

Stanovení hormonů

Stanovení hormonů

- používají se imunochemické metody
- založeny na specifické reakci antigen – protilátka

Dělení:

- dle uspořádání reakce – kompetitivní, nekompetitivní (sendvičové)
- dle prostředí
- homogenní imunoanalýza (stanovení a detekce přímo v reakční směsi – fluoroimunoanalýza, př. přístroj Kryptor, firma Brahms)
- heterogenní imunoanalýza (po separaci vytvořeného imunokompl.)
- dle techniky použité k měření signálu – radioimunoanalýza, enzymoimunoanalýza, luminiscenční imunoanalýza, fluoroimunoanalýza
- dle použité značky (často je předmětem patentu konkrétní firmy)

Kompetitivní stanovení:

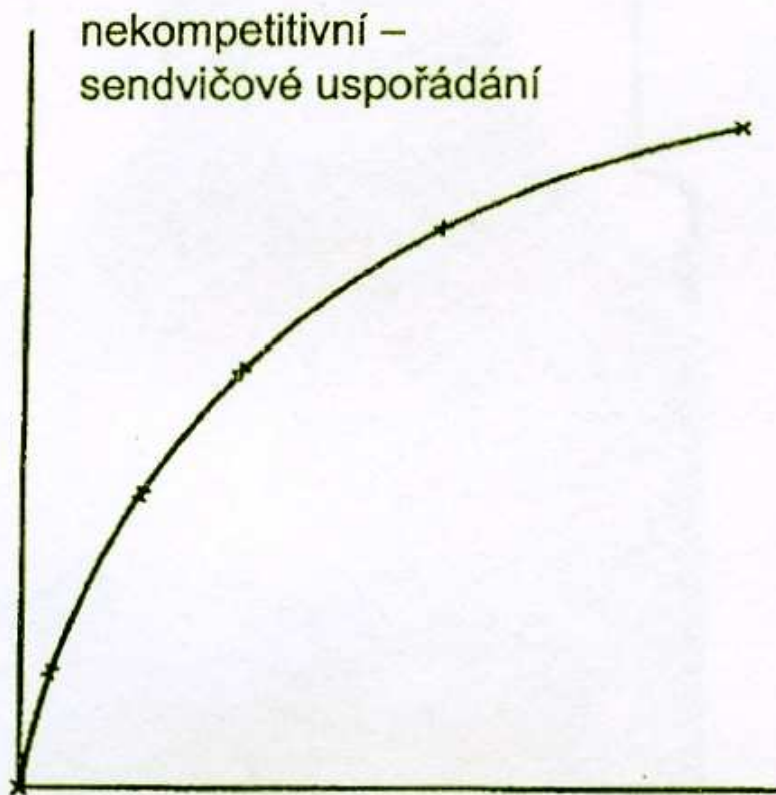
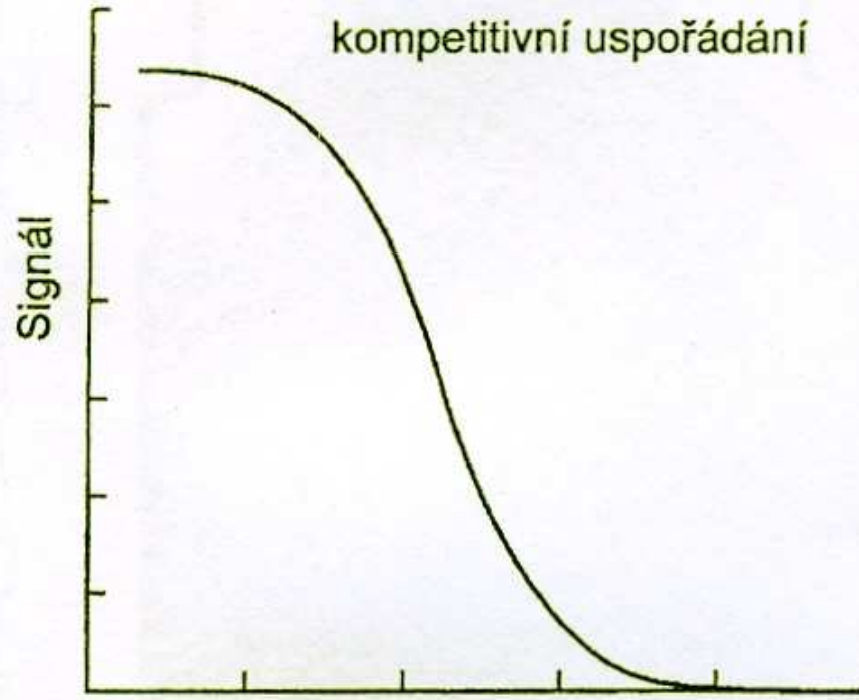
- Stanovovaný antigen soutěží se stejným antigenem, na který je navázána značenka o limitované množství protilátky
- Velikost odezvy je nepřímo závislá na koncentraci stanovovaného analytu
- Kalibrační křivka má hyperbolický tvar
- Metoda je vhodná pro nízkomolekulární analyty s malou molekulou (př. T3, steroidní hormony)
- S výhodou se u ní používají polyklonální protilátky

Sendvičové stanovení:

- Stanovovaný antigen ze vzorku reaguje a dvěma protilátkami, které jsou v reakční směsi v přebytku
- Jedna protilátka bývá značená, druhá protilátka umožňuje separaci vznikajícího komplexu
- Velikost měřeného signálu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu
(parabolický tvar kalibrační křivky)
- Metoda se používá pro molekuly s vyšší molekulovou váhou, které umožňují vazbu protilátek na dvě determinanty – př. TSH
- Často se používají monoklonální protilátky

Můstkové uspořádání:

- Podobné jako sendvičové uspořádání, ale princip je používán ke stanovení protilátek (př. IgA)
- Protilátka reaguje s dvěma antigeny



