

Doplňky a opravy ke skriptům Klinická biochemie

Analytická část

Str. 133, 32.1. Močovina dU 167 – 583 mmol/24 hod

Str. 134, 32.2. Kreatinin dU 8,8 – 15,0 mmol/24 hod

Str. 134, 32.2.1.1. metody používající Jaffého reakci
- třetí věta Jaffého reakce není specifická

Str. 136, 32.3. Kyselina močová (1,3,8 trioxopurin)

Str. 136, 32.3. Kyselina močová dU 0,5 – 6,0 mmol/24 hod

Str. 140 Na^+ , K^+ , Cl^- se u vzorků moče stanovuje vždy po ředění diluentem s vyšší iontovou silou, aby byla u vzorků, kde bývá velmi rozdílná, zachována její podobná hodnota

Str.151, 35.1. Hemoglobin

Místo karboxyhemoglobin:

Karbaminohemoglobin (Hb-NHCOOH, karbohemoglobin) – sloučenina hemoglobinu a oxidu uhličitého, který je v této formě transportován krví

Karbonylhemoglobin, častěji **karboxyhemoglobin** – forma obsahující oxid uhelnatý

Str.158, 37.3. Turbidimetrické metody

Jako doporučená turbidimetrická metoda pro stanovení CB v moči a likvoru – odstavec 41.1. ze str.167 Stanovení s benzethonium chloridem

Str.159 za odstavec 38.1.3. tematicky patří odstavec 41.2. Mikroalbuminurie ze strany 167

Str. 175 za kapitolu 44 zařadit laktát

Str. 181 přiřadit ApoA, Apo B a homocystein

Str. 222, 50.1.5. Glukosa

– druhá věta ... na glukonolakton a peroxid vodíku.
třetí věta

Peroxid vodíku v přítomnosti peroxidázy oxiduje indikátor za vzniku zelené barvy.

Str. 224, za bod 50.2.3.Hamburgerův sediment doplnit Mikroskopické vyšetření moče – popis jednotlivých částic

Za str. 224 doplnit Analýza močového konkrementu

Ke kapitolám 42. Kardiomarkery, 47. Stanovení léků a drog, 48. Hormony, 49.

Tumormarkery, případně 52. Vitamíny a Osteomarkery (v analytické části neuvedeno) je přiložen detailnější postup imunochemické analýzy.

Laktát

Analyzovaný materiál: plasma, likvor

Speciální preanalytické požadavky: K odběru pro stanovení v plasmě se využívají zkumavky s fluorid/EDTA nebo fluorid/oxalátem. Plasmu je nutno rychle po odběru stočit. Pro stanovení v likvoru se používají zkumavky bez přísad.

Interference: není významná

Referenční rozmezí: P- laktát : 0,6 - 2,3 mmol/l
CSF-laktát : 1,2 - 2,1 mmol/l

TMU: -

Referenční metoda: -

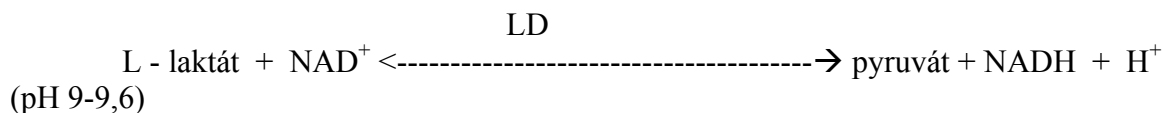
Certifikovaný referenční materiál: -

Laktát (sůl kyseliny mléčné) vzniká především v kosterním svalstvu, mozku, kůži a erytrocytech. Přibližně 65% laktátu je zpracováno v játrech. Větší množství laktátu vzniká při dlouhodobé intenzivní fyzické aktivitě. Laktát je konečným produktem glykolýzy za anaerobních podmínek. Signifikantní laktátovou acidózu představuje koncentrace laktátu větší než 5 mmol/l a pH menší než 7,25.

Pot obsahuje značné množství laktátu. Při analýze je třeba zabránit dotyku špiček.

Doporučené rutinní metody:

Stanovení s laktátdehydrogenasou

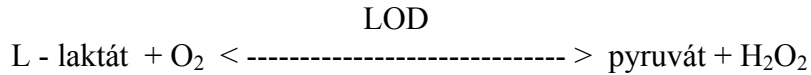


Reakce laktát - pyruvát běžně běží výrazně vlevo. Při pH 9 - 9,6 a následné reakci, kdy je

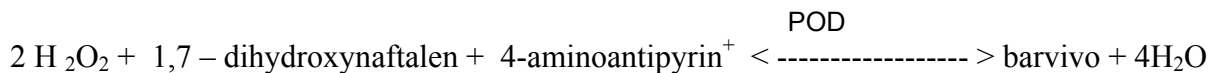
spotřebováván pyruvát se rovnováha posunuje vpravo.
Fotometricky se měří nárůst absorbance NADH při 340 nm.

Stanovení s laktát oxidasou

Laktát je v přítomnosti specifického enzymu laktát oxidasy oxidován na pyruvát:



Peroxidu vodíku pak dále reaguje oxidační koplací např. s 4-aminofenazonem a 1,7 – dihydroxynaftalenem v přítomnosti peroxidasy (POD) za vzniku barviva, jehož absorbance je přímo úměrná koncentraci laktátu.



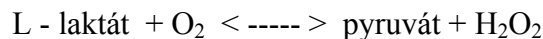
Stanovení v hemolyzátu či plasmě -

- Elektrochemicky na POCT či glukometrech s využitím biosenzoru:

Při stanovení se využívá kapilární odběr.

Princip:

V senzoru je zabudován enzym LOD, který katalyzuje vznik peroxidu vodíku



Peroxid vodíku se rozkládá na platinové elektrodě za uvolnění elektronů – generovaný proud se stanoví amperometricky .

Mikroskopické vyšetření moče – popis jednotlivých částic

Erytrocyty

Erytrocyty jsou bezjaderné buňky s piškotovitým tvarem, nejmenší ze základních elementů nacházených v moči.

Příčiny hematurie:

1. Renální (glomerulonefritida, nádor ledvin)
2. Prerenální (hemoglobinurie a myoglobinurie – hemolýza, svalová traumata, popáleniny)
3. Subrenální (krvácení do močových cest – zánět, kámen, nádor; hemoragická diatéza)

Erythrocyty. Šipky ukazují na akantocyty (dimorfní erythrocyty) jejichž nález svědčí pro renální krvácení.

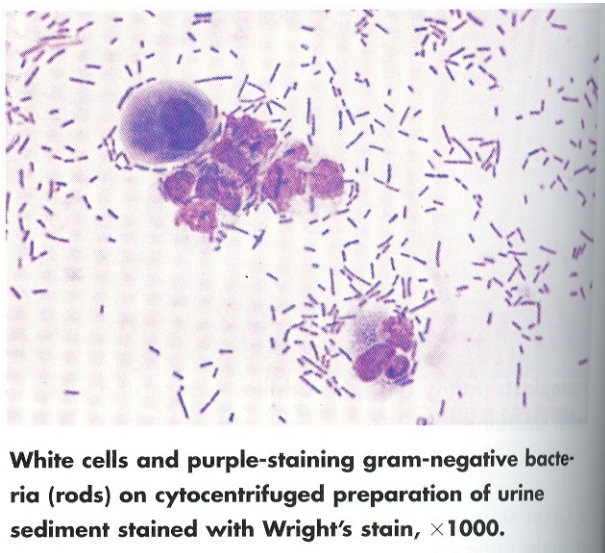


Leukocyty

Leukocyty jsou bezbarvé jaderné buňky přibližně kulatého tvaru.

