

Základní imunochemické metody

Lenka Fialová

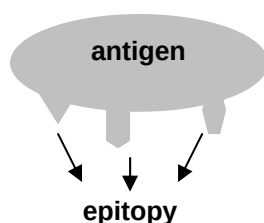
1. ANTIGENY	2
2. PROTILÁTKY	2
3. IMUNOCHEMICKÉ METODY	3
3.1. <i>IMUNOPRECIPITACE</i>	3
3.2. <i>IMUNOPRECIPITAČNÍ METODY V GELU</i>	4
3.2.1. <i>Jednoduchá radiální imunodifuze</i>	5
3.2.2. <i>Dvojitá imunodifuze</i>	6
3.2.3. <i>Imunoelektroforeza</i>	6
3.2.4. <i>Imunofixace</i>	6
3.3. <i>IMUNOPRECIPITAČNÍ METODY V ROZTOKU</i>	8
3.3.1. <i>Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie</i>	8
3.4. <i>AGLUTINACE</i>	9
3.4.1. <i>Přímá aglutinace</i>	10
3.4.2. <i>Nepřímá aglutinace</i>	10
3.4.3. <i>Inhibice aglutinace</i>	10
3.5. <i>IMUNOANALYSA</i>	12
3.6. <i>ENZYMOVÁ IMUNOANALYSA (EIA)</i>	12
3.6.1. <i>Kompetitivní enzymová imunoanalýza se značeným antigenem</i>	13
3.6.2. <i>Nekompetitivní enzymová imunoanalýza (sandvičové metody)</i>	13
3.6.3. <i>Nekompetitivní enzymová imunoanalýza pro stanovení antigenu</i>	13
3.6.4. <i>Nekompetitivní enzymová imunoanalýza pro stanovení protilátky</i>	14
3.7. <i>VYUŽITÍ IMUNOCHEMICKÝCH METOD V RYCHLÉ DIAGNOSTICE</i>	17
3.7.1. <i>Příklady metod rychlé imunochemické diagnostiky</i>	18

1. Antigeny

Antigeny (Ag), makromolekuly přirozeného nebo umělého původu, jsou po chemické stránce různé polymery - proteiny, polypeptidy, polysacharidy nebo nukleoproteiny. Antigeny mají dvě základní vlastnosti - *navozují specifickou imunitní odpověď*, ať buněčného nebo protilátkového typu, a *specificky reagují s produkty této odpovědi* (tj. protilátkami a imunokompetentními buňkami). Obě tyto vlastnosti má **kompletní antigen - imunogen**, který je tvořen z makromolekulového nosiče, a **antigenních determinant neboli epitopů** (obr. 1). **Epitopem** je určitá skupina atomů na povrchu molekuly antigenu a charakterizuje jeho specifitu a schopnost reagovat s vazebným místem protilátky nebo antigenovým receptorem na lymfocytech. Počet antigenních determinant reagujících s vazebným místem protilátek udává valenci antigenů.

Nízkomolekulová látka, která nemůže sama navodit tvorbu protilátek, ale specificky reaguje s produkty imunitní odpovědi, se označuje jako **hapten (nekompletní antigen)**.

Obr. 1 Schéma antigenu

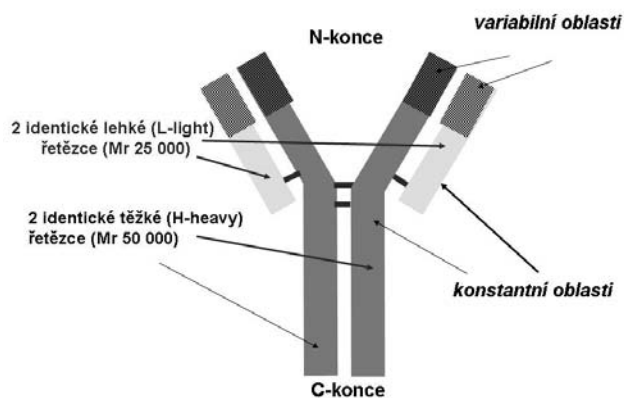


2. Protilátky

Protilátky (Ab) jsou produkovány plasmatickými buňkami, vyvíjejícími se z B-lymfocytů po stimulaci antigenem.

Protilátky jsou heterogenní skupinou glykoproteinů živočišného původu, které se při elektroforese pohybují v oblasti β až γ a označují se **imunoglobuliny (Ig)**. Molekula imunoglobulinů obsahuje minimálně dva identické lehké (L) a dva identické těžké (H) polypeptidové řetězce vzájemně spojené disulfidovými vazbami (obr. 2). Jedna molekula Ig obsahuje vždy jen jeden typ lehkého a jeden typ těžkého řetězce. Lehké řetězce jsou dvojí - κ nebo λ a určují **typ imunoglobulinové molekuly**. Těžké řetězce, které existují v pěti různých izotypech γ , μ , α , ϵ a δ určují příslušnost ke **třídě imunoglobulinů** - IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. C-koncové části řetězců tvoří konstantní oblast Ig, N-konce řetězců se označují jako variabilní oblasti a představují část molekuly protilátky vazající antigen - **vazebné místo neboli paratop**. Kromě IgM s 10 vazebnými místy a sekrečního IgA se 4 vazebnými místy mají ostatní imunoglobulinové třídy 2 vazebná místa pro antigen.

Obr. 2 Struktura protilátky



3. Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na reakci antigenu s protilátkou, přesněji řečeno na reakci epitopů s vazebným místem protilátky. Využívají protilátky vyrobené různým způsobem.

Monoklonální protilátky jsou produkty jednoho klonu plasmatických buněk odvozených od B-lymfocytů, připravených v laboratorních podmínkách hybridomovou technologií. Jejím podstatou je buněčná fúze nádorových (myelomových) buněk s lymfocyty sleziny imunisované myši. Monoklonální protilátky jsou namířené proti jednomu epitopu určitého antigenu, a proto představují identické kopie molekul imunoglobulinů, které mají stejnou primární strukturu a stejnou specifitu vazebných míst. Vyznačují se výraznou specifitou, ale špatně precipitují.

Polyklonální protilátky (konvenční protilátky) se připravují imunizací zvířat (obvykle králíci, kozy, ovce) antigenem. Krevní sérum imunisovaného zvířete, které obsahuje protilátky proti antigenu použitému k imunizaci, se označuje jako **antisérum**. Pokud byl k imunizaci použit jeden antigen (např. jedna bílkovina), vytvářejí se **monospecifické protilátky** (antisérum). Každý epitop v molekule antigenu stimuluje na tvorbu protilátek jeden klon B-lymfocytů. Protože kompletní antigeny mají více epitopů, aktivují několik klonů B-buněk. Imunisované zvíře syntetizuje směs monoklonálních protilátek lišících se tím, že jejich vazebná místa mají různou afinitu i specifitu k jednotlivým epitopům určitého antigenu, který vyvolal jejich tvorbu.

Imunizace zvířat směsí antigenů navozuje produkci **polyspecifických protilátek**¹, obsahující imunoglobuliny proti většímu počtu antigenů (např. antisérum proti bílkovinám lidského séra používané při imunoelektroforese).

Na měření tvorby komplexu antigenu a protilátky je založeno stanovení většiny analytů v tělesných tekutinách.

3.1. Imunoprecipitace

Imunoprecipitace je reakce **rozpustného antigenu** s protilátkou, při níž vzniká precipitát (jemná sraženina). Provádí se jako kvalitativní nebo kvantitativní reakce.

Kvantitativní imunoprecipitační křivka

Základní princip, který využívají různé imunochemické metody, vychází z kvantitativní imunoprecipitační reakce. Jestliže budeme do zkumavek obsahujících konstantní množství protilátky přidávat ve stoupajícím množství rozpustný antigen, v některých z nich se vytvoří precipitát, který oddělíme centrifugací. Vztah mezi koncentrací antigenu a množstvím precipitátu za podmínky konstantního množství protilátky charakterizuje kvantitativní **imunoprecipitační křivka**, kterou popsali v roce 1935 Heidelberger a Kendall.

Křivku lze rozdělit na tři úseky (obr. 3):