Analytická koncentrace

Protilátky:

- Specificita a senzitivita imunochemických vyšetření - ovlivněny používanou protilátkou
- Používají se protilátky monoklonální a polyklonální
- **Monoklonální** protilátky – produkovány hybridony, které se připravují fúzí imunizovaných slezinných buněk s nádorovými
 - po vyčištění a selekci produkují jen jedinný typ protilátky
 - dosahuje se vyšší specificity, kontinuální produkce
- **Polyklonální** protilátky – připravují se imunizací zvířete, jsou vždy směsí protilátek, jsou schopny rozeznat i izoformy antigenu
 - mají proto vyšší citlivost
 - závisí na imunizovaném zvířeti, získání může být neopakovatelné
- Pro výslednou senzitivitu stanovení je podstatný také způsob detekce – dostatečnou citlivost mají např. luminiscenční metody

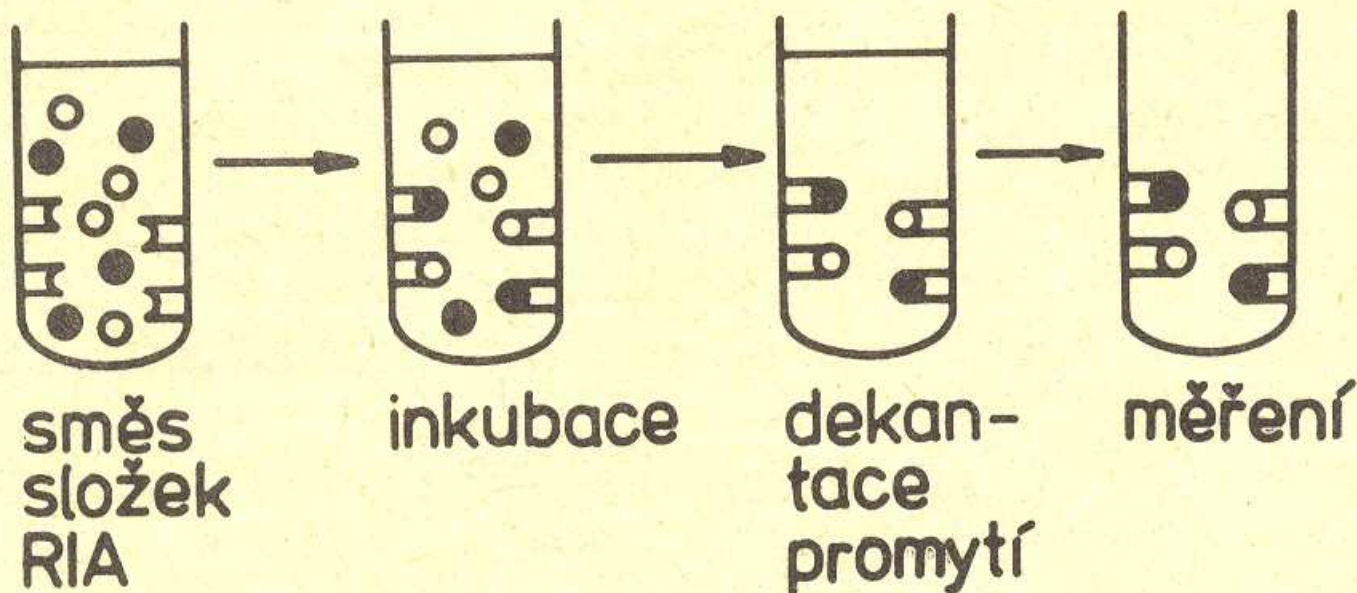
Radioimunoanalýza:

- Patří mezi heterogenní, ruční metody
- Nejstarší imunoanalytická metoda
- Od roku 1959
- Citlivá, náročná na ruční práci a na zachování předpisů při práci s radioizotopy
- Jako značka se používá izotop jódu ^{125}I - γ - zářič s poločasem rozpadu 60 dní (případně β - zářič tritium (^3H) s poločasem rozpadu kolem 12 roků)
- Kompetitivní uspořádání (RIA)
- Sendvičová metoda (IRMA – Imunoradiometrická analýza)
- Nezastupitelné místo
- Metody pro nově používané analyty

Schematické znázornění kompetitivního stanovení (RIA):

smíchání komponent, inkubace (vznik komplexu antigen-protilátka), separace (ukotvení komplexu na pevném nosiči a promytí) a detekce

- ▣ první protilátka
- značený antigen
- neznačený antigen



Příklad - stanovení 17-OH Progesteronu:

- Zvýšené hladiny 17-OHP v krvi nasvědčují vrozenému metabolickému onemocnění kongenitální adrenální hyperplasii (CAH)
- Principem stanovení je kompetitivní RIA ve zkumavkách potažených protilátkou proti 17-OHP
- Inkubace ve zkumavkách potažených protilátkou společně s 17-OHP značeným ^{125}I (radioindikátor)
- Odsátí obsahu zkumavek
- Měření radioaktivity navázaného komplexu ve zkumavce
- Koncentrace 17-OHP ve vzorcích se odečítá z kalibrační křivky

Detekce - scintilační dektor:

- Multidetektorový gama měřič LB 2104
- Kvantitativní měření radioaktivity gama záření radioaktivních nuklidů
- Založen na vzniku luminiscence při průchodu ionizujícího záření vhodnou látkou - scintilátorem
- Jako scintilační jednotka se používají krystaly NaJ/Tl , tj. jodidu sodného se stopami thalia
- Systém je vybaven 12 scintilačními jednotkami (sondami) a fotonásobičem
- Při průchodu záření gama scintilačním krystalem vznik fotoelektrického jevu a Comptonova rozptylu (foton vyráží elektron a ztrácí část energie)
- Elektrony uvolněné z atomových obalů excitují atomy krystalu
- Vzniká viditelné luminiscenční záření – scintilace
- Fotonásobiče - mění scintilaci na elektrické impulsy
- Lze měřit až 12 zkumavek současně

