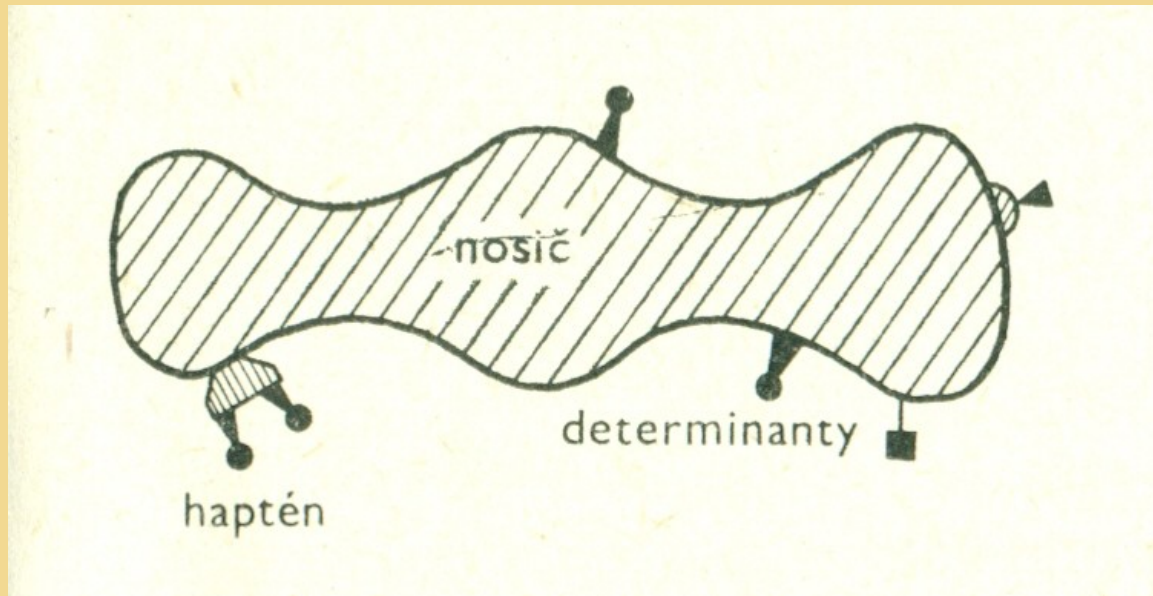


Imunochemické techniky

Miroslava Beňovská

Antigeny

- Látky schopné vyvolat v živém organismu tvorbu specifických protilátek
- Imunitní odpověď může vyvolat pouze kompletní antigen - imunogen
- Nekompletní antigen – haptén (např. léky, nízkomolekulární peptidy, hormony, aj.) – vyvolá tvorbu protilátek pouze tehdy, je-li navázán na bílkovinný nosič



Protilátky

- 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

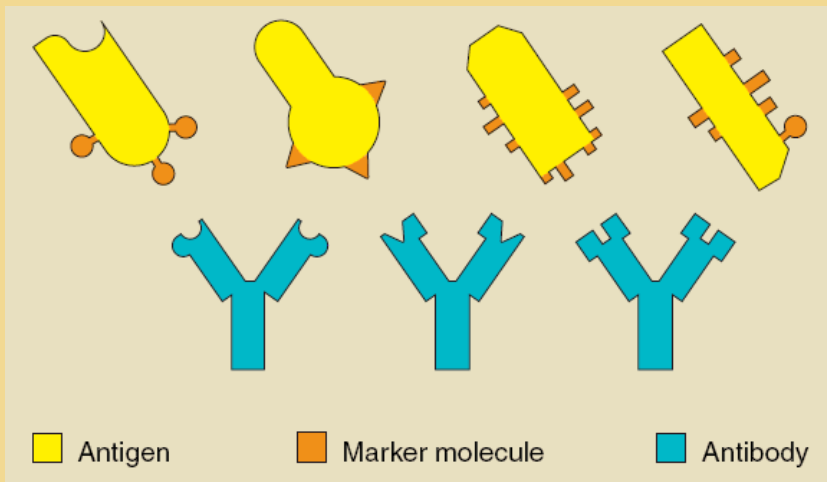
Protilátky:

- 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

Antigeny a vazebná místa protilátek

Epitopy (antigenní determinanty):

- imunologicky aktivní oblasti imunogenu (antigenu) - přístupná místa na povrchu imunogenu
- velikost epitopů je určena velikostí vazebného místa pro antigen na protilátkové molekule (velikostí paratopu)



Vazba protilátky s epitopem zahrnuje slabé nekovalentní interakce

- fungují na krátké vzdálenosti, závisí na komplementaritě epitopu a paratopu, aby se tyto interakce maximalizovaly.

Faktory ovlivňující vazbu antigen-protilátka

- Afinita epitopu a paratopu dána silou nekovalentních interakcí, tj. vodíkovými můstky, disperzními silami, elektrostatickými silami
- Vazba je poměrně slabá, ovlivňovaná ionty přítomnými v reakční směsi, iontovou silou, nebo ději na rozhraní pevné a kapalné fáze (např. odtlačování molekul vody, adsorpce, kapilarita aj.)

Avidita

- Antigeny obsahují několik determinantů, proto se zavádí pojem avidita, který charakterizuje vazebnou energii mezi komplexním antigenem a protilátkou
- Avidita je závislá na afinitě, ale bere v úvahu valenci antigenu a protilátky i nespecifické faktory, které ovlivňují vazby mezi antigenem a protilátkou

Imunochemické techniky

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

Dělení:

- dle uspořádání reakce – **kompetitivní, nekompetivní** (sendvičové)
- dle prostředí
- **homogenní** imunoanalýza (stanovení a detekce přímo v reakční směsi – př. fluoroimunoanalýza, přístroj Kryptor, firma Brahms)
- **heterogenní** imunoanalýza (po separaci vytvořeného imunokompl.)
- dle techniky použité k měření signálu – **radioimunoanalýza, enzymoimunoanalýza, luminiscenční imunoanalýza, fluoroimunoanalýza**
- dle použité značky (**radioizotop, enzym, luminofory, fluorofory**) (neznačené metody – viz imunoturbidimetrie, imunonefelometrie)
- dle způsobu provedení: **jednostupňové - dvoustupňové**
manuální analýzy - automatizované analýzy

METODY STANOVENÍ

- **Imunoanalytické metody**

Detekce s vysokou citlivostí:

luminometrická (LIA, ILMA, CMIA, ECL)

fluorometrická (MEIA, FPIA, TRACE, DELFIA)

fotometrická – enzymová (EIA, ELISA, EMIT)

radioaktivní (RIA, IRMA)

Uplatnění pro **analyty s nízkou koncentrací**
(nmol/l, pmol/l)

Imunometody rozdělení

Homogenní analýzy

U této techniky není potřeba odstraňovat reaktanty - oddělovat nenavázanou protilátku (send.) či imunokomplex (komp.) – vše mimo vázaný komplex je inaktivní, nedává signál - stanovení a detekce probíhá přímo v reakční směsi. Je to rychlejší a jednodušší technika.

Heterogenní analýzy

Obě složky dávají signál, jednu nebo druhou je třeba oddělit

Luminiscenční

- Lumino Immuno Assay (**LIA**)
- Chemiluminescent Magnetic Immuno Assay (**CMIA**)
- Immuno Lumino Metric Assay (**ILMA**)
- ElectroChemiluminescence (**ECL**)

Fluorescenční

- Fluorescence Immuno Assay (**FIA**)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (**FPIA**)
- Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro Immuno Assay (**DELFI**A)
- Time Resolved Amplified Cryptate Emission (**TRACE**)

Enzymové - fotometrický princip

- **E**nzymo **I**mmuno **A**ssay (**EIA**)
- **E**nzyme **L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay (**ELISA**)
- **E**nzyme **M**ultiplied **I**mmunoassay **T**echnique (**EMIT**)
- **I**mmuno **E**nzyme **M**etric **A**ssay (**IEMA**)

Enzymoimunoanalýza

Enzymy

křenová peroxidáza

substrát peroxid vodíku, uvolněný kyslík
oxiduje bezbarvý chromogen
(o-fenylendiamin)

alkalická fosfatáza

substrát p-nitrofenylfosfát

glukozooxidáza

beta-galaktosidáza

Radiometrické

- Radio Immuno Assay (RIA)
- Immuno Radio Metric Assay (IRMA)
- Radio Enzymo Assay (REA)
- Radio Receptor Assay (RRA)