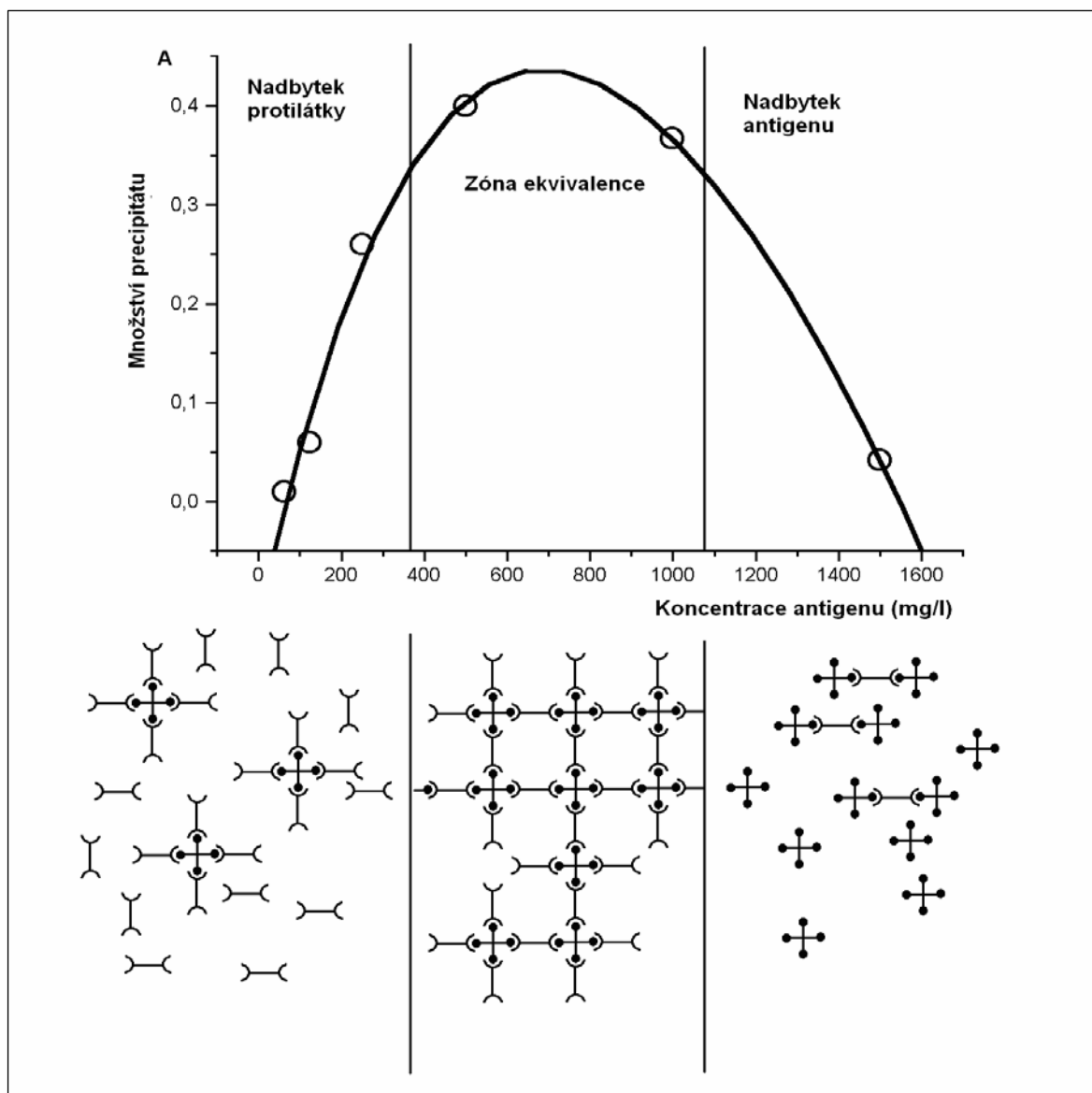
Oblast nadbytku protilátky – se zvyšujícím se množstvím antigenu vzrůstá precipitát. Na všechna vazebná místa antigenu jsou navázány protilátky, Výsledkem je vznik **malých rozpustných komplexů** antigenu a protilátky, které se vzájemně nepropojují. V supernatantu neprokazujeme žádný antigen, ale může se vyskytnout volná (nenavázaná) protilátka. V oblasti nadbytku protilátky je množství komplexu antigen-protilátka **úměrné koncentraci přítomného antigenu**. Tyto reakční poměry se využívají u **imunoturbidimetrie a imunonefelometrie a nekompetitivních imunoanalys**.

Oblast ekvivalence – dochází k vzájemnému propojování molekul antigenu a protilátky a tím vznikají velké nerozpustné imunokomplexy s mřížkovitou strukturou, které agregují a vytvářejí imunoprecipitát. V supernatantu neprokazujeme volný antigen ani volnou protilátku. Dosažení ekvivalence se používá u **imunodifusních metod**.

¹ Polyspecifické protilátky jsou někdy nesprávně označovány jako polyvalentní a monospecifické jako monovalentní. Termín valence se však vztahuje na počet vazebných míst protilátky.

Oblast nadbytku antigenu – množství precipitátu klesá v důsledku vysoké koncentrace antigenu. Velké vzájemně propojené imunokomplexy se rozpadají. Všechna vazebná místa protilátek jsou vysycena antigenem a některé molekuly antigenu zůstávají bez navázané protilátky. Vznikají malé rozpustné imunokomplexy. V supernatantu nejsou přítomny volné protilátky, ale vzestupné množství volného antigenu. Podmínka nadbytku antigenu musí být splněna u **kompetitivních imunoanalys**.

Obr. 3 Imunoprecipitační křivka



Imunoprecipitační křivka je základem pro různé imunochemické metody, které mohou být prováděny v gelu nebo v roztoku.

3.2. Imunoprecipitační metody v gelu

Jako gelové prostředí je nejčastěji využíván **agar nebo agarosa**. Do agarového či agarosového gelu se v různém uspořádání nanáší protilátka a antigen. U **jednoduché difuze** se může v agarose pohybovat pouze jedna složka (tj. antigen nebo protilátka) a druhá složka je rovnoměrně rozptýlena v gelu. Pokud se obě složky imunochemické reakce volně pohybují proti sobě, jde o **dvojitou difuzi**. V místě reakce antigenu a protilátky se vytváří precipitační linie ve formě obloučku, linie či prstence.

Imunodifuse využívá např. *jednoduchá radiální imunodifuse dle Manciniové nebo dvojité radiální imunodifuse dle Ouchterlonyho*.

Další metody kombinují imunochemickou reakci s elektroforetickou separací jako je tomu např. u *imunoelektroforezy a imunofixace*.

3.2.1. Jednoduchá radiální imunodifuse

Radiální imunodifuse je kvantitativní imunochemická metoda bez velkých nároků na přístrojové vybavení. Antigen, obsažený ve vyšetřovaných vzorcích nebo standardních roztocích, je aplikován do jamek, které jsou vykrojeny do agarosového gelu, obsahujícího odpovídající monospecifickou protilátku (obr. 4). Deska je inkubována při pokojové teplotě po dobu 48 – 72 hodin podle charakteru antigenu. Antigen difunduje z jamek radiálně do agarosy, v níž je koncentrace protilátky konstantní. Migrace antigenu pokračuje až do dosažení ekvivalentního poměru mezi antigenem a protilátkou. Komplexy antigenu a protilátky vytvářejí imunoprecipitát, který se projeví jako ostrý bílý prstenec kolem jamky. Plocha precipitačního prstence nebo druhá mocnina průměru prstence je přímo úměrná koncentraci antigenu.

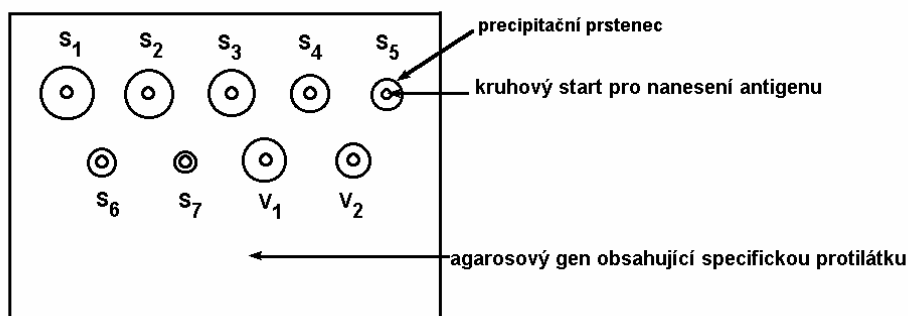
Pracovní postup zahrnuje několik kroků:

- Rozvařená agarosa, do které se po ochlazení na 50 °C přidá monospecifické antisérum, se nalije na skleněnou desku či do Petriho misky.
- Po ztuhnutí se do agarosy vyříznou pomocí šablony kulaté starty, které se plní standardními roztoky a vyšetřovanými vzorky.
- Deska se vloží do vlhké komůrky a nechá se inkubovat potřebnou dobu, během níž antigen radiálně difunduje do okolí a reaguje s protilátkou.
- Po skončení difuze se destička usuší a pro zvýraznění precipitačních prstenců obarví.
- Vyhodnocování spočívá ve změření průměru prstenců a výpočtu jejich druhých mocnin. Z hodnot druhých mocnin průměru precipitačních prstenců několika ředění standardních roztoků antigenu zhotovíme kalibrační křivku, z níž odečteme koncentrace antigenu v neznámých vzorcích.

Rozsah měření této metody je zpravidla 10 - 200 mg/l, a je proto vhodná pro stanovení většiny sérových proteinů (např. imunoglobulinů IgG, IgM, IgA, prealbuminu, transferrinu, α_2 -makroglobulinu, ceruloplasminu).

V současné době je tato metoda nahrazována imunoturbidimetrií nebo imunonefelometrií (viz níže).

Obr. 4 Jednoduchá radiální imunodifuse (S₁ – S₇ – standardy, V₁ – V₂ – vzorky)

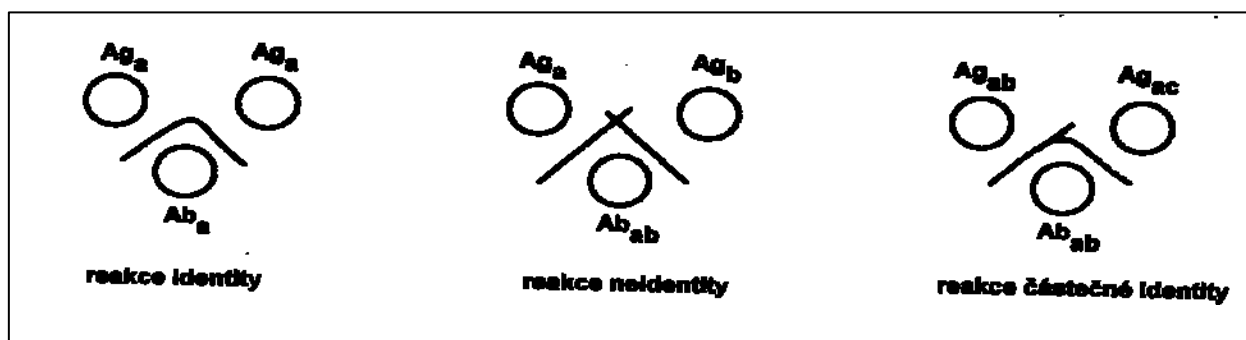


3.2.2. Dvojitá imunodifuze

Při dvojité imunodifuzi difundují proti sobě antigen a protilátka. Často se používá *úprava podle Ouchterlonyho*. Do gelového prostředí se obvykle ve tvaru růžice vyřežou jamky, které se plní antigenem nebo protilátkou. Antigen a protilátka difundují do okolí jamek radiálně. V případě setkání antigenu a odpovídajícího antiséra, které jsou ve vhodném poměru, se vytvoří mezi jamkami precipitát. Jestliže do jednotlivých jamek okolo středového startu s antisérem nanese různé antigeny, mohou vzniknout precipitáty různých tvarů. V přítomnosti více antigenů v jednom vzorku identifikujeme několik linií. Podle tvaru precipitační linie v sousedních jamkách můžeme usuzovat, zda jsou sousední antigeny identické, zda mají společné pouze některé antigenní determinanty nebo nejsou identické (obr. 5).