Průkaz leukocytů v moči svědčí pro bakteriální zánět močových cest nebo ledvin.

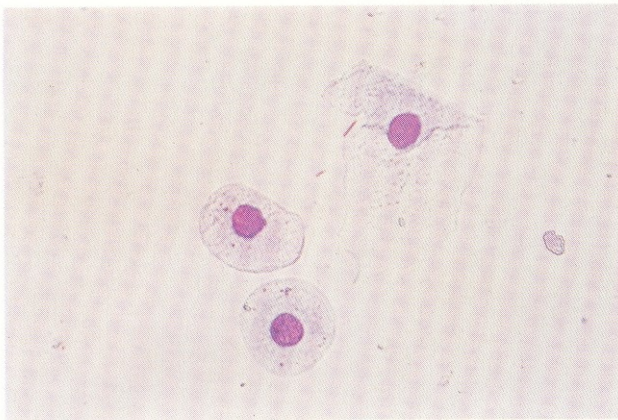
Leukocyty obklopené gramnegativními bakteriemi



Epitelie se dělí na dlaždicové (skvamózní), buňky přechodného epitelu a renální tubulární. Dlaždicové (skvamózní) epitelie — pochází z uretry a vagíny. Mají nepravidelný tvar, velké, dobře viditelné jádro. Jejich klinický význam je minimální, většinou svědčí o kontaminaci. Jedná se o častý nález.

Buňky přechodného epitelu — jedná se o buňky epitelární výstelky urinálního traktu — močový měchýř a proximální část uretry u mužů. Buňky pocházející z hlubších vrstev jsou hustší a kulatější. Ty, které jsou v přímém kontaktu s močí, absorbují vodu a vypadají jako balónky s vodou. Jsou menší než dlaždicové epitelie. Mohou mít i dvě jádra. Menší počet může být normální, velké množství se objevuje vlivem infekcí a některých léků.

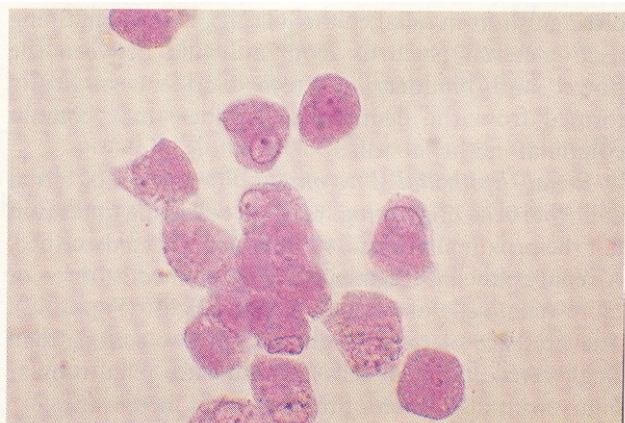
Buňky přechodného epitelu



Two transitional epithelial cells, one folded squamous epithelial cell. Cytospin, Wright's stain, ×400.

Renální tubulární epitelie je možno považovat za významný nález. Bývají však identifikovány velmi zřídka. Velký počet svědčí o renální tubulární nekróze nebo virové infekci. Jsou malé, asi dvakrát větší než neutrofilily, polyedrické, mají často excentrické ohraničené jádro.

Renální tubulární epitelie



Cuboidal or polyhedral renal tubular epithelial cells probably from the small collecting ducts; very difficult to differentiate from transitional epithelial cells. Sedi-Stain, $\times 400$.

Oválná tuková tělíska — jedná se o renální tubulární epitelie nebo makrofágy naplněné tukem. Objevují se při velké permeabilitě glomerulu u pacientů se sníženým albuminem, kteří mají zvýšenou syntézou proteinů a lipoproteinů.

Válce vznikají precipitací proteinu v tubulech ledvin. Základ tvoří Tamm — Horsfallův glykoprotein, který je sekretován z renálních tubulárních buněk. Vyšší tendence pro tvorbu válců je při kyselějším pH, v přítomnosti větší koncentrace plasmových bílkovin, při dehydrataci organismu nebo po náročné fyzické aktivitě.

K charakteristickým vlastnostem patří definovaná vnější linie, paralelní strany, zakulacené konce, tvar tubulu. Občas je možno pozorovat úlomky válců. Bez barvení jsou pod mikroskopem špatně viditelné, lepší viditelnost poskytuje fázová kontrastní mikroskopie.

Válce mohou být hyalinní, buněčné, granulované, tukové, voskové a směsné.

Po vytvoření válce nezůstávají ve stejném stavu, ale postupně se vyvíjí. Čím jsou horší tlakové podmínky v ledvině, tím zůstávají déle a dojde k tvorbě pozdějších stádií válců. Buňky obsažené v buněčných válcích podléhají postupné degeneraci, dochází ke zborcení, ztrátě buněčné membrány a tvorbě granulí. V tomto stadiu se válce nazývají granulované. Granule postupně podléhají další generaci, ztrátě struktury, válcová hmota zhoustne, ztřešne a zvoskovatí, vznikají voskové válce.

Hyalinní válce - jedná se o nález, který není v menším množství patologický. Objevují se v koncentrované kyselé moči. Ve velkém počtu se mohou objevit při zánětech. Bývají pak úzké v důsledku otoku tubulů.

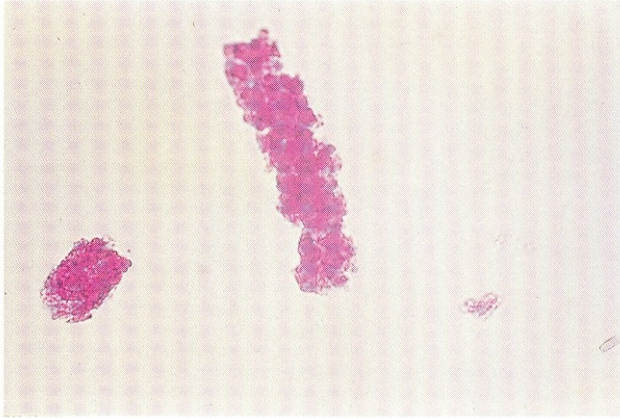
Buněčné válce — do této kategorie patří erytrocytární, leukocytární (granulocytární), z renálních tubulárních epitelii, bakteriální. Nález všech těchto válců je patologický.

Erytrocytární válce — objevují se při glomerulární nefritidě, jsou nejkřehčí ze všech válců, proto jsou nalezeny vyjimečně.

Leukocytární válce — nejčastěji z neutrofilů, objevují se při zánětech a infekcích.

