

Literatura

- De VUYST, L., VANDAMME (1994): Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. *Blackie Academic and Professional*, London, s. 151-221.
- DODD, H.M., HORN, N., GIFFARD, C.J., GASSON, M.J. (1996): A gene replacement strategy for engineering nisin. *Microbiology*, 142, s. 47-55.
- DUŠKOVÁ, M., ŠPANOVÁ, A., DRÁB, V., RITTICH, B. (2009): Searching for genes of *Lactococcus lactis* encoding the bacteriocin nisin using DNA/DNA hybridization. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, s. 366-368.
- FDA (2001): Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000065: August 2005. Washington, D.C.: Department of Health and Human Services. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g065.html>.
- GARCERA, M.J.G., ELFERINK, M.G.L., DRIESSEN, A.J.M., KONINGS, W.N. (1993): In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. *European Journal of Biochemistry*, 212, s. 417-422.
- CHUMCHALOVÁ, J., JOSEPHSEN, J., PLOCKOVÁ, M. (1995): Characterization of acidocin CH5, a saccharolytic sensitive bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 17, s. 145-150.
- LI, T., TAO, J., HONG, F. (2005): Study on The Inhibition Effect of Nisin. *The Journal of American Science*, 1(2), s. 33-37.
- MONTVILLE, T.J., CHUNG, H.J., CHIKINDAS, M.L., Chen, Y. (1999): Nisin A depletes intracellular ATP and acts in a bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*. *Letters in Applied Microbiology*, 28, s. 189-193.
- PIPER, C., HILL, C., COTTER, P.D., ROSS, R.P. (2010): Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbial Biotechnology*, 4(3), s. 375-382.
- ROCES, C., COURTIN, P., KULAKAUSKAS, S., RODRIGUEZ, A., CHAPOT-CHARTIER, M.P., MARTINEZ, B. (2012): Isolation of *Lactococcus lactis* Mutans Simultaneously Resistant to the Cell Wall-Active Bacteriocin Lcn972, Lysozyme, Nisin, and Bacteriophage c2. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (12), s. 4157-4163.
- STOYANOVA, L.G., SULTIMOVA, T.D., BOTINA, S.G., NETRUSOV, A.I. (2005): Isolation and Identification of New Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Milk. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(5), s. 492-499.
- TRAMER, J., FOWLER, G.G. (1964): Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15, s. 522-528.

Přijato do tisku: 13. 9. 2014

Lektorováno: 28. 9. 2014

PLOTNOVÁ DIFUZNÍ METODA PRO STANOVENÍ REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉČE

Pavína Navrátilová¹, Jana Vyhňáková¹,
Jaroslava Jeřábková²

¹ Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, Brno

² Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93, Jihlava

THE PLATE DIFFUSION METHOD FOR DETERMINING INHIBITORY SUBSTANCE RESIDUES IN MILK

Souhrn

Pro ochranu zdraví spotřebitele i pro zajištění kvalitní suroviny pro výrobu mléčných výrobků je nezbytná kontrola přítomnosti reziduí inhibičních látek v mléce.

Plotnová difuzní metoda zaujímá po řadu let významné postavení v systému kontroly reziduí antimikrobiálních látek v surovinách a potravinách živočišného původu v ČR i ve světě. Článek poskytuje informaci o historii vývoje plotnových metod a o jejich využití v současnosti.

Klíčová slova: plotnová difuzní metoda, využití, princip

Summary

To protect the health of a consumer and to ensure the quality of raw milk in the production of dairy products, it is necessary to monitor the presence of inhibitory substance residues in milk. The plate diffusion method holds an important position in the monitoring system for antimicrobial substance residues in raw materials and foodstuffs of animal origin in the Czech Republic and in the world. This article provides information about the historical development of the plate diffusion method and informs about its current use.