- **Reakce imunochemické identity** - linie vytvořené vedle sebe umístěnými antigeny plně splývají.
- **Reakce imunochemické neidentity** - precipitační linie jsou překřížené.
- **Reakce částečné identity** - je charakterizována obrazem ostruhy, to znamená, že antigeny mají určitý epitop stejný, ale v jiném se liší. Splývající linie je podmíněna reakcí společného epitopu s příslušnou protilátkou, ostruha je výsledkem reakce epitopu, přítomného pouze v jedné antigenu.

Obr. 5 Dvojitá radiální imunodifuze podle Ouchterlonyho (Ag_a , Ag_b , Ag_c – antigeny s epitopy a, b, c, Ab_a , Ab_b – protilátky proti epitopům a, b)



Ouchterlonyho dvojitá difuze je kvalitativní metoda vhodná k identifikaci antigenů a určení jejich imunochemické příbuznosti, pokud jsou k dispozici příslušná antiséra, nebo opačně na důkaz přítomnosti protilátek pomocí čistých antigenů.

3.2.3. Imunoelektroforesa

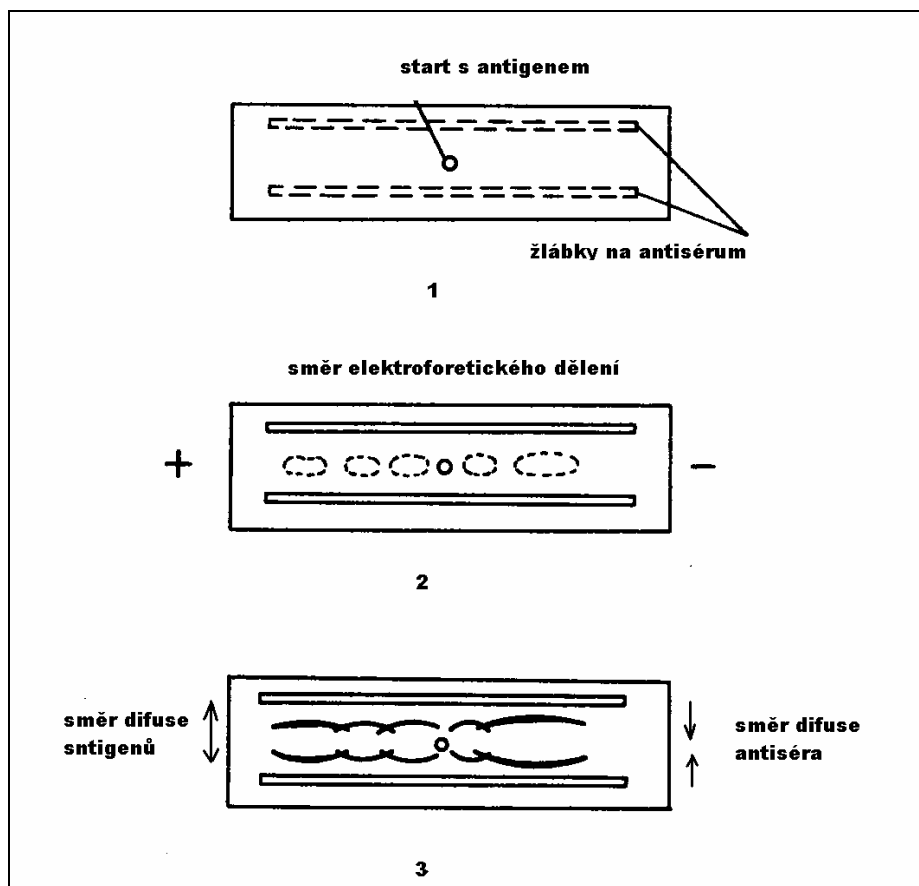
Imunoelektroforesa je *kombinace elektroforezy s imunodifuzí*. Provedení probíhá ve dvou krocích. V první fázi se směs antigenů rozdělí podle své elektroforetické pohyblivosti na jednotlivé složky. Ve druhém kroku se naplní kanálek podél elektroforeogramu požadovaným antisérem – monospecifickým nebo polyspecifickým. Rozdělené antigeny a protilátky proti sobě difundují a v místě reakce antigenu a odpovídající protilátky se vytvoří precipitační oblouček (obr. 6).

3.2.4. Imunofixace

Imunofixace je metoda umožňující identifikaci a typizaci monoklonálních imunoglobulinů v séru, moči nebo mozkomíšním moku. Podobně jako imunoelektroforesa je i imunofixace dvoustupňová metoda. V první fázi se směs bílkovin rozdělí podle *elektroforetické pohyblivosti*. Ve druhé fázi identifikujeme specifickou bílkovinu pomocí *imunoprecipitační reakce*.

Elektroforesa směsi bílkovin se uskutečňuje většinou v agarosovém nebo acetátcelulosovém gelu. V gelu se zhotoví obvykle 6 startů, do nichž se aplikuje vzorek téhož pacienta. Po skončení

Obr. 6 Imunoelektroforesa (použito polyspecifické antisérum)(upraveno podle Ferenčík M.: Imunochémia. Alfa, Bratislava, 1989)



elektroforesy se na povrch gelu přiloží šablona s vyříznutými proužky v zónách elektroforetických drah. Do prvního proužku, který je určen pouze pro elektroforesu, se aplikuje fixační roztok, do ostatních vyříznutých proužků se nanášejí specifické protilátky (proti IgG, IgA, IgM a proti lehkým řetězcům κ a λ), které difundují do gelu a v místě, kde reagují s příslušným antigenem, vytvářejí imunokomplexy ve formě precipitátu. Po promytí vhodným pufrům zůstanou v gelu pouze nerozpuštěné imunokomplexy, vytvářející ohraničný pruh, který se zvýrazňuje obarvením.

Kritickým bodem imunofixace je použití **vhodného ředění vzorku**. Jak vyplývá z imunoprecipitační křivky, dochází při nadbytku jedné ze složek antigenu nebo protilátky k rozpadu imunokomplexu. Nízké koncentrace antigenu se nemusí prokázat, pokud vzorek příliš naředíme, a naopak při vysoké koncentraci se imunokomplexy rozpustí.

Využití

Imunofixace se v klinicko-biochemické praxi uplatňuje především při průkazu monoklonálních imunoglobulinů. Prakticky nahradila dříve používanou imunoelektroforesu. Oproti ní se vyznačuje jednoduchým a rychlým provedením, relativně nekomplikovaným odečítáním a vyšší citlivostí.

K vyšetření imunofixací přistupujeme tehdy, pokud při elektroforetickém vyšetření séra či moči vyslovíme podezření na přítomnost monoklonálního imunoglobulinu (paraproteinu) – tzv. **M-komponenty**. Monoklonální imunoglobuliny jsou celé molekuly imunoglobulinů nebo jejich části, jejichž přítomnost je typická pro monoklonální gamapati, stav charakterizovaný nadměrnou tvorbou nežádoucích imunoglobulinů. Monoklonální imunoglobuliny vznikají tak, že buňky produkující protilátky přestanou být citlivé na regulační signály, dále se rozmnožují a produkují tyto protilátky nepotřebné pro organismus. U monoklonální gamapatie se nekontrolovaně rozmnožuje jeden klon plasmatických buněk, které syntetizují identické molekuly imunoglobulinů nebo jeho částí (lehké nebo těžké řetězce). **Monoklonální gamapatie** mohou mít někdy **benigní charakter**. Většinou jsou však

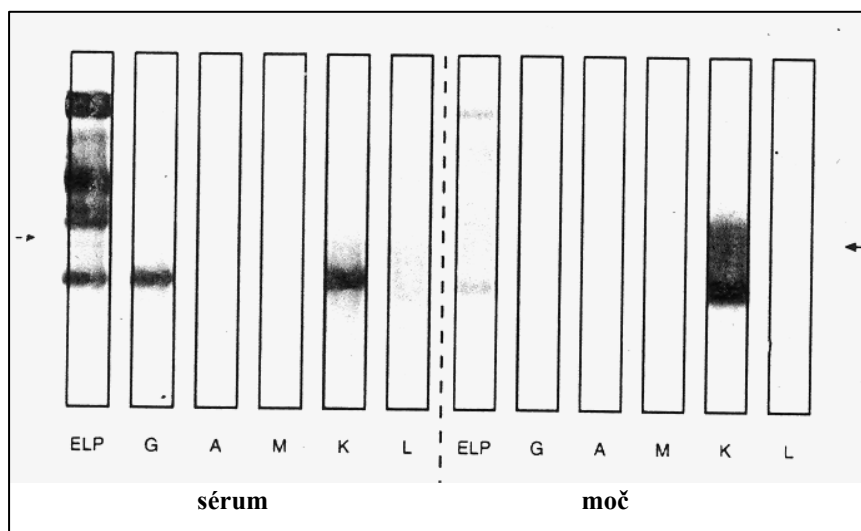
příznakem nádorového bujení buněk produkujících protilátky. Mezi **maligní formy** patří **mnohočetný myelom (plasmocytom)**, u něhož mohou být produkovány kompletní monoklonální imunoglobuliny především třídy IgG a IgA. Někdy jsou syntetizovány společně s tzv. **Bence-Jonesovou bílkovinou**, jejíž molekula je tvořena monomerem či dimerem lehkých řetězců². Je prokazována především v moči, neboť pro svoji malou molekulu snadno proniká glomerulárním filtrem. Při Waldenströmově makroglobulinemii vzniká nadměrné množství monoklonálního IgM.

Imunofixací můžeme charakterizovat typ monoklonálního imunoglobulinu, což je umožněno použitím sady antisér. Komerční soupravy obsahují monospecifická antiséra proti IgG, IgA a IgM a proti lehkým řetězcům κ a λ .

Hodnocení:

- **Polyklonální imunoglobuliny** se projevují vznikem difusně zbarvených precipitátů, prokazatelných při reakci s jedním nebo několika antiséry proti těžkým nebo lehkým řetězcům.
- **Monoklonální imunoglobuliny** se prokazují jako úzký silně obarvený proužek v difusním precipitátu polyklonálních Ig při reakci s jedním z antisér proti těžkým řetězcům a s jedním z antisér proti lehkým řetězcům. Bence-Jonesova bílkovina vytváří úzký proužek pouze při reakci s jedním ze dvou antisér proti lehkým řetězcům (obr. 7).