Válce renálních tubulárních epitelii — např. po otravě Hg nebo etylenglykolem, při hepatitidě, kdy dochází k poškození tubulů. Není-li jisté, zda-li jsou částice ve válci leukocyty nebo epitelie, nazveme válec buněčný.

Buněčný válec pravděpodobně z erytrocytů

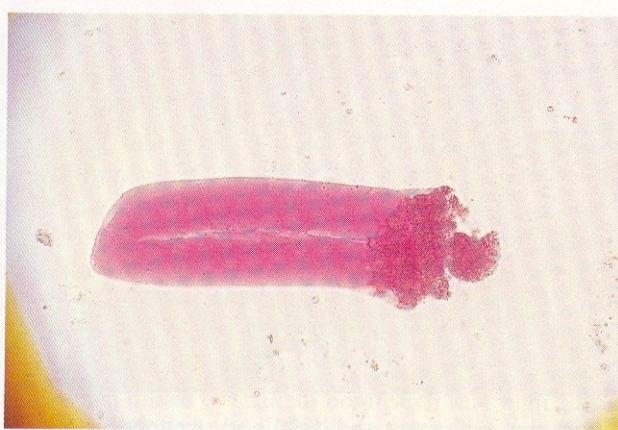


Cellular cast (probably red cell origin). Sedi-Stain, ×400.

Granulované válce — granule vznikají po rozbití buněčné membrány ve válci či tubulech. Malý počet se jich může objevit po intenzivní fyzické aktivitě (hodně jich bylo nalezeno u otužilců), ale větší počet je silně patologický. Obsahují agregované plasmatické proteiny, fibrinogen, globuliny. Není v nich možno určit původ buněk, ze kterých granule vznikly. Vidíme-li na válci pouze několik granulí, řadíme válce mezi hyalinní.

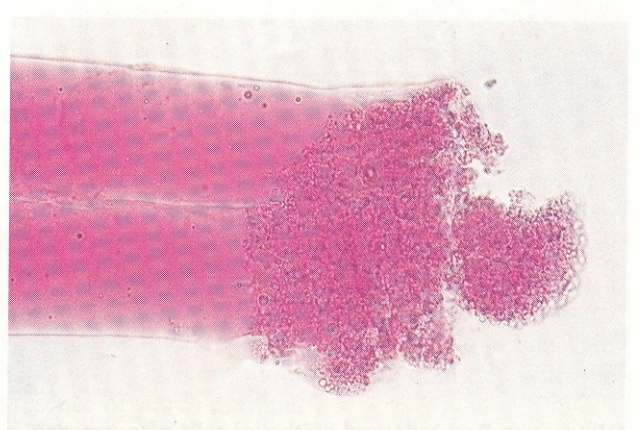
Voskové válce – jejich přítomnost je nejzávažnější, objevují se při chronickém onemocnění ledvin. Říká se jim válce renálního selhání. Mají homogenní strukturu, ale v některých částech mohou přecházet ve válec jiného typu — např. granulovaný. Jsou nejširší ze všech válců a mívají nepravidelně zalomené konce. Vypovídají o poškození tubulů a obsahují částičky ledvin. Zůstávají v tubulech ledvin nejdéle.

Voskový válec s granulovaným koncem



A

Broad waxy cast with central fissure and granular end. Sedi-Stain. A, Low-power, ×160. B, Higher magnification of same cast as in A, showing granular end and fat inclusions, ×400.



B

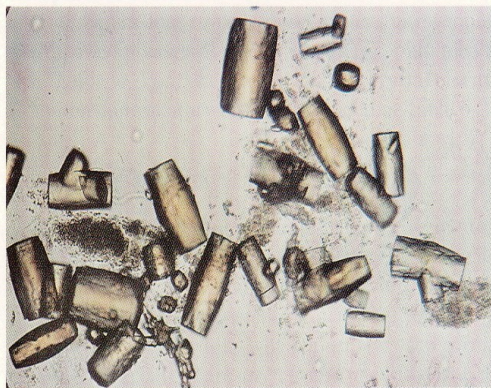
Tukové válce — objevují se v případě silné renální dysfunkce, nefrotického syndromu. Často jsou v moči s pěnou, silně zvýšenou bílkovinou a albuminem, u diabetiků, po intoxikaci Hg. Obsahují

oválná tuková tělíska. Speciálním barvením lze rozlišit, zda je v nich převaha cholesterolu či triglyceridů.

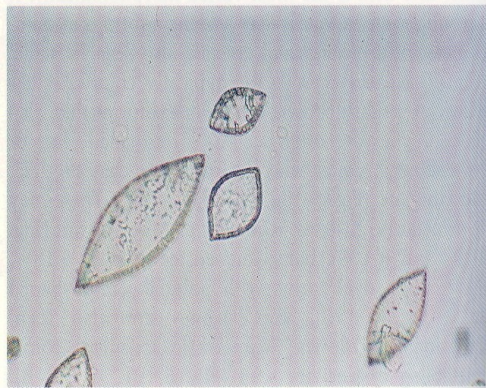
Pseudoválce – např. vlákna hleny, vlákna z plínek

Krystaly a amorfní drť – většinou se nejedná o příliš významný nález. Nejčastěji se objevují oxaláty, kyselina močová, fosfáty a triplfosfáty. Vyjimečně je třeba počítat s tvorbou lékových, bilirubinových, cystinových a myoglobulinových krystalů.

Krystaly kyseliny močové



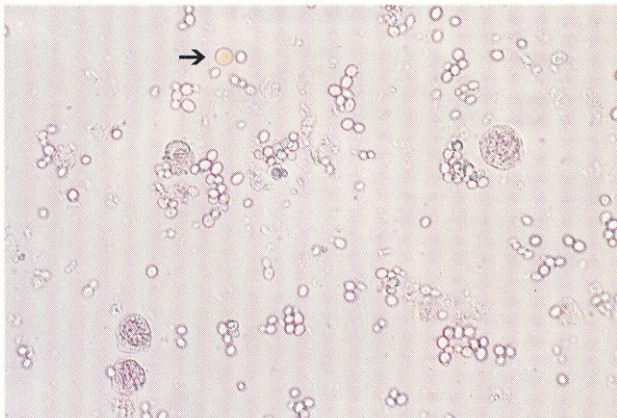
Uric acid, large, barrel-shaped, ×100



Uric acid, large, lemon-shaped, ×400.

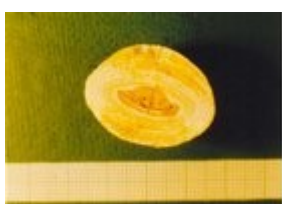
Při mikroskopickém vyšetření moče hodnotíme také přítomnost dalších nalezených kategorií jako jsou např. bakterie, kvasinky, plísně, hlen, spermie atd.

Kvasinky – typické řetězkovité řazení



Many slightly stained yeast, white cells (4), and red cell (arrow). Sedi-Stain, ×400.

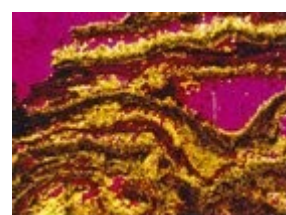
Močové konkrementy



Průřez konkrementem z močového měchýře, skládá se z vrstev struvitu a apatitu.