Key words: plate diffusion method, use, principle

Úvod

Z historického hlediska je analýza reziduí antimikrobiálních látek v potravinách relativně mladá disciplína. První znepokojení vztahující se k přítomnosti reziduí antibiotik v potravinách bylo vysloveno zpracovateli mléka, kteří si všimli, že mléko kontaminované antibiotiky inhibuje růst startovacích kultur používaných v mlékárenském průmyslu a také ovlivňuje výsledek testu s metylenovou modří. Impuls pro vývoj a zavedení metod pro kontrolu reziduí inhibičních látek (RIL) vyšel od zpracovatelů mléka. V období 1947-1967 se intenzívně pracovalo na vývoji metod a následně byla řada metod pro detekci RIL v mléce uvedena do praxe. K prvním metodám využitým pro kontrolu přítomnosti reziduí antimikrobiálních látek v potravinách patřily mikrobiologické metody, i když byly původně vyvinuty pro aplikaci v klinické medicíně. Do skupiny mikrobiologických inhibičních metod řadíme plotnové difuzní metody, které zaujímají od 60. let 20. století důležité postavení v systému kontroly reziduí antimikrobiálních látek v surovinách a potravinách živočišného původu (Mitchell a kol., 1998, de Brabander a kol., 2009).

Již v roce 1952 byl aplikován první mikrobiologický inhibiční test s testovacím kmenem *Bacillus subtilis*. V roce 1978 byla vyvinuta standardní plotnová metoda s kmenem *Bacillus stearothermophilus* (Mitchell a kol., 1998) a v roce 1980 byla v Německu představena Bogaertsem a Wolfem 4-plotnová metoda, která se dodnes využívá a je součástí multi-plotnových metod. IDF se koncem 70. let 20. století začala intenzívně věnovat problematice RIL v mléce. V roce 1987 bylo vydáno speciální číslo bulletinu (Bulletin 283/1993) zaměřené na význam RIL v mléce a metody detekce RIL. Plotnové difuzní metody byly zařazeny mezi screeningové metody a doporučeny i jako post-screeningové konfirmační metody. Na základě doporučení IDF byly v praxi aplikovány následující plot-

nové metody: např. metoda s *Bacillus stearothermophilus*, 3-plotnová metoda s kmeny *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus megaterium* a 6-plotnová metoda s testovacími kmeny *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (Heeschen, 1993).

I v České republice byla plotnová difuzní metoda poměrně brzy využívána k detekci RIL v mléce. Oborová norma 57 0531, která byla navržena v roce 1980 (s platností od roku 1982), uváděla dvě metody pro stanovení RIL: plotnovou metodu s testovacím mikroorganismem *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* a dále zkumavkovou metodu s kmenem *Streptococcus thermophilus* Lactoflora T 280 (Havlová a kol., 1993). V roce 1990 vydala SVS ČR Veterinární laboratorní metodiky pro hygienu potravin. Nedílnou součástí metodik byly metody pro detekci RIL v potravinách. Základními screeningovými metodami byly plotnové metody - metoda s kmenem *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 a 4-plotnová metoda s kmeny *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* (SVS ČR a SVS SR, 1990).

Princip metod

Princip mikrobiologických metod vychází ze společné vlastnosti antimikrobiálních látek: schopnosti inhibice růstu mikroorganismů. Metody jsou založeny na specifické reakci mezi citlivým bakteriálním kmenem a látkou s antimikrobiálním účinkem přítomnou ve vzorku a umožňují kvalitativní nebo semi-kvantitativní stanovení (Cháfer-Pericás a kol., 2010).

Plotnová difuzní metoda se provádí na Petriho miskách, které obsahují vrstvu agarového média inokulovaného testovacím kmenem. Vzorky mléka se aplikují na sterilní papírový disk o standardní velikosti a absorpční schopnosti, disky se po nasycení vzorkem pokládají na povrch agaru. Pokud vzorek obsahuje RIL, na které je testovací mikroorganismus citlivý, inhibiční látky (IL) během inkubace difundují do média (princip agarové difuze) a dochází k inhibici růstu testovacího kmene. Přítomnost inhibičních látek v testovaném vzorku je indikována vytvořením zóny inhibice růstu (Botsoglou a Fletouris, 2001; Mitchell a kol., 1998).