Citlivosti metod

Metoda	(g)
EMIT	10^{-6}
FIA, FPIA, EIA	10^{-9}
RIA, REA, IRMA	10^{-12}
LIA, ILMA	10^{-15}

Základní postup při imunoanalýze:

- smíchání komponent
- inkubace – vznik komplexu antigen - protilátka
- separace (v případě heterogenní imunoanalýzy, časté využití magnetu)
- reakce značenky komplexu antigen – protilátka s chemickou látkou startující reakci s detekovatelným efektem
- detekce (př. chemiluminiscence)

Kompetitivní stanovení:

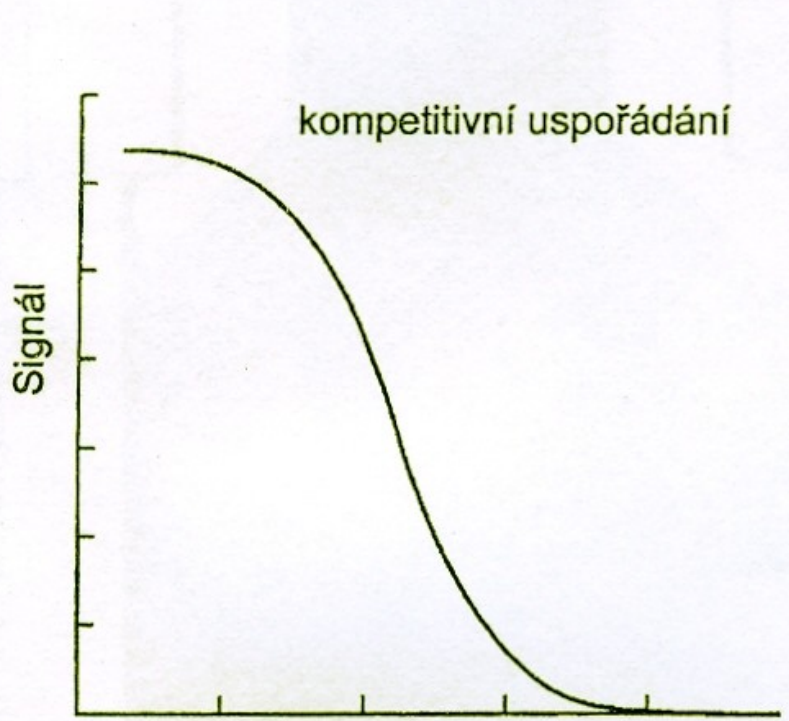
- Stanovovaný antigen soutěží se stejným antigenem, na který je navázána značenka o limitované množství protilátky
- Velikost odezvy je nepřímo závislá na koncentraci stanovovaného analytu
- Kalibrační křivka má hyperbolický tvar
- Metoda je vhodná pro nízkomolekulární analyty s malou molekulou (př. B12, folát, teofylin, fenytoin 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, ferritin, nádorové antigeny, PSA, S100, srdeční troponiny, osteomarkery
- 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

Heterogenní imunoanalýza

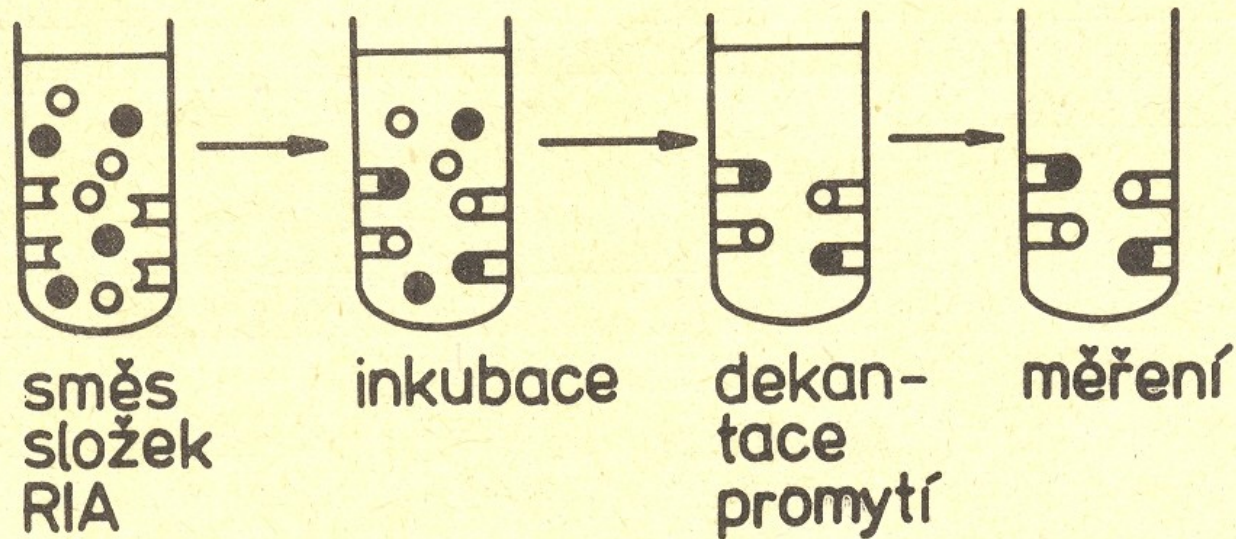
Radioimunoanalýza:

- 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 trícium (^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 detektor:

- 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

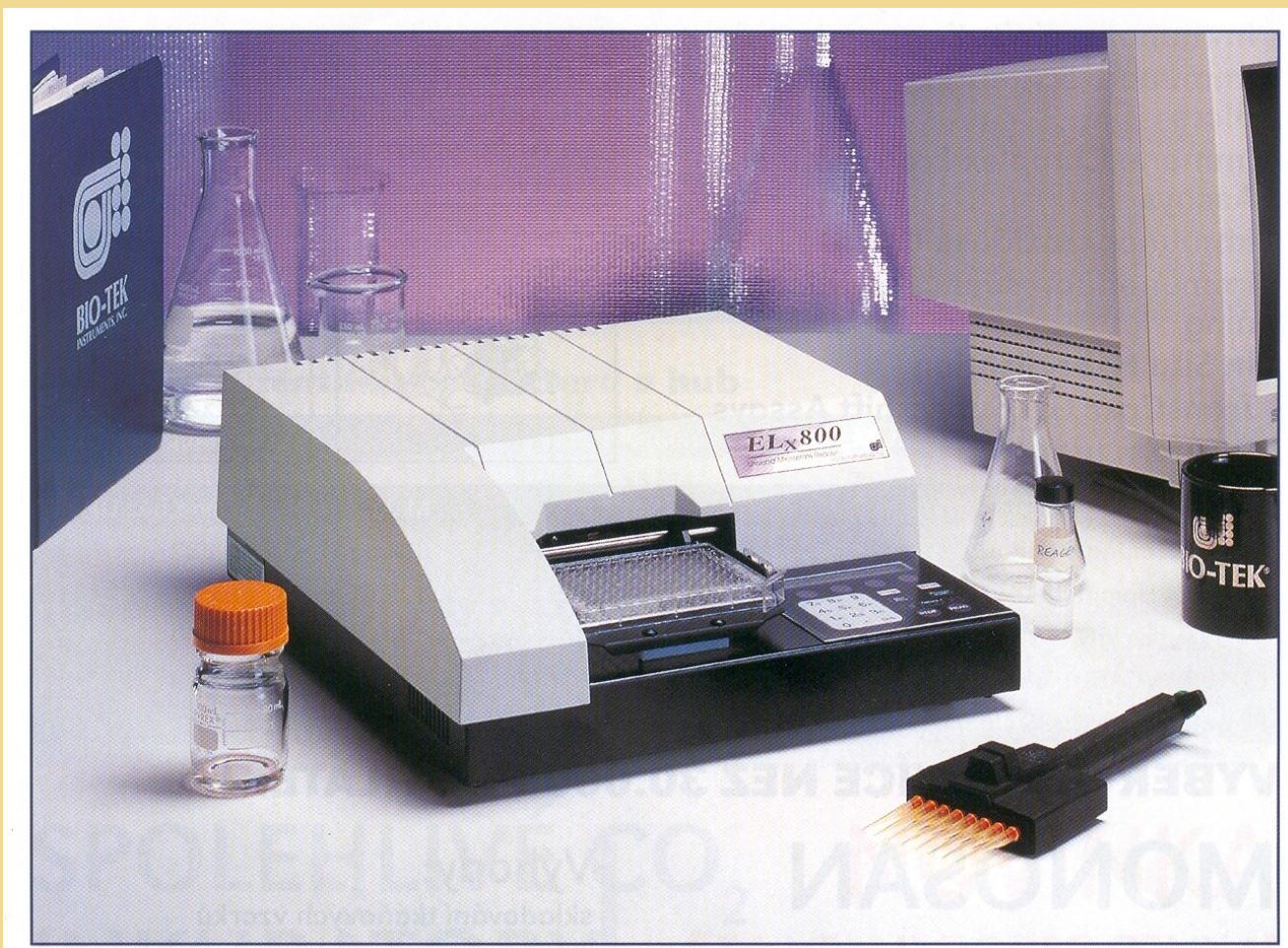
ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- 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

