

Doplňky a opravy ke skriptům Klinická biochemie

Analytická část

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. 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. 147 v odstavci 33.7.2.2. Místo s ferritinem s ferrozinem (věta Nezreagované železnaté ionty jsou pak stanoveny s ferrozinem)

Str. 147 v posledním vzorci na stránce přidat x 100:

$$\text{Saturace transferinu (\%)} = \frac{\text{Konc. Fe (\mu\text{mol/l})}}{\text{Konc. transferinu (g/l)}} \times 3,98 \times 100$$

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: 18 %

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.

Doporučené rutinní metody:

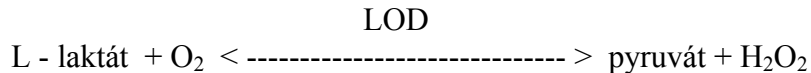
Stanovení s laktátdehydrogenasou



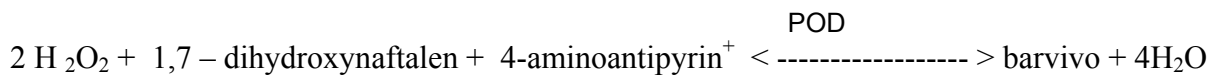
Reakce laktát - pyruvát běžně běží výrazně vlevo. Při pH 9 - 9,6 a následné reakci, kdy je spotřebováván pyruvát se rovnováha posunuje vpravo.
Fotometricky se měří nárůst absorbance NADH při 340 nm.

Stanovení s laktát oxidasou

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



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



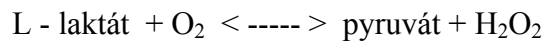
Stanovení v hemolýzátu či plasmě -

- 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 .

Popis jednotlivých částic při mikroskopickém vyšetření moče

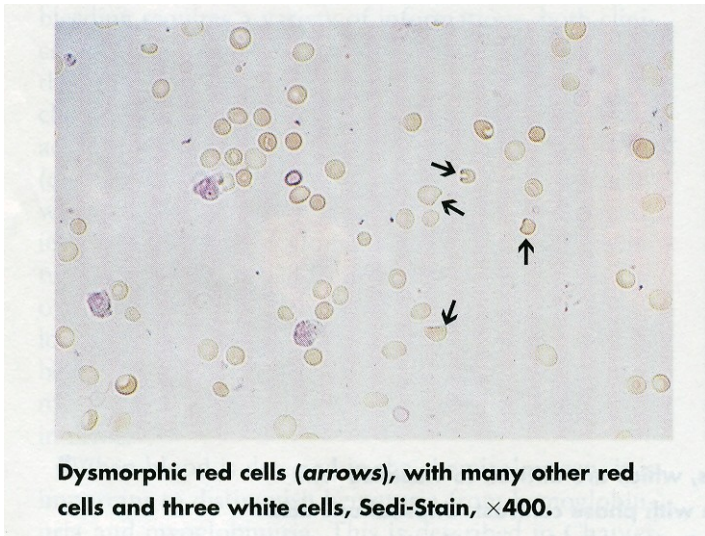
Erythrocyty

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

Příčiny nálezu erythrocytů - 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)

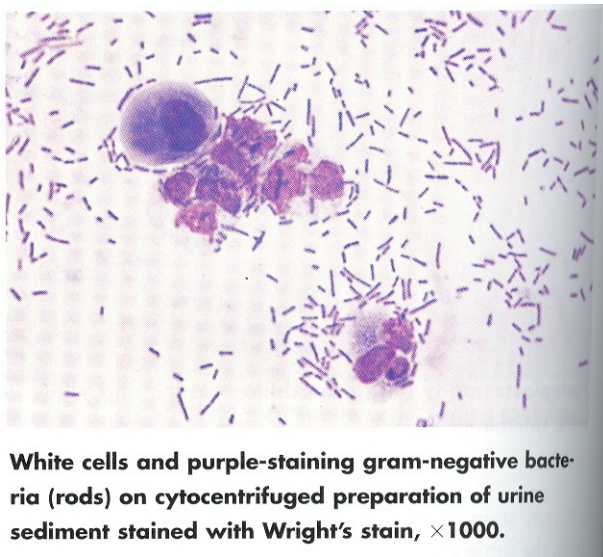
Erythrocyty. Šipky ukazují na akantocyty (dimorfní erythrocyty) jejichž nálezní svědčí pro renální krvácení.



Dysmorphic red cells (arrows), with many other red cells and three white cells, Sedi-Stain, $\times 400$.

Leukocyty jsou bezbarvé jaderné buňky přibližně kulatého tvaru.
Průkaz leukocytů v moči svědčí pro bakteriální zánět močových cest nebo ledvin.

Leukocyty obklopené gramnegativními bakteriemi

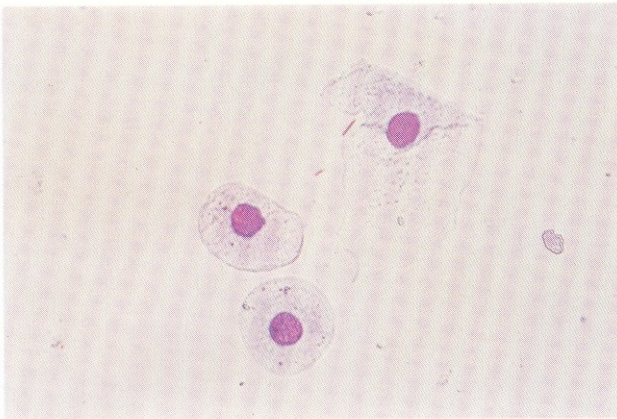


White cells and purple-staining gram-negative bacteria (rods) on cytocentrifuged preparation of urine sediment stained with Wright's stain, $\times 1000$.

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, $\times 400$.