Odlitkový kámen z pánvičky ledvinné tvořený vrstvami struvitu a apatitu.



Střídající se vrstvy apatitu a whewellitu s příměsí weddellitu, výbrus, PM **zvětšeno 160x**

Metody používané k analýze močových konkrementů:

1) INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE

Infračervená spektrometrie je metoda, která zkoumá absorpci infračerveného záření molekulami vzorku. Poskytuje informace o přítomných funkčních skupinách a o molekulové struktuře látky a slouží i k jejímu kvantitativnímu stanovení.

V infračervené oblasti je aktivní většina molekul, přičemž absorpční spektrum je pro látku tak charakteristické, že kromě izomerů prakticky nelze najít dvě různé látky se stejným spektrem. Při absorpci elektromagnetického záření v infračervené oblasti spektra nastává změna vibračních a rotačních stavů molekuly.

Infračervená část spektra se dělí na oblast blízkou, střední a vzdálenou (rotační změny). Při analýze močových konkrementů se využívá střední oblast, ve které dominují vibrační změny - v rozsahu 4 000 do 400 cm^{-1} .

Infračervené spektrum

Vzniká superpozicí absorpčních pásů náležících vibračním dvojic atomů, skupin atomů nebo celé molekuly. Znázorňuje závislost absorbance A nebo transmitance T na vlnótu nebo vlnové délce. V infračerveném spektru se rozlišují dvě oblasti:

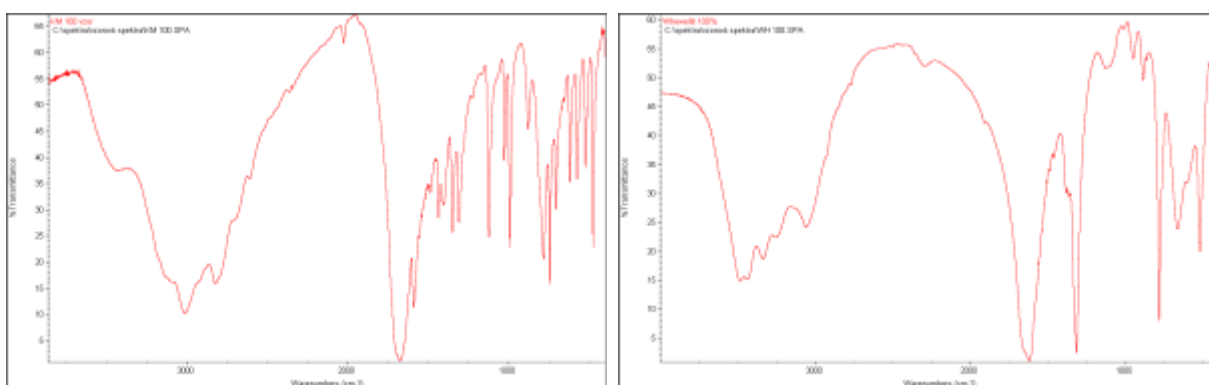
- oblast skupinových vibrací mezi 4 000 až 1 400 cm^{-1}

- oblast "otisku palce" pod $1\,400\text{ cm}^{-1}$, kde se nacházejí deformační a skeletové vibrace, které jsou charakteristické pro molekulu určité chemické sloučeniny.

Metodika přípravy vzorků

Při analýze konkrémentů se v IČ nejčastěji používá **KBr technika**, která spočívá v lisování směsi jemně rozetřené analyzované látky s KBr. Slisováním suché směsi tlakem cca 500 MPa v lisovací formě vznikají průhledné tablety, které se analyzují v spektrometru.

Příklady IČ spekter:



2) Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskop je využíván v geologii, mineralogii a metalurgii. Oproti běžnému mikroskopu je vybaven polarizačním zařízením, které umožňuje studovat i ty vlastnosti minerálů, které nejsou patrné v obyčejném (nepolarizovaném světle). Optickými metodami lze minerály studovat v procházejícím nebo v odraženém světle.

Optické jevy, k nimž dochází v důsledku interakce polarizovaného světla a krystalů, jsou často neobyčejně složité. Kvalitní využití polarizačního mikroskopu vyžaduje mnoho dalších znalostí a především praktických zkušeností.

Stanovení hormonů, léků, tumormarkerů, kardiomarkerů, anemických markerů a osteomarkerů

Ke stanovení uvedených parametrů se používají převážně **imunoanalytické metody**. Další významnou metodikou pro tyto analyty je **vysokoúčinná kapalinová chromatografie**.

Imunoanalytické metody jsou založeny na specifické reakci antigen – protilátka.

Můžeme je rozdělit z několika hledisek:

- 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 imunokomplexu –
většina používaných metod)

- 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, B12, folát, teofylin, fenytoin). S výhodou se u ní používají polyklonální protilátky.

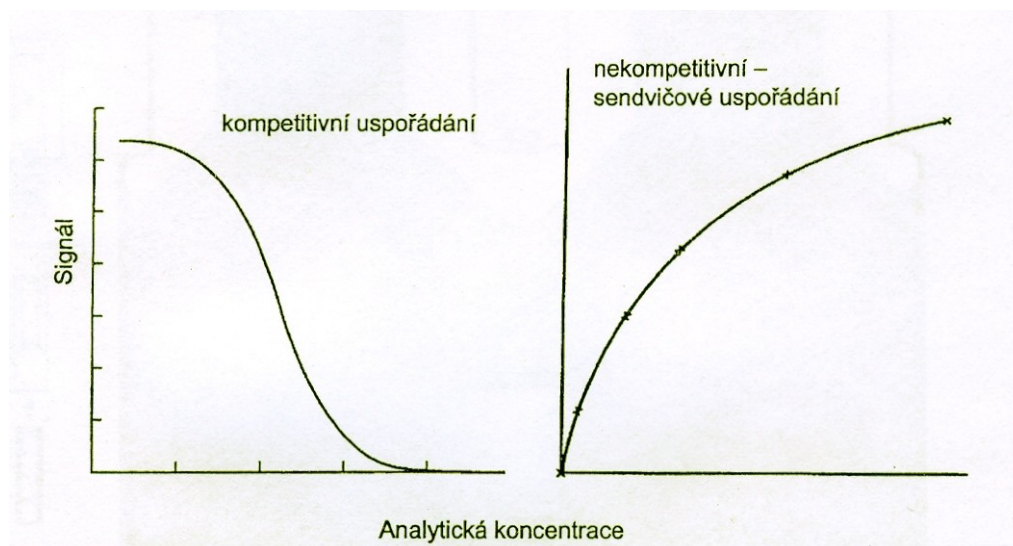
Sendvičové stanovení:

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 větší molekuly a molekuly s vyšší molekulovou váhou, které umožňují vazbu protilátek na dvě determinanty – př. TSH, ferritin, nádorové antigeny (CA), PSA, S100, CKMB mass, Troponin T, osteomarkery (PINP, β -CrossLaps). Používají se při ní dvě monoklonální nebo jedna monoklonální a jedna polyklonální protilátka.