MEIA (Enzymová imunoanalýza na mikročasticích; Microparticle Enzyme Immunoassay)

- Technika patří mezi heterogenní enzymovou imunoanalýzu na mikročasticích
- Immunokomplex značený enzymem (ALP)
- Jako fluorogenní substrát např.
4-metylumbelliferylfosfát (MUP) - s ním reaguje enzym (ALP) - vzniká 4-metylumbelliferon (MU) a po jeho excitaci vzniká fluorescenční záření
- Jako světelný zdroj se používá Hg-výbojka ($\lambda = 365 \text{ nm}$), MU emituje fluorescenční záření ($\lambda = 448 \text{ nm}$)

Luminiscenční imunoanalýza

(heterogenní) – automatické imunoanalyzátoary:

- Analyzátoary s přímou chemiluminiscenční detekcí rozšířené
- Vysoká citlivost - vhodné pro stanovení hormonů
- Luminofory 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
- LIA - kompetitivní
- ILMA – nekompetitivní (sendvič)

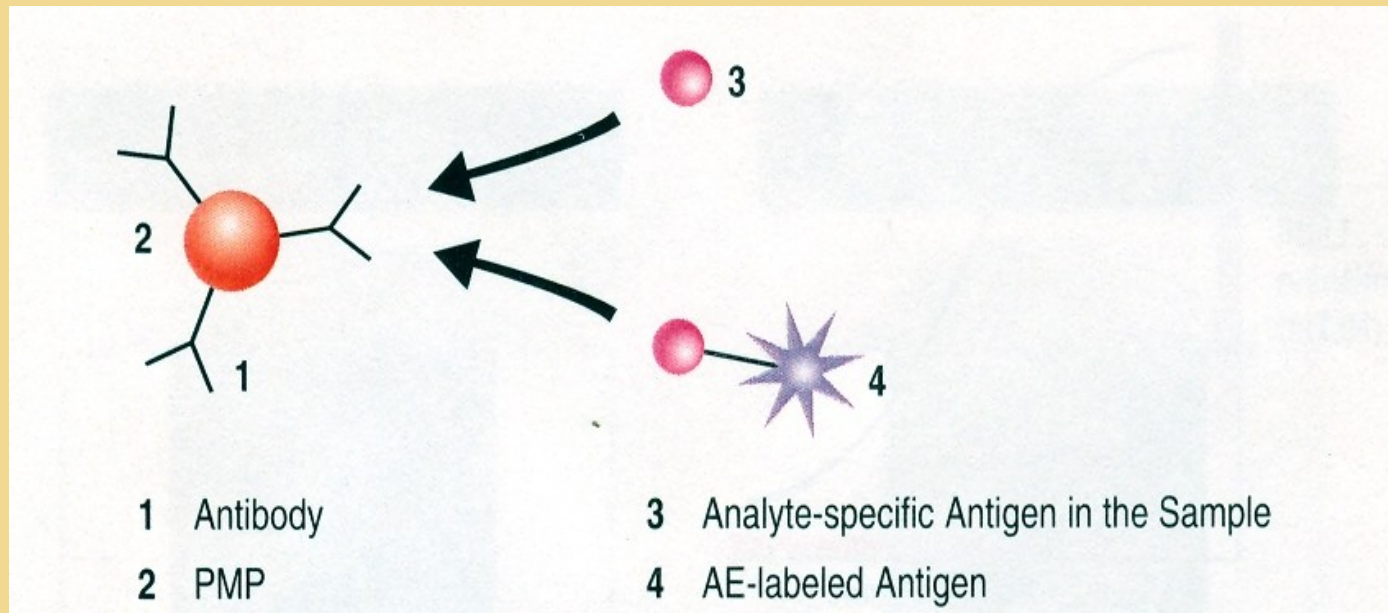
Chemiluminiscence – Centaur, firma Siemens (Bayer)

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})

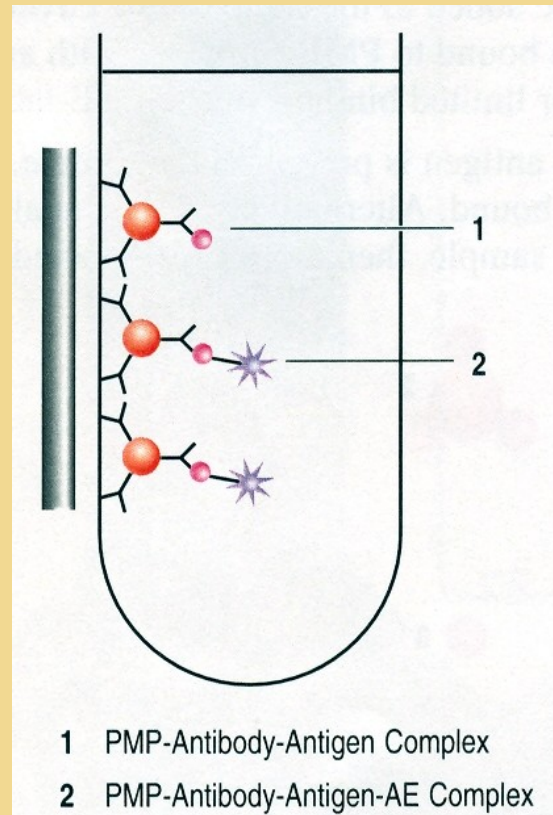
LIA - kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- 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



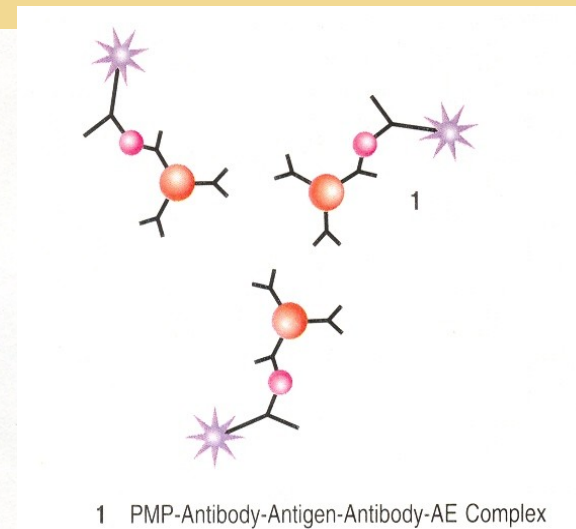
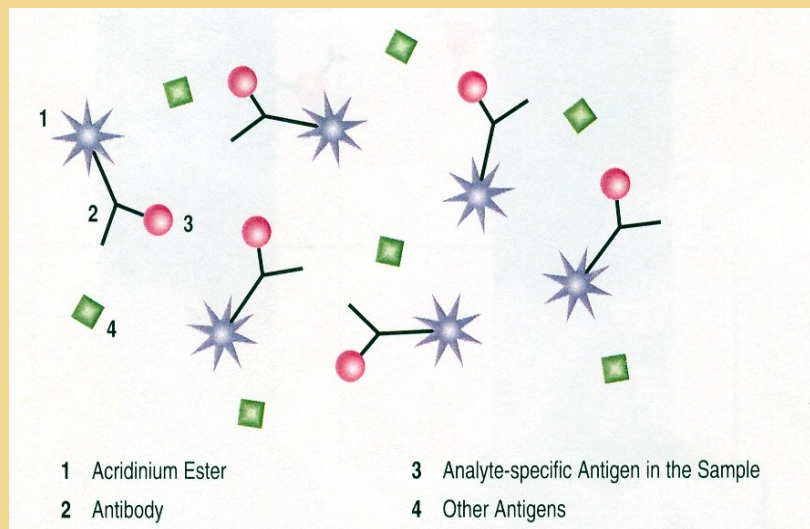
LIA kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- 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