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 neutrofilly, 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 tělíška — jedná se o renální tubulární epitelie nebo mikrofágy 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 kyslejší 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 neměnné, ale postupně se vyvíjí. Čím jsou horší tlakové podmínky v ledvině, tím zůstávají déle a dochází 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.

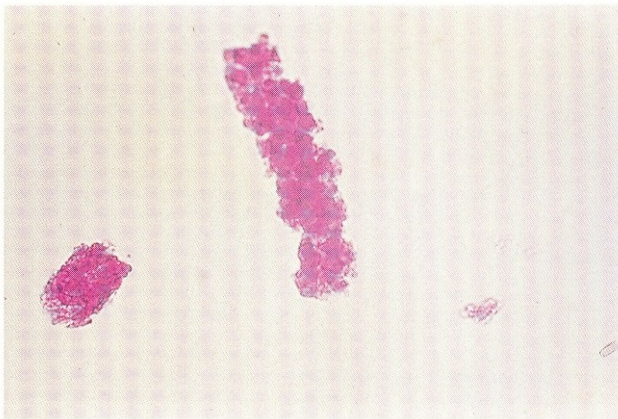
Buněčné válce — do této kategorie patří erytrocytární, leukocytární (granulocytární), z renálních tubulárních epitelii, bakteriální. Nález všech těchto válců je patologický.

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



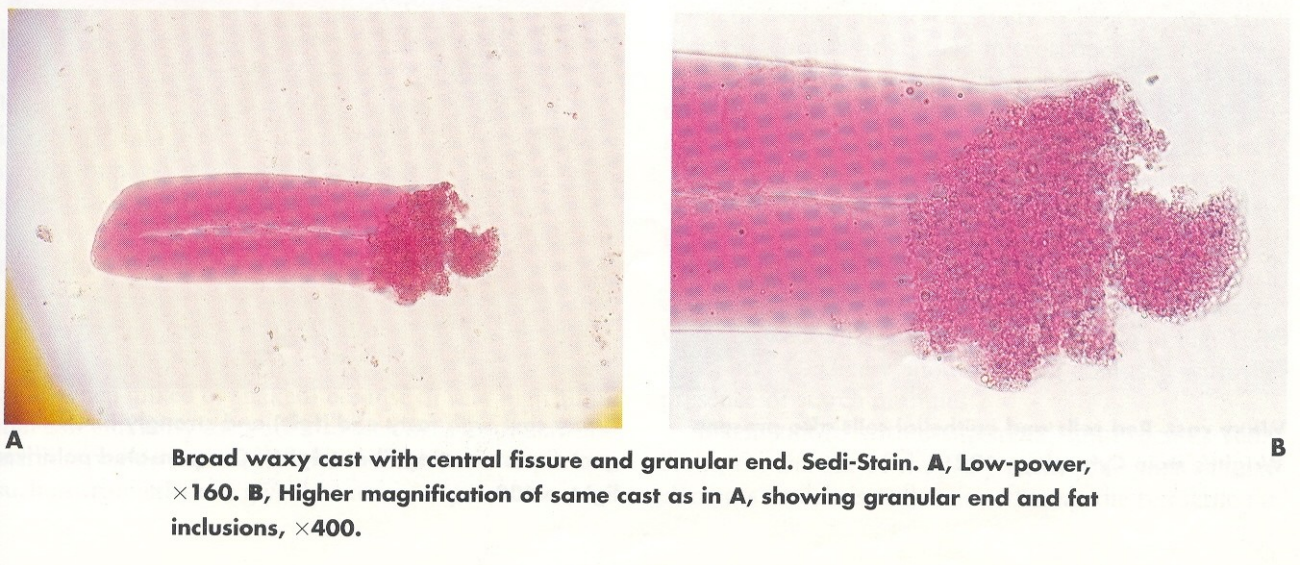
Cellular cast (probably red cell origin). Sedi-Stain, ×400.

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 buňek, 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

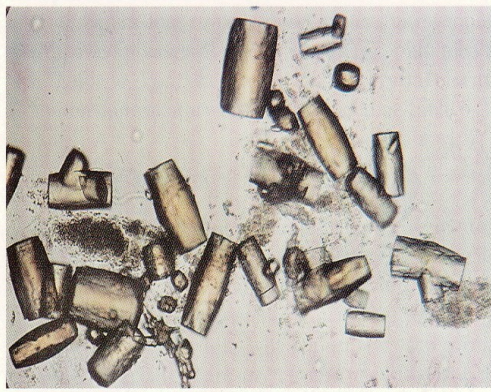


Tukové válce — objevují se v případě silné renální dysfunkce, nefrotického syndromu. Často jsou v moči s pěnou, silně zvýšenou bílkovinou a albuminem, u diabetiků a po intoxikaci Hg. Obsahují oválná tuková tělíska. Speciálním barvením lze rozlišit, zda je v nich převaha cholesterolu či triglyceridů.

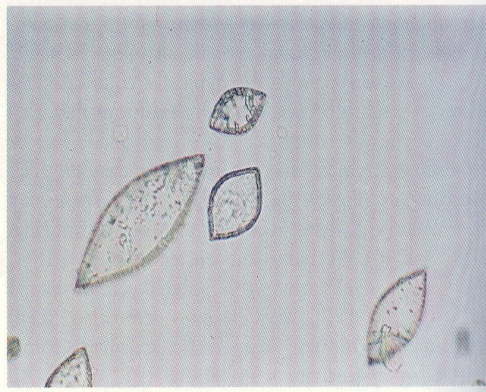
Pseudoválcce – např. vlákna hleny, vlákna z plínek

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



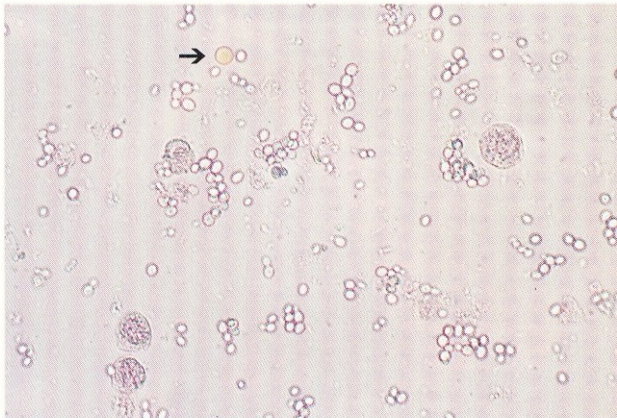
Uric acid, large, barrel-shaped, ×100



Uric acid, large, lemon-shaped, ×400.