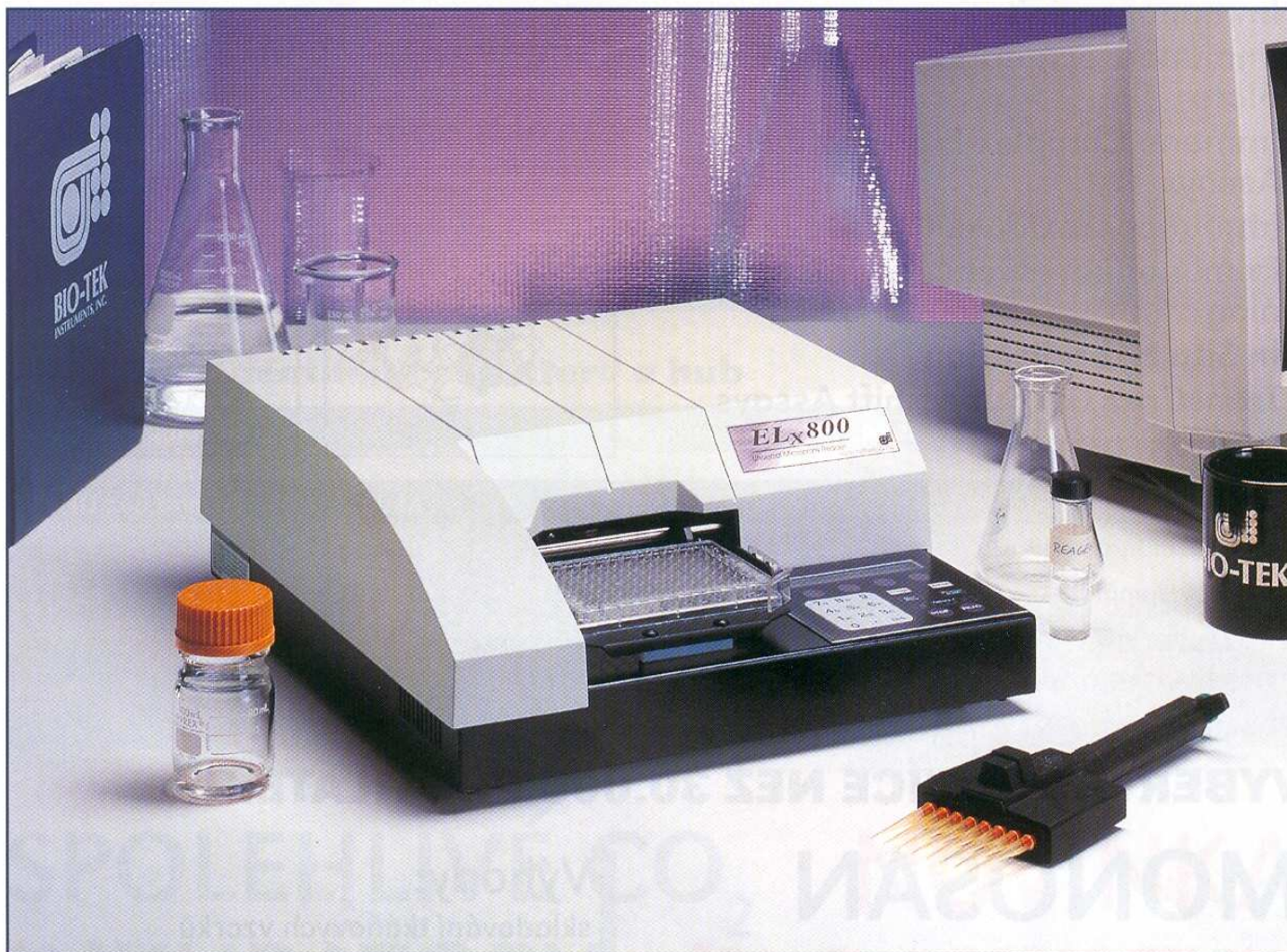
ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- Patří k enzymové heterogenní imunoanalýze - enzym jako značka (křenová peroxidasa), ruční technika
- Enzymová imunoanalýza může být využívána také na imunoanalyzátorech (př. Immulite, Siemens, enzym ALP)
- Kompetitivní nebo sendvičové uspořádání
- Stanovení na mikrotitračních destičkách, potažených protilátkou
- Fáze stanovení jako u radioimunoanalýzy
- Pro usnadnění práce se využívají vícekanálové pipety a automatické promývací stanice
- Detekce - ELISA reader

Vysokoúčinná promývačka mikrotitračních destiček (firma TECAN)



ELISA reader ELx800, firma BIO-TEKK
vertikální fotometr pro mikrotitrační destičky, měří koncentrace v celé destičce
současně



ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- Nevýhodou stanovení je nutnost provedení vícebodové kalibrační závislosti při každém měření. Vzhledem k tomu, že metodika se v současnosti používá většinou pro vysoce speciální analyty, které nebyly dosud převedeny na automatické imunoanalyzátory, bývají vzorky skladovány, dokud se jich neshromáždí větší počet. Mikrotitrační destičky je možno rozložit na jednotlivé použky, takže není nutné zpracovat celou destičku.
- Na pracovištích, kde se provádí větší počet ELISA stanovení je možno zakoupit také systém, kde je pipetování, promývání i měření automatizováno (BRIO od firmy DRG).

