snadno měřitelný, měření není zatíženo nespecifickými chybami.

ELISA: V současnosti velice rozšířená metoda pro stanovení specifických protilátek. Princip spočívá ve spektrofotometrickém stanovení komplexu antigen – protilátka. Stanovení je nejčastěji uspořádáno tak, že na povrch jamek mikrotitrační desky je navázána protilátka proti stanovované složce (tou je v případě měření specifických protilátek také protilátka). Tato protilátka se váže nejčastěji prostou absorpcí. Místa na vnitřním povrchu jamky, kde se protilátka nenaváže, se musí tzv. vyblokovat – vyvážou se např. albuminem. V dalším kroku se přidá vzorek obsahující sledovanou složku a po určité době inkubace se promytím pomocí pufru odstraní nenavázané molekuly. Následně se přidá tzv. druhá (sekundární) protilátka označená enzymem (konjugát). Nejvíce se používají systémy křenová peroxidáza – ortofenylendiamin, nebo biotin – avidin. Po opětovné inkubaci a promytí se přidá substrát pro enzym a příslušná enzymatická reakce je provázena barevnou změnou, která se detekuje fotometricky.

ÚLOHA 7: Dvojitá radiální imunodifúze podle Ouchterlonyho

Princip

Ouchterlonyho modifikace imunodifúze probíhá na skleněné destičce v agarózovém gelu, do kterého se vysekají jamky podle šablony. Do jamek se pak nanáší Ag a Ab. Ty difundují radiálně do gelu a v místě střetu vytvářejí charakteristické precipitační linie, které lze vizualizovat obarvením (např. barvení bílkovin amidočerní). Podle jejich počtu lze stanovit počet přítomných dvojic Ag a Ab. Když kolem jedné jamky s Ab vysekáme podle různých šablon několik jamek a do nich napipetujeme různé Ag, můžeme podle tvaru obloučků a jejich propojení určovat identitu, příbuznost nebo odlišnost Ag. Lze také porovnávat vzájemnou molekulovou hmotnost Ag a Ab. Semikvantitativně lze určovat i množství Ag.

Protože Ag a Ab difundují kolem jamek radiálně, nazývá se tato metoda dvojitá radiální imunodifúze.

Výhody a nevýhody

Metoda je snadná na provedení a výsledky jsou dobře patrné. Nevýhodou je dlouhá čekací doba na vyhodnocení výsledků.

Chemikálie a roztoky

1. Protilátka - komerční prasečí sérum s anti-IgM protilátkami (*Orion Diagnostica*)
2. Fyziologický roztok
3. Agaróza v práškové formě
4. Borát-fosfátový pufr (pH 6,8)
5. Barvicí roztok
 $225 \text{ ml } \text{CH}_3\text{OH} + 25 \text{ ml } \text{CH}_3\text{COOH} + 0,25 \text{ g amidočerni } 10\text{B}$
6. Odbarvovací diferenční roztok
 $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} - 10:1$

Vzorek: Komerční lidské sérum obsahující IgM (*Orion Diagnostica*)
Vystupuje jako antigen.

Přístroje a pomůcky

Skleněné plotny 5 x 5 cm, skleněná pipeta, korkovrt napojený na vývěvu, Petriho misky na vlhkou komůrku, filtrační papír, vyvažovací podložka pro nalévání skleněných ploten, vodováha, vaříč, vodní lázeň.

Postup - Pracujeme ve dvojicích

1. Připravíme skleněné plotny s agarózovým gelem:
 - a. vyvážíme podložku na nalévání do vodorovné polohy
 - b. skleněnou plotnu (5 x 5 cm) očistíme alkoholem a necháme oschnout
 - c. připravenou skleněnou pipetu několikrát propláchneme horkou vodou
 - d. na plotnu nanese skleněnou pipetou 2,4 ml 1% roztoku agarózy v borát-fosfátovém pufru
 - e. gel necháme několik minut ztuhnout na kalibrované vodorovné ploše.

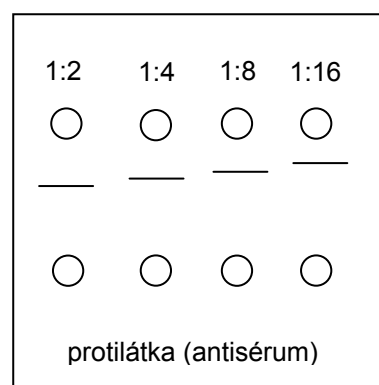
2. Připravíme si různá ředění vzorku (sérum):
 - a) do zkumavky 1. napipetujeme 12 μ l séra a 12 μ l fyziologického roztoku
 - b) do zkumavek 2., 3. a 4. napipetujeme 12 μ l fyziologického roztoku
 - c) ze zkumavky 1. přeneseme 12 μ l do zkumavky 2., zamícháme, přeneseme 12 μ l do zkumavky 3., zamícháme, přeneseme 12 μ l do 4. zkumavky a opět zamícháme.

Označení zkumavky	1.	2.	3.	4.
Fyziologický roztok	12 μ l	12 μ l	12 μ l	12 μ l
Antigen (sérum)	12 μ l	-	-	-

Ředění:	1:2	1:4	1:8	1:16
Celkový objem:	12 μ l	12 μ l	12 μ l	24 μ l

3. Do gelu podle šablony vysekáme 8 jamek ve dvou řadách.

4. Do jamek naneseeme:
 - a) do horní řady 10 μ l různě naředěného antigenu
 - b) do spodní řady jamek po 10 μ l protilátky (antiséra)



5. Skleněnou plotnu vložíme do vlhké komůrky a necháme inkubovat v lednici 48 hodin.

Dále pokračuje vyučující

6. Po skončení inkubace pereme skla nejvýše 2 minuty ve fyziologickém roztoku, zabalíme je do filtračního papíru navlhčeného fyziologickým roztokem a přes noc sušíme při pokojové teplotě.
7. V dalším cvičení sejmeme ze sklíček papír, skla opereme pod tekoucí vodou a barvíme barvicím roztokem do dostatečného obarvení linií. Pozadí odbarvíme diferenciačním roztokem. Nakonec opereme v destilované vodě a usušíme bez papíru.

Hodnocení

Vizuálně vyhodnotíme výsledek:

- mezi jamkou s antigenem a jamkou s protilátkou (antisérem) by se měla objevit precipitační linie v různé vzdálenosti podle množství antigenu. Rozdíl v koncentraci antigenu se také projeví intenzitou precipitační linie.

Výstup

Slovní shrnutí, zda a jak se projevil rozdíl koncentrace antigenu. Stanovení je semikvantitativní tzn., že rozdíly v koncentraci jsou pouze orientační.