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

Kvasinky – typické řetězkové řazení



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

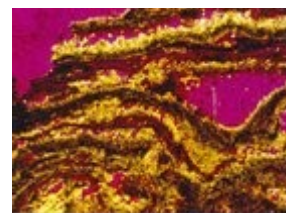
Močové konkrementy



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**

MOČOVÉ KONKREMENTY

Metody používané k analýze

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 vlnočtu nebo vlnové délce .

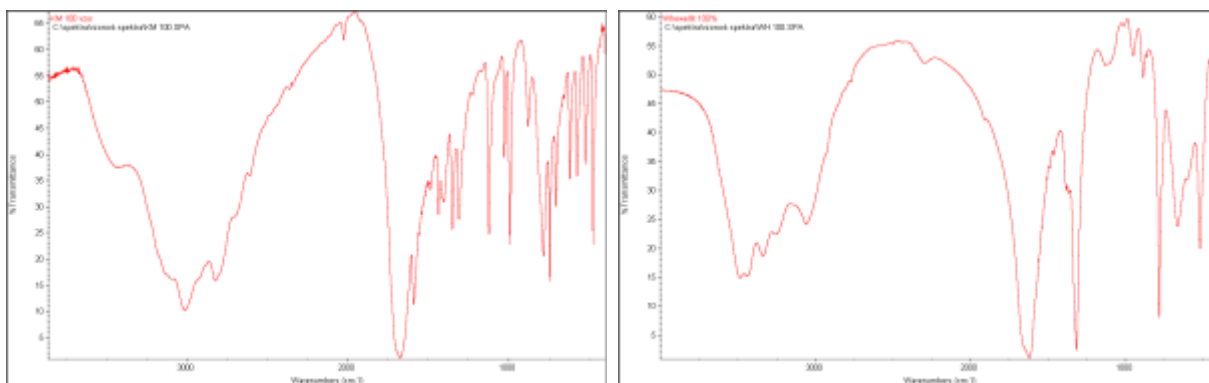
V infračerveném spektru se rozlišují dvě oblasti:

- oblast skupinových vibrací mezi 4 000 až 1 400 cm^{-1}
- oblast "otisku palce" pod 1 400 cm^{-1} , kde se nacházejí deformační a skeletové vibrace, které jsou charakteristické pro molekulu určité chemické sloučeniny.

Metodika přípravy vzorků

Při analýze konkrementů 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.

HORMONY, LÉKY, TUMORMARKERY, KARDIOMARKERY, ANEMICKÉ MARKERY a OSTEOMARKERY

Ke stanovení hormonů, léků, tumormarkerů, kardiomarkerů, anemických markerů a osteomarkerů je vzhledem k jejich výskytu ve velmi nízkých koncentracích v biologickém materiálu (nmol/l, pmol/l) třeba využívat metodiky s dostatečnou citlivostí.

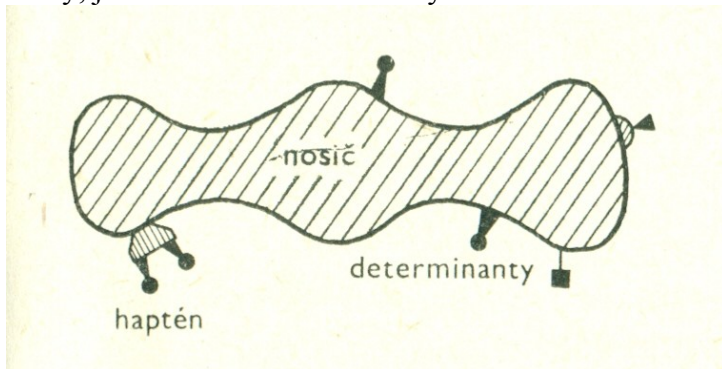
Používají se převážně **imunoanalytické metody**. Další významnou metodikou pro tyto analyty je **vysokoúčinná kapalinová chromatografie**. V současné době se rozvíjí multiplexové technologie ke kterým patří Tandemová MS s HPLC nebo CZE (kapilární zónová elektroforéza), mikročipové technologie a také xMAP technologie (microarraye partical).

IMUNOANALYTICKÉ METODY

Imunoanalytické metody jsou založeny na specifické reakci mezi antigenem a specifickou protilátkou za vzniku imunokomplexu.

Antigeny jsou látky, které jsou schopné vyvolat v živém organismu tvorbu specifických protilátek. Imunitní odpověď může vyvolat pouze kompletní antigen. Nekompletní antigen –

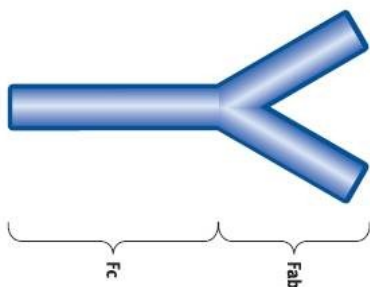
haptén (např. léky, nízkomolekulární peptidy, hormony, aj.) – vyvolá tvorbu protilátek pouze tehdy, je-li navázán na bílkovinný nosič.