Obr. 7 Imunofixace – příklad IgG monoklonálního imunoglobulinu
(sérum – paraprotein IgG kappa, moč – volné lehké řetězce kappa)



3.3. Imunoprecipitační metody v roztoku

Precipitát, který vzniká v gelu, se může tvořit rovněž v roztoku. Množství vzniklého precipitátu stanovují dvě kvantitativní metody - **imunoturbidimetrie a imunonefelometrie**.

3.3.1. Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie

Výsledkem smísení roztoku antigenu s odpovídající protilátkou je vznik malých agregátů. Roztok se stává zakaleným. Světlo, které prochází zakaleným roztokem, je rozptylováno na rozdíl od

² Charakteristickou vlastností Bence-Jonesovy bílkoviny je atypická denaturace. Při teplotě 50 – 60 °C precipituje (při pH 4-6), při dalším zahřívání precipitát vymizí.

roztoku, kde neproběhla žádná imunochemická reakce. Stupeň zákalu je **v oblasti nadbytku protilátky** úměrný koncentraci antigenu. Vzniklý zákal se měří turbidimetricky nebo nefelometricky.

Turbidimetrie využívá optických detekčních systémů, které měří intenzitu světla prošlého zakaleným roztokem v přímém směru jako u klasické fotometrie. Proto je možno k detekci použít běžné spektrofotometry. Naopak **nefelometrie** je založena na měření intenzity rozptýleného světla, které vychází z roztoku všemi směry. Měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření, obvykle 45° nebo 90°. Vyžaduje speciální přístroj – nefelometr, využívající jako světelný zdroj obvykle laser (obr. 8).

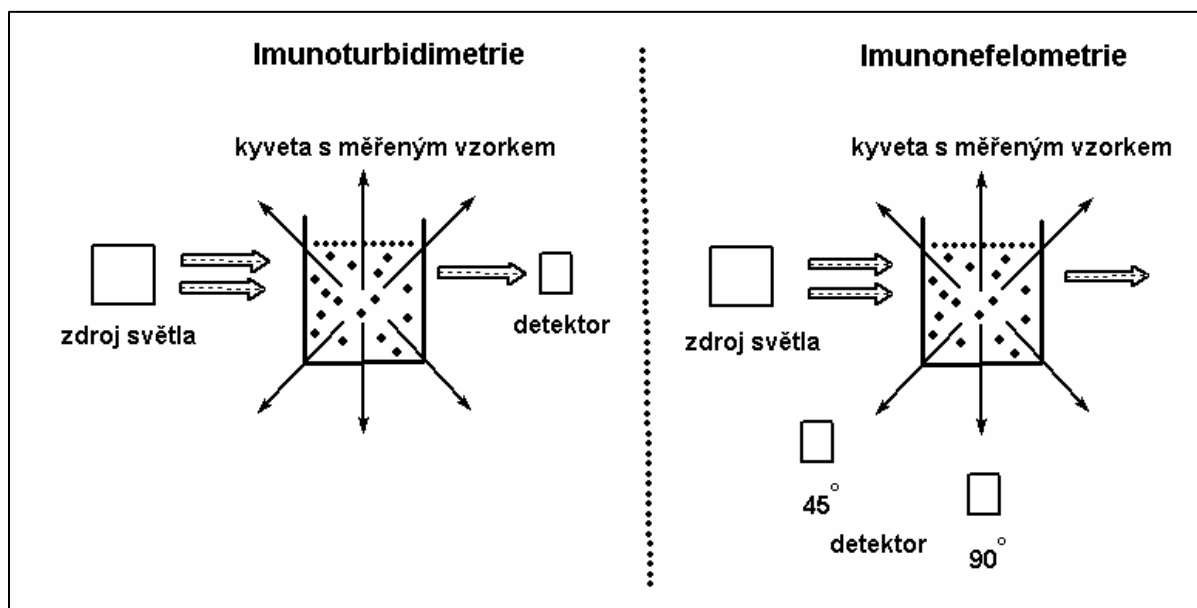
Je nezbytné, aby při provádění těchto metod byl v reakční směsi **nadbytek protilátky**, neboť stejnou hodnotu absorbance mohou poskytovat dvě rozdílné koncentrace antigenu – jedna v oblasti nadbytku protilátky, druhá v oblasti nadbytku antigenu (viz imunoprecipitační křivku). Při vysokých koncentracích stanovené látky se imunokomplexy rozpouštějí a v tomto případě bychom mohli změřit falešně nízké hodnoty. Pomocí moderních zařízení je možno měřit rychlost vzniku zákalu, který je přímo úměrný koncentraci antigenu. Jiným způsobem, jak rozhodnout v jaké oblasti precipitační křivky leží hodnota absorbance, je opakování měření s vyšším ředěním vzorku.

Praktické provedení obou metod je jednoduché, a proto **vhodné k automatizaci**. Spočívá ve smíchání optimálně naředěného monospecifického antiséra s naředěným vzorkem a následným turbidimetrickým nebo nefelometrickým měřením.

Citlivost precipitačních metod v roztoku lze **zvýšit navázáním protilátky nebo antigenu na latexové částice**, které zesilují rozptýl světla vyvolaný imunokomplexy vzniklými v imunochemické reakce.

Metody imunoprecipitace v roztoku jsou rychlejší, ale dražší než radiální imunodifuze, protože mají větší spotřebu protilátek.

Obr. 8 Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie



3.4. Aglutinace

Aglutinace (z lat. agglutino – přilepuji, připojuji) je imunochemická reakce, při níž reaguje specifická protilátka s antigenem, který na rozdíl od imunoprecipitace, má **korpuskulární charakter**. Povahu korpuskulárního antigenu mohou mít např. celá těla mikroorganismů a erytrocyty nebo může být připraven uměle navázáním solubilních antigenů na povrch inertních částic, které se vyznačují větší trvanlivostí. Antigeny, které reagují při aglutinaci, se označují aglutinogeny a protilátky aglutininy. Aglutinaci erytrocytů nazýváme hemaglutinací.

Princip aglutinace spočívá v reakci, při níž se vzájemně propojí dvou vazebné (IgG) nebo vícevazebné (IgM) protilátky s částicemi s více epitopy. Bivalentnost či multivalentnost protilátek a větší počet epitopů na partikulích je základní podmínkou pro vznik příčných vazeb mezi reagujícími složkami a pro vytvoření **vyšokomolekulární mřížkovité struktury**. Vzniklý imunokomplex, označovaný jako **aglutinát**, má zrnitý či vločkovitý charakter, rychle sedimentuje a **je viditelný pouhým okem**. Protilátky třídy IgM s 10 vazebnými místy vytvářejí příčné můstky mnohem efektivněji než IgG s pouhými 2 vazebnými místy. Pokud některé protilátky nejsou schopny aglutinovat, lze aglutinace dosáhnout tím, že v dalším kroku přidáme do reakční směsi zvířecí protilátky proti lidským imunoglobulinům (Coombsův test).

Aglutinační reakce se mohou provádět na podložním sklíčku, ve zkumavkách či mikrotitračních destičkách. Ve srovnání s precipitačními metodami jsou citlivější. Při běžném uspořádání poskytují aglutinační metody kvalitativní, popř. semikvantitativní výsledky, ale je možné i jejich kvantitativní provedení, které je velmi rychlé a citlivé.

Aglutinační testy dělíme na **přímé a nepřímé**.

3.4.1. Přímá aglutinace

Při přímé aglutinaci je **antigen integrální součástí povrchu částice** (těla nebo části mikroorganismů, erytrocyty). Suspence částic je přímo shlukována roztokem specifických protilátek přítomných ve vyšetřovaném vzorku. S metodou přímé aglutinace se setkáváme v hematologii při zjišťování krevních skupin či v imunologické diagnostice při průkazu přítomnosti protilátek proti povrchovým antigenům některých mikrobů (např. proti *Salmonella typhi* – tzv. Widalova reakce). Při stanovení protilátek je aglutinace obvykle prováděna s několika ředěními vyšetřovaného vzorku a slouží k určení tzv. titru protilátek, kterým rozumíme nejvyšší ředění, při němž ještě prokazujeme aglutinaci.

3.4.2. Nepřímá aglutinace

Technika nepřímé aglutinace používá **částice, na které byly antigeny dodatečně navázány**. Původně se jako nosič antigenů používaly erytrocyty, později se jako vhodné ukázaly i inertní částice z latexu (latexová aglutinace), koloidního zlata, popř. z dalších materiálů. Mnohé antigeny se na povrch částic adsorbují spontánně (některé proteiny, bakteriální antigeny, viry). Navázání jiných antigenů vyžaduje předchozí modifikaci povrchu částice např. taninem nebo chloridem chromitým. Použití partikulí se známým antigenem umožňuje jednoduchý **průkaz specifických protilátek** proti povrchovým antigenům některých patogenů a některých autoprotilátek (např. revmatoidní faktor³) (obr. 9).

Partikule však mohou být **obaleny místo antigenu specifickou protilátkou**. Tento způsob uspořádání je označován jako **reversní aglutinace** a lze jím naopak ve vyšetřovaném vzorku **prokazovat antigeny** (obr. 10). Jako příklad může sloužit semikvantitativní stanovení C-reaktivního proteinu nebo lidského choriového gonadotropinu.

