

616-074-097:577.1[:616]

IMUNOCHEMICKÉ METODY A JEJICH VYUŽITÍ V KLINICKÉ BIOCHEMII

RNDr. Miloš TICHÝ, CSc.

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP, Hradec Králové
(náčelník: genmjr. prof. MUDr. J. Vaňásek, CSc.)

Úvod

Pojem imunochemie poprvé použil švédský chemik Arrhenius v r. 1907. Imunochemii můžeme definovat takto: imunochemie zkoumá chemii antigenů a protilátek a mechanismus jejich interakce (8). Antigeny jsou látky, které jsou schopné vyvolat v reaktivním organismu specificky proti sobě namířenou imunitní odpověď. Determinantní skupiny na povrchu antigenu mohou in vitro reagovat se specifickou protilátkou, která se vytvořila v reaktivním organismu. Vlastnost antigenů má řada biologicky významných látek, i chemicky jednoduché látky, tzv. hapteny, které se stávají imunogenní až po vazbě na bílkovinný nosič. Předpokládá se, že vazebné místo protilátky je strukturálně doplnitelné determinantní skupinou antigenu. Je tím podmíněna vysoká specifičnost imunologických metod, které umožňují stanovení i nepatrného množství bílkovinných i nebílkovinných látek bez předchozí izolace. K velkému rozvoji imunochemie došlo v posledních dvaceti letech, kdy na počátku 70 let vyvrcholily

studie o imunoglobulinech, které se staly molekulární bází imunochemie.

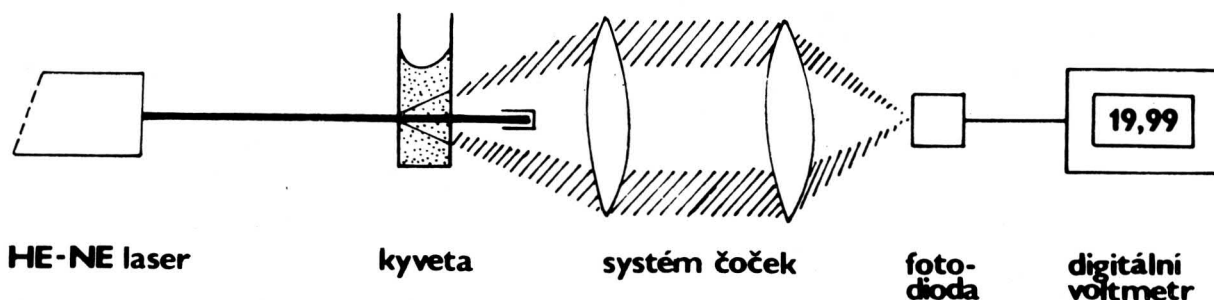
Imunochemie je typickou mezioborovou disciplínou. Tvoří rozhraní mezi imunologií a chemií, ale je úzce spojená i s jinými obory, jako jsou molekulární biologie, mikrobiologie, biofyzika. Imunochemie zasahuje nepřímo i do jiných vědních oborů a to tak, že tyto modifikují a využívají její určité metody. Jako příklad můžeme uvést právě klinickou biochemii, která využívá řadu jak klasických, tak i nejmodernějších imunochemických metod s velkou výhodou. Předmětem tohoto sdělení je podat stručný přehled imunochemických metod, používaných v současné klinické biochemii.

Přehled imunochemických metod

Mezi imunochemické metody (11) používané v klinické biochemii obvykle zahrnujeme jednak metody využívající skutečně imunochemických reakcí, především reakce mezi antigenem a specifickou protilátkou, jednak metody používané k izolaci a charakterizaci bílkovin. Jsou

První práce o nefelometrickém stanovení bílkovin jsou starší dvaceti let, ale nové jednoduché metody jako radiální imunodifúze nebo elektroimunostanovení zasunuly tuto metodu do pozadí. Znovu byl o ni obnoven zájem v r. 1975 s vyvinutím laserového nefelometru. Smícháme-li zředěné roztoky antigenu a protilátky, dojde k tvorbě malých agregátů a tím k zakalení roztoku. Zakalení můžeme měřit na základě rozsahu rozptylu světla. Vysoké citlivosti dosahujeme buď použitím monochromatického světla z laseru, nebo přidáním polyetylglykolu, čímž zvětšíme tvorbu agregátů (obr. 2).