Obr 1: Antigeny – haptén, nosič, determinanty

Protilátky jsou bílkoviny vznikající v organismu jako jeho odpověď na přítomnost antigenů, vykazují specifickou vazebnou aktivitu k antigenu, proti kterému byly připraveny. Jsou to imunoglobuliny, v laboratorní praxi jsou obsaženy v tzv. antisérech. Specifická a senzitivita imunoanalytických metod jsou ovlivněny používanou protilátkou. *Polyklonální protilátky* se připravují imunizací zvířat, obvykle opakovaným intravenózním podáváním antigenu (nejčastěji lidské sérum). Potom se provede odběr krve a získá se sérum bohaté na protilátky, které nazýváme antisérum. Jsou vždy směsí různých protilátek proti jednotlivým vazebným místům nebo epitopům antigenu. Komerční antiséra proti lidským sérovým bílkovinám jsou buď monovalentní (obsahují protilátky proti jedné stanovované bílkovině) nebo polyvalentní (obsahují protilátky proti mnoha bílkovinám).

Monoklonální protilátky jsou produkovány technologií buněčných hybridomů, vytvořené z lymfocytů a nádorových buněk, a které po vyčištění a selekci produkují stejné imunoglobulinové molekuly protilátky. Představují homogenní směs protilátek proti jedné antigenní determinantě (jednomu epitopu multivalentního antigenu). S monoklonální protilátkou se dosahuje vyšší specifické stanovení.



Obr 2: Struktura protilátek (Fab - oblast obsahující vazebné místo pro antigen; Fc - oblast konstantního složení ve třídě protilátky)

Imunoanalytické metody můžeme rozdělit z několika hledisek:

1. Podle uspořádání reakce:

a) **Kompetitivní** (soutěživá) **imunoanalýza**

b) **Nekompetitivní** (nesoutěživá, sendvičová) **imunoanalýza**

2. Podle prostředí:

- a) Homogenní imunoanalýza
- b) Heterogenní imunoanalýza

3. Podle techniky použité k měření signálu

- a) Radioimunoanalýza (RIA)
- b) Enzymoimunoanalýza (EIA)
- c) Luminiscenční imunoanalýza (LIA)
- d) Fluoroimunoanalýza (FIA)

4. Použité značky:

- a) Radioizotop
- b) Enzym
- c) Luminofory
- d) Fluorofory
- e) Substráty

5. Podle způsobu provedení:

- a) Jednostupňové
- b) Dvoustupňové
- c) Manuální analýzy
- d) Automatizované analýzy

Kompetitivní (soutěživé) metody:

Stanovovaný antigen soutěží se stejným antigenem, na který je navázána značka, ve vazbě na specifickou protilátku proti stanovovanému antigenu, která je v limitovaném množství.

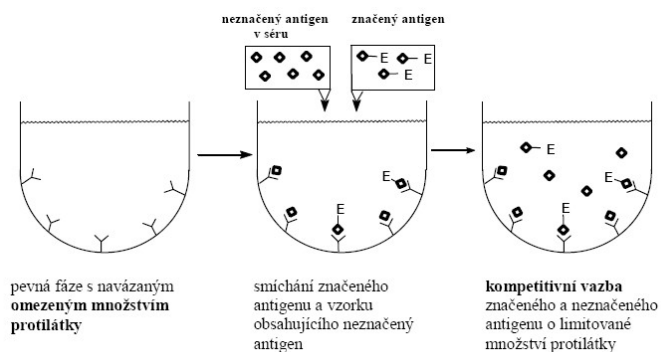
Vzniknou imunokomplexy, obsahující značku a imunokomplexy bez značky. Čím je koncentrace stanovovaného antigenu vyšší, tím více vznikne imunokomplexů bez značky.

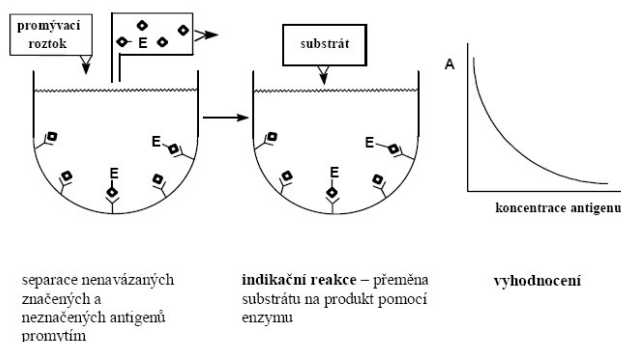
Po ukončené reakci měříme signál u imunokomplexů se značkou. Velikost odezvy je nepřímo závislá na koncentraci stanovovaného analytu.

Je-li značkou radioizotop, měříme radioaktivitu, je-li značkou enzym, měříme po přidání substrátu produkt enzymové reakce, případně podle typu značky luminiscenci nebo fluorescenci.

Kalibrační křivka má hyperbolický tvar.

Metoda je vhodná pro nízkomolekulární analyty s malou molekulou (např. T3, steroidní hormony, B12, folát, teofylin, fenytoin).