Využití plotnových metod v současnosti

V návaznosti na neustále se rozšiřující spektrum veterinárních léčiv používaných pro léčení potravinových zvířat, které mají stanovené limity (maximální limit reziduí, MRL) a jejichž rezidua se mohou vyskytovat v surovinách a potravinách živočišného původu, se požadavky na metody pro detekci antimikrobiálních látek v posledních desetiletích výrazně změnily. Aby byly uspokojeny tyto požadavky a současně bylo zabráněno vstupu kontaminovaných produktů do potravinového řetězce, byla vyvinuta nebo modifikována řada mikrobiologických metod s dostatečnou citlivostí k širokému spektru látek. Byly pub-

likovány studie zabývající se plotnovými difuzními metodami pro detekci reziduí antimikrobiálních látek v surovinách živočišného původu s cílem zvýšit citlivost metod, stanovit limity detekce metod pro různé antimikrobiální látky, vyvinout nové multi-plotnové systémy, aplikovat nové testovací kmeny, upravit citlivost metod tak, aby byla v souladu s požadavky současné legislativy (Okerman a kol., 2004; Nouws a kol., 1999; Gaudin a kol., 2004; Mitchell a kol., 1998).

Ve světě i v zemích ES jsou aplikovány různé varianty plotnových difuzních metod. Laboratoře využívají specifické postupy lišící se zvolenými testovacími kmeny a počtem testovacích ploten.

Česká republika

V České republice je standardizovaná plotnová difuzní metoda referenční metodou pro stanovení RIL v surovinách a potravinách živočišného původu. Plotnová difuzní metoda se provádí podle Metodického pokynu na stanovení RIL ve tkáních, mléce, vejcích a potravinách ze dne 1. 6. 2008, který vydala Národní referenční laboratoř pro mykotoxiny a další přírodní toxiny, barviva a antibakteriální (inhibiční) látky a rezidua veterinárních léčiv (NRL, 2008).

Plotnová difuzní metoda v současné době používá 6 testovacích ploten (tabulka č. 1). Základ metody tvoří původní čtyř-plotnová metoda (Bogaerts a Wolf, 1980) s 2 testovacími kmeny *Bacillus subtilis* BGA a *Kocuria rhizophila*. Metoda využívá odlišné pH testovacího agaru, různou teplotu inkubace a přidavek specifických látek k potencování účinku některých léčiv (trimethoprim-sulfonamidy). Metoda umožňuje skupinovou identifikaci tetracyklinových, aminoglykosidových, makrolidových antibiotik a sulfonamidů (tabulka č. 2). Součástí plotnové metody je dále plotna s kmenem *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 vykazující citlivost především k β -laktamovým antibiotikům a aminoglykosidům. V roce 2008 byla plotnová metoda rozšířena o plotnu s kmenem *Escherichia coli* pro detekci chinolonových léčiv.

Při vyšetření vzorku mléka se postupuje následujícím způsobem: sterilní disk (např. Blank Paper Disc, 12,7 mm) se ponoří částečně do vzorku, nechá se nasáknout mlékem

Tab. 1 Referenční plotnová difuzní metoda v ČR: přehled ploten, testovacích kmenů, pH půd a inkubačních podmínek

Plotna č.	Testovací kmen	pH agaru	Inkubační podmínky	
			Teplota [°C]	Doba [hod]
1	<i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062	6,0	30	18-24
2	<i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062	8,0	30	18-24
3	<i>Kocuria rhizophila</i> CCM 552	8,0	37	18-24
4	<i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062 + TMP*	7,2	30	18-24
5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> v.c. C 953 CCM 5965	8,0	64	5 (18-24)
6	<i>Escherichia coli</i> CCM 7372	8,0	37	18-24