ELISA

- Nevýhoda - provedení vícebodové kalibrační závislosti při každém měření
- Skladování vzorků, většinou se neprovádí denně
- Mikrotitrační destičky lze rozložit na jednotlivé proužky
- Možnost automatizace pipetování, promývání i měření (BRIO od firmy DRG)

Příklad ELISA - stanovení luteinačního hormonu:

- Sendvičová technika
- Jamky v mikrotitrační destičce potaženy monoklonální protilátkou proti LH - vychytává LH ze vzorku
- Druhá protilátka je polyklonální, značena křenovou peroxidasou
- Inkubace 1 h při 37 °C, pětinásobné promytí
- Přidat substrát tetrametylbenzidin - reaguje s enzymem
- Zastavení reakce kyselinou sírovou
- Intenzita zbarvení se měří při 450 nm

Luminiscenční imunoanalýza

(heterogenní) – automatické imunoanalyzátoři:

- Analyzátoři s přímou chemiluminiscenční detekcí rozšířené
- Vysoká citlivost - vhodné pro stanovení hormonů
- Luminofoři používané ke značení nemají interference v biologických materiálech
- Zavedení nové metody časově i finančně náročné, trvá několik let
- Nabídka metod bývá proto pozadu za technikou RIA a ELISA
- Výhodou je automatizace, případně provedení klinických a imunoanalytických metod z jedné zkumavky

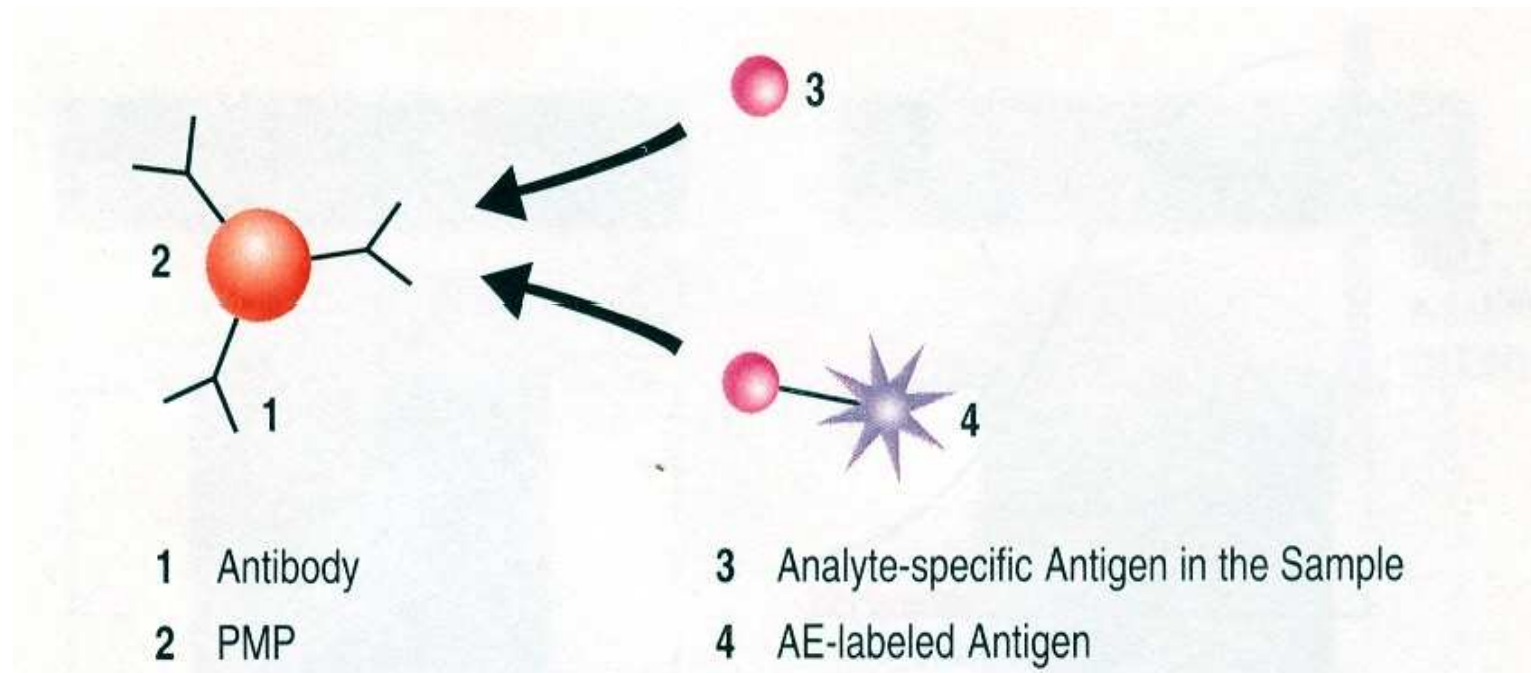
Chemiluminiscence – Centaur, firma Siemens (Bayer)

Princip měření:

- Systém měří kvantitativní množství světla emitovaného během chemiluminiscenční reakce
- Pevná fáze jsou paramagnetické částice
- Značka - AE (acridinium ester) - chemiluminiscenční látka, která emituje světlo při oxidaci H_2O_2 v alkalickém prostředí
- Reakce probíhá během jedné sekundy, je velice citlivá (10^{-15})