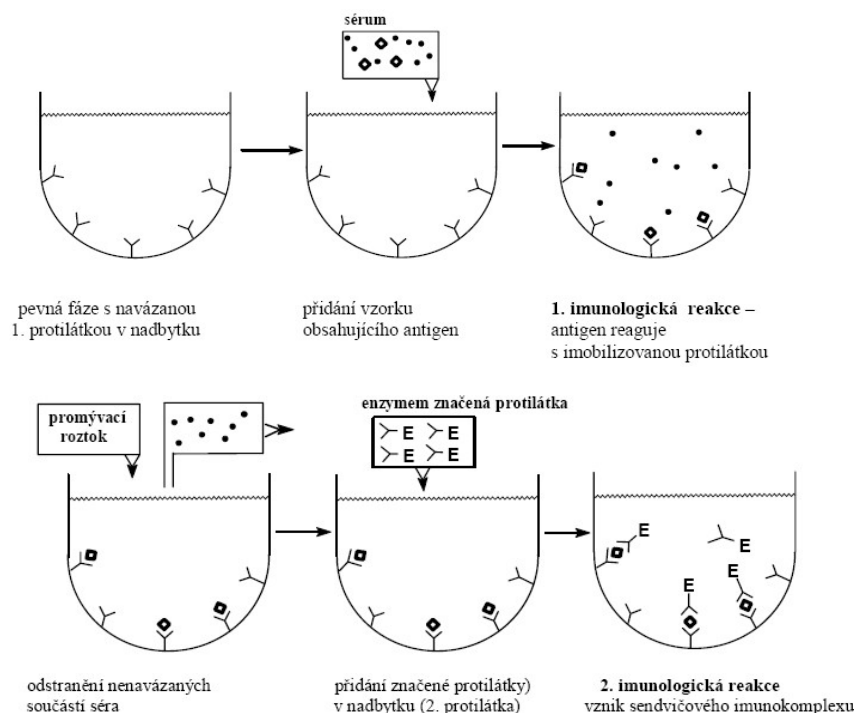
Obr 3: Kompetitivní EIA

Nekompetitivní (nesoutěživé) metody (sendvičová technika):

Stanovovaný antigen ze vzorku reaguje a dvěma protilátkami, které jsou v reakční směsi v přebytku. Jedna protilátka bývá značená, druhá protilátka je navázána na pevnou fázi umožňuje separaci vznikajícího imunokomplexu. Analyt (antigen) je vázán mezi dvěma protilátkami (sendvič).

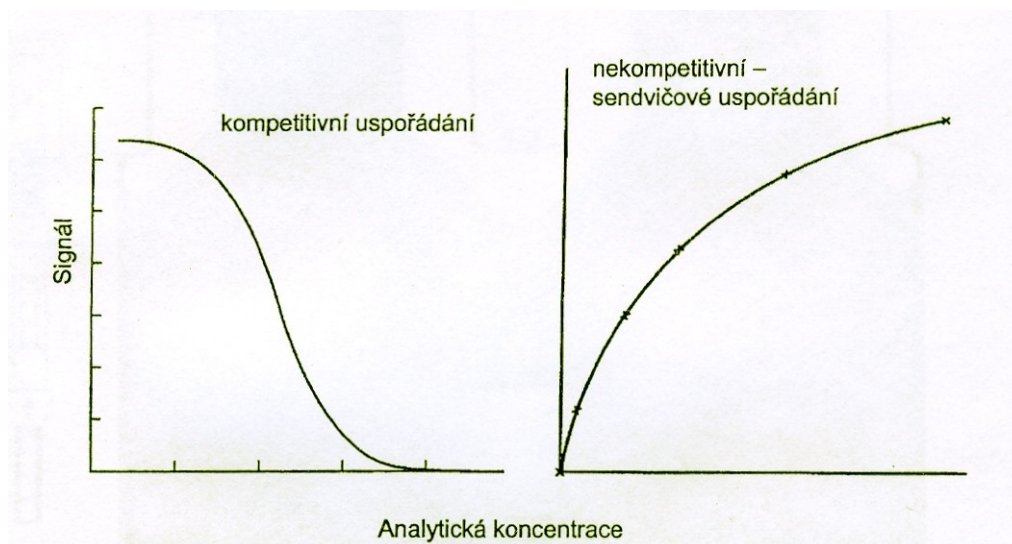
Velikost měřeného signálu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu (parabolický tvar kalibrační křivky).

Metoda se používá pro větší molekuly, molekuly s vyšší molekulovou hmotností, které umožňují vazbu protilátek na dvě determinanty (např. TSH, ferritin, nádorové antigeny, PSA, S100, srdeční troponiny, osteomarkery, aj.). Používají se dvě monoklonální nebo jedna monoklonální a jedna polyklonální protilátka.



Obr 4: Nekompetitivní EIA

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



Obr 5: Kalibrační závislosti u kompetitivního a nekompetitivního uspořádání

1) HETEROGENNÍ IMUNOANALÝZA

U této techniky se z reakční směsi odstraňují různými způsoby (např. magnetickou separací a promytím) buď imunokomplexy nebo nepotřebné reaktanty. Reakce s detekcí proběhne až po této separaci. Do této skupiny patří většina používaných vyšetření.

Ruční metody:

Radioimunoanalýza

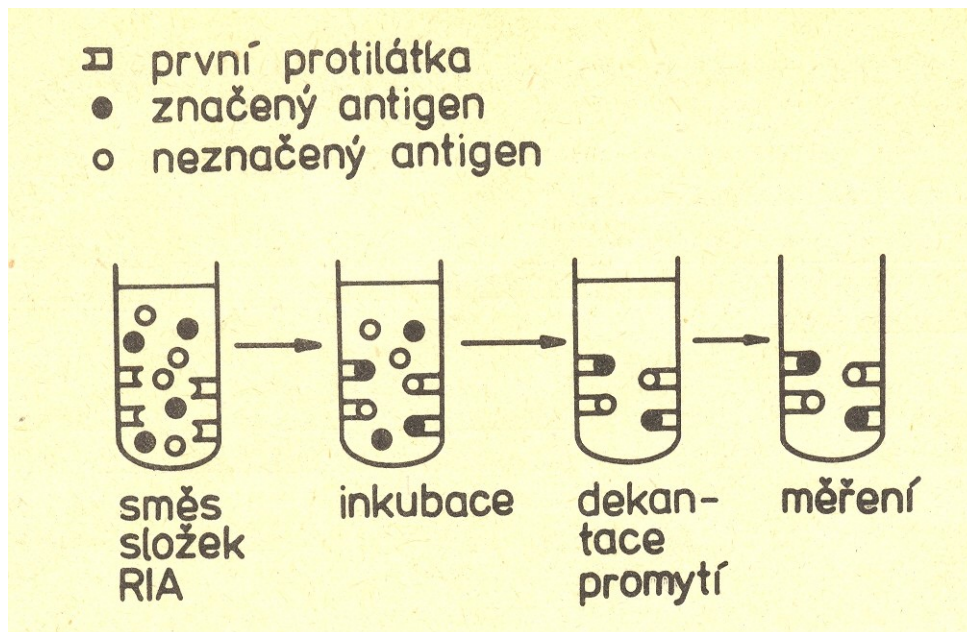
Jedná se o nejstarší imunoanalytickou metodu, která se řadí k heterogenní imunoanalýze. Používá se již od roku 1959. Je velmi citlivá, ale náročná na ruční práci a na zachování předpisů při práci s radioizotopy.