Můstkové uspořádání:

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



Specificita a senzitivita imunochemických vyšetření jsou ovlivněny používanou protilátkou. Používány jsou protilátky monoklonální a polyklonální.

Monoklonální protilátky – jsou produkovány hybridovými buňkami, které se připravují fúzí imunizovaných slezinových buněk s nádorovými. Po vyčištění a selekci produkují jen jediný typ protilátky. S touto protilátkou se dosahuje vyšší specifity. Lze ji produkovat kontinuálně.

Polyklonální protilátky – připravují se imunizací zvířete, jsou vždy směsí protilátek, jsou schopny rozeznat i izoformy antigenu a mají proto vyšší citlivost. Závisí na imunizovaném zvířeti a jejich získání může být neopakovatelné.

Pro výslednou senzitivitu stanovení je podstatný také způsob detekce – dostatečnou citlivost mají např. luminiscenční metody.

Ruční metody:

Radioimunoanalýza:

Jedná se o nejstarší imunoanalytickou metodu, která se řadí k heterogenní imunoanalýze. Používá se již od roku 1959. Je velmi citlivá, ale náročná na ruční práci a na zachování předpisů při práci s radioizotopy.

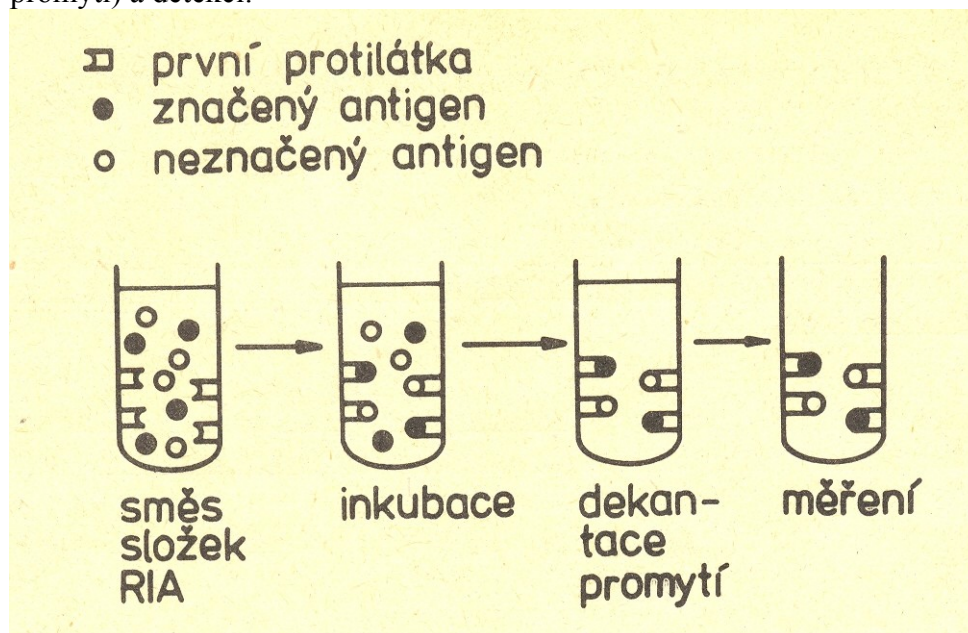
Jako značka se používá izotop jódu ^{125}I . Jedná se o α – zářič s poločasem rozpadu 60 dní. Vyjíměčně, pouze v málo laboratořích se používá značení β – zářičem triciem (^3H) s poločasem rozpadu kolem 12 roků.

Radioimunoanalýza se používá v kompetitivním uspořádání (RIA) nebo jako sendvičová metoda (IRMA – Imunoradiometrická analýza).

Přesto, že počet analytů stanovovaných radioimunoanalýzou nebývá v současných laboratořích příliš vysoký, má tato analýza v rámci imunoanalytických metod nezastupitelné místo. V nabídce jsou často stanovení nově používaných analytů, která ještě nebyla vypracována pro automatické imunoanalýzátory.

Schematické znázornění kompetitivního stanovení (RIA):

Schéma zachycuje jednotlivé kroky – smíchání komponent, inkubaci (vznik komplexu antigen-protilátka), separaci (v tomto případě ukotvení komplexu na pevném nosiči a promytí) a detekci.



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. Sérum a standardy se inkubují ve zkumavkách potažených protilátkou společně s 17-OHP značeným ^{125}I (radioindikátor). Po inkubaci a odsátí obsahu zkumavek se měří radioaktivita navázaného komplexu ve zkumavce. Koncentrace 17-OHP ve vzorcích se odečítají z kalibrační křivky.

Detekce se provádí s využitím scintilačního detektoru:

Gama měřič LB 2104 je multidetektorový gama měřič, je určen pro kvantitativní měření radioaktivity gama záření radioaktivních nuklidů. Scintilační detektor je založen na vzniku luminiscence při průchodu ionizujícího záření vhodnou látkou - scintilátorem. Pro detekci záření gama se jako scintilační jednotky používají krystaly NaJ/Tl, tj. jodidu sodného, v němž je obsaženo malé množství thalía. Systém je vybaven 12 scintilačními jednotkami (sondami) a fotonásobičem.

Při průchodu záření gama scintilačním krystalem dochází k fotoelektrickému jevu a ke Comptonově rozptylu (foton vyráží elektron a ztrácí část energie). Elektrony uvolněné z atomových obalů excitují atomy krystalu. Přitom vzniká viditelné luminiscenční záření zvané scintilace. Pro přeměnu scintilací na elektrické impulsy, se používají fotonásobiče.

Při detekci je možno měřit až 12 zkumavek současně.

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Stanovení patří k enzymové imunoanalýze, kdy je enzym využíván jako značka. Enzymová imunoanalýza může být využívána také na imunoanalyzátozech (př. Immulite, Siemens, enzym ALP). U ruční techniky ELISA se nejčastěji jako značka používá křenová peroxidasa. Opět můžeme využít uspořádání kompetitivní nebo sendvičové.

Stanovení se provádí na mikrotitračních destičkách, potažených protilátkou. Jednotlivé fáze stanovení jsou velmi obdobné jak bylo uvedeno u radioimunoanalýzy. Pro usnadnění práce se často využívají vícekanálové pipety a automatické promývací stanice.

K detekci slouží vertikální fotometr pro mikrotitrační destičky (reader). Uspořádání umožňuje proměřit koncentrace v celé destičce současně.

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 imunoanalyzátozy, 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).

Příklad ELISA - stanovení luteinačního hormonu:

Souprava je určena ke stanovení LH v séru sendvičovou ELISA. Jamky v mikrotitrační destičce jsou potaženy monoklonální protilátkou proti LH, která vycytává LH ze vzorku. Druhá protilátka, která se přidává, je polyklonální a je značena křenovou peroxidasou. Po inkubaci 1 h při 37 °C a pětinašobném promytí deionizovanou vodou se přidá substrát tetrametylbenzidin, který reaguje s enzymem. Reakce se zastaví kyselinou sírovou a intenzita zbarvení se měří při 450 nm.

