

543.436:621.378.33:612.124:543.062

IMUNONEFELOMETRICKÉ STANOVENÍ PLAZMATICKÝCH BÍLKOVIN

Npor. MUDr. Tomáš VOTRUBA

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlář, CSc.)

Jednou z nejmodernějších kvantitativních imunochemických metodik je laserová nefelometrie. Využívá principu měření světla rozptýleného na zákalových částicích. Vlastní princip je znám již mnoho desetiletí. Ve většině spektrofotometrů byly a dosud jsou zamontovány nefelometrické nástavce, ale efektivnost většiny takovýchto zařízení je velmi nízká a přesnější měření nedovoluje. Důvodem je především charakter světelného zdroje. Proto účinné technické ztvárnění bylo možné až po zavedení laserů do běžné laboratorní měřicí techniky. V současné době je komerčně dostupno asi 9 přístrojů, na kterých je možno provádět tato měření. Jde buď o nefelometry jako takové (Beckman Immunochemistry Analyzer, Hyland PDQ-TM, LSA 290 Kallestad, Behring Laser Nephelometer), nebo jde o víceúčelové centrifugační analyzátory (LKB 8600 Clinicon, Abbot ABA 10, GEMSAEC Centrifugal Analyzer, CentrifChem System 400, Technicon Autoanalyzer II). Pro výzkumnou práci a paralelní rutinní vyšetření se nejvíce hodí přístroj firmy Hyland, který vlastní i naše oddělení.

Vlastní princip práce přístroje je jednoduchý. Světlo z laserového zdroje prochází kyvetou, kde na částicích tvořených nerozpustnými komplexy antigen-protilátka se rozptýlí, rozptýlené světlo je zaznamenáno fotonásobičem a převedeno na číselný údaj na digitálním displeji. Touto metodou lze stanovit prakticky vše, proti čemu lze připravit protilátku. Dnes se tak běžně stanovují plazmatické bílkoviny, antibiotika, některé léky, např. opiáty, drogy a další.

Principem — vlastní reakcí — je reakce an-

tigen-protilátka v prostředí nadbytku protilátky, kdy dochází k vytváření nerozpustných komplexů, jejichž množství, a tedy množství rozptýleného světla, je úměrné množství antigenu. Závislost je široce parabolická a při zvolení vhodných podmínek je dosti přesně extrapolovatelná lineární závislostí. Z toho je vidět, že na volbě a hlavně dodržení přesných podmínek velmi mnoho záleží. Jsou kladeny značné požadavky na reagenty obecně. Citlivost přístroje vyžaduje naprosto bezprašné reakční prostředí, proto je nutné reakční složky předem filtrovat přes membránové filtry. Antigen, nejčastěji lidské sérum, se do reakce značně ředí, 10krát až 200krát (pro albumin ještě mnohem více), proto požadavky nejsou tak přísné — sérum ovšem nesmí být lipemické; přítomnost barviv stanovení neruší, hemolytická i ikterická séra jsou plně použitelná. Daleko větší nároky je nutno splnit u pufrujícího prostředí a protilátky. Jako reakční médium používáme fosfátem pufrovaný fyziologický roztok s přísadou detergentů a polyetylglykolu průměrné molekulové hmotnosti 6000, což zaručuje stálost a neměnnou heterogenost zákalu. U antisér je vyžadována vysoká avidita a vysoký obsah specifických protilátek. To znamená v praxi celou řadu problémů. Komerčně dostupná antiséra z produkce Ústavu sér a očkovacích látek jsou určena pro aplikaci v jiných imunochemických technikách, a jsou proto nepoužitelná. Mají pro tuto techniku nízkou koncentraci specifických protilátek a technologický postup přípravy je pro požadavky a nároky imunonefelometrie nevyhovující. Protože zásobování pomocí zahraničních souprav nepřichá-

zí v úvahu, museli jsme tuto otázku vyřešit samostatně. Na základě dlouhodobých dobrých vztahů se střediskem imunochemie sérových bílkovin Ústavu sér a očkovacích látek v Praze jsme získali surová prasečí hyperimunní séra, která jsme pak speciální náročnou technologií opracovali a získali tak nakonec lyofilizovaný preparát, stálý po velmi dlouhou dobu, který svou kvalitou vyhovuje pro práce na laserovém nefelometru.

Je třeba podotknout, že antiséra z produkce ÚSOL jsou vyráběna na prasatech, což ve srovnání s jinými zvířecími druhy není příliš výhodný druh pro tuto techniku, protože se nikdy nedosáhne té avidity jako např. při imunizaci koz. Zvolili jsme však pracovní podmínky tak, abychom mohli pracovat v tom rozsahu, v jakém se pracuje se soupravami zahraniční provenience. Celkově lze shrnout, že tato technika patří mezi velmi přesné, ale mimořádně náročné na dodržení přesných reakčních podmínek.

Jaké jsou přednosti této metody? V tabulce 1 je srovnání užívaných technik pro imunochemická stanovení plazmatických bílkovin. Jde o jednoduchou radiální imunodifúzi, elektroimunostanovení dle Laurella („raketky“), imunonefelometrii dvou typů (kinetické měření tzv. rate, měření koncového stavu tzv. end-point) a radioimunostanovení. Ze srovnání plynou výhody nefelometrie. V případě RIA lze dosáhnout vyšší citlivosti, ale přesnost je podstatně menší, protože u RIA techniky je velký rozptyl výsledků. Velkou nevýhodou RIA je také vysoká pořizovací cena techniky a problematika pracovního režimu. Významným faktorem je pracovní čas, který v případě nefelometrie je nejkratší vůbec. Vedle toho dovoluje nefelometrii ve srovnání s jednoduchou radiální imunodifúzí a elektroimunodifúzí nejširší rozsah stanovovaných hodnot, aniž je třeba měnit pracovní podmínky a nastavení přístroje. Nefelometrická technika je také automatizovatelná. V prvním stupni je možno zařadit výpočetní techniku. Firma sama dodává k nefelometru malý stolní počítač Hewlett-Packard 9815, který významně zrychlí a hlavně zpřesní fázi vyhodnocování výsledků. Další fází je automatizace přípravy vzorků. Výrobce sestavil systém nazývaný DISC 120, který umožňuje plnoautomatický provoz s hodinovou kapacitou až 120 vzorků. Takovýto systém má však opodstatnění jen ve velkých laboratořích, kde se provádějí vyšetření počítaná denně na desítky až stovky.