Jako značka se používá izotop jódu ^{125}I . Jedná se o γ – zářič s poločasem rozpadu 60 dní. Vyjíměčně, 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 stanovených 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 zavedena na 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 RIA se provádí s využitím **scintilačního dektoru**. Pro detekci záření gama se jako scintilační jednotky používají krystaly jodidu sodného, v němž je obsaženo malé množství thalia.

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Stanovení patří k enzymové imunoanalýze, kdy je enzym využíván jako značka. Enzymová imunoanalýza může být využívána také na imunoanalýzátorech (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 imunoanalýzátory, bývají vzorky skladovány, dokud se jich neshromáždí větší počet. Pipetování, promývání i vyhodnocení je možné automatizovat.

Automatizovaná imunoanalýza:

Luminiscenční imunoanalýza (heterogenní) – automatické imunoanalýzátory:

Analýzátory s luminiscenční - zejména přímou chemiluminiscenční detekcí jsou na trhu značně rozšířené. Vyznačují se vysokou citlivostí, takže jsou pro stanovení analytů v nízkých

koncentracích 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.

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.

Chemiluminiscence

- Chemiluminiscence – luminiscence je vyvoláno energií chemické reakce. Vzniká vyzářením fotonu z molekuly luminoforu po jeho chemické oxidaci působením oxidantů (H_2O_2 , O_2 , ...)
- Elektrochemiluminiscence (modifikace chemiluminiscence) - luminiscence je generována chemickými reakcemi iniciovaných elektrochemicky (oxidace na anodě)

Analytické luminofory jsou nejčastěji jsou navázány jako značka (na protilátky nebo antigeny) nebo substrát, eventuelně vznikají až po rozštěpení substrátu.

- Luminol, isoluminol
- Fluorescein
- Methylumbelliferon (MU)
- Akridin a jeho estery
- Adamantyl dioxetan
- Cheláty lanthanidů (Europium)

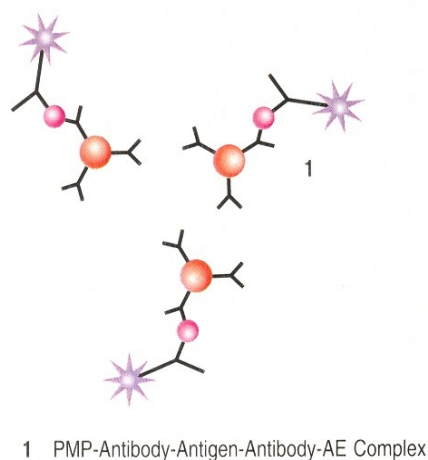
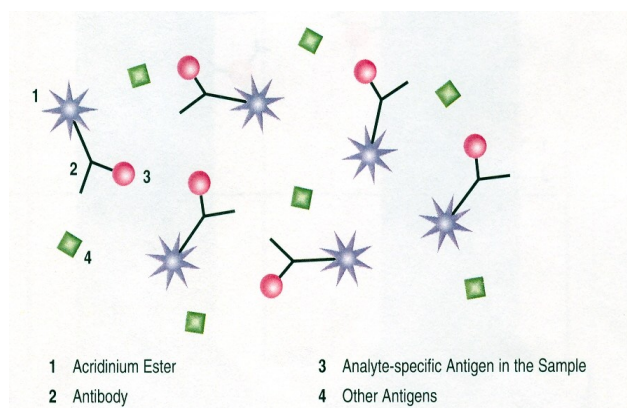
Př.: Přístroj Centaur, firma Siemens

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}).

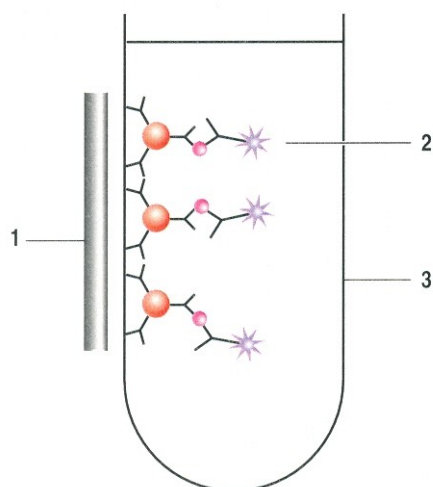
Jako v předchozích případech se využívá kompetitivní i sendvičová reakce.

Stanovení hCG – Sendvičová metoda

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



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



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

Po separaci, odsátí a promytí se přidá peroxid vodíku a v luminometru NaOH, který inicializuje chemiluminiscenční reakci.

MEIA (Enzymová imunoanalýza na mikročásticích; Microparticle Enzyme Immunoassay)

Tato technika patří mezi heterogenní enzymovou imunoanalýzu na mikročásticích, ve které je imunokomplex značený enzymem (ALP).

Jako fluorogenní substrát se např. používá 4-metylbumbelliferylfosfát (MUP), s kterým reaguje enzym (ALP). Při této defosforylaci substrátu vzniká 4-metylbumbelliferon (MU) a po jeho excitaci vzniká luminiscenční záření.

