

7 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 podmnožina kvalitativního stanovení, můžeme ovšem stanovovat i koncentrace těchto specifických protilátek.

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

Stanovení protilátek se dnes nejčastěji provádí nefelometricky nebo turbidimetricky. Lze také použít stanovení radiální difúzí, touto metodou se však stanovuje většinou jen IgD, který má nízkou aviditu a nefelometrie se pro jeho stanovení nehodí. Tato stanovení přináší informaci o kvalitě (třída imunoglobulinů) a následně také o koncentraci. 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 cytoplasmě 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. Problém 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, laboratoří 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 antigenům determinantům borrelií 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 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, tedy kvalitativní hodnocení, 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 kvalitativním stanovení vyjadřujeme množství protilátek jako tzv. **titr, což je reciproká hodnota nejvyššího ředění séra, která ještě dává pozitivní reakci**. Např. titr 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 reakce
- séropozitivita, séronegativita – přítomnost, resp. nepřítomnost specifických protilátek v séru
- sérorezistence – stav, kdy při léčbě zůstává séropozitivita bez klinických příznaků
- sérorecidiva – znovuobjevení pozitivivity séra po přechodném vymizení specifických protilátek
- sérotyp (sérovar) skupina původců onemocnění (bakterie) podmnožina 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. Specifický antigen je v prvním kroku navázán na pevný nosič (papír, membránu, celulósový polymer, povrch mikrotitrační destičky). Ve druhém kroku se na tento antigen váže námi sledovaná protilátka a ve třetím kroku je tato navázána protilátka označena buď sekundární protilátkou s enzymatickou značkou pro následnou vizualizaci - ELISA technika nebo radioaktivně značenou sekundární protilátkou v případě RIA techniky. Množství IgE se potom 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 imunofíce. 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 je 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 imunodeficit, kdy očekáváme zpravidla 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 buněk, která je u autoimunit poměrně častá.

Fyziologické hodnoty množství protilátek v séru:

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 stanovení 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 imunálních komplexů, které vznikají po reakci stanovované protilátky s přidaným antigenem. Např. chceme-li stanovit celkové IgG, použijeme protilátku anti IgG.

Reakce antigen – protilátka je základem celé řady metod v humorální, ale i buněčné imunitě. Jako antigen často vystupuje protilátka proti stanovované protilátce. Zde je trochu nejasnost v terminologii. Navíc pro označení stanovovaného ligandu se také někdy užívá označení receptor. 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 touto 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 je vzrůstá s přidávkem 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, roztoku, v roli antigenu zde vystupuje stanovovaná protilátka a přidáváme protilátku proti ní. V reakčním roztoku bývá dále obsažena enhancující látka, nejčastěji polyetylen glykol. Pokud se pohybujeme v oblasti křivky využitelné pro měření, je množství precipitátu je přímo úměrné koncentraci stanovované protilátky. Výsledkem reakce antigen – protilátka je precipitát, který se projevuje jako zákal.

U nefelometrie se měří intenzita záblesků 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, měří se úbytek intenzity světla, které prošlo měřicí kyvetou. Opět se využívá toho, že komplexy antigen – protilátka odrážejí světlo. Turbidimetrie je méně citlivá než nefelometrie.

Obě metody mohou být uspořádány ve dvou odlišných režimech stanovení:

1 „End point“ systém – smíchá se stanovovaný antigen a protilátka v prostředí polyetylen glykolu a po určité době inkubace, kdy je dosaženo rovnovážného stavu se provede měření. Tento způsob je použitelný u systémů, které jsou odzkoušené a kde je jistota, že koncentrace stanovované složky leží v oblasti křivky využitelné pro měření, tzn. nemůže nastat situace, kdy je antigenu nadbytek nad kritický bod. Pokud by tomu tak bylo, může se v tomto uspořádání stát, že naměříme falešně nízké hodnoty antigenu.

2. Kinetický (rate) systém – měřicí směs v kyvetě se musí míchat, měření startuje ihned po přidávku protilátky a měří se v určitých krátkých časových (několikasekundových) intervalech. Atypický průběh hodnot signalizuje, že systém mohl překročit bod ekvivalence. Většina komerčních analyzátorů má ve svém softwaru možnost řešení těchto situací např. dotitrováním nadbytku antigenu.

Pomocí turbidimetrie a nefelometrie se stanovují základní bílkoviny séra: imunoglobuliny, kromě IgD, lehké řetězce imunoglobulinů, složky komplementu C3 a C4, proteiny akutní fáze zánětu – CRP, orosomukoid, transferin, albumin aj.

Zejména 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. Dnes i běžné ordinace praktických lékařů mohou mít ve svém vybavení analyzátor CRP.

ELISA: dnes velice rozšířená metodika pro stanovení specifických protilátek. Princip spočívá ve spektrofotometrickém stanovení komplexu antigen – protilátka. Stanovení je nejčastěji uspořádáno tak, že na povrch jamek mikrotitrační desky je navazána protilátka proti stanovované složce (to 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 – vyváží 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). Používají se např. 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.