Luminiscenční imunoanalýza (heterogenní) – automatické imunoanalyzátozy:

Analyzátozy s luminiscenční - zejména přímou chemiluminiscenční detekcí jsou na trhu

značně rozšířené. Vyznačují se vysokou citlivostí, takže jsou pro stanovení hormonů velmi vhodné. Luminofory používané ke značení nemají interference v biologických materiálech. Zavedení nové metody na analyzátoři je časově i finančně náročné trvá většinou několik let, což je proti RIA a ELISA metodám, které jsou vyvíjeny mnohem rychleji, zřetelná nevýhoda. Nabídka metod bývá proto pozadu za technikou RIA a ELISA.

Velkou výhodou je však automatizace a v poslední době možnost provedení klinických a imunoanalytických metod na automatech z jedné zkumavky.

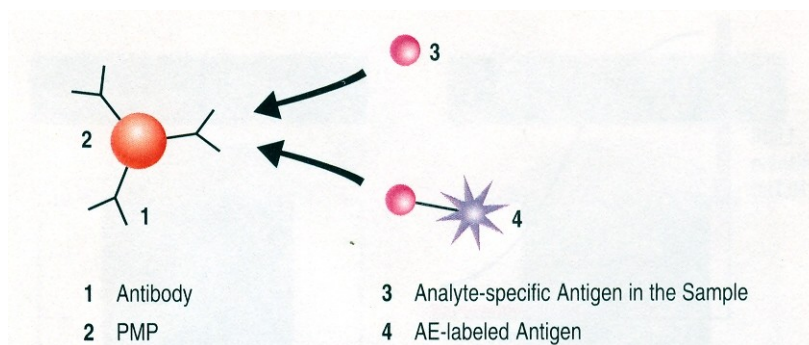
1) Chemiluminiscence – přístroj Centaur, firma Siemens (Bayer)

Princip měření: systém měří kvantitativní množství světla emitovaného během chemiluminiscenční reakce, pevná fáze jsou paramagnetické částice, značka je AE (acridinium ester) - chemiluminiscenční látka, která emituje světlo při oxidaci H_2O_2 v alkalickém prostředí. Reakce probíhá během jedné sekundy a je velice citlivá (10^{-15}).

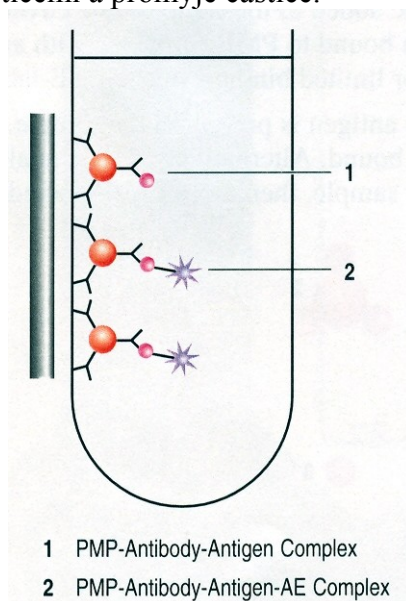
Jako v předchozích případech se využívá kompetitivní i sendvičová reakce.

a) Kompetitivní – př. stanovení estradiolu

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



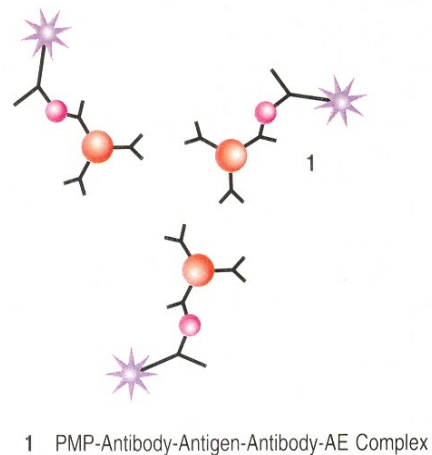
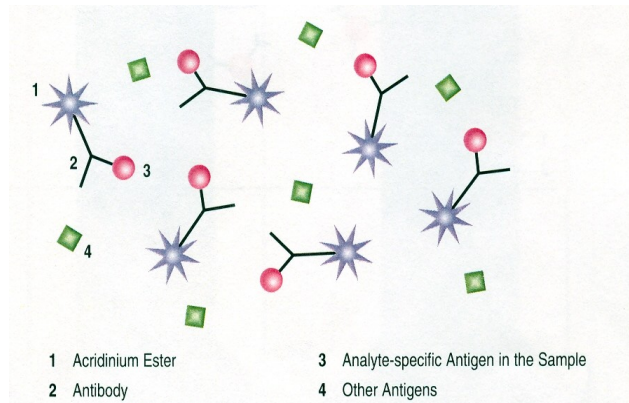
Po inkubaci systém magneticky odseparuje komplex antigen – protilátky s paramagnetickými částicemi a promyje částice.



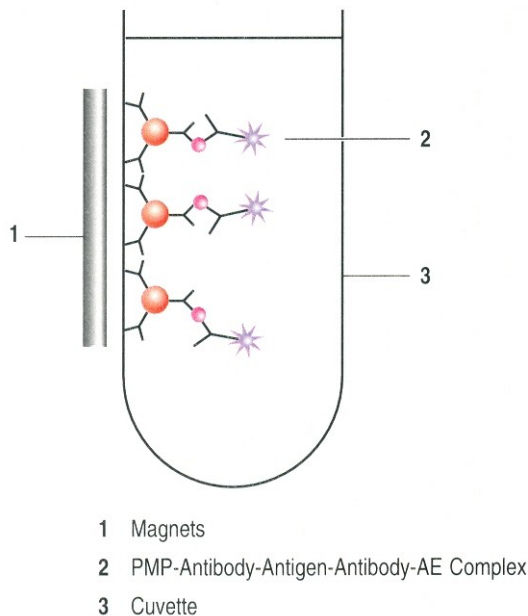
Dále se přidá peroxid vodíku a v luminometru NaOH, který inicializuje chemiluminiscenční reakci.

a) Sendvičová – př.stanovení hCG

Používá se konstantní množství dvou protilátek. První je polyklonální kozi protilátka proti hCG, označená acridinium esterem. Druhá, monoklonální myší protilátka proti hCG je kovalentně vázaná s paramagnetickými částicemi. Tyto dvě protilátky jsou specifické pro odlišné přítomné epitopy, free betasubjednotku a betasubjednotku intaktní molekuly.