nosičích, především na gelu acetylované celulózy, na agaróze, na polyakrylamidovém gelu. Velkého významu zřejmě dosáhne v klinické laboratoři dvojrozměrná gelová elektroforéza, která dovoluje např. v plazmě identifikovat až 128 bílkovin [15]. V moderní klinicko-biochemické laboratoři se začíná prosazovat izoelektrická fokusace, umožňující dělení podle izoelektrického bodu bílkovin, v gradientu pH na polyakrylamidovém gelu nebo na agaróze. Umožňuje demonstrovat mikroheterogenitu imunoglobulinů. Využívá se též k dělení izoenzymů, např. izoenzymů kreatinkinázy, které se



Obr. 2. Princip měření na laserovém nefelometru — laserový paprsek prochází kyvetou s antigen-protilátkovým komplexem, systémem čoček je soustředěn na fotodiodu a signál z fotodiody je pak indikován na voltmetru

Další imunochemickou metodou používanou v klinických laboratořích je hemaglutinační inhibiční stanovení. Např. test na stanovení morfia na tomto principu popsali již v r. 1971 Adler a Liu [1]. Jde o jednoduchý test — prasečí erytrocyty obalené krysím albuminem s navázaným morfiem jsou aglutinovány antisérem proti morfiu. Jestliže přidáme moč, která obsahuje morfium, naváže se morfium na toto antisérum a inhibuje aglutinaci. Tato stanovení jsou velmi jednoduchá, dají se automatizovat a citlivostí se vyrovnají RIA.

Přibývá metodik na stanovení enzymů na imunochemickém principu. Jako příklad můžeme uvést stanovení izoenzymů kreatinkinázy sety fy. Merck, které využívají imunoinhibice — k séru přidáme antisérum proti svalové frakci CK-MM a určíme zbývající aktivitu srdeční a mozkové frakce.

V r. 1969 byla popsána metoda imunofixace k rychlé identifikaci M-gradientu v elektroforeogramech. Po elektroforetickém rozdělení bílkovin jsou na gel aplikována specifická antiséra. Antigen vytvoří s příslušným antisérem imunitní komplex, který je nerozpustný a lze identifikovat barvením. Při jiné modifikaci je na elektroforeogram aplikována membrána acetylované celulózy s nasátým antisérem, do ní difunduje antigen z dělicího gelu a barvíme vzniklý imunoprecipitát. Mluvíme pak o „imunotisku“ (imunoprint), [9].

K metodám imunochemickým se často v praxi přiřazují metody používané k průkazu dysproteinemí a imunologických onemocnění. Jsou to především metody elektroforetické na různých

při izoelektrické fokusaci rozdělí až na 7 frakcí oproti třem při běžné elektroforéze.

Přehled imunochemických metod podle citlivosti je na tab. 1. Nejcitlivější jsou metody RIA, enzymoimunoanalýza, pasivní hemaglutinace; citlivostí se jim blíží raketková imuno elektroforéza.

Využití imunochemických metod v klinicko-laboratorní diagnostice

Využití imunochemických metod v klinické biochemii je široké a nabývá postupně na významu. Moderní elektroforetické metody umožňují stále citlivější analýzu změn bílkovinného spektra séra. Na obr. 3 je ukázka elektroforézy séra se zdvojenou paraproteinémií (dva drobné M-gradients v zóně gamaglobulinů) IgM a IgG na acetylované celulóze. Obr. 4 demonstruje elektroforézu séra a moče na agaróze; byl prokázán drobný gradient raritního monoklonálního IgD. Jeho imuno elektroforetický průkaz je na obr. 5, na kterém jsou zřetelné typické deformace precipitačních linií. Imuno elektroforéza patří stále k základním imunochemickým metodám používaným v laboratořích klinické biochemie [13].