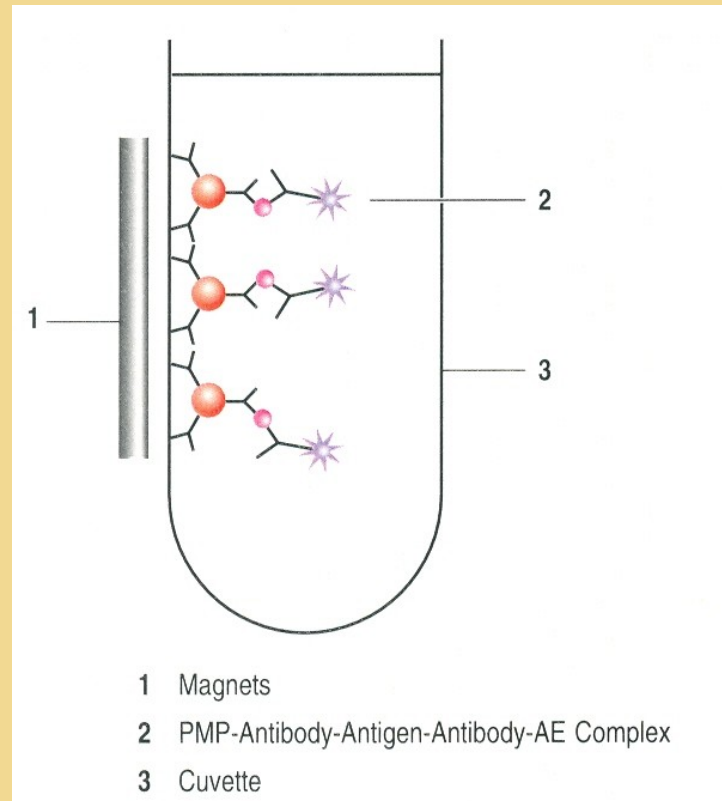
ILMA sendvičová – př.stanovení hCG

- 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



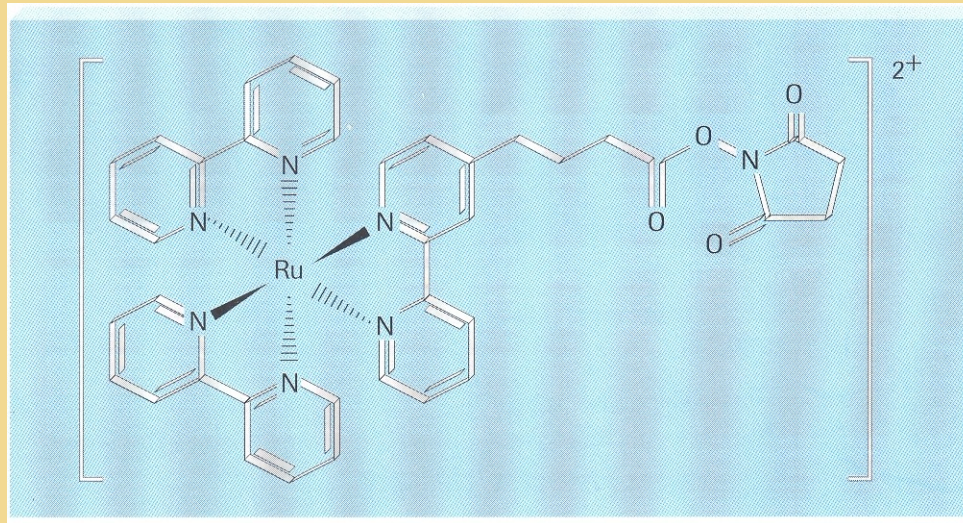
LIA sendvičová – př.stanovení hCG

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



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



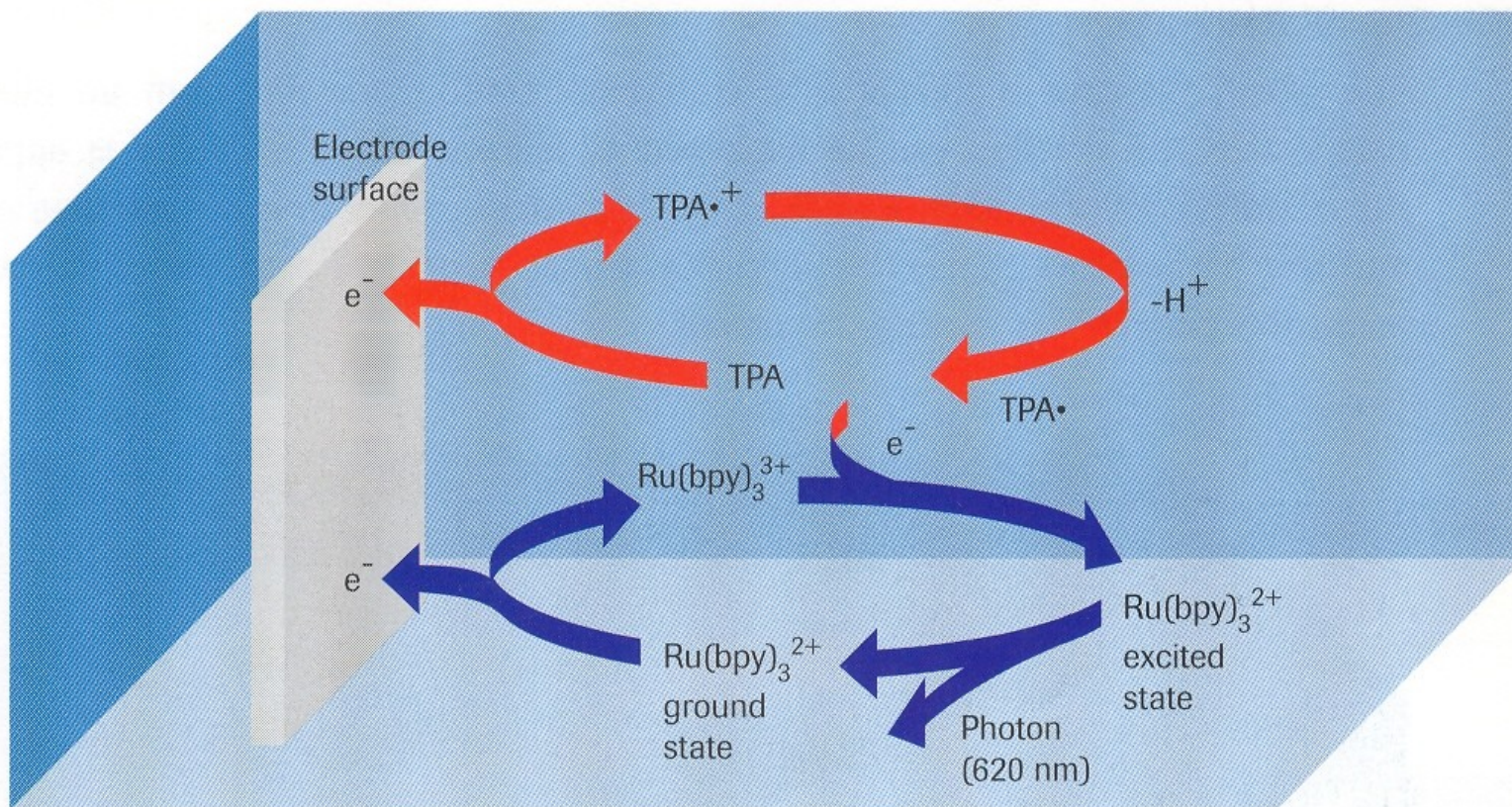
Rutenium(II) tris-bipyridylovým komplexem

Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys, Cobas nebo Modular s modulem e (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)



