

**Chemiluminescence,
elektrochemiluminescence, FPIA,
MEIA**

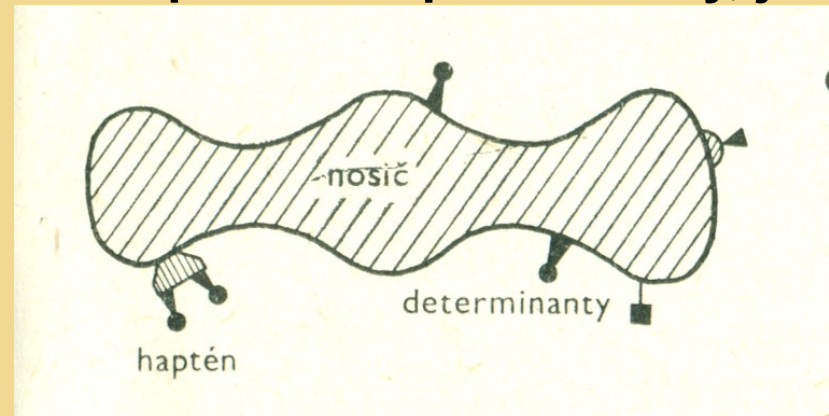
Miroslava Beňovská

Imunochemické metody

- Založeny na reakci antigenu a specifické protilátky za vzniku imunokomplexu
- Reakce **antigen - protilátka** popsána v r.1934 (J. Marrack)
- Antigen tvoří stanovovaný analyt
- Jako protilátka využívána reagencie

Antigeny

- Makromolekuly přirozeného nebo umělého původu (proteiny, karbohydráty, nukleové kyseliny, lipidy aj.)
- Látky schopné vyvolat v živém organismu tvorbu specifických protilátek
- Na reakci antigenu s protilátkou se účastní pouze některé její povrchové skupiny, tzv. **determinantní skupiny** neboli **epitopy**
- 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:

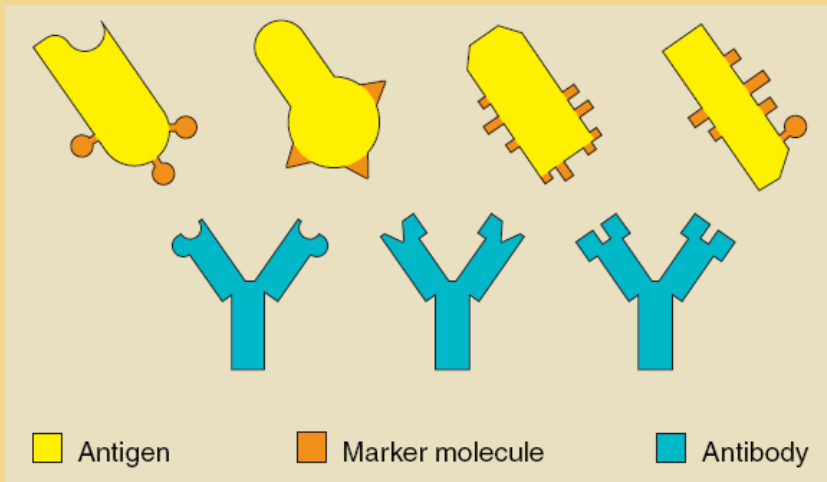
- Používají se protilátky monoklonální a polyklonální
- **Monoklonální** protilátky – produkovány hybridony, které se připravují fúzí imunizovaných slezinných buněk s nádorovými
 - po vyčištění a selekci produkují jen jedinný typ protilátky
 - dosahuje se vyšší specificity, kontinuální produkce
- **Polyklonální** 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

- Afinita vyjadřuje intenzitu s jakou se uskutečňuje interakce mezi vazebným místem protilátky a epitopem antigenu
- Afinita **epitopu** a **paratopu** je 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 síla se kterou polyvalentní protilátka interaguje s **polyvalentním antigenem**
- Závislá na afinitě, ale bere v úvahu valenci antigenu a protilátky i nespecifické faktory, které ovlivňují vazby mezi antigenem a protilátkou
- Vyrůstá s afinitou vazebného místa a počtem vazebných míst

Imunochemické techniky - rozdělení

Podle uspořádání reakce

- a) Kompetitivní (soutěživá) imunoanalýza
- b) Nekompetitivní (nesoutěživá, sendvičová) imunoanalýza

Podle prostředí

- a) Homogenní imunoanalýza
- b) Heterogenní imunoanalýza

Podle techniky použité k měření signálu

- a) Luminiscenční imunoanalýza
- b) Fluoroimunoanalýza
- c) Enzymoimunoanalýza
- d) Radioimunoanalýza