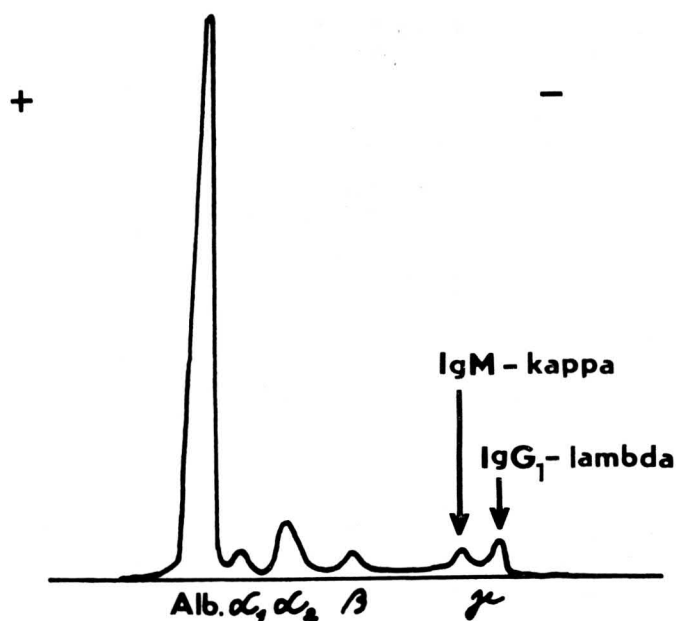
Své použití si v klinické biochemii zachovává i Ouchterlonyho metoda dvojité imunodifúze, např. při určení podtříd monoklonálních IgG (obr. 6).

Dnes velmi rozšířené imunodifúzní metody (tab. 2) — zejména jednoduchá radiální imunodifúze a elektroimunodifúze [11], umožnily

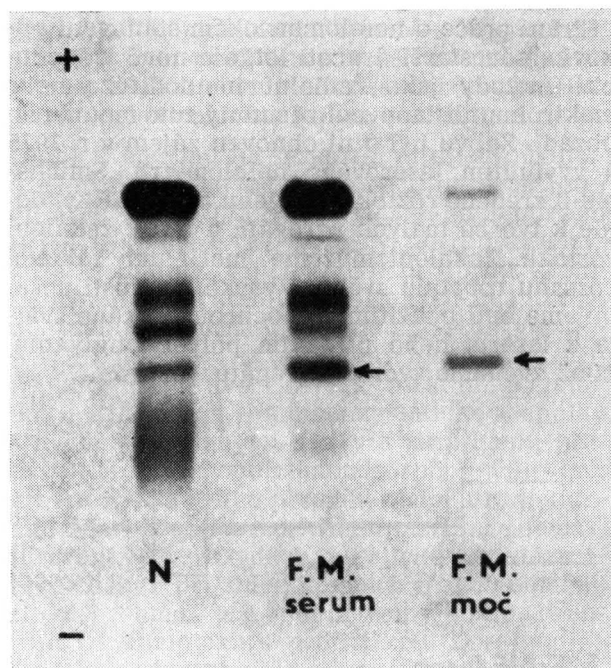
Tab. 1

METODA	$\mu\text{g/ml}$
PRECIPITACE V KAPALNÉM PROSTŘEDÍ	10 - 20
PRECIPITACE V AGAROVÉM GELU	
jednoduchá ve zkumavce	5 - 10
jednoduchá radiální	5 - 10
dvojitá	10 - 20
imunoelktroforéza	10 - 30
dvojnásobná imunoelktroforéza	0,02 - 2,0
raketa imunoelktroforéza	0,1 - 0,5
radioimunoelktroforéza	0,001 - 0,01
AGLUTINACE	
bakteriální antigen	0,01 - 0,1
erytrocytární antigen	0,1 - 0,2
pasivní hemaglutinace	0,005 - 0,02
VAZBA KOMPLEMENTU	0,1 - 0,5
VAZBA NA IMUNOADSORBENT	10 - 20
RADIOIMUNOSTANOVENÍ	0,0001 - 0,1
IMUNOENZYMATICKE STANOVENÍ	0,01 - 0,1
NEUTRALIZACE BAKTERIOFAGA	0,0001 - 0,001
PASIVNÍ KOŽNÍ ANAFYLAXE	0,02 - 0,05