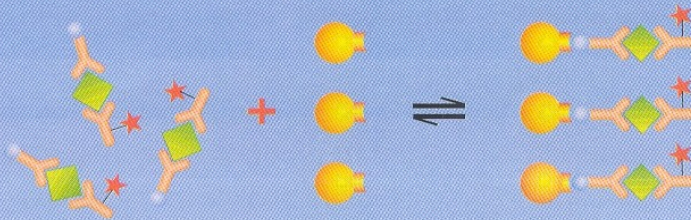
SANDWICH PRINCIPLE

FIRST IMMUNOLOGICAL REACTION

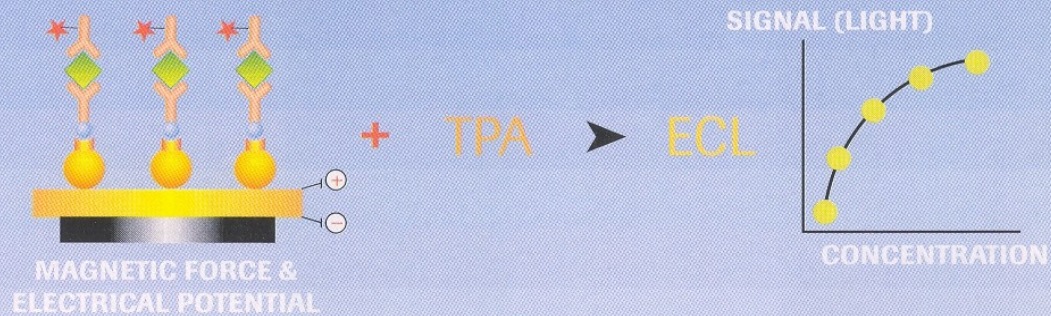


+ SERUM CONSTITUENTS


SECOND REACTION




LIGHT REACTION



 ANTIGEN

 RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

TPA TRIPROPYLAMINE

 BIOTINYLATED ANTIBODY

 STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

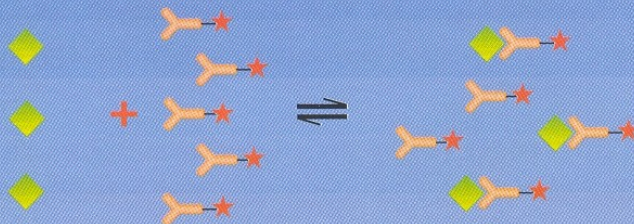
Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

Kompetitivní uspořádání (např. stanovení fT4)

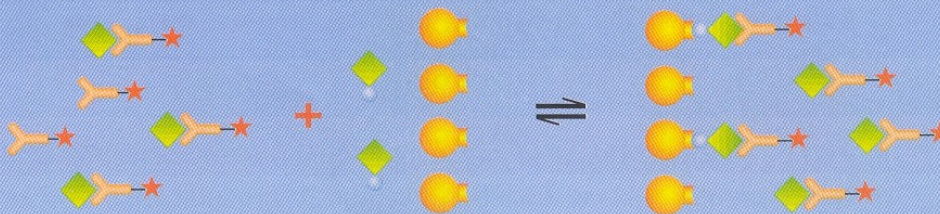
- soutěží stanovovaný antigen s biotynilovaným antigenem o limitované množství značené protilátky (polyklonální)
- Pouze komplex biotynilovaný antigen – protilátka se může vázat na paramagnetické částice
- Komplex stanovovaný analyt – protilátka je při separaci odstraněn
- Dále probíhá reakce stejně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

COMPETITIVE PRINCIPLE

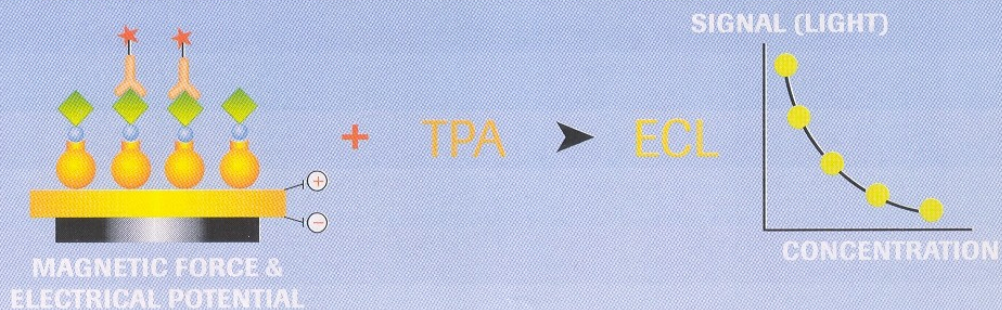
FIRST REACTION



SECOND REACTION



LIGHT REACTION



◆ ANTIGEN

Y-RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

TPA TRIPROPYLAMINE

◆ BIOTINYLATED ANTIGEN

● STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

Technologie ChemiFlex CMIA (Abbott)

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

CMIA - princip

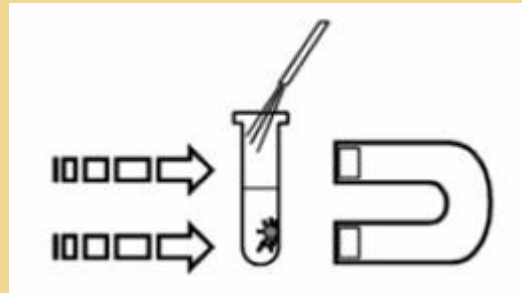
- Mikročástice (microparticles): mikročástice potažené rekombinantním antigenem ve fyziologickém roztoku s TRIS pufrem
- Konjugát :konjugát rekombinantních antigenů s akridiniem a monoklonální protilátkou proti příslušnému antigenu s akridiniem

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

CMIA - princip

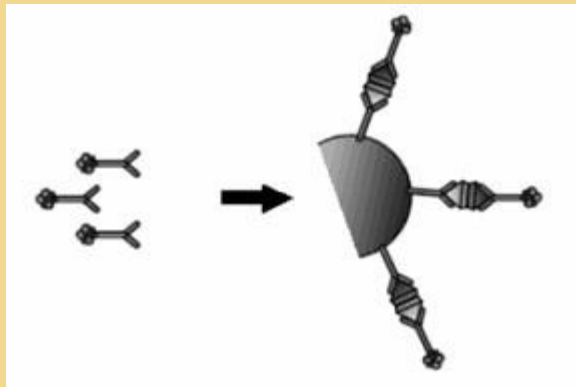
3. Po inkubaci přitáhne magnet paramagnetické mikročástice (navázané na specifický analyt) ke stěně reakční nádoby
Následuje proplach reakční směsi a odstranění nenavázané látky



Přitažení paramagnetických mikročástic magnetem

CMIA - princip

4. Příkladavek konjugátu značeného chemiluminiscenčním akridiniem
Konjugát se naváže na imunokomplex



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 akridiniového barviva z konjugátu navázaného na komplex mikročásticeAkridiniové 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

CMIA – 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 imunoanalýza

Fluorescenční enzymová imunoanalýza – RAD 120 (Radim)

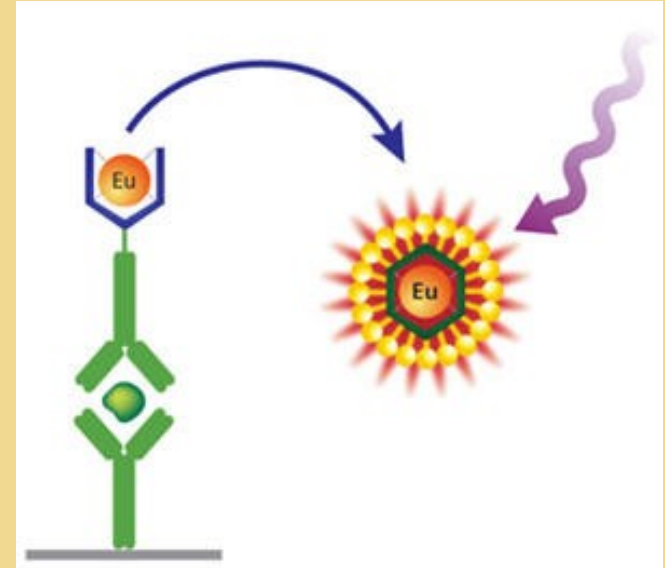
např. **Stanovení prolaktinu** (sendvič)