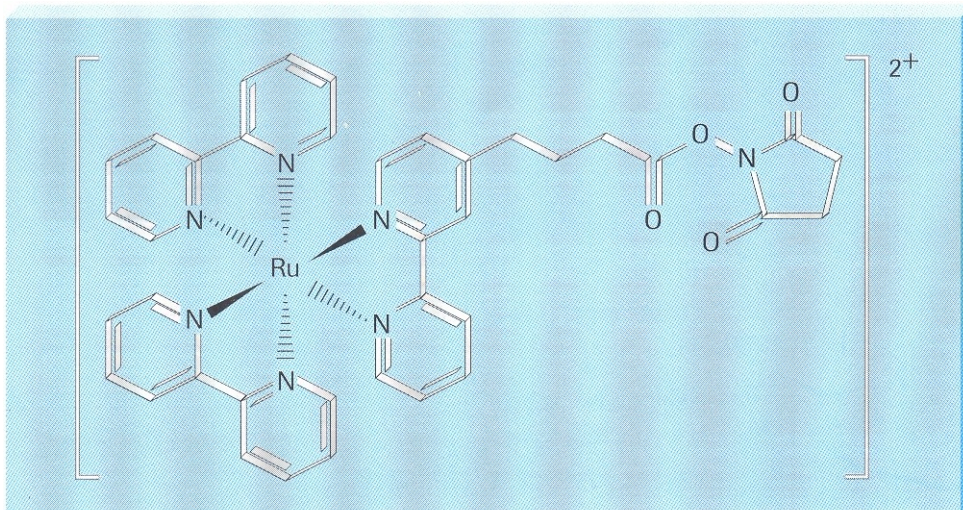


Po separaci, odsátí a promytí se opět dávkuje reagent a proběhne chemiluminiscenční reakce.



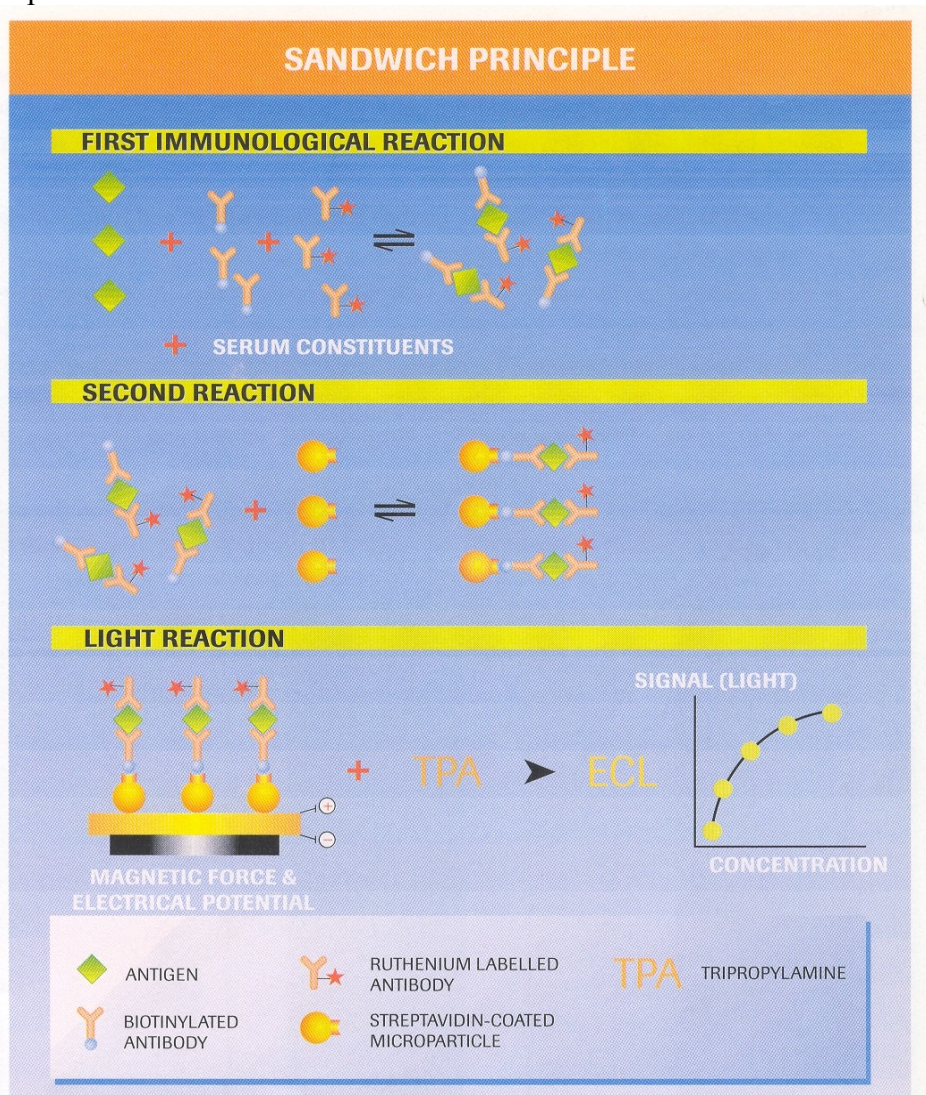
2) Elektrochemiluminiscence –přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

Podle uspořádání metody – kompetitivní nebo sendvičové – jsou protilátka nebo antigen biotynilovány. Další specifická protilátka je značená rutheniovým komplexem.