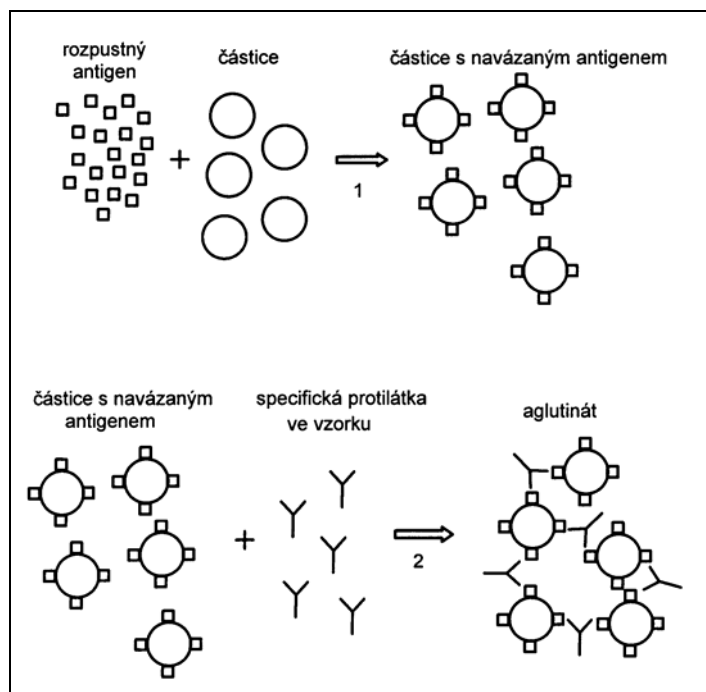
3.4.3. Inhibice aglutinace

Inhibice aglutinace je další formou aglutinační reakce a lze ji použít **ke stanovení solubilních antigenů**. Je založena na soutěži solubilního antigenu a antigenu navázaného na částice o vazbu na omezené množství protilátky. Specifická protilátka je inkubována se vzorkem obsahujícím testovaný antigen. Po přidání suspence částic s navázaným antigenem k aglutinaci nedochází, neboť vazebná místa protilátek byla obsazena solubilní formou antigenu v první fázi reakce. Nepřítomnost aglutinace představuje pozitivní výsledek (obr. 11). Pokud by v testovaném vzorku nebyl přítomen solubilní antigen, aglutinace by se po přidání korpuskulárního antigenu uskutečnila.

³ Revmatoidní faktory (RF) jsou antiimunoglobulinové protilátky obvykle třídy IgM se specifitou pro Fc fragment IgG. Jejich zvýšené hodnoty jsou typické pro revmatická onemocnění, ale můžeme se s nimi setkat i u jiných chorob. Při vyšetření RF se používají latexové částice potažené lidským IgG (latex-fixační test).

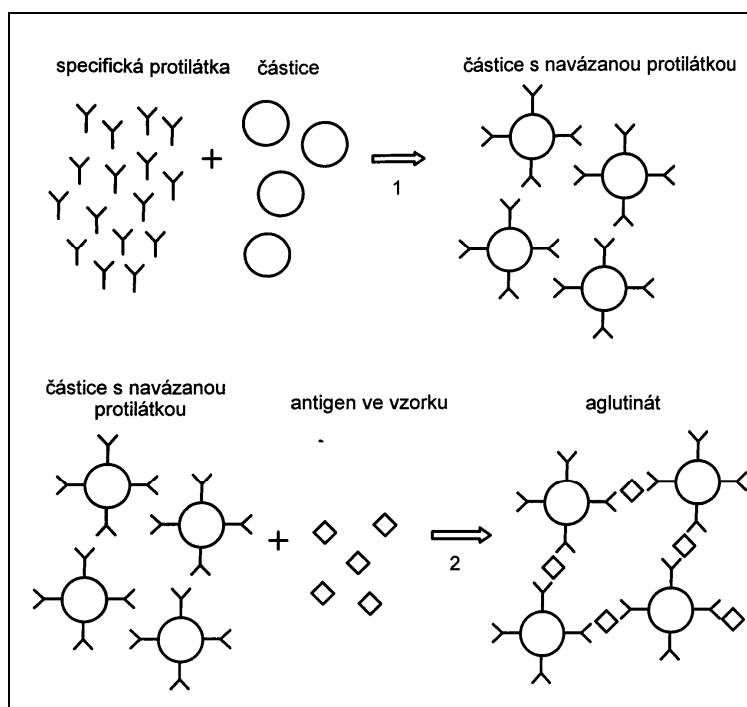
Obr. 9 Nepřímá aglutinace pro stanovení protilátky ve vyšetřovaném vzorku

1. reakce – antigen je adsorbován na povrch inertní částice
2. reakce – částice s navázaným antigenem jsou aglutinovány specifickými protilátkami přítomnými ve vyšetřovaném vzorku



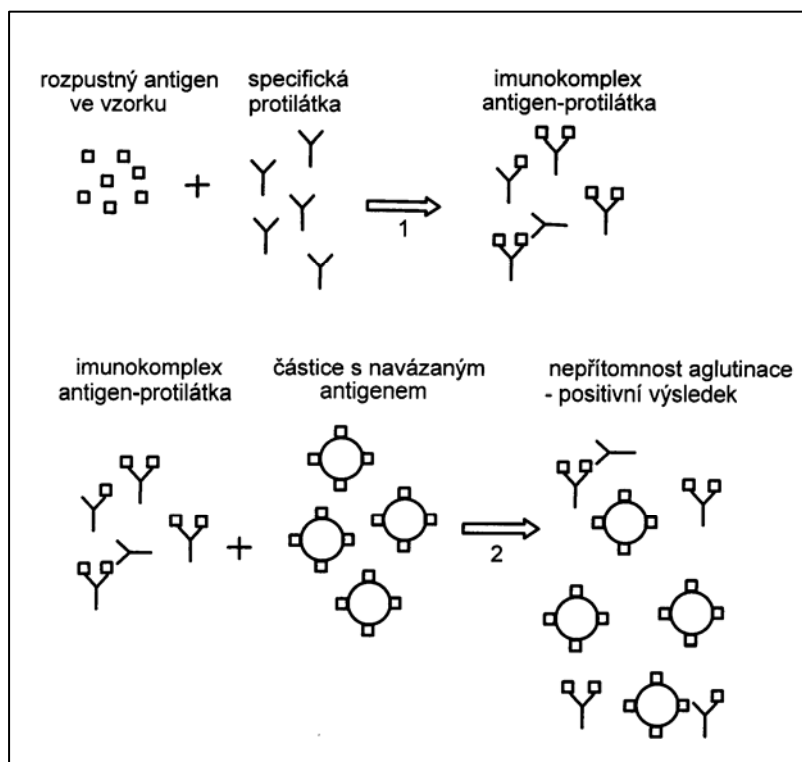
Obr. 10 Nepřímá reversní aglutinace pro stanovení antigenu ve vyšetřovaném vzorku

1. reakce – specifická protilátka je adsorbována na povrch inertní částice
2. reakce – částice s navázanou specifickou protilátkou jsou aglutinovány příslušným antigenem přítomným ve vyšetřovaném vzorku



Obr. 11 Inhibice aglutinace

1. fáze – ke specifickým protilátkám se přidá vzorek obsahující solubilní antigeny, které s nimi vytvoří imunokomplexy
2. fáze – po přidání suspence částic, na nichž je navázán antigen, nemůže dojít k aglutinaci, neboť vazebná místa protilátek byla obsazena v předchozí fázi solubilní formou antigenu



3.5. Imunoanalýza

Moderní imunoanalytické metody dosahují zvýšení citlivosti značením jedné z reagujících složek – antigenu nebo protilátky látkou, jejíž detekce je citlivější než průkaz imunoprecipitátu. Značkou může být vhodný **radioizotop** (radioimunoanalýza), **enzym** (enzymová imunoanalýza), **fluorescenční nebo chemiluminiscenční** látka (fluorescenční nebo chemiluminiscenční imunoanalýza), popř. další. Detekční limity těchto metod dosahují hodnot až 10^{-9} až 10^{-12} mol.

3.6. Enzymová imunoanalýza (EIA)

Enzymové imunoanalýzy jsou citlivé imunochemické metody, které využívají enzymů ke značení antigenu nebo protilátky. Jako enzymová značka slouží obvykle peroxidasa nebo alkalická fosfatasa.

Heterogenní enzymová imunoanalýza se označuje jako ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). V tomto typu metody je jedna komponenta imunochemické reakce (antigen nebo protilátka) nespecificky adsorbována na povrch pevné fáze. Jako pevné fáze se užívají různé materiály – zkumavky, jamky mikrotitračních destiček, magnetické částice. Pevná fáze usnadňuje oddělení vázaných a volných značených reaktantů.

Jako **homogenní enzymová imunoanalýza** je označována technika, která nevyžaduje oddělení vázané (v imunokomplexu) a volné značené protilátky nebo antigenu. Příkladem je metoda EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique). Její provedení je jednoduché a užívá se ke stanovení nízkomolekulárních látek (léků, hormonů a metabolitů). Vzorek obsahující stanovovaný antigen se smíchá se známým množstvím téhož antigenu s navázaným enzymem (konjugát) a příslušnou protilátkou

v omezeném množství. Při imunochemické reakci soutěží neznačený antigen s konjugátem o navázání na omezené množství protilátky. Při vazbě protilátky na konjugát se aktivní centrum enzymu může zablokovat nebo nastává konformační změna enzymové molekuly spojená se ztrátou aktivity. Čím je ve vzorku více neznačeného antigenu, tím více molekul protilátky s ním reaguje a tím zůstane zachováno více enzymové aktivity v konjugátu, který nevstoupil do imunochemické reakce. Enzymová aktivita je proporcionální koncentraci antigenu v neznámém vzorku.

Imunoanalytické metody využívají obvykle dva způsoby uspořádání - **kompetitivní a nekompetitivní**.

3.6.1. Kompetitivní enzymová imunoanalýza se značeným antigenem

Tato metoda se provádí **v nadbytku antigenu**. Se sérem, které obsahuje neznámé množství antigenu, se smíchá známé množství stejného antigenu značeného enzymem (konjugát). Antigen v séru nebo ve standardním roztoku a konjugát soutěží o vazebná místa **omezeného množství specifických protilátek** vázaných na pevné fázi. Neznačený antigen ve vzorku a značený antigen se vážou na protilátku ve stejném poměru jako byl jejich poměr v původní směsi; to znamená, že čím více neznačeného antigenu reakční směs obsahuje, tím méně značeného antigenu se naváže na protilátku a opačně (obr. 12). Za těchto podmínek je pravděpodobnost vazby protilátky se značeným antigenem nepřímě úměrná koncentraci neznačeného antigenu. Se zvyšujícím se množstvím neznačeného antigenu zůstává více značeného antigenu nenavázaného.