*trimethoprim

Tab. 2 Plotnová difúzní metoda v ČR: citlivost ploten

Plotna č.	Citlivost ke skupině léčiv
1	tetracykliny
2	aminoglykosidy
3	β -laktamy a makrolidy
4	sulfonamidy a tetracykliny
5	β -laktamy a aminoglykosidy
6	chinolony

a přebytek mléka se odstraní otřením disku o vnitřní stranu vzorkovnice. Disky se vzorky se položí na povrch testovacího agarů na Petriho misce. Po inkubaci se za pozitivní výsledek označuje úplná inhibice růstu testovacího kmene v prstencové zóně kolem disku s mlékem. Velikost inhibiční zóny (IZ) se měří kalibrovaným měřidlem v mm, a to od okraje disku k vnějšímu okraji zóny. U plotny č. 5 je vzorek pozitivní v případě, že velikost IZ je ≥ 1 mm, u ostatních ploten ≥ 2 mm. Plotnová metoda je semi-kvantitativní metoda, podle velikosti IZ je možné v některých případech odhadnout přibližně koncentraci IL ve vzorku.

Evropské společenství

V zemích Evropského společenství je STAR metoda (Star Protocol, 2002) oficiálně schválenou a doporučenou metodou referenční laboratoří Evropského společenství. STAR metoda se liší od metody užívané v ČR (tabulka č. 3) výběrem testovacích kmenů, citlivostí ploten, ale i v metodickém postupu, např. množstvím testovacího agarů v Petriho misce a velikostí disků používaných k vyšetření vzorků mléka.

Tab. 3 STAR metoda

Testovací kmen	pH agarů	Citlivost ke skupině léčiv
<i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	7,4	sulfonamidy a β -laktamy
<i>Bacillus subtilis</i> BGA DSMZ 618	7,2	aminoglykosidy
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	6,0	tetracykliny
<i>Kocuria varians</i> ATCC 9341	8,0	makrolidy a β -laktamy
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	8,0	chinolony

Výhody a nevýhody plotnové metody

Podobně jako většina mikrobiologických inhibičních metod jsou výbornými screeningovými metodami proto, že jsou schopné detekovat současně velké množství různých antibakteriálních látek s různou chemickou strukturou. Současně umožňují skupinovou identifikaci antibakteriálních látek, používají se proto i jako post-screeningové konfirmační metody (Gaudin a kol., 2004; Botsoglou a Fletouris, 2001).

Citlivost agarových difúzních metod mohou ovlivnit různé faktory např.: pH agarového média a jeho množství v Petriho misce, druh testovacího mikroorganismu a koncentrace buněk nebo spor v agarovém mediu, způsob aplikace vzorku, druh vzorku aj. (Botsoglou a Fletouris, 2001). Citlivost plotnových metod významně kolísá v závislosti na druhu detekované antibakteriální látky.

Testovací kmeny nejsou shodně citlivé ke všem antibakteriálním látkám, proto se využívá multi-plotnová metoda s různými testovacími bakteriálními kmeny. Některé antibakteriální látky jsou detekovány s vyšší úspěšností, jiné méně úspěšně (Brabander a kol., 2009).

Plotnové metody detekují antibakteriální látky inhibující růst vybraných citlivých testovacích kmenů. Nejsou však schopné detekovat přítomnost metabolitů, které nevykazují inhibiční účinky nebo nehydrolyzované konjugáty antibakteriálních látek. Plotnové mikrobiologické inhibiční metody neposkytují úplnou informaci o vyšetřovaném vzorku. Pokud je vzorek po vyšetření negativní, výsledek nemusí vždy znamenat nepřítomnost veterinárních léčiv, protože ne všechna léčiva a jejich metabolity vykazují antibakteriální aktivitu (Botsoglou a Fletouris, 2001). Některé látky, přirozeně se vyskytující v mléce, mohou rovněž v některých případech vykazovat inhibiční účinky interferující s analýzou (Mitchell a kol., 1998). Nevýhodou těchto metod je dlouhá inkubační doba (18-24 hod.) a náročnost provedení, proto není možné je využít v prvovýrobě mléka a v mlékárenském průmyslu.