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

DELFLIA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

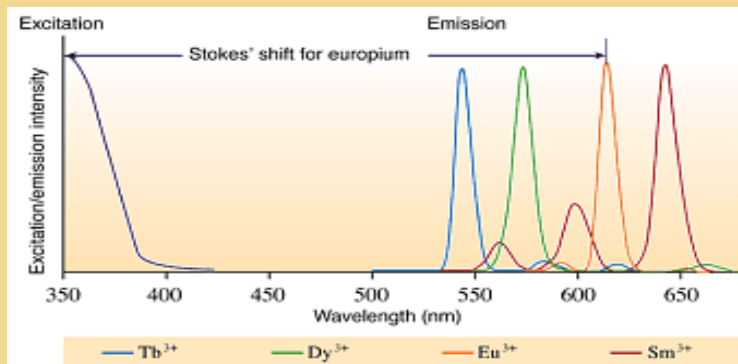
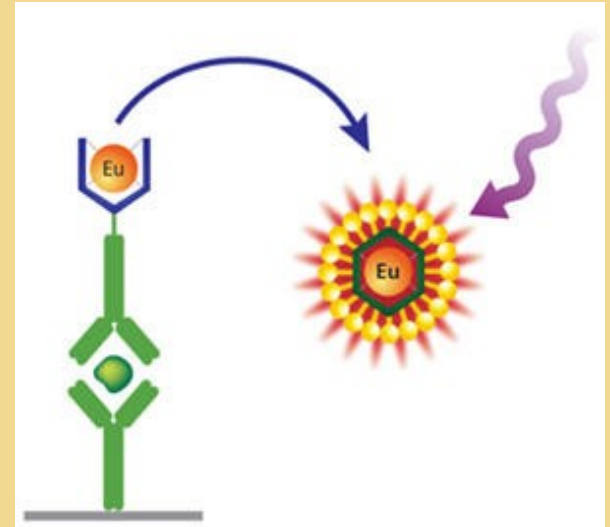
- Fluoroimunoanalytická heterogenní metoda vyvinutá (finskou firmou Wallac Oy)
- Velmi citlivá a specifická metoda pro stanovení nízko- i vysokomolekulárních analytů.
- využívá časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů - Europium, Terbium, Sammarium..



Periodic Table of Elements																	
1	2	skupenství prvku										18	19	20			
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198
199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216
217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234
235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252
253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288
289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306
307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324
325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342
343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378
379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396
397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414
415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432
433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468
469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486
487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504
505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522
523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558
559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576
577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594
595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612
613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648
649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666
667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684
685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702
703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738
739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756
757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774
775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792
793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828
829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846
847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864
865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882
883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900
901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918
919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936
937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954
955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972
973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990
991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008
1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026
1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044
1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062
1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080
1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098
1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116
1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134
1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152
1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170
1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188
1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206
1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224
1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242
1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260
1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278
1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296
1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314
1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332
1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350
1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368
1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386
1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404
1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413</									

DELFLIA - princip

- Protilátka nebo antigen jsou označeny fluorescenční sondou – chelátem lanthanoidu, nejčastěji **Europia**
- Po proběhlé imunochemické reakci se ke vzniklému komplexu přidává „zesilovací“ roztok, který odtrhne **Eu** z komplexu a přemění jej na nový intenzivně fluoreskující chelát
 - fluorescence s velkým Stokesovým posunem fluorescenčního spektra (rozdíl mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence)



- Vzorek je pulsně excitován zářením o vlnové délce 340 nm
- Fluorescence se měří v dlouhovlnné části viditelného spektra (Europium 620 nm).

DELFLIA

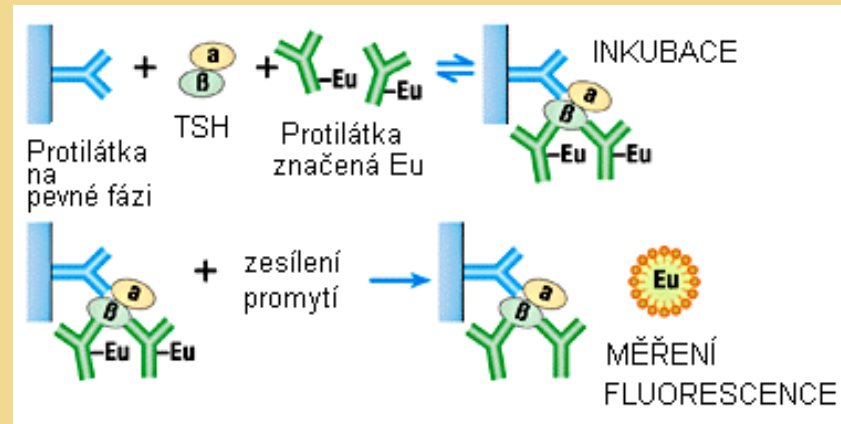
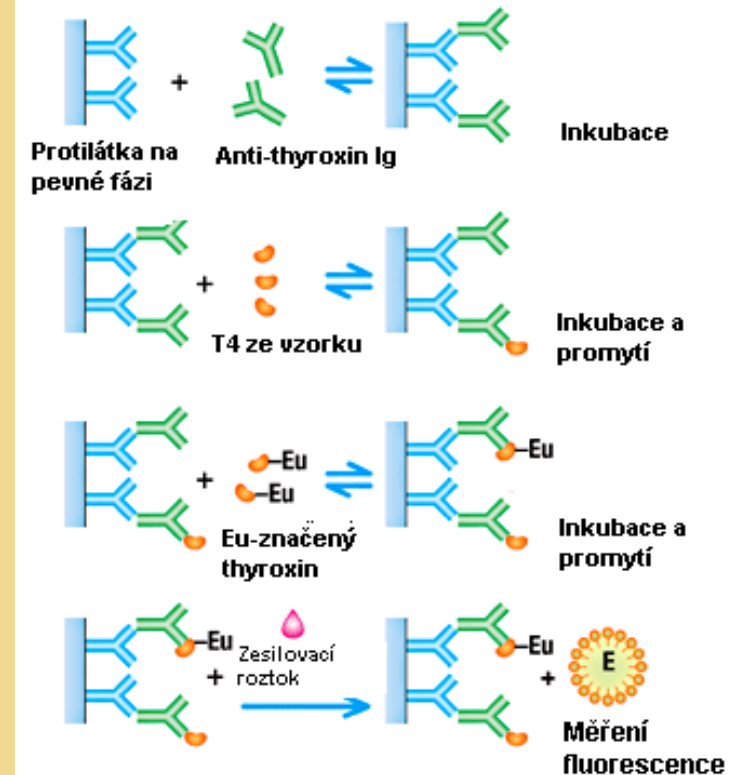
Uspořádání imunochemické reakce:

- kompetitivní:

- fluorescenční sondou značený antigen
- intenzita fluorescence nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku

- nekompetitivní (sendvičové):

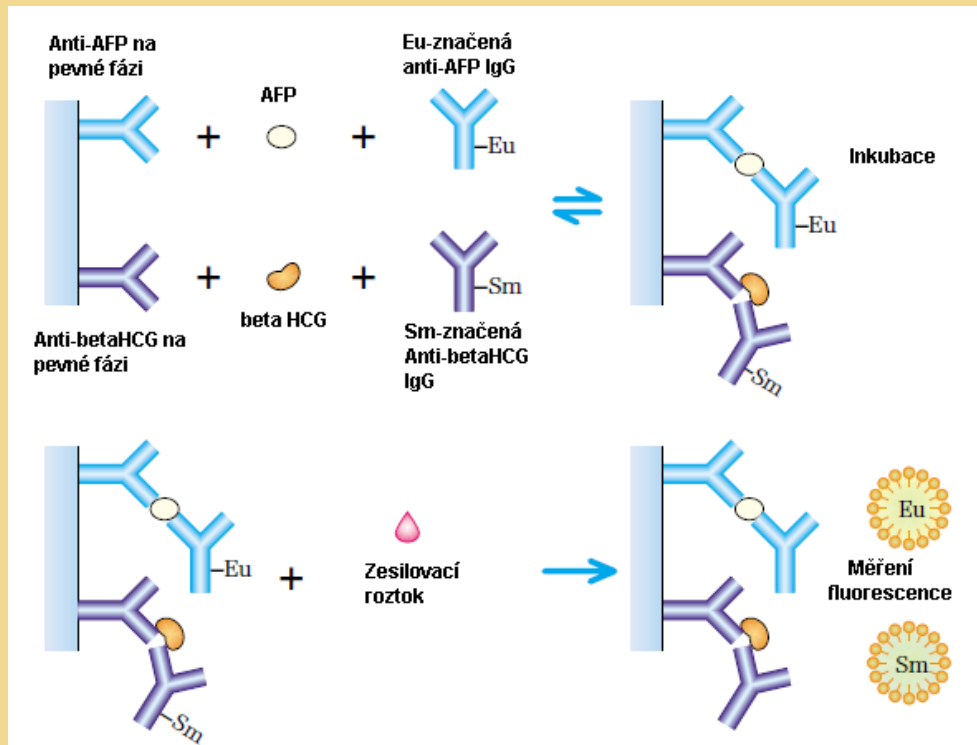
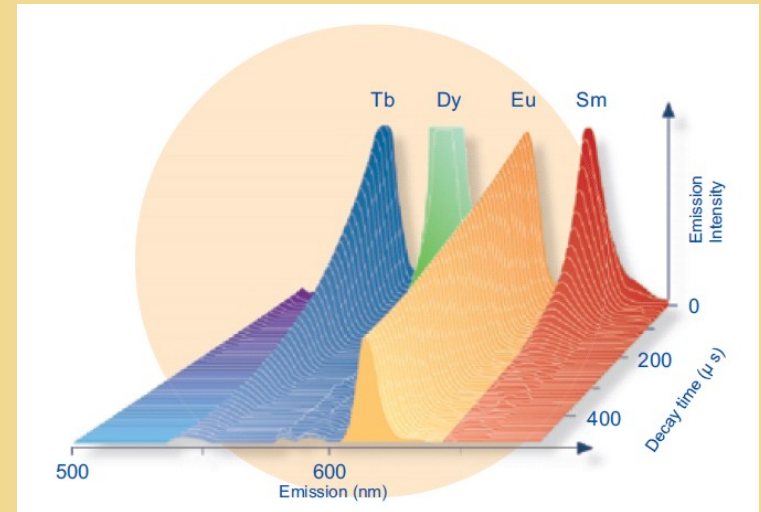
- fluorescenční sondou značená protilátka
- intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku



DELFLIA - současné stanovení více analytů

Fluorescence lanthanidů:

- Úzké emisní píky při různých vlnových délkách (Eu 613 nm, Sm 643 nm)
- Různá doba trvání fluorescence Eu, Sm



- Při měření se nepřekrývají vlnové délky ani časy odečtu fluorescence Eu a Sm - umožňuje současné stanovení dvou analytů

DELFI A - využití

DELFI A lze použít pro široké spektrum analytů (v principu lze lanthanidem označit každou stabilní sloučeninu obsahující aminoskupinu):

- Proteiny
- Peptidy
- Oligonukleotidy
- Malé organické molekuly (steroidy, aminokyseliny, léky,...)

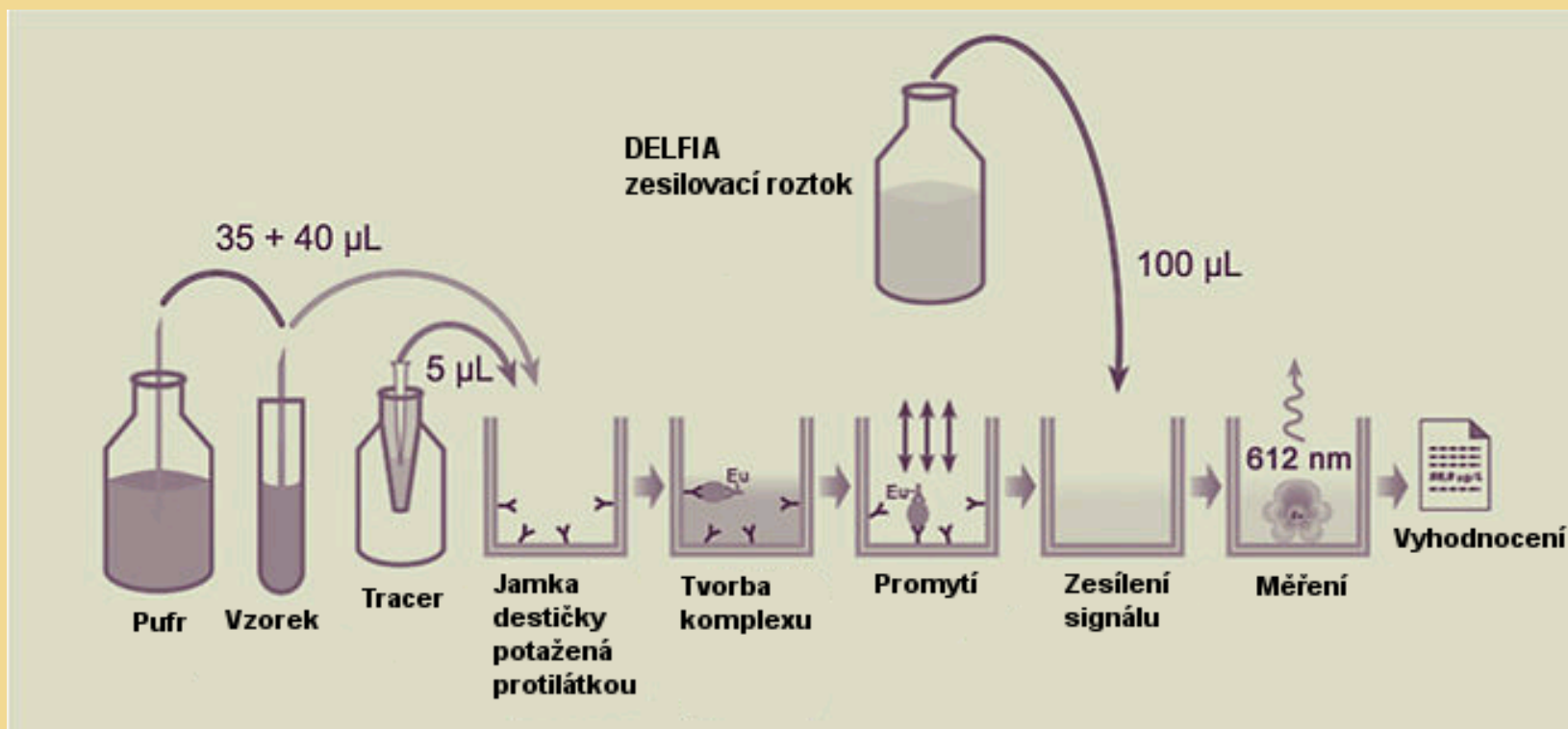
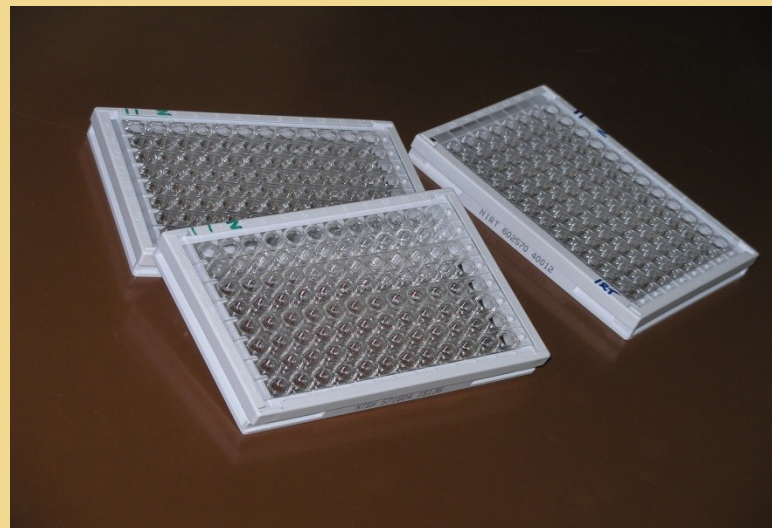
Novorozenecký screening (stanovení ze suché krevní skvrny):

- TSH (kongenitální hypotyreóza)
- 17-hydroxy-progesteron (kongenitální adrenální hyperplázie)
- Imunoreaktivní trypsinogen IRT (cystická fibróza)

DELFLIA

praktické provedení

- Pracuje se v mikrotitračních destičkách v uspořádání 8x12 jamek se specifickou protilátkou (obvykle monoklonální) vázanou na pevné fázi