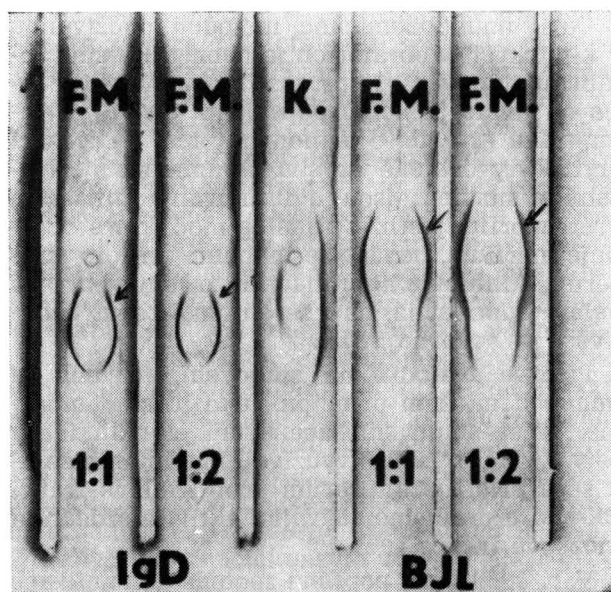
Ferenčík, M.: Imunochemie, Bratislava, 1980

Obr. 3. S.F., 77 let, dg. fakultativní monoklonální gamapatie IgM-kappa a IgG₁-lambda. Elektroforeogram s densitometrickým záznamem a s vyznačením gradientů monoklonálních imunoglobulinů

rutinní stanovení celé řady bílkovin krevní plazmy, především imunoglobulinů. Jejich kvantitativní stanovení nabylo na významu u mnoha onemocnění, která mohou být provázána buď zvýšením koncentrací polyklonálních imunoglobulinů [tab. 3], nebo nálezem deficitu jedné nebo více imunoglobulinových tříd [tab. 4], [3]. Svůj diagnostický význam má kvantitativní stanovení dalších složek bílkovinného spektra séra. S postupným rozšířením laserové

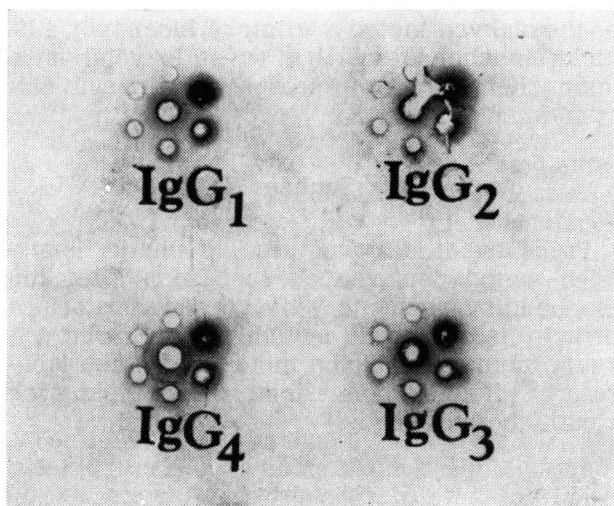


Obr. 4. F.M., 52 let, dg. mnohočetný myelom IgD-lambda. Elektroforéza séra a moče na acetylované celulóze (N = normální sérum)



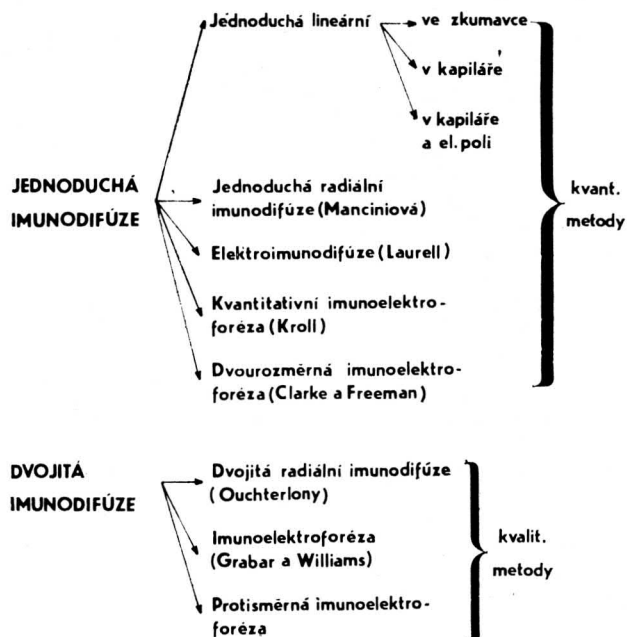
Obr. 5. F.M., 52 let, dg. mnohočetný myelom IgD-lambda. Imunoelktroforéza séra, šipkou vyznačena typická deformace precipitačních linií