Závěr

V současnosti trvá snaha neustále zdokonalovat metody pro detekci RIL v souvislosti se stále se rozšiřujícím spektrem antimikrobiálních látek používaných ve veterinární praxi. Mikrobiologické inhibiční metody jsou v praxi široce používány a není pravděpodobné, že budou v blízké budoucnosti nahrazeny jinými technikami, protože jsou schopné detekovat široké spektrum antibakteriálních látek s různou chemickou strukturou.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV "KUS" QJ1230044.

Seznam literatury

- BOGAERTS R., WOLF F. (1980): A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft*, 60, s. 667-675.
- BOTSOGLOU N.A., FLETOURIS D.J. (2001): *Drug residues in foods: pharmacology, food safety, and analysis*. New York, Marcel Dekker, 1194 s.
- CHÁFER-PERICÁS C., MAQUIEIRA Á., PUCHADES R. (2010): Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, s. 1038-1049.
- DE BRABANDER H.F., NOPPE H., VERHEYDEN K., BUSSCHE J.V., WILLE K., OKERMAN L., VAN HAECHE L., REYBROECK W., OOGHE S., CROUBELS S. (2009): Residue analysis: future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, 1216, s. 7964-7976.
- GAUDIN V., MARIS P., FUSELIER R., RIBOUCHON J.L., CADIEU N., RAULT A. (2004): Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for screening of antibiotic residues in milk. *Food Additives and Contaminants*, 21, s. 422-433.
- HAVLOVÁ J., JIČÍNSKÁ E., HRABOVÁ H. (1993): *Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. Praha, ÚZPI, 243 s.
- HEESCHEN W.H. (1993): Residues of antibiotics and sulfonamides in milk. *Bulletin of the IDF no 283*, Brusel, IDF, s. 3-12.
- MITCHELL J.M., GRIFFITHS M.W., MC EWEN S.A., MC NAB W.B., YEE A.J. (1998): Antimicrobial drug residues in milk and meat: cause, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection*, 61, s. 742-756.

- NOUWS J.F.M., VAN EGMOND H., SMULDERS I., LOEFFEN G., SCHOUTEN J., STEGEMAN H. (1999): Antimicrobial assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. *International Dairy Journal*, 9, s. 85-90.
- NRL ČR (2008): *Metodický pokyn na stanovení reziduí inhibičních látek ve tkáních, mléce, vejcích a potravinách*. Jihlava, SVÚ Jihlava, 14 s.
- OKERMAN L., CROUBELS S., CHERLET M., DE WASH K., DE BACKER P., VAN HOOFF J. (2004): Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. *Food Additives and Contaminants*, 21, s. 145-153.
- STAR PROTOCOL (2002): Screening test for antibiotic residues. Fougères, Laboratoire D'Etudes et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants. *Community Reference Laboratory*, 14 s.
- SVS ČR, SVS SR (1991): *Veterinární laboratorní metodiky - Hygiena potravin*. Bratislava, ÚVIO, 130 s.

Přijato do tisku 13. 9. 2014
Lektorováno 1. 10. 2014

OBSAH IMUNOGLOBULINŮ JAKO INDIKÁTOR KVALITY KOLOSTRA

Volodymyr Skalka, Markéta Vašíčková, Ladislav Čurda
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav mléka, tuků a kosmetiky

Content of immunoglobulins as quality indicator of colostrum

Abstrakt

Vzhledem k vysokému obsahu biologicky aktivních látek se kolostrum stává důležitou surovinou pro výrobu potravních doplňků a funkčních potravin. Indikátorem kvality mleziva je vysoký obsah imunoglobulinů, především IgG1. Metody pro jejich stanovení jsou nezbytné pro kontrolu suroviny, průběhu zpracování i finálních produktů. Cílem práce bylo ověřit vybrané metody a posoudit je z hlediska shody se standardní metodou radiální imunodifuze (RID), rychlosti a cenové dostupnosti. Pro RID se osvědčil kit BindingSite. Měření hustoty a indexu lomu lze použít pro rychlé a levné orientační stanovení. Byly zjištěny značné rozdíly mezi výsledky z RID a SDS-PAGE. Za perspektivní lze považovat vylučovací chromatografii (SEC), která vykazuje dobrou shodu s RID ($R^2=0,9501$), vyžaduje malé množství vzorku a je poměrně rychlá.