DELFLIA - linka



Autodelfia



HOMOGENNÍ IMUNOANALÝZA

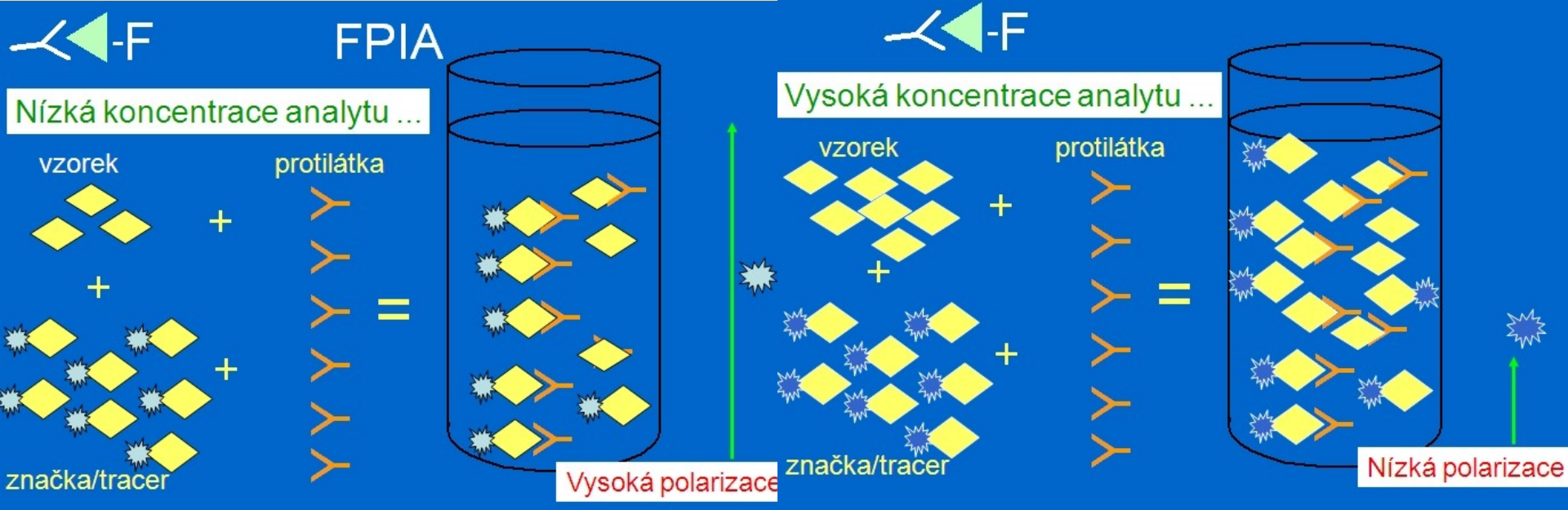
FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza; Fluorescence Polarization Immunoassay)

- Patří mezi homogenní kompetitivní imunoanalýzu
- Stanovovaný analyt a analyt značený fluoresceinem soutěží 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 základní stavu se měří emise zeleného světla přes polarizační filtr
- Intenzita polarizovaného světla je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu

FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza; Fluorescence Polarization Immunoassay)

- **Využívá různé rychlosti rotace velkých a malých molekul (imunokompl. a antigenu)- změna polarizace**
- **Malé molekuly (stanovovaný analyt a značený analyt) se otáčejí rychle, po excitaci polarizovaným světlem značený analyt emituje fluorescenční záření do mnoha směrů - naměří se pouze nízká intenzita tohoto záření**
- **Po vzniku velké molekuly (imunokomplex)-dojde ke snížení rychlosti rotace - emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitující – naměří se vysoká intenzita záření**
- **Pro stanovení malých antigenů (např. léků,...)**

FPIA



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

Technologie LOCI - Siemens

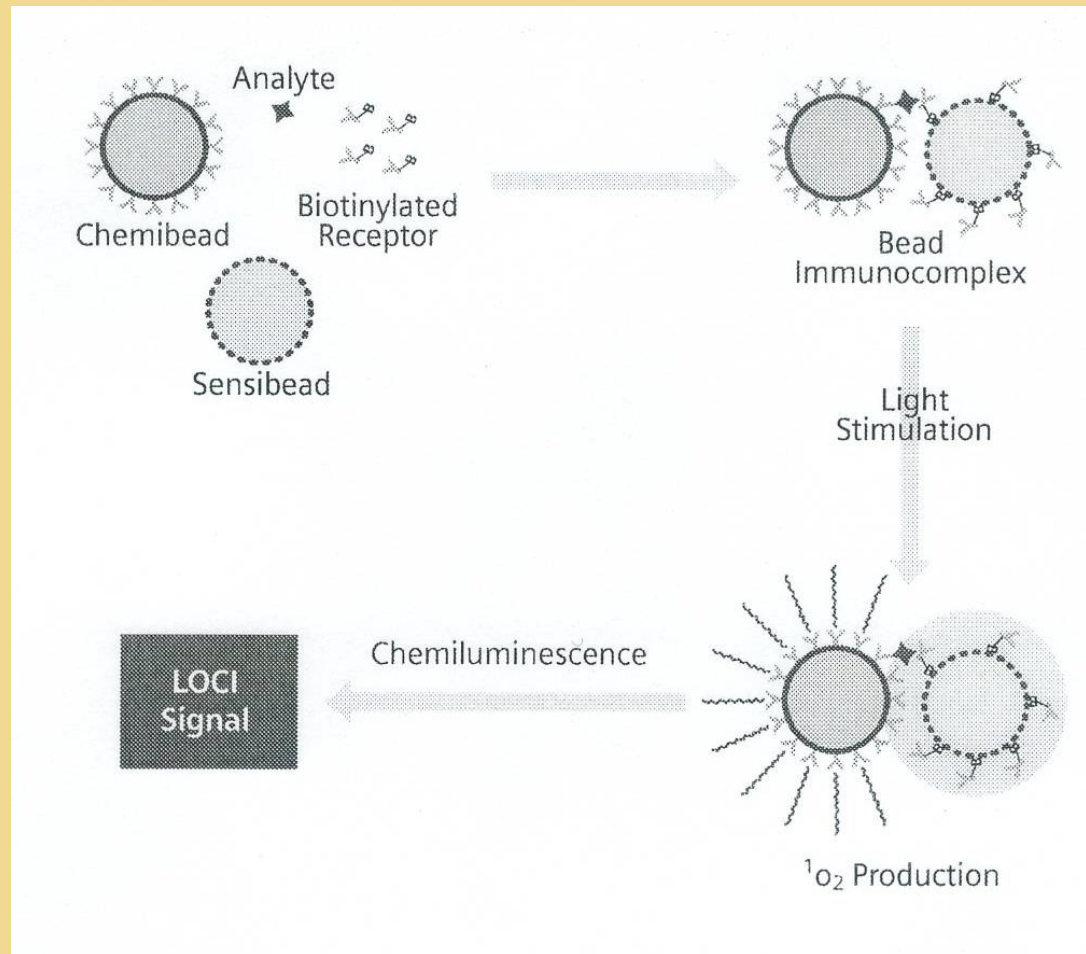
- Technologie založena na přenosu kyslíku
- První **homogenní** imunoanalytická metoda **s chemiluminiscenční detekcí** – novinka
- Vysoká citlivost
- Přístroj Dimension Vista 1500 Intelligent Lab Systém

Technologie LOCI - Siemens

Princip:

- **Dvě latexové kuličky**
 - jedna obsahuje olefinové barvivo a protilátku specifickou pro analyzovanou metodu (chemibead)
 - druhá je potažená streptavidinem a obsahuje barvivo, které generuje singletový kyslík (sensibead)
- **Do reakce dále vstupuje**
 - stanovovaný analyt
 - biotinylovaná protilátka specifická pro analyt.
- **Vytvoří se imunokomplex ze všech popsaných komponent.**
- **Po osvětlení komplexu se z **sensibead** uvolní singletový kyslík, pronikne do chemibead a uvolní chemiluminiscenční záření**

Technologie LOCI - Siemens



EMIT

- Homogenní, kompetitivní EIA
- Měří se aktivita **volného** enzymu **Ag^E**
(glukoso-6-fosfát dehydrogenáza)
- Enzym v imunokomplexu **Ag^E – Ab** je **inhibován**, změna v okolí značky
- **Ag^E** a **Ag^E – Ab** není třeba oddělovat
- Malé molekuly léky, drogy, mykofenolát
- Rychlost, jednoduchost provedení práce v jedné kyvetě, automatizace, přímá úměra
- Příklad – stanovení drog na přístroji Viva-E, Siemens