nefelometrie nebo imunoturbidimetrie jsou zaváděna stanovení imunokomplexů, apolipoproteinů, revmatoidních faktorů. Dochází k rozvoji tak potřebné kvalitativní analýzy bílkovin moče [6], především elektroforézou na agaróze a na polykrylamidovém gelu. K dokonalejší diagnostice typu proteinurie přispívá stanovení beta-2 mikroglobulinu hlavně metodou RIA. Průkaz specifických nádorových antigenů, i když zatím zůstává v klinické praxi omezen



Obr. 6. Ukázka dvojité imunodifúze podle Ouchterlonyho, použité pro stanovení podtřídy IgG. Serum ředěné 1:8 až 1:256, pozitivní precipitační linie s antisérem proti IgG₄

Tab. 2



na stanovení alfa-1 fetoproteinu a karcinoembryonálního antigenu, má nesporný diagnostický význam. Je to především zásluhou citlivějších metod, což demonstrujeme na stanovení alfa-1 fetoproteinu. Jednotlivá imunochemická stanovení alfa-1 fetoproteinu s uvedením citlivosti metody jsou na tab. 5. Zatímco jednoduchá radiální imunodifúze je prakticky nepoužitelná, elektroimunodifúze již může určit koncentrace kolem 500 ng/ml. V současnosti používané metody RIA, enzymoimunoanalýza a laserová nefelometrie jsou schopny stanovit koncentrace kolem 1 ng/ml. Diagnostický význam tohoto zcitlivění metodik vyplývá z tab. 6.

RIA metody a v posledních letech mnohem

Tab. 3

Kategorie nemocí s polyklonálním zvýšením Ig	
Kategorie	Příklady
Infekční onemocnění	subakutní nebo chronické infekce
Kolagenózy	Revmatoidní artritida, Sjögrenův syndrom, SLE
Onemocnění jater	Chronická aktivní hepatitida
Nádory	Lymfomy
Ostatní chronická zánětlivá onemocnění	

Tab. 4

Příklady nemocí se snížením všech nebo některých tříd Ig				
Onemocnění	IgG	IgA	IgM	IgE
Některé kombinované imunodeficiency (Švýcarský typ)	↓	↓	↓	
Ataxia telangiectasia	N	↓	↑	↓
Nefrotický syndrom	↓	↓ nebo N	N	
Myotonická dystrofie	↓	N	N	N
Různé přidružené hypogamaglobulinémie	↓	↓	↓	↓
Wiskott - Aldrich syndrom	N	↑	↓	↑

výhodněji i enzymoimunoanalýza slouží ke sledování koncentrací hormonů v biologickém materiálu. Tyto metody umožňují také monitorování léčby [5]. Zatím jde především o určování koncentrací kardioglykosidů, syntofylinu, aminoglykosidů, antiepileptik a prokainamidů. Jsou důležitým pomocníkem klinického farmakologa, kterému umožňují kontrolovat aktuální koncentraci léčiva v organismu a operativně upravovat jeho dávky.

Tab. 5

Stanovení α_1 -fetoproteinu	
Metoda	Citlivost
RID	10 μ g / ml
EID	500 ng / ml
RIA	0,5 ng / ml
ELISA	0,7 ng / ml
LN	1 ng / ml

nochemických metod v klinické biochemii. Klinická biochemie využívá ve stále větší míře imunochemii s velkým prospěchem pro svůj další metodický rozvoj.