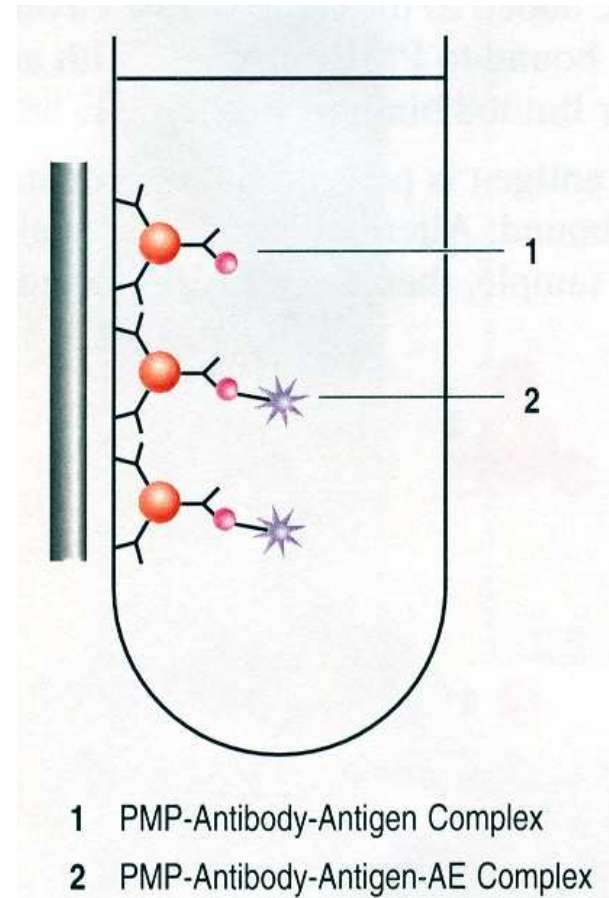
LIA kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- Estradiol ve vzorku soutěží s estradiolem označeným akridinium esterem o limitované množství králičí protilátky proti estradiolu
- Králičí antiestradiolová protilátka je navázána na myší protilátku proti králičímu IgG, která je spojena s paramagnetickými částicemi



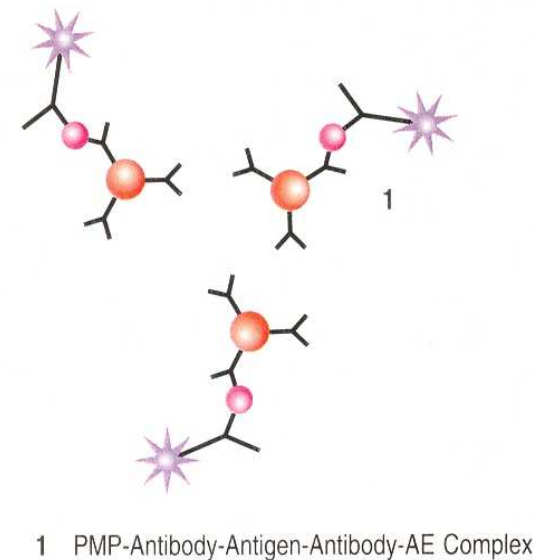
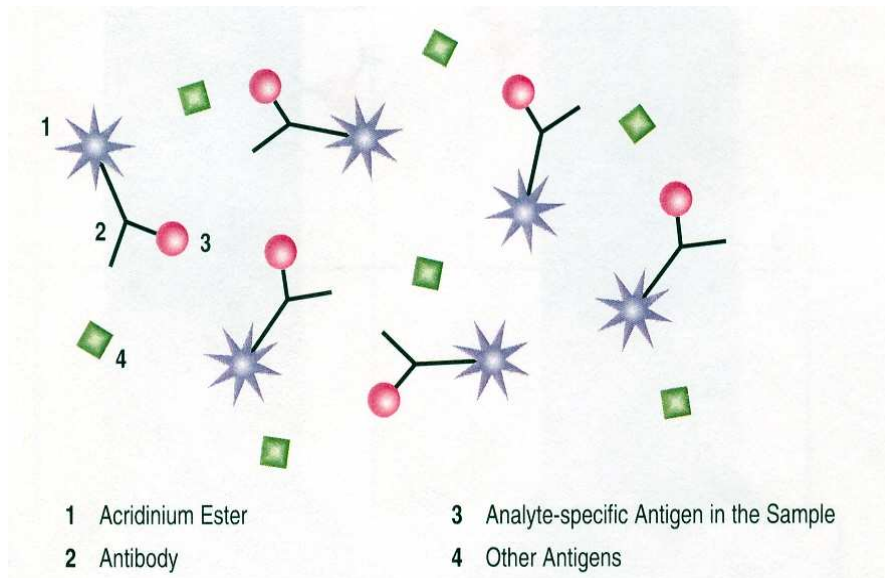
LIA kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- Po inkubaci systém magneticky odseparuje komplex antigen – protilátky s paramagnetickými částicemi a promyje částice
- Dále se přidá peroxid vodíku a v luminometru NaOH, který inicializuje chemiluminiscenční reakci



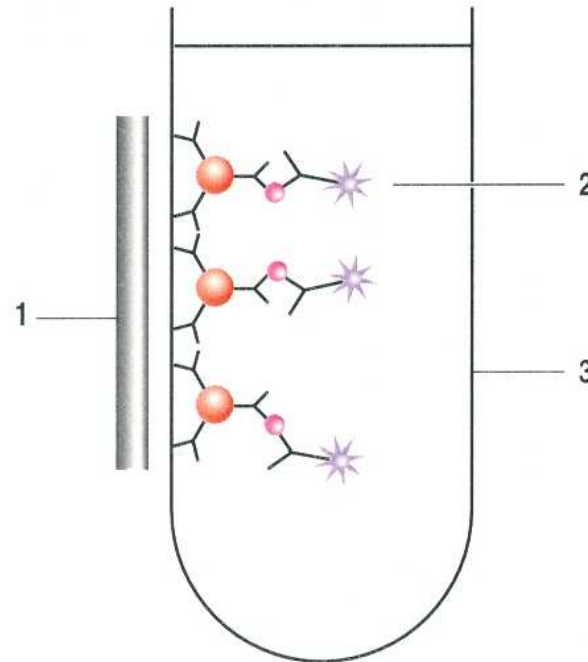
LIA sendvičová – př.stanovení hCG

- Konstantní množství dvou protilátek.
- První polyklonální kozí protilátka proti hCG, označená acridinium esterem
- Druhá, monoklonální myší protilátka proti hCG kovalentně vázaná s paramagnetickými částicemi
- Obě protilátky specifické pro odlišné přítomné epitopy, free betasubjednotku a betasubjednotku intaktní molekuly