Imunochemické techniky - rozdělení

Podle použité značky

Typy značek:

- Luminofory
- Fluorofory
- Enzymy
- Substráty
- Radioizotopy

Bez značení:

- Imunoturbidimetrie
- Immunonefelometrie

Podle způsobu provedení

- Jednostupňové - dvoustupňové

- Automatizované analýzy - manuální analýzy

Imunoanalytické metody

Homogenní imunoanalýza

- U této techniky není potřeba odstraňovat reaktanty - oddělovat nenavázanou protilátku (send.) či imunokomplex (komp.)
- Vše mimo komplex je inaktivní, nedává signál
- Stanovení a detekce probíhá přímo v reakční směsi
- Rychlejší a jednodušší technika

Heterogenní imunoanalýza

- Nepotřebné reaktanty nebo imunokomplexy se z reakční směsi odstraňují (např. magnetickou separací nebo ukotvením na pevném nosiči a promytím)
- Separuje se značka volná od značky vázané (obě dávají signál)
- Reakce s detekcí proběhne až po této separaci

Základní postup při heterogenní 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)

Metody stanovení imunoanalýzy - dle detekční techniky

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)

Luminiscenční

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

- **Enzy**mo **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

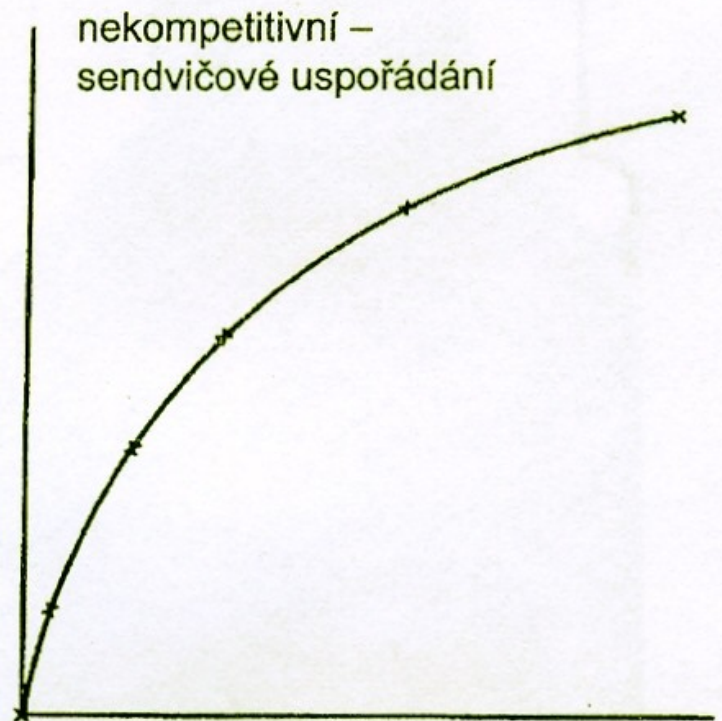
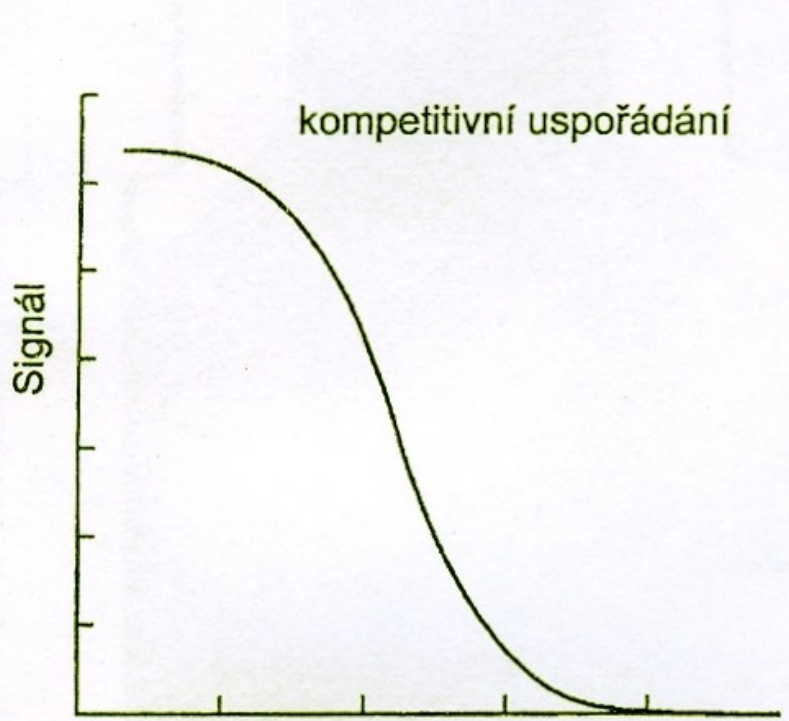
Metoda	(g)
EMIT	10^{-6}
FIA, FPIA, EIA	10^{-9}
RIA, REA, IRMA	10^{-12}
LIA, ILMA	10^{-15}