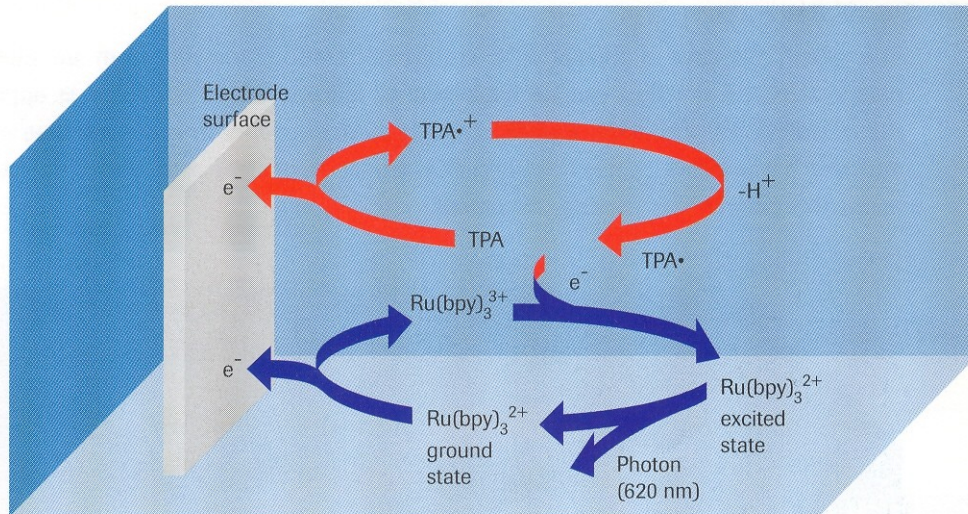


Rutenium(II) tris-bipyridylovým komplexem

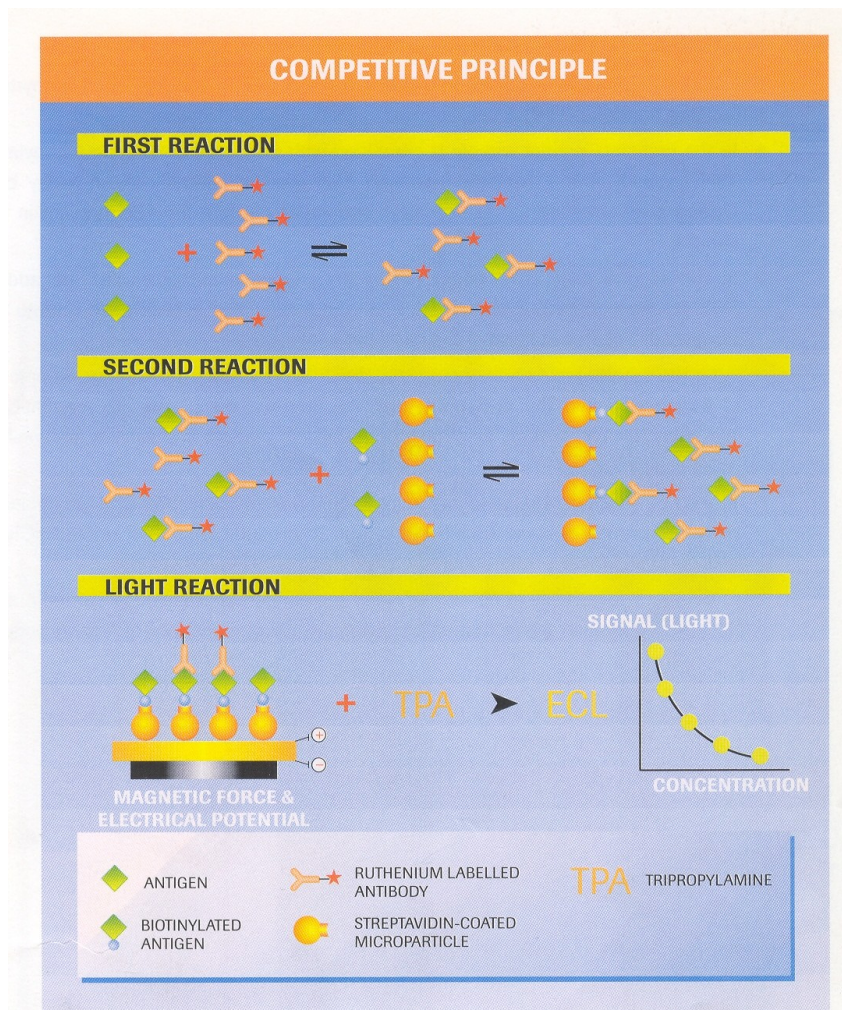
Při sendvičovém uspořádání pak protilátky reagují s antigenem ve vzorku (např. TSH) za tvorby sendvičového komplexu. Firma využívá dvě monoklonální protilátky. Po přidání mikročásteček potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi interakcí biotinu se streptavidinem.



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 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ kationu. Ruthéniový marker se po luminiscenční reakci regeneruje.



Při kompetitivní reakci (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 však nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu.



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

Zkratky

AACC	Americká společnost pro klinickou chemii
AAS	Atomová absorpční spektrometrie
ABR	Acidobazická rovnováha
ALTM	Průměrná hodnota souboru spočítaná po vyloučení odlehlých výsledků
B,b	Odchylka průměru měření od správné hodnoty (míra pravdivosti)
BCR	Evropská společnost referenčních institucí
CA	Sacharidový tumorový antigen
CDC	Centrum pro sledování nemocí a jejich prevence (USA)
CE	Kapilární elektroforéza
CE	Produkt vyhovuje požadavkům Evropské direktivy 98/79 EC pro diagnostické in vitro zařízení
CEDIA	Homogenní imunoanalýza využívající rekombinantní DNA technologii
CMIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích
CRM	Certifikovaný referenční materiál
CSF	Mozkomíšni mok
CUSUM	Metoda VKK formou kumulativního součtu
CV	Variační koeficient (Relativní směrodatná odchylka)
ČIA	Český institut pro akreditaci
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
DELFIA	Lanthanidy zesílená fluoroimunoanalýza
DGKL	Německá společnost klinické chemie a laboratorní medicíny
DPM	Dědičné poruchy metabolismu
EC	Evropská komise
ECLIA	Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
EHK	Externí hodnocení kvality
EIA	Enzymoimunoanalýza
EKK	Externí kontrola kvality
ELFO	Elektroforéza
ELISA	Heterogenní enzymoimunoanalýza
EMIT	Homogenní enzymoimunoanalýza
EN	Evropská norma
ERM	Evropský referenční materiál
ESI	Elektrosprayová ionizace
EU	Evropská unie
FAAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie
FAES	Plamenová atomová emisní spektrometrie
FIA	Fluorescenční imunoanalýza
FID	Plamenový ionizační detektor
FPIA	Fluorescenční polarizační imunoanalýza
GC	Plynová chromatografie
HAMA	Lidské anti-myší protilátky
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IC	Iontová chromatografie
ID	Izotopové zředování
IEF	Izoelektrická fokuzace
IFCC	Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny
ILMA	Imunoanalýza luminiscenční (nekompetitivní)
IQC	Vnitřní řízení kvality
IR	Infračervená spektrometrie
IRMA	Imunoradiometrická analýza

IRMM	Mezinárodní institut pro referenční materiály a měření
ISE	Iontově selektivní elektroda
ISO	Mezinárodní komise pro normalizaci
IU (U)	Mezinárodní jednotka
IVD MD	In vitro diagnostické zařízení pro zdravotnické účely
IZIP	Internetový přístup ke zdravotním informacím pacienta
JCTLM	Společná komise pro návaznost v laboratorní medicíně
LASER	Zesilování světla pomocí stimulované emise záření
LC	Kapalinová chromatografie
LIA	Luminiscenční imunoanalýza
LIS	Laboratorní informační systém
LOT	Číslo šarže
MEIA	Enzymová imunoanalýza na mikročásticích
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NAA	Neutronová aktivační analýza
NČLP	Národní číselník laboratorních položek
NIST	Národní ústav pro normalizaci a technologie (USA)
NZIS	Národní zdravotnický informační systém
P	Krevní plazma
p	Hladina pravděpodobnosti
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PENIA	Imunonefelometrie zesílená částicemi
PETIA	Imunoturbidimetrie zesílená částicemi
pH	Záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů
POCT	Laboratorní metody a testy prováděné v místě péče o pacienta
PRM	Primární referenční materiál
QC	Řízení kvality
QCM	Materiál kontroly kvality
R	Výtěžnost (recovery)
RIA	Radioimunoanalýza
RM	Referenční materiál
ROC	Operační křivka používaná ke sledování specifčnosti a citlivosti metod
S	Krevní sérum
s	Směrodatná odchylka
s ₂	Rozptyl
SD	Směrodatná odchylka
SEKK	Systém externí kontroly kvality (ČR)
SIKK	Systém interní kontroly kvality
SLP	Správná laboratorní praxe (také název počítačového programu)
SOP	Standardní operační postup
SRM	Standardní referenční materiál
TAT	Čas odezvy
TDM	Sledování terapeutických koncentrací léků
TEa	Celková analytická chyba
TLC	Tenkvrstenná chromatografie
TM	Tumorové markery
TMU	Cílová nejistota měření
TRACE	Fluorescenční imunoanalýza využívající kryptandy vážící fluorofor (Eu ³⁺)
U	Moč
VK	Variační koeficient (Relativní směrodatná odchylka)
VKK	Vnitřní kontrola kvality (ekvivalence IQC)
WHO	Světová zdravotnická organizace
x	Průměr