A nyní ke spektru práce oddělení klinické a experimentální imunologie. Vyšetření provádíme pro potřeby odborných oddělení Ústřední vojenské nemocnice v Praze. V tabulce 2 jsou schematicky shrnuta prováděná vyšetření. První sloupec zachycuje plazmatické bílkoviny, které je možno stanovovat pomocí zahraničních souprav a které také naše oddělení stanovuje pomocí antisér našich s výsledky plně srovnatelnými. Druhý sloupec zachycuje bílkoviny,

Tab. 1

Srovnání nefelometrické metody s ostatními metodami stanovování hladin plazmatických bílkovin

	citlivost mg/l	čas	přes- nost %	repro- duk. %	auto- mat.
JRID	1	1—3 d	10—50	10	ne
EID	1	6—36 h	10	5	ne
INA rate	<1	<1 min	2	2	ne
INA end	<1	20 m—4 h	5	5	ano
RIA	0,01	3 h—5 d	—	—	ano

JRID — jednoduchá radiální imunodifúze

EID — elektroimunostanovení dle Laurella

INA — imunonefelometrické stanovení

rate — kinetická metoda

end — metoda koncového bodu

RIA — radioimunostanovení

Tab. 2

Přehled plazmatických bílkovin stanovovaných komerčními preparáty zahraniční provenience a imunologickým oddělením VÚHEM

IMUNOL. ODD. ZAHR. FIRMY	IMUNOL. ODD.	ZAHR. FIRMY
imunoglobulin A imunoglobulin G imunoglobulin M C3 komplement C4 komplement transferin α 1antitrypsin orosomukoid ceruloplasmin α 2makroglobulin prealbumin β 2lipoprotein	β 2mikroglobulin α 2APglykoprotein imunoglobulin D C1q komplement	CRP RF hemopexin albumin C1 inhibitor C3 aktivátor α 1fetoprotein

které na našem oddělení stanovujeme, ale pro které dosud ve světě nejsou komerčně dostupná antiséra pro nefelometrii (a pokud je nám známo z literatury, dosud tyto bílkoviny nikdo nefelometricky nestanovoval). Konečně třetí sloupec zahrnuje bílkoviny, které je možno stanovovat zahraničními preparáty a pro které my vlastní protilátky nemáme. Naši snahou bude v dalším si připravit antiséra i proti těmto antigenům a rozšířit tak paletu vyšetření. Za prvořadý úkol považujeme stanovování C-reaktivního proteinu a revmatoidního faktoru. CRP je významným reaktantem akutní fáze, mnohem signifikantnějším než např. vyšetření sedimentace. Stanovování revmatoidního faktoru bychom převedením na nefelometrické měření zpřesnili a učinili vysoce reprodukovatelným.

První provedené pokusy jsou dosti slibné. Dalším polem, kde by bylo možno přístroj využít, je stanovování cirkulujících imunokomplexů, významného laboratorního údaje v diagnostice autoimunních onemocnění. Pracujeme na metodice, která by nám umožnila měření specifického zákalu vytvářeného imunními komplexy a C1q složkou komplementu. Konečně také slibnou se jeví spolupráce s oddělením klinické biochemie Ústřední vojenské nemocnice při stanovování apolipoproteinů A-I a B, velmi důležitých parametrů posouzení otázek lipidového metabolismu a hlavně prevence náhlých příhod srdečních.

Souhrn

Článek shrnuje základní možnosti a laboratorní aplikace moderní imunonefelometrické metody stanovení plazmatických bílkovin. V článku jsou srovnány možnosti této techniky s ostatními imunochemickými metodami. Je uveden přehled bílkovin stanovovaných na pracovišti autora.

Literatura

1. Ritchie, R. F.: Theory and practice of automated nephelometry. In: *Protides of Biological Fluids*, 21st Colloquium, Brugge, 1973. New York, H. Peeters, (ed.) Pergamon Press 1974.
2. Ritchie, R. F.: Specific proteins assays. *Fed. Proc.*, 34, 1975, s. 2139—2144.
3. Ritchie, R. F.: *Automated Immunoanalysis*, Ritchie, R. F. (ed.), díl 1. Marcel Dekker, New York, Basel 1978.
4. Iverius, P. H. - Laurent, T. C.: Precipitation of some plasma proteins by the addition of dextran and PEG. *Biochim. biophys. Acta*, 133, 1967, s. 371—378.
5. Blom, M. - Hjerne, N.: Profile analysis of blood proteins with a centrifugal analyzer. *Clin. Chem.*, 5, 1976, s. 657—672.
6. Peracino, A. - Marcovine, S. - Fenili, D.: Immunonephelometric and immunoturbidimetric techniques for plasma protein evaluation. *Ric. clin. Lab.*, 8, 1978, Suppl. 1, s. 113—137.
7. Wider, G. et al.: Survey of a new nephelometric system. *Ric. clin. Lab.*, 12, 1982, s. 313—322.

Klíčová slova: Imunonefelometrie; Stanovování plazmatických bílkovin; Specifická antiséra pro nefelometrii.