Kompetitivní stanovení:

- Stanovovaný antigen soutěží se stejným antigenem s navázanou značkou o limitované množství protilátky
- Vzniknou imunokomplexy obsahující značku a imunokomplexy bez značky
- 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



Analytická koncentrace

Luminiscence

- Jev představující vyzařování přebytečné energie ve formě fotonů - dochází k němu při návratu excitovaných elektronů na základní hladiny
- Emise světla vzniká následně po excitaci atomů působením jiného záření, elektronů nebo při chemické reakci apod. a po jejich návratu do základního stavu
- Děj, při němž záření o kratší vlnové délce (větší frekvenci) vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce (nižší frekvenci)
- Část energie se vyzáří ve formě tepla (nesvítivé deexcitační procesy)

Druhy luminiscence

Luminiscence vzniká po dodání energie v různé podobě

- **Fotoluminiscence** – luminiscence je vyvolána elektromagnetickým zářením (zářivky) - do této kategorie patří **fluorescence** a **fosforescence**
- **Chemiluminiscence** – luminiscence je vyvolána chemickou reakcí (sem patří také bioluminiscence, kdy je emise světelného záření vytvořena živými organizmy – světlušky, medúzy)
- **Elektroluminiscence** – luminiscence je vyvolána elektrickým polem (reklamní panely, nouzové osvětlení)
- **Katodoluminiscence** – luminiscence je vyvolána dopadajícími elektrony (stínítko televizní obrazovky).
- **Termoluminiscence** – luminiscence je vyvolána vzrůstem teploty po předchozím dodání energie
- **Radioluminiscence** – luminiscence je vyvolána působením radioaktivního záření
- **Triboluminiscence** – luminiscence je vyvolána působením tlaku (při deformaci tělesa)
- **Sonoluminiscence** - vyvolána dopadem ultrazvuku

Fotoluminiscence

- Podle délky trvání ▶ **fluorescence**
▶ **fosforescence**
- Dochází k ní vlivem absorpce energie dopadajícího světelného záření
- Pokud po odstranění zdroje ozařování rychle vymizí ▶ fluorescence
- Pokud přetrvává (doznívá) i po odstranění zdroje ozařování ▶ fosforescence

Fotoluminiscence



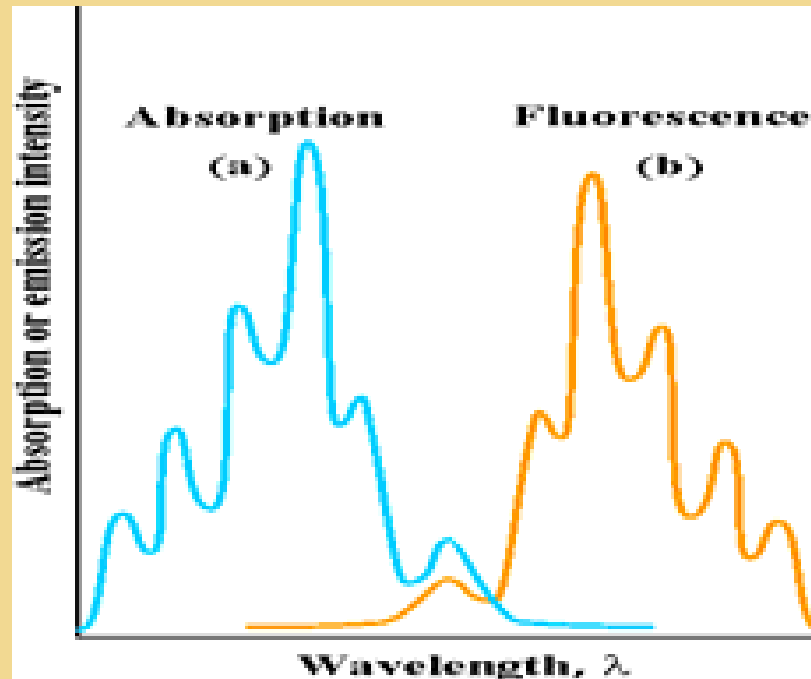
X a X^* je základní a excitovaný stav molekuly
 $h\nu$ a $h\nu'$ dopadající a emitovaná světelná energie

- Emitovaná energie záření je nižší než energie dopadajícího (primárního) záření
- Emitované (sekundární) záření má nižší frekvenci a delší vlnovou délku než světelné záření primární
- Rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emitujícího záření - **Stokesův posun**