Souhrn

Práce uvádí literární přehled imunochemických metod používaných současnou klinickou biochemií. Stručně je vždy popsána historie a princip jednotlivých metod. Je hodnocen význam imunochemických metod v klinické laboratorní diagnostice s demonstrací některých vlastních zkušeností.

Literatura

Tab. 6

Nemoci spojené se zvýšením koncentrace α_1 -fetoproteinu		
Hepatom	90%	} často > 1000ng/ml
Teratokarcinomy	75%	
Virové hepatitidy	40%	} 10 - 1000ng / ml
Jaterní cirhóza	5-50%	
Chronická aktivní hepatitida	33%	
Normální hodnota	2 - 15ng / ml	

Budoucnost patří především imunochemickým reakcím používajícím přesně definované antigeny a protilátky, u kterých bude procento nespecifických reakcí sníženo na minimum. V r. 1975 našli Milstein a Köhler novou cestu, která dramaticky změnila přípravu a použití vysoce purifikovaných protilátek. Je to technologie produkce monoklonálních protilátek hybridom. Jde o techniku na získání nesmrtelných klonů buněk syntetizujících protilátku jen s jednou specifitou a dosáhli toho spojením normálních buněk produkujících protilátku s vhodnou nádorovou linií buněk. První imunoenzymatická stanovení používající monoklonální protilátky obdržené klasickou hybridomovou technologií jsou již komerčně dostupná.

Závěr

S prudkým rozvojem klinické imunologie dochází a bude docházet k uplatnění nových imu-

1. Adler, F. L. - Liu, C. T.: Detection of morphine by hemagglutination inhibition. J. Immunol., 106, 1971, s. 1684.
2. Avrameas, S.: Immunoenzymatic techniques: enzymes as markers for the localisation of antigens and antibodies. Int. Rev. Cytol., 27, 1970, s. 349.
3. Bloch, K. J. - Salvaggio, J. E.: Use and interpretation of diagnostic immunologic laboratory tests. JAMA, 248, 1982, s. 2734.
4. Czwikla, H.: Enzymoimmunoassay in der Schilddrüsendiagnostik. Lab. Prax. Med., 4, 1980, s. 52.
5. Džurík, R. - Džuríková, V.: Monitorovanie farmakoterapie. Biochem. clin. bohemoslov., 11, 1982, s. 175.
6. Engliš, M.: Proteinurie — patogeneze a klasifikace. Biochem. clin. bohemoslov., 11, 1982, s. 203.
7. Engvall, E. - Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. J. Immunol., 109, 1972, s. 129.
8. Ferenčík, M.: Imunochémia. Bratislava, ALFA 1980, s. 1-330.
9. Johnson, A. M. - Čejka, J. - Hellsing, K. - Ritchie, R.: Immunofixation electrophoresis and electrofocusing. Clin. Chem., 28, 1982, s. 1797.
10. Mancini, G. - Carbonare, A. O. - Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2, 1965, s. 235.
11. Masopust, J. - Doležalová, V.: Základy imunochemických vyšetřovacích metod. Praha, Inform. služba SEVAC 1976, s. 1-199.
12. Ritchie, F. F.: Specific protein assay. Fed. Proc., 34, 1975, s. 2139.
13. Tichý, M. - Hrnčíř, Z.: Atlas monoklonálních imunoglobulinů. Praha, Avicenum 1981, s. 1-136.
14. Tichý, M. - Pospíšil, M. - Šimša, J.: Naše zkušenosti se stanovením digoxinu soupravami Enzymun-Test Digoxin. In: Sborník věd. prací VLVDÚ JEP. 86. Hradec Králové, VLVDÚ JEP 1981, s. 159.
15. Tracy, R. P. - Currie, R. M. - Young, D. S.: Two-dimensional gel electrophoresis of serum specimens from a normal population. Clin. Chem., 28, 1982, s. 890.
16. Van Weemen, B. K. - Schuurs, A. H. W. M.: Immunoassay using antigenenzyme conjugates. FEBS Lett., 15, 1971, s. 232.

Klíčová slova: Imunochemie; Klinická biochemie; Imunoprecipitace; Enzymoimunoanalýza; Laserová nefelometrie; Elektroforetické metody.