Klíčová slova: mlezivo, imunoglobuliny, radiální imunodifuze, index lomu, hustota, vylučovací chromatografie

Abstract

With respect to high content of biologically active components colostrum becomes important raw material for production of food supplements and new functional foods. Indicator of colostrum quality is high content of immunoglobulins, first of all IgG1. Methods for their estimation are essential for control of raw material, processing and final products. The aim of this work was to verify

selected methods and evaluate them from the point of view of agreement with radial immunodiffusion (RID), time and price of analysis. Kit BindingSite proved successful for RID. Density and refraction measurement is useful for fast and inexpensive estimation of immunoglobulin concentration. Rather big differences were found between results from RID and SDS-PAGE. Size exclusion chromatography (SEC) seems to be perspective for IgG analysis. It has good agreement with RID ($R^2=0,9501$). SEC also needs small amount of sample and it is rather fast.

Key words: colostrum, immunoglobulins, radial immunodiffusion, refraction index, density, size exclusion chromatography

Úvod

Kolostrum (mlezivo) je sekret mléčné žlázy savců produkováný v prvních hodinách po porodu. Kromě toho, že je nezbytnou prvotní potravou mláďete, v posledních letech vzrůstá zájem o jeho využití v doplňcích stravy a funkčních potravinách. Jde o tekutinu bohatou na živiny i nejrůznější biologicky aktivní látky. Jednou ze základních složek mleziva jsou imunoglobuliny, které se výrazně podílejí na rozvoji základní obranyschopnosti mláďete. Jejich obsah je dosti variabilní, po porodu velice rychle klesá, rychle se mění i obsah dalších biologicky aktivních látek. Vysoká cena suroviny i produktů z mleziva může vést k tomu, že se využívá i mlezivo z pozdějších nádojů. Obsah imunoglobulinů může proto sloužit jako indikátor kvality mleziva při nákupu suroviny zpracovateli i pro kontrolu finálních produktů. Cílem práce bylo ověřit dostupné metody, které by mohly sloužit ke stanovení obsahu imunoglobulinů v kolostru.

Struktura a vlastnosti imunoglobulinů

Imunoglobuliny tvoří komplexní skupinu látek produkovanou plazmatickými buňkami, tzv. B lymfocyty. Tyto látky se výrazně podílejí na vzniku a podpoře imunity. Imunoglobuliny se vyskytují jako monomery nebo oligomery základního Y tvaru. Ten se skládá ze čtyř polypeptidových řetězců: dvou identických lehkých řetězců (L) s molekulovou hmotností kolem 25 kDa a dvou identických těžkých řetězců (H) s molekulovou hmotností v rozmezí 55 kDa - 76 kDa v závislosti na třídě imunoglobulinu. Struktura Y tvaru je stabilizována, pomocí disulfidových vazeb, které jsou inter- i intramolekulární. Těžký H řetězec je tvořen konstantní (C) oblastí, která zahrnuje 3 - 4 domény obsahující přibližně 110 aminokyselin, a variabilní oblast (V) na N-konci. Lehké řetězce jsou typu λ nebo κ (u hovězích imunoglobulinů převažuje z 90 % λ typ), jsou tvořeny z jedné domény C na C-konci a jedné V domény na N-konci. Z variabilní domény L a H řetězce na koncích Y tvaru vzniká antigenní vazebné místo. Podle druhu konstantní oblastí těžkých řetězců rozlišujeme několik tříd a podtříd imunoglobulinů: IgG (podtřídy IgG1, IgG2), IgA, IgM, IgE a IgD. IgG tvoří monomery (cca 150 kDa), IgA dimery, IgM pentamery (Farrell a kol., 2004; Madureira a kol. 2007).