Fluorescence

- Přejchod mezi tzv. povolenými stavy atomu
- K vyzáření **fotonů** dojde již za pár nanosekund (krátkodobé světélkování - 10^{-8} až 10^{-5} s).
- Představuje sekundární záření po absorpci elektromagnetického záření

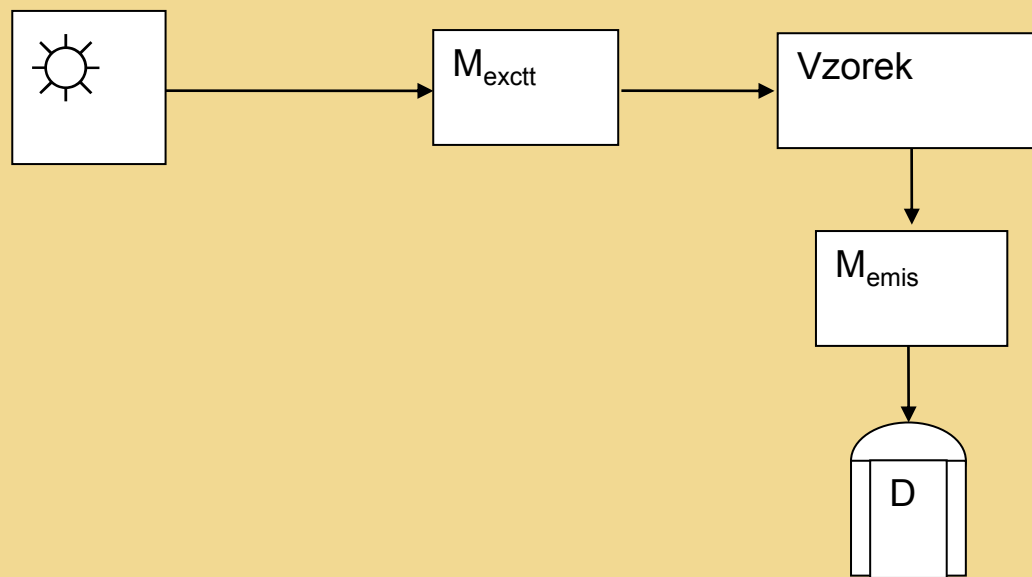
Absorpční a fluorescenční spektrum



- Posunuto k delším vlnovým délkám než původní absorpční spektrum (**Stokesův posun**)
- Zaujímá zrcadlovou pozici

Fluorimetr

- Zdroj světelného záření (xenonová nebo xenonová-rtuťová oblouková výbojka)
- Monochromátor pro výběr excitačního záření
- Kyveta (křemenné)/vzorek
- Monochromátor pro sekundární (emisní) záření
- Detektor (fotonásobič)



Fosforescence

- **Přechod tzv. zakázaný.**
- **Při fosforescenci se fotony vyzáří, ale trvá to až několik minut (dlouhodobé světélkování 10-2s až několik dní)**
- **Nemá v klinické laboratoři praktické využití**

Chemiluminescence

- Je luminiscence vyvolaná energií chemické reakce
- Vzniká vyzářením fotonu z molekuly luminoforu po jeho chemické oxidaci působením oxidantů (H_2O_2 , O_2 , ...)
- Dochází k produkci světelného záření excitovanými molekulami v průběhu chemické reakce
- Chemiluminescence v živých organismech - bioluminescence
- $\mathbf{A + B \rightarrow X^* \rightarrow P + h\nu}$
A a **B** jsou reaktanty, **X*** je excitovaný meziprodukt, **P** je produkt v základním stavu a $h\nu$ je energie emitovaného světelného záření

Luminometr

- Skládá se z měrné komůrky a detektoru (fotonásobiče)
- Měrná komůrka (cela) se vzorkem a ostatními reaktanty obsahuje systém zrcadel – soustřeďují světelné záření na detektor
- Vznik záblesků světla - fotony
- Počet fotonů zachycuje citlivý fotonásobič

Fluorofory, luminofory

- **Fluoreskující látky obsahují konjugované dvojné vazby**
- **Spontánně fluoreskuje málo biologických molekul - tryptofan a porfyriny**
- **Luminofory produkují záření při chemických reakcích**
- **V imunoanalýze jsou fluorofory a luminofory navázány jako značka na protilátky či antigeny nebo tvoří substrát, eventuelně vznikají až po jeho rozštěpení**

Fluorofory, luminofory

Příklady:

Akridin a jeho estery

Adamantyl dioxetan

Methylumbelliferon (MU)

Cheláty platinových kovů (ruténium)

Cheláty lanthanidů (europium)

Luminol, isoluminol

Fluorescein