LIA sendvičová – př.stanovení hCG

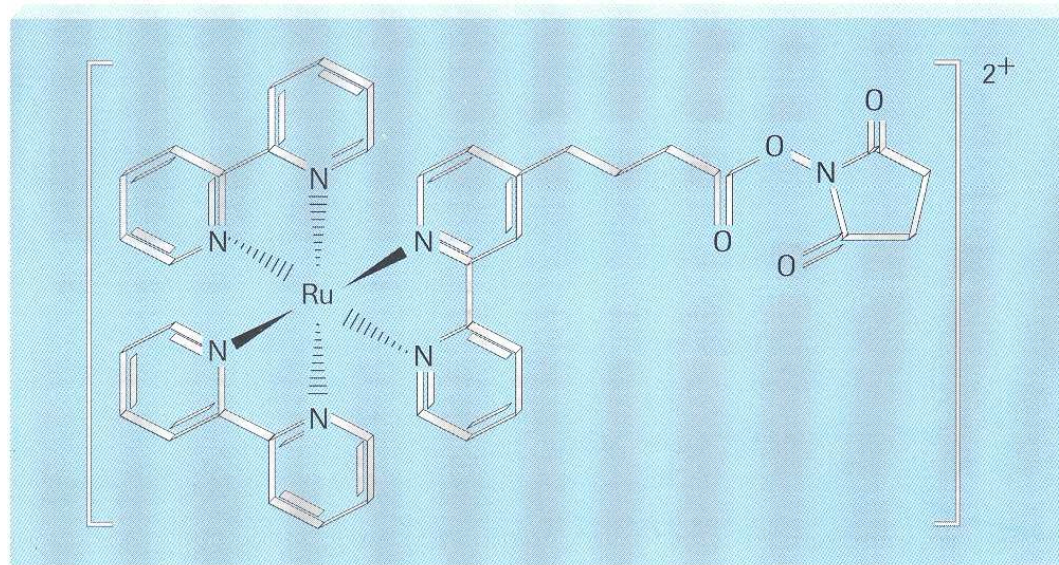
- Po separaci, odsátí a promytí se opět dávkuje reagent a proběhne chemiluminiscenční reakce



- 1 Magnets
- 2 PMP-Antibody-Antigen-Antibody-AE Complex
- 3 Cuvette

Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

- Uspořádání metody – kompetitivní nebo sendvičové
- Protilátka nebo antigen biotynilovány
- Další specifická protilátka je značená rutheniovým komplexem



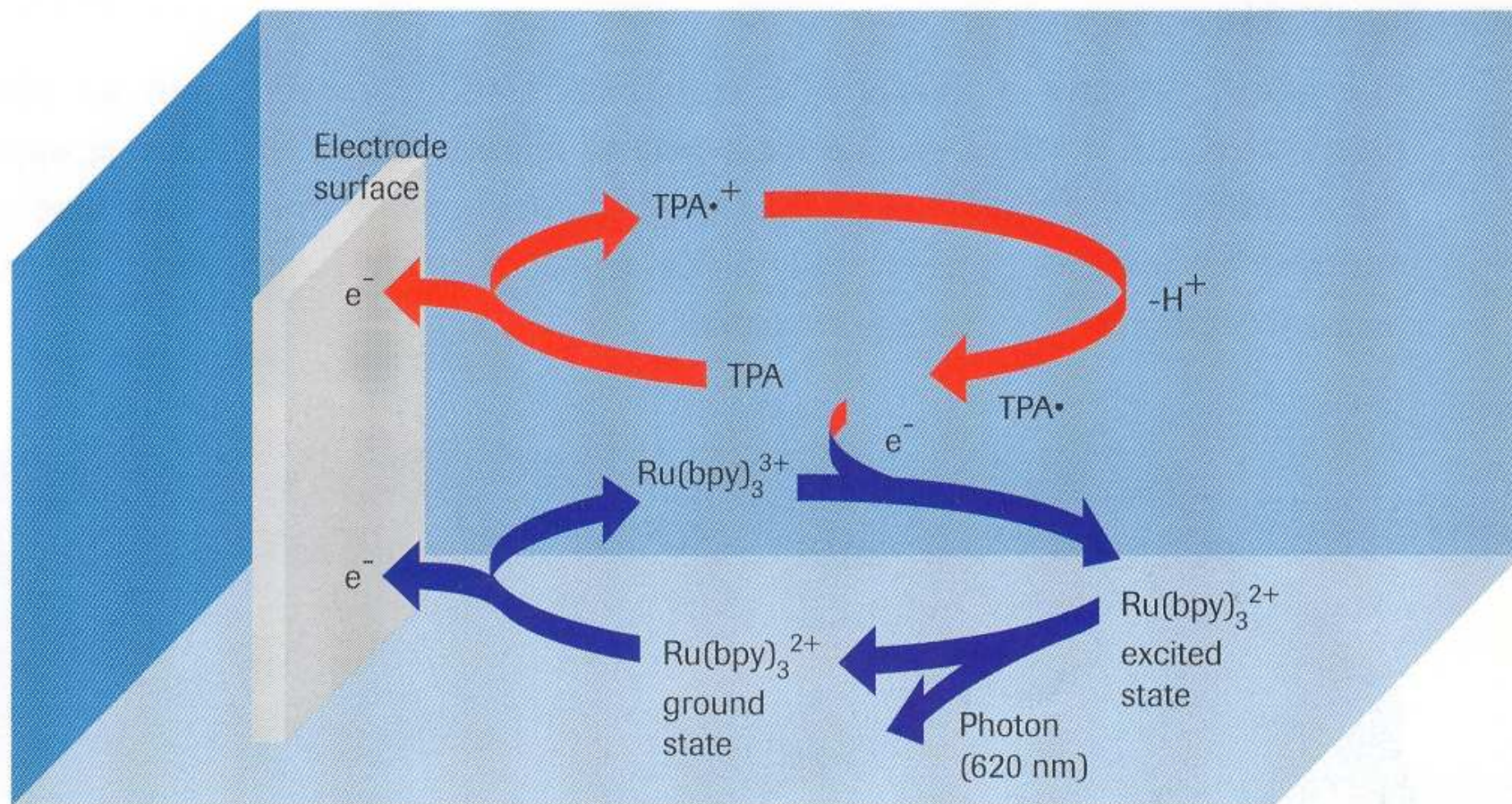
Rutenium(II) tris-bipyridylovým komplexem

Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

Sendvičové uspořádání

- Protilátky reagují s antigenem ve vzorku (např. TSH) za tvorby sendvičového komplexu
- Firma využívá většinou monoklonální protilátky
- Po přidání mikročástic potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi interakcí biotinu se streptavidinem
- Mikročástice se zachycují magnetickým polem na povrchu elektrody
- Po přidání substrátu tripropylaminu (TPA) a přivedení napětí na elektrody vzniká elektrochemiluminiscenční emise – ruthéniový komplex uvolní na elektrodě elektron za vzniku $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ kationtu
- Ruthéniový marker se po luminiscenční reakci regeneruje

Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

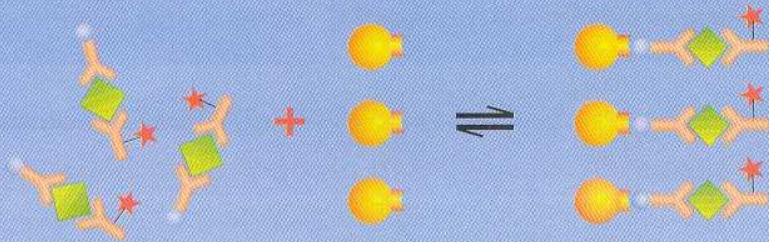


SANDWICH PRINCIPLE

FIRST IMMUNOLOGICAL REACTION



SECOND REACTION



LIGHT REACTION



◆ ANTIGEN

Y Biotinylated Antibody

Y★ RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

● STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

TPA TRIPROPYLAMINE

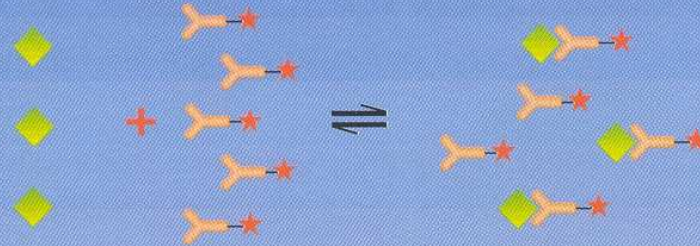
Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

Kompetitivní uspořádání (např. stanovení fT4)

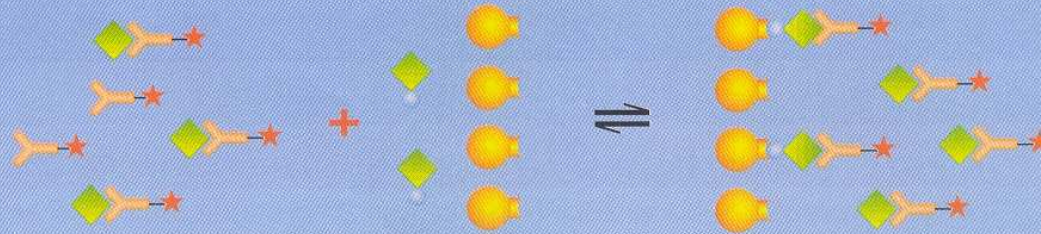
- soutěží stanovovaný antigen s biotynilovaným antigenem o limitované množství značené protilátky (polyklonální)
- Pouze komplex biotynilovaný antigen – protilátka se může vázat na paramagnetické částice
- Komplex stanovovaný analyt – protilátka je při separaci odstraněn
- Dále probíhá reakce stejně jako v předchozím případě
- Velikost signálu je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu

COMPETITIVE PRINCIPLE

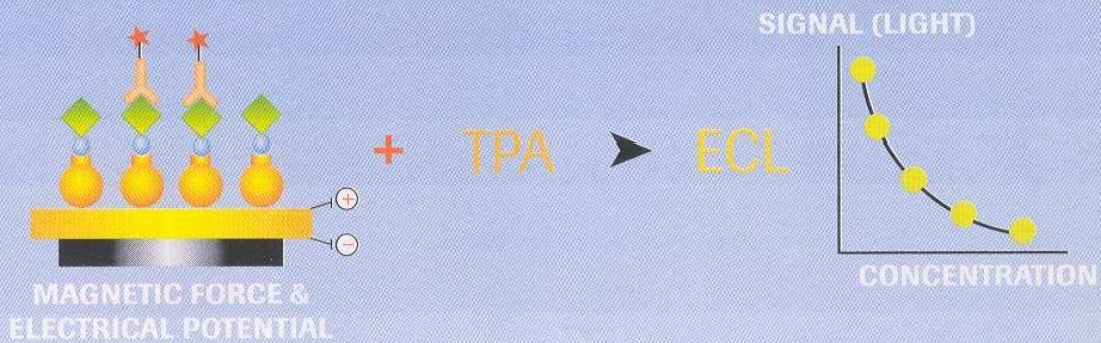
FIRST REACTION



SECOND REACTION



LIGHT REACTION



ANTIGEN

BIOTINYLATED ANTIGEN

RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

TPA TRIPROPYLAMINE

Technologie ChemiFlex CMIA (Abbott)

- CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročasticích
- Značení patentovaným akridiniem
- Možnost dvou promývacích kroků (One Step, Two Step)

CMIA - princip



CMIA - princip

- Mikročástice (microparticles): mikročástice potažené rekombinantním antigenem ve fyziologickém roztoku s TRIS pufrem
- Konjugát :konjugát rekombinantních antigenů s akridiniem a monoklonální protilátkou proti příslušnému antigenu s akridiniem

CMIA - princip

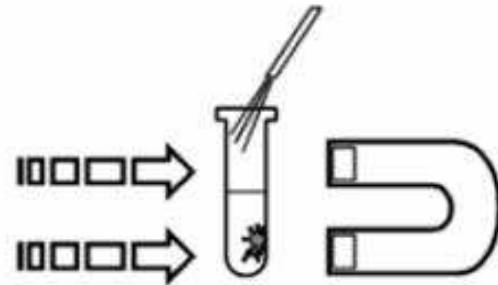
1. Dávkování paramagnetických mikročastic obalených záchyťovými molekulami do reakční nádoby se vzorkem
2. Inkubace v třepačce, analyt ze vzorku se naváže na záchyťové molekuly na mikročasticích – vznik imunokomplexu



Vazba mezi vzorkem a mikročasticemi

CMIA - princip

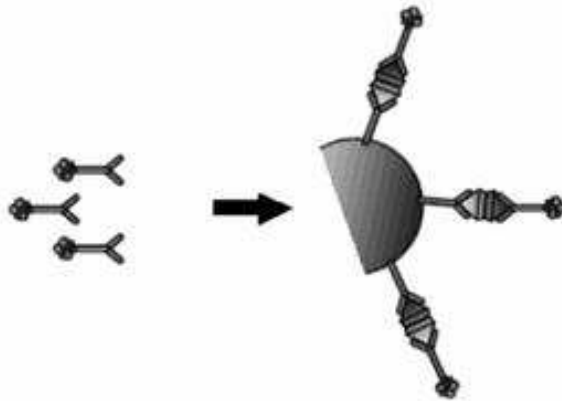
3. Po inkubaci přitáhne magnet paramagnetické mikročástice (navázané na specifický analyt) ke stěně reakční nádoby
Následuje proplach reakční směsi a odstranění nenavázané látky



Přitažení paramagnetických mikročástic magnetem

CMIA - princip

4. Přídavek konjugátu značeného chemiluminiscenčním akridiniem
Konjugát se naváže na imunitní komplex



Přidání akridiniového konjugátu

5. Inkubace
6. Promytí a odstranění nenavázaného analytu

CMIA - princip

7. Nadávkuje se Pre-Trigger (peroxid vodíku) a optický systém CMIA provede čtení pozadí

Pre-Trigger plní následující funkce:

- vytváří kyselé prostředí, které zabraňuje předčasnému uvolnění emise světla
- pomáhá předcházet shlukování mikročástic
- slouží k odštěpení akridinového barviva z konjugátu navázaného na komplex mikročástice

Akridinové barvivo je připraveno pro další krok.

8. Do reakční směsi se nadávkuje Trigger (hydroxid sodný). Dojde k oxidační reakci a vzniku chemiluminiscence

Vzniká N-methylakridon a při návratu do základního energetického stavu uvolní energii ve formě emise světla

9. Obsah analytu je zjišťován na základě měření chemiluminiscenční emise

CMA – stanovení **kortizolu**

- Jednokroková imunoanalýza, kompetitivní
- Vzorek se smíchá s paramagnetickými mikročásticemi potaženými protilátkami proti kortizolu
- Kortizol ze vzorku se naváže na protilátky proti kortizolu na mikročásticích
- Po inkubaci se do reakční směsi přidá konjugát kortizolu s akridiniem
- Konjugát soutěží o dostupná vazebná místa na mikročásticích potažených protilátkami proti kortizolu
- Po druhé inkubaci se mikročástice promyjí a do reakční směsi se přidají roztoky Pre-Trigger a Trigger
- Množství kortizolu ve vzorku je nepřímo úměrné jednotkám RLU (Relative Light Units), ve kterých se měří výsledná chemiluminiscenční reakce

Fluorescenční enzymová imunoanalýza – RAD 120 (Radim)

např. **Stanovení prolaktinu** (sendvič)

- ke vzorku a přidá polyklonální protilátka navázaná na magnetizovatelné částice
- a monoklonální protilátka proti prolaktinu značená alkalickou fosfátasou
- inkubace, promytí
- přidá se substrát – 4-methylumbelliferyl fosfát
- při další inkubaci vznik 4- methylumbelliferon
- fluorescence při 450 nm

Homogenní fluorescenční imunoanalýza – TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) - Kryptor (Brahms)

Princip měření:

- Neradioaktivní přenos energie z donoru (kryptátová struktura s iontem europia v centru) na akceptor (chem. modif. protein)
- Měření signálu emitovaného z imunokomplexu s časovým zpožděním
- Měřený vzorek je ozářen dusíkovým laserem, následně donor (kryptát) emituje fluorescenční signál, po něm emituje signál akceptor

Odpadají promývací a separační kroky

Příklad problematického stanovení – **Tyreoglobulin** (glykoprotein s rozhodující úlohou při syntéze T3 a T4)

- V přítomnosti protilátek proti Tg – výsledky mohou být ovlivněny
- Platí pro imunochemické stanovení od různých výrobců
- Doporučeno současné stanovení anti-Tg
- Nebo konfirmační stanovení Tg s přidavkem známé konc. Tg

Výsledky Tg i Tg po přidavku Tg zadat do vzorce – je-li výtěžnost mimo požadované rozmezí, vliv protilátek okomentovat