Jako světelný zdroj se používá Hg-výbojka ($\lambda = 365 \text{ nm}$), MU emituje fluorescenční záření ($\lambda = 448 \text{ nm}$).

2) HOMOGENNÍ IMUNOANALÝZA

U této techniky není potřeba odstraňovat reaktanty, stanovení a detekce probíhá přímo v reakční směsi. Je to rychlejší a jednodušší technika.

FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza; Fluorescence Polarization Immunoassay)

Tato technika patří mezi homogenní kompetitivní imunoanalýzu, při které soutěží stanovený analyt a analyt značený fluoresceinem o vazebná místa na specifické protilátce. K excitaci se používá lineárně polarizované světlo ($\lambda = 485 \text{ nm}$ - zdroj wolframová lampa + polarizační filtr). Při návratu molekuly fluoroforu do základního stavu se měří emise zeleného světla při 525-550 nm přes polarizační filtr a detekce se provádí fotonásobičem. Měření se provádí ve dvou polarizačních rovinách vektikální a horizontální, výsledná intenzita polarizovaného světla je nepřímě úměrná koncentraci stanoveného antigenu

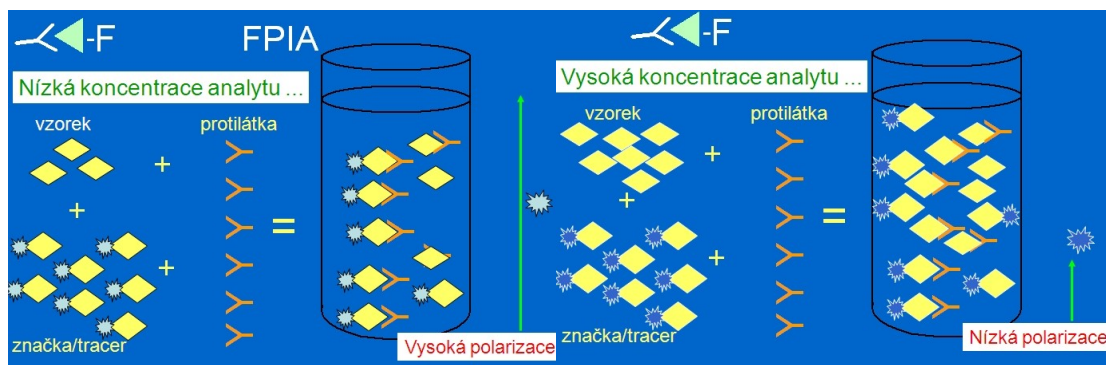
Využívá se různé rychlosti rotace velkých a malých molekul (imunokomplexu a antigenu),

které vedou ke změně polarizace.

Malé molekuly (stanovovaný analyt a značený analyt) se otáčejí velkou rychlostí, po excitaci polarizovaným světlem značený analyt emituje fluorescenční záření do mnoha směrů. Při detekci polarizovaného světla se naměří pouze nízká intenzita tohoto záření. Je-li značený analyt vázán na protilátku (imunokomplex: značený antigen-protilátka), dojde ke snížení rychlosti rotace této velké molekuly, emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitující – při detekci se naměří vysoká intenzita záření. Čím vyšší koncentrace stanovovaného analytu, tím více bude tohoto analytu navázáno na protilátku a tedy tím méně bude navázáno značeného analytu, takže naměřené hodnoty fluorescence budou nízké a naopak při nízké koncentraci naměříme hodnoty vysoké. Platí nepřímá úměra.

Nutná podmínka:

- Významný rozdíl v rychlosti rotace malé molekuly antigenu a velké molekuly imunokomplexu
- Použití pouze pro stanovení koncentrace malých antigenů (např. léků,...)



Obr.7: FPIA – zjednodušené schéma měření

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

Princip měření:

Metoda je založena na neradioaktivním přenosu energie z donoru (kryptátová struktura s iontem europia v centru) na akceptor (chemicky modifikovaný protein). Měření signálu emitovaného z imunokomplexu probíhá s časovým zpožděním. Měřený vzorek je ozářen dusíkovým laserem, následně donor (kryptát) emituje fluorescenční signál, po něm emituje signál akceptor.

Za tuto technologii byla udělena Nobelova cena. Má krátkou inkubační dobu a odpadájí při ní promývací a separační kroky.

LOCI

Jedná se o vysoce citlivou homogenní imunoanalytickou metodu s chemiluminiscenční detekcí. Technologii jako novinku představila firma Siemens na přístroji Dimension Vista 1500 Intelligent Lab Systém. Tato luminiscenční technologie je založena na přenosu kyslíku.

Princip:

Technologie pracuje s dvěma latexovými kuličkami – jedna obsahuje olefinové barvivo a protilátku specifickou pro analyzovanou metodu (chemibead), druhá je potažena streptavidinem a obsahuje barvivo, které generuje singletový kyslík (sensibead). Do reakce kromě stanovovaného analytu vstupuje také biotinylovaná protilátka specifická pro analyt.

Dojde k vytvoření imunokomplexu ze všech popsaných komponent. Po osvětlení komplexu se z sensibead uvolní singletový kyslík, pronikne do chemibead a uvolní chemiluminiscenční záření.

3) MULTIPLEXOVÉ METODY

Princip xMAP technologie (microarraye partical):

Metodika využívá 100 druhů mikrokuliček (magnetické) rozlišených kombinací dvou fluorescenčních barev. Na každém druhu je navázána molekula vázající specificky jeden analyt. Na kuličku se naváže analyt a druhá protilátka. Kuličky protékají přístrojem (**Luminex 100 IS, Luminex Corp.**) - **princip flow cytometrie**. Měří se fluorescence vzniklé po excitaci dvěma lasery – z nich se vyhodnotí – druh a množství analytu.

xMAP technologie poskytuje možnost simultánního měření až 100 analytů v jedné jamce mikrotitrační destičky. Analýzu je možné provádět pro předem připravené panely vyšetření – př. cytokiny.