Po inkubaci jsou konjugát a neznačený antigen, které se nenavázaly na protilátku, společně s dalšími součástmi séra, odstraněny promytím.

V indikační reakci, pomocí níž se prokazuje enzymová aktivita vázaného konjugátu, se přidá chromogenní substrát reagující s enzymovou značkou. **Intenzita vzniklého zbarvení je nepřímě úměrná koncentraci antigenu** v sérovém vzorku. Výsledky získáme odečtením z kalibrační křivky, která je sestavena na základě standardních roztoků o známé koncentraci antigenu (obr. 13).

Uvedený princip je využíván pro určování koncentrací malých molekul s jednou antigenní determinantou jako jsou hormony (steroidy, thyreoidální hormony) nebo léky v biologických tekutinách.

3.6.2. Nekompetitivní enzymová imunoanalýza (sendvičové metody)

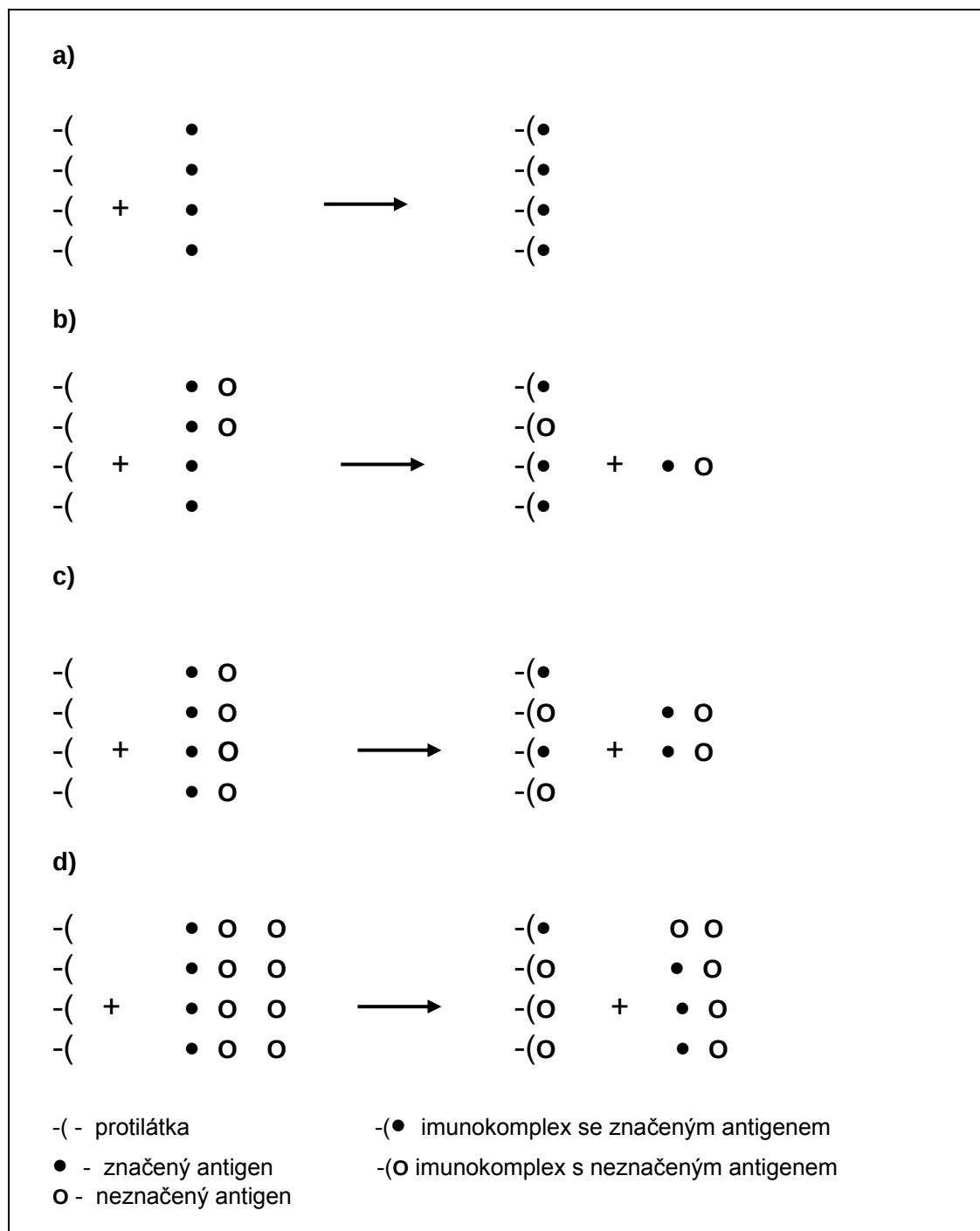
Tento typ enzymové imunoanalýzy se využívá ke stanovení antigenů nebo protilátek. Je to heterogenní imunoanalýza využívající pevnou fázi s navázanou protilátkou nebo antigenem, které musí být v nadbytku vzhledem k analysované látce."

3.6.3. Nekompetitivní enzymová imunoanalýza pro stanovení antigenů

Nekompetitivní enzymová imunoanalýza je vhodná pro stanovení velkých antigenů s několika epitopy (např. lidský choriový gonadotropin, α_1 -fetoprotein, celkový IgE). Pro provedení metody jsou nezbytné dvě různé protilátky namířené proti různým epitopům stanovovaného antigenu. První **protilátka je v nadbytku** navázaná na pevnou fázi. K imobilisované protilátce jsou přidány vyšetřované vzorky nebo standardy obsahující antigen. Dojde k první imunochemické reakci.

V průběhu inkubace se navazuje antigen na první protilátku. Vzhledem k tomu, že protilátky je nadbytek, všechny molekuly antigenu mají možnost se navázat. Po inkubaci jsou odstraněny promytím všechny nezreagované složky séra. V nadbytku je přidána druhá protilátka značená enzymem (je odlišná od první protilátky). Ta reaguje s dalším epitopem vyšetřovaného antigenu. Vzniká sendvičový komplex - navázaná protilátka na pevné fázi - antigen - protilátka značená enzymem. Po odstranění nezreagovaného konjugátu se přidá substrát. Po proběhnutí enzymové reakce změříme **absorbanci** produktu, která **je přímo úměrná množství antigenu** (obr. 14).

Obr. 12 Princip kompetitivních imunoanalys – různý poměr značeného a neznačeného antigenu