Výhodou je potřeba velmi malého objemu a nižší cena za vyšetření. Metodika je vhodná pro měření imunochemických metod, nukleových kyselin, enzymů. Nevýhodou je dlouhá inkubace a nutnost práce ve větších sériích.

Dalším příkladem **Biočipová array technologie**:

Jedná se o imunoanalýza založenou na simultánní multianalýze. Na jednom biočipu se analyzují celé panely příbuzných testů. Principem stanovení je ELISA (přístroj Evidence, Randox).

PUNKTÁTY

Punktát (výpotek) je zmnožená tekutina v tělesných dutinách.

Dle lokality, kde se tekutina nachází se punktáty dělí na:

- Peritoneální – v dutině břišní (ascites)
- Pleurální – v dutině hrudní
- Perikardiální – v dutině srdeční
- Kloubní (synoviální)

Typy punktátu:

Transsudát – ultrafiltrát plasmy (proti plasmě má mnohem nižší koncentraci bílkovin a látek, jejichž součástí jsou bílkoviny - enzymy nebo látky na bílkoviny navázané – lipidy). Vzniká při zvýšeném filtračním tlaku v kapilárách nebo sníženém onkotickém tlaku v plasmě.

Exsudát – tekutina zánětlivého původu (koncentrace bílkovin a látek na ně vázaných se blíží plasmě, leukocyty a bakterie však snižují koncentraci glukosy a přemění ji na laktát. Zvýšené bývají také koncentrace enzymů). Vzniká při poškození výstelky tělesných dutin zánětem nebo karcinomem, kdy dojde k zvýšení permeability kapilár.

V řadě případů není jasné, o jakou tělní tekutinu se jedná, a je významné tekutiny odlišit pomocí laboratorních vyšetření.

Význam má:

- odlišení moče v břišní dutině (močová píštěl) od ascitu: moč má proti ascitu vysokou ureu, kreatinin, kalium.
- odlišení likvoru od tělní tekutiny z nosu, ucha, krku - obsahuje-li tekutina β 2-transferin, jedná se o likvor. Stanovení se provádí elektroforeticky.

Laboratorní stanovení punktátu

Stanovení jednotlivých parametrů v punktátech se ve většině případů provádí stejnými metodami jako v séru či v moči.

Nejčastěji se analyzují tyto parametry: urea, kreatinin, bilirubin, amylasa, laktátdehydrogenasa, cholesterol, triacylglyceridy, celková bílkovina, albumin, Na, K, Cl, pH, tumormarkery.

Stanovení chloridů v potu

Coulometrické stanovení se využívá například pro stanovení chloridů v potu. Pot se zachytí do čtverečku filtračního papíru po stimulaci pilokarpinem (pilokarpinová iontoforéza). Vážkově se stanoví celková hmotnost potu a po eluci se stanoví koncentrace chloridů.

Vyšetření slouží k potvrzení diagnózy cystické fibrózy v určitých případech. Je to např. při pozitivním screeningu a následné genetické analýze, je-li nalezena pouze jedna mutace k potvrzení, že se jedná o homozygota bez příznaků nebo u starších jedinců, kdy nelze provést novorozenecký screening. Hodnoty koncentrace chloridů se u nemocných zvyšují.

Nemocniční informační systém (NIS)

Nemocniční informační systém je software podporující a evidující všechny medicínské procesy a postupy. Zajišťuje mezioborovou komunikaci a spolupráci.

Hlavní funkce NIS

- Systém umožňuje kompletní patientskou dokumentaci ambulantních i lůžkových oddělení (vstupní anamnéza, průběh léčby, závěrečná zpráva).
- Shromažďuje výsledky laboratorního a obrazového komplementu
- Zajišťuje tisk receptů a generaci elektronické žádanky
- Poskytuje přehled o aktuálních nákladech a vyúčtování zdravotní péče

Nadstavbové funkce NIS

- Lékárna
- Stravovací provoz
- Transfuzní terapie
- Digitální zpracování dat
- Příložený zvukového nebo obrazového záznamu operace

Žádný NIS v ČR si nedokázal zajistit dominantní postavení na trhu. K nejlépe hodnoceným patří systémy pracující ve velkých nemocnicích – STAPRO a AMIS. Nově se na trhu objevil nadějný systém INEQ.

Elektronická žádanka

Elektronická žádanka je tvořena přímo na oddělení. Obsahuje stejné údaje jako klasická žádanka pro laboratoře. Po vytvoření žádanky dojde k vygenerování čárového kódu, kterým je označen biologický materiál.

Po příchodu vzorku do laboratoře je čárový kód načten pomocí čtečky čárového kódu a požadavky jsou automaticky převedeny do LIS.

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	Mozkomíšní mok
CUSUM	Metoda VKK formou kumulativního součtu
CV	Variační koeficient (Relativní směrodatná odchylka)
ČIA	Český institut pro akreditaci
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
DELFLIA	Lanthanidy zesílená fluoroimunoanalýza
DGKL	Německá společnost klinické chemie a laboratorní medicíny
DPM	Dědičné poruchy metabolismu
EC	Evropská komise
ECLIA	Elektrochemiluminescenční imunoanalýza
EHK	Externí hodnocení kvality
EIA	Enzymoimunoanalýza
EKK	Externí kontrola kvality
ELFO	Elektroforéza
ELISA	Heterogenní enzyimoimunoanalýza
EMIT	Homogenní enzyimoimunoanalýza
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	Vysokoúčinná 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 specifičnosti a citlivosti metod
S	Krevní sérum
s	Směrodatná odchylka
s2	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	Tenkovrstenná 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