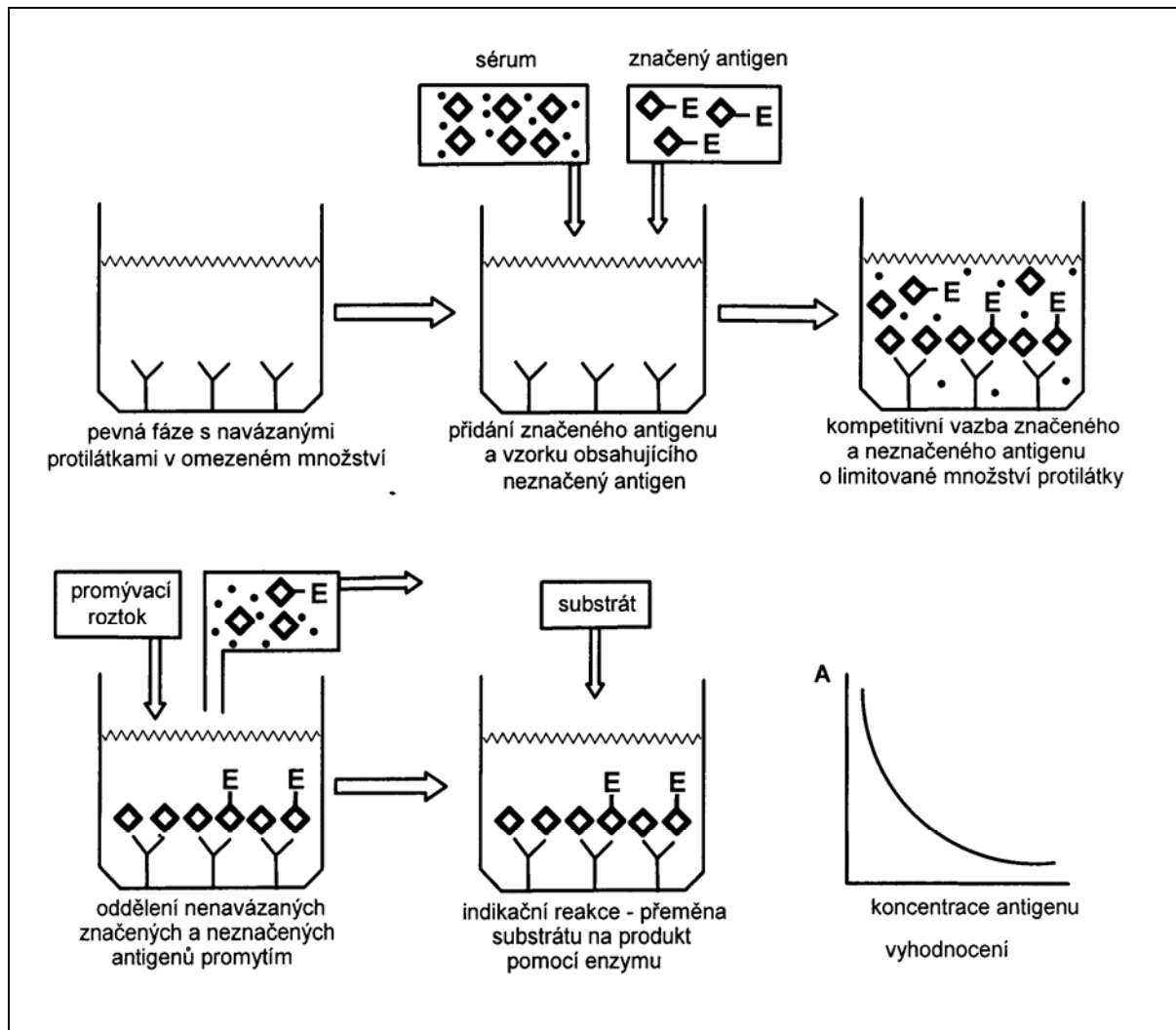


3.6.4. Nekompetitivní enzymová imunoanalýza pro stanovení protilátek

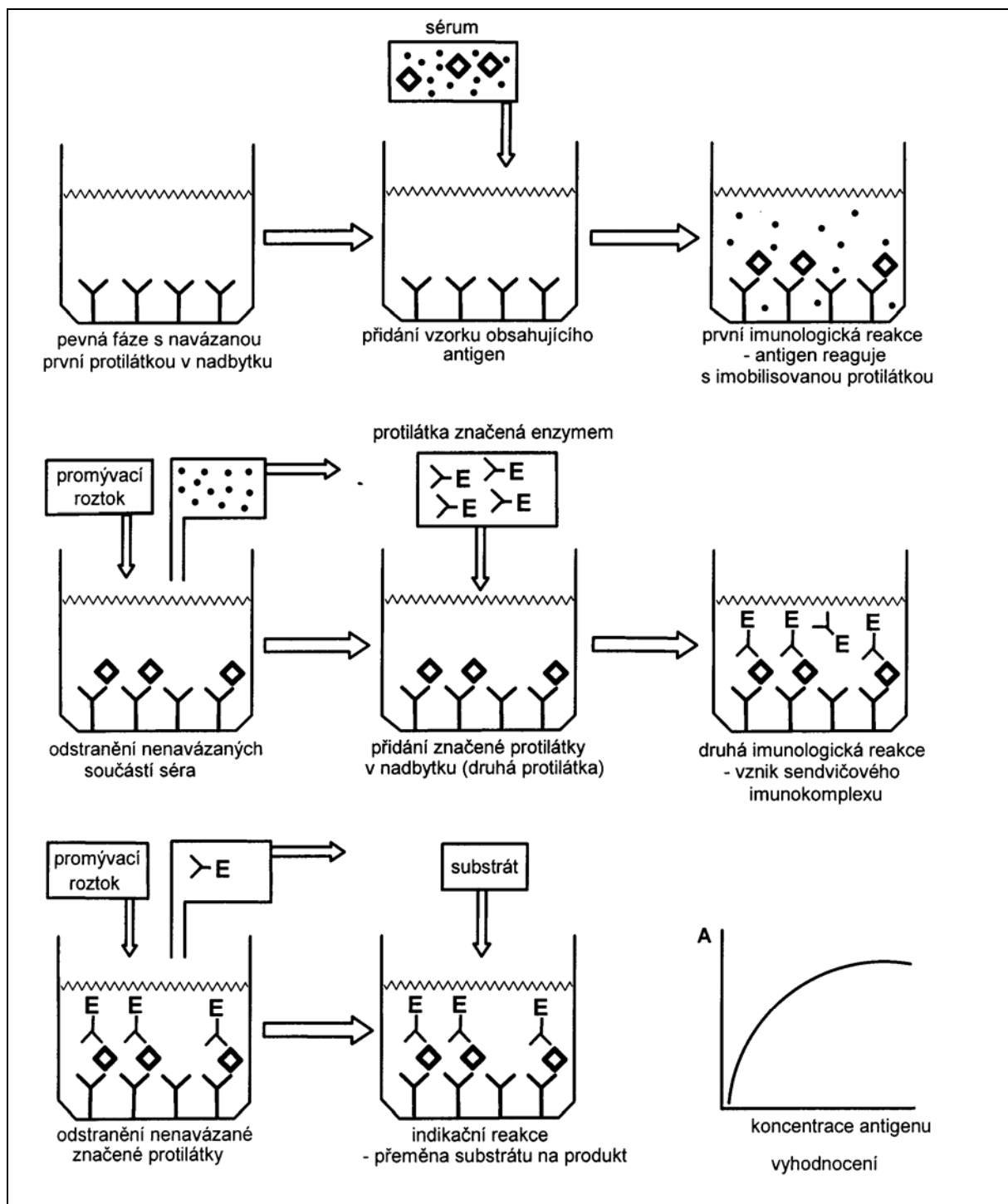
Využívá se především pro detekci specifických sérových protilátek např. proti virům a parazitům, autoprotilátek a specifických protilátek IgE proti jednotlivým alergenům. V tomto případě je na pevnou fázi navázán antigen (popř. alergen) v nadbytku. Po přidání vyšetřovaného vzorku nebo standardů reagují všechny specifické protilátky přítomné ve vzorku s imobilizovaným antigenem a vytvoří imunokomplex. Vzniklé imunokomplexy prokazujeme pomocí druhé protilátky proti lidským imunoglobulinům značené enzymem. Značené protilátky mohou být namířeny proti jednotlivým imunoglobulinovým třídám (IgG, IgA, IgM či IgE). Rozlišení třídy specifické protilátky může mít význam např. pro určení fáze infekčního

onemocnění (např. IgM v časně fázi a IgG v pozdější fázi). Další postup je podobný jako v případě stanovení antigenů (obr. 15).

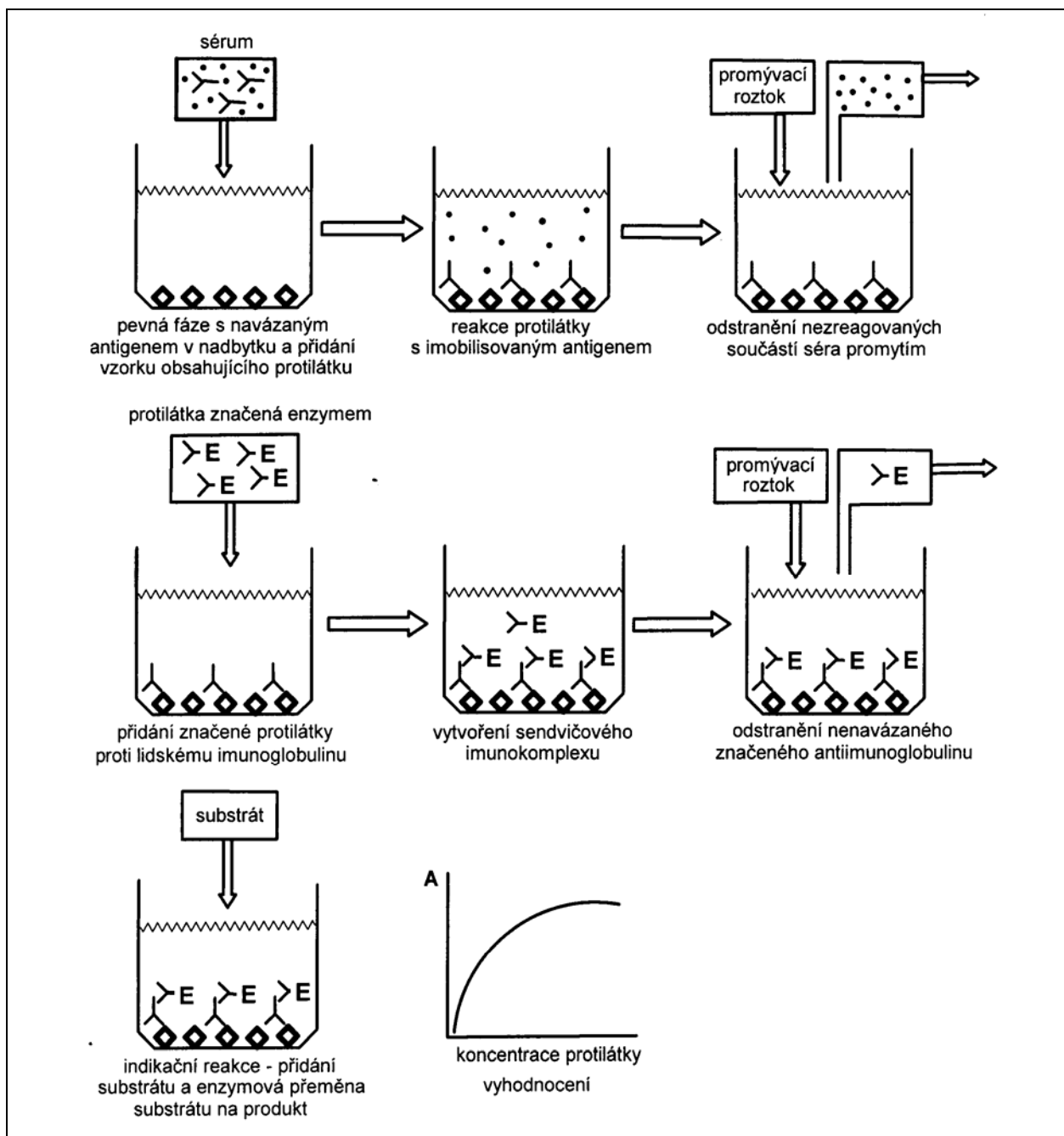
Obr. 13 Kompetitivní enzymová imunoanalýza



Obr. 14 Nekompetitivní enzymová imunoanalýza pro stanovení antigenu



Obr. 15 Nekompetitivní enzymová imunoanalýza pro stanovení protilátky



3.7. Využití imunochemických metod v rychlé diagnostice

Důležitou oblastí uplatnění imunochemických metod jsou testy určené ***k rychlé orientační diagnostice v terénu nebo u lůžka nemocného na principu tzv. suché chemie***. Reagencie jsou zakotveny v pórovitém materiálu, který je připevněn na podložce z plastu nebo je vložen do plastového rámečku s otvory pro nanášení vzorku a odečítání výsledků. Testy využívají různého uspořádání a průběhu imunochemické reakce. Příkladem může být stanovení lidského choriového gonadotropinu (hCG) k průkazu těhotenství nebo troponinu T v diagnostice infarktu myokardu či průkaz drog v biologickém materiálu.

3.7.1. Příklady metod rychlé imunochemické diagnostiky

Stanovení přítomnosti drog v moči nebo ve slinách

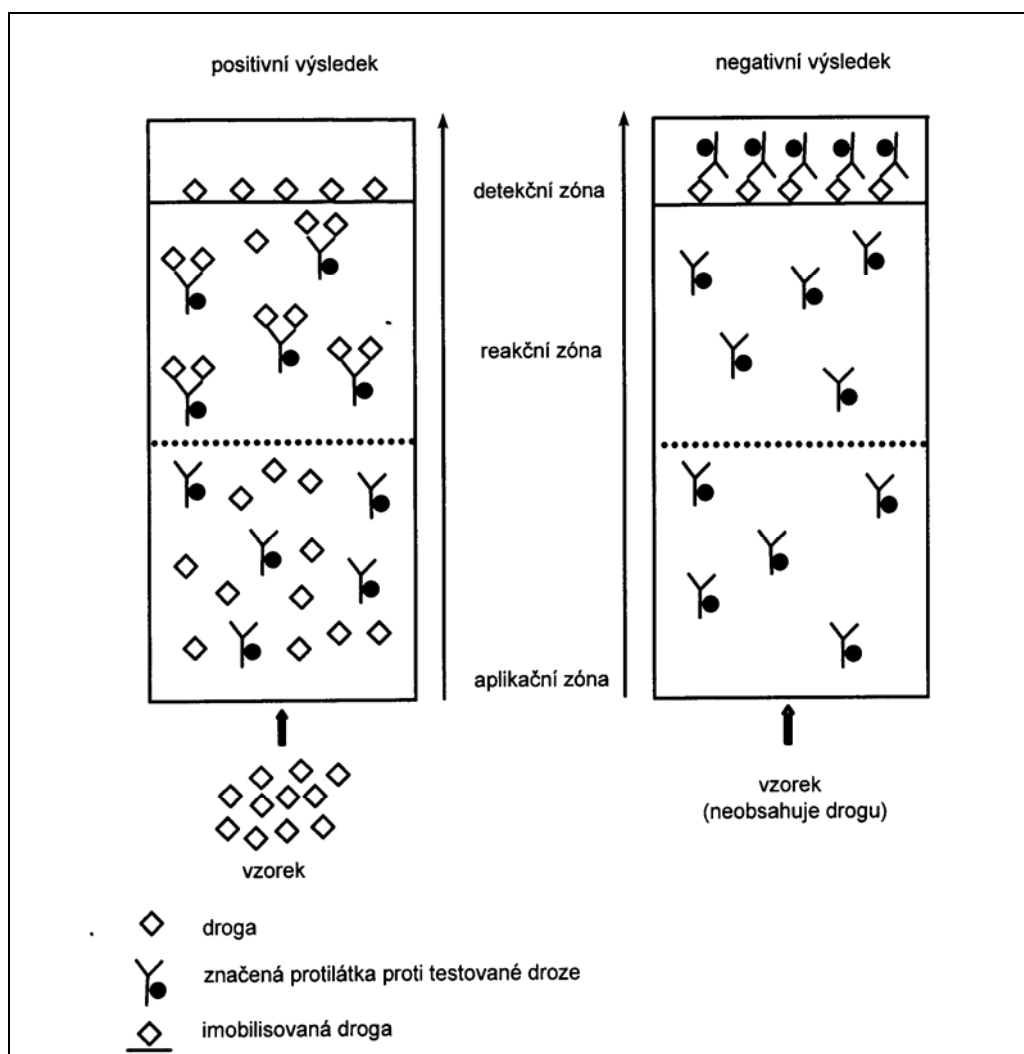
Jeden z principů spočívá v *soutěži mezi drogou ve vyšetřovaném vzorku a konjugátem drogy*, který je imobilisován v detekční zóně proužku *o omezené množství specifické protilátky*. Vzorek putuje reakční zónou obsahující specifické protilátky navázané na barevné mikročástice, které se v průběhu reakce mobilisují. Moč i rehydratované značené protilátky postupují reakčním proužkem a v detekční zóně se setkají se zakotvenými konjugáty drogy (obr. 16).

Pokud vyšetřovaný **vzorek obsahuje drogu**, vazebná místa barevně označených protilátek jsou jimi saturována a nemohou se tedy navázat na imobilisované konjugáty drogy. Barva detekční zóny zůstane nezměněna a výsledek je odečítán jako pozitivní (obr. 16).

V nepřítomnosti drogy ve vyšetřovaném vzorku jsou značené protilátky zachyceny imobilisovaným konjugátem drogy. V detekční zóně se vytvoří barevný proužek, který znamená negativní výsledek (obr. 16).

Pro rychlou diagnostiku jsou k dispozici testy pro stanovení jedné drogy nebo pro současné stanovení několika drog. Tímto způsobem lze v současnosti prokázat nejčastěji užívané drogy - amfetamin, metamfetamin, barbituráty, benzodiazepiny, kannabinoidy, kokain, opiáty, fencyklidin, tricyklická antidepresiva.

Obr. 16 Příklad rychlého orientačního průkazu drog v moči



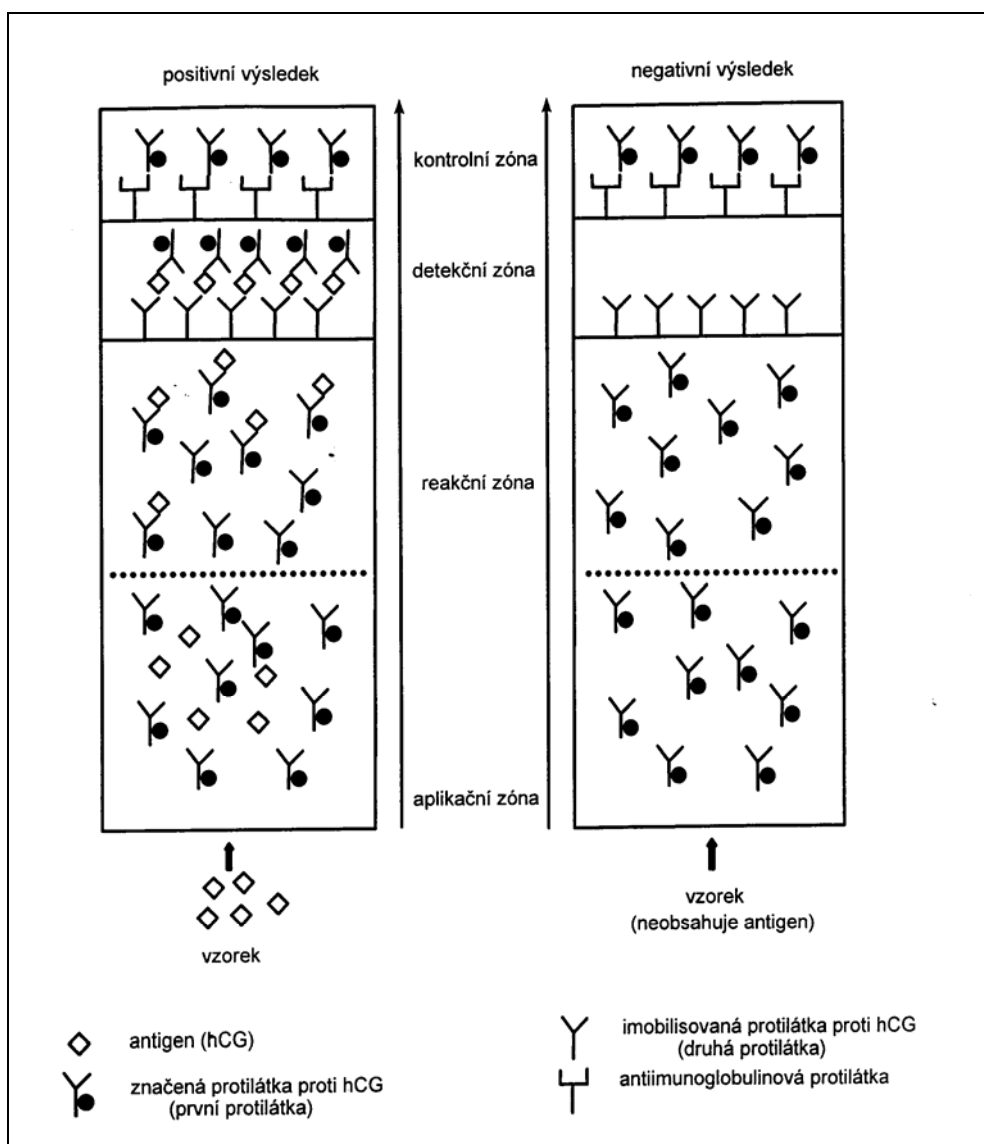
Stanovení lidského choriového gonadotropinu (test na detekci gravidity)

V poresní membráně testovacího proužku jsou tři zóny protilátek. Aplikační zóna proužku obsahuje **první specifickou protilátku proti hCG značenou** např. mikročasticemi koloidního zlata nebo modrým latexem (Ab1). Po ponoření proužku do vzorku moči je značená protilátka mobilisována močí a difunduje k druhé (detekční zóně), ve které je zakotvena **druhá specifická protilátka proti hCG** (Ab2). Pokud je v moči přítomen lidský choriový gonadotropin, vytvoří s první značenou protilátkou imunokomplex, který je zachycen druhou protilátkou imobilizovanou v detekční zóně. V místě vytvoření sendvičového imunokomplexu (Ab2-hCG-Ab1) vznikne barevný proužek. Přebytek nezreagované první protilátky je zachycen ve třetí (kontrolní) zóně, v níž jsou imobilisovány protilátky proti anti-hCG protilátce. Vznik druhého barevného proužku (kontrolní linie) znamená, že test správně funguje (obr. 17). Dva barevné proužky odečítáme jako **pozitivní výsledek**.

V případě, že moč neobsahuje hCG, je značená protilátka zachycena až ve třetí zóně. Vývin jednoho proužku v kontrolní zóně znamená **negativní výsledek**. Pokud by se v kontrolní zóně nevytvořil barevný proužek, je třeba výsledek testu pokládat za neplatný.

Některé testy jsou uspořádány tak, že kontrolní proužek tvoří vodorovnou linii - (minus) a detekční zóna má vertikální směr a protíná kontrolní linii, takže výsledkem je znaménko + (plus).

Obr. 17 Příklad rychlého orientačního průkazu hCG v moči



Použitá literatura

Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. IDVPZ, Brno, 1995.
Ferenčík M.: Imunochémia. Alfa, Bratislava, 1989.
Kaplan L.A., Pesce A.J.: Clinical Chemistry, 3rd edition, Mosby, 1996
Soubor návodů Sebia. A.L. Instruments.