

Automatické imunochemické analyzátory

- Spojení **luminiscenčních technik a imunoanalýzy** představují **automatické imunochemické analyzátory**
- Na nich většina imunoanalytických metod v laboratorní medicíně
- Uplatnění biochemie, sérologie, transfúzní stanice
- Automatizace koncem 80. let
- Uplatnění pro analyty s nízkou koncentrací (nmol/l, pmol/l)
- Využití reakce antigen – protilátka
- Značená protilátka (případně antigen)
- Většinou heterogenní imunoanalýza (pevný povrch – paramagnetické částice, kulička)
- Doba analýzy 15 – 60 min
- Detekce s vysokou citlivostí (chemiluminiscence, elektrochemiluminiscence, fluorescence..)

Automatické imunochemické analyzátory

- **Jsou opatřeny čtečkou čárového kódu, umožňují tak jednoznačnou identifikaci pacienta**
- **Zpracovávají vzorky v primární zkumavce , práce po pacientech - Random Access**
- **Požadavky pro jednotlivé analýzy jsou přijímány z laboratorního informačního systému (LIS), analýza pak probíhá automaticky bez zásahu obsluhy**
- **Jedná se o uzavřené systémy – pouze pro reagenty výrobce přístroje**

Automatické imunochemické analyzátory

- Kazetový systém reagensů
- Detekce sraženiny patří ke standardní výbavě
- Cena imunochemických vyšetření poměrně vysoká - řádově mezi 50 – 200 Kč
- Principy jednotlivých firem se liší typem **značky, separace a detekce**

Separace na paramagnetických mikročásticích

- Rozšířeným způsobem oddělení komplexu antigen - protilátka
- Jedná se o oxidy železa - vykazují magnetické vlastnosti
- Povrch částic mnohonásobně větší než stěny reakční nádoby
- Mikročástice mají vazebná místa pro navázání stanovovaných a značených analytů
- Po proběhlé imunoanalytické reakci se z reakční směsi odstranit pro detekci nepotřebné součásti
- Působením magnetu se mikročástice s navázaným imunokomplexem při promývání přidrží na stěně reakční nádoby

Kalibrace

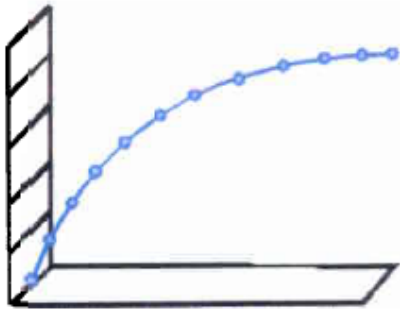
- K výpočtu koncentrace stanovovaných analytů na imunoanalytických analyzátoch - nelineární kalibrační závislosti
- Využití kubických polynomů
- Master křivka od výrobce - zákazník ji při kalibraci pouze koriguje na aktuální podmínky (dvě hladiny)

Detekční limit

- Chemiluminiscenční a fluorescenční techniky patří k nejcitlivějším metodikám
- Řádově fento až zeptomoly (10^{-15} až 10^{-21} molu)

Elecsys® - The Master Calibration Process at Roche Diagnostics

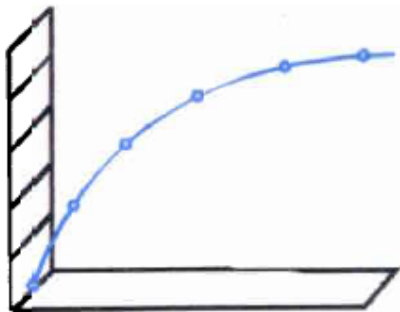
Reference Standardization once



**Reference: gold standard (e.g. WHO material),
10 - 12 concentration values
(much wider range than reportable range).**

➔ read values for master calibrators (copies of gold standards)
to secure reproducible reference to gold standards

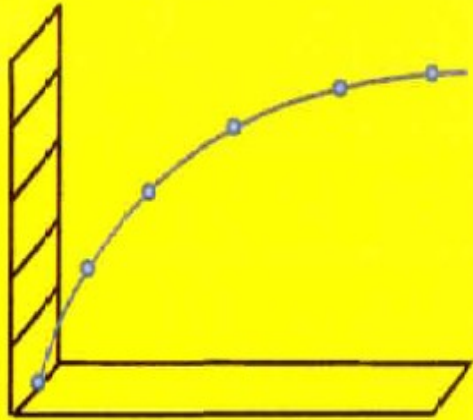
Lot specific Master Calibration for each lot



**Reference: master calibrators, 5 - 6 concentration values
(range wider than reportable range).**

➔ read values for a) Calset Calibrators
b) Rodbard parameters: a,b,c,d ➔ Roche-Barcode

Master calibration



Master calibration
performed by Roche

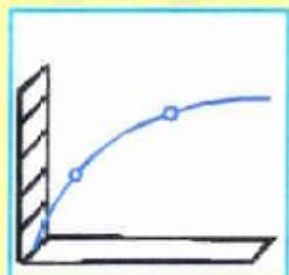
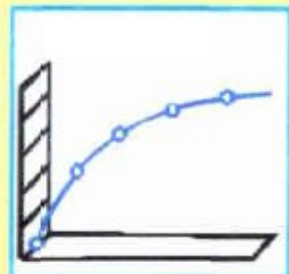
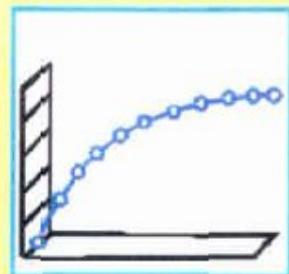


Data carrier



Calibration on
customer's site
with two calibrators

Elecsys® 2010 - The Master Calibration Process



Roche Development



Roche Production



Customer



Chemiluminiscenční techniky v automatizované imunoanalýze – heterogenní imunoanalýza

Chemiluminiscence s využitím akridinium esteru

Princip měření:

- Systém měří kvantitativní množství světla emitovaného během chemiluminiscenční reakce
- Pevná fáze jsou paramagnetické částice (Fe_2O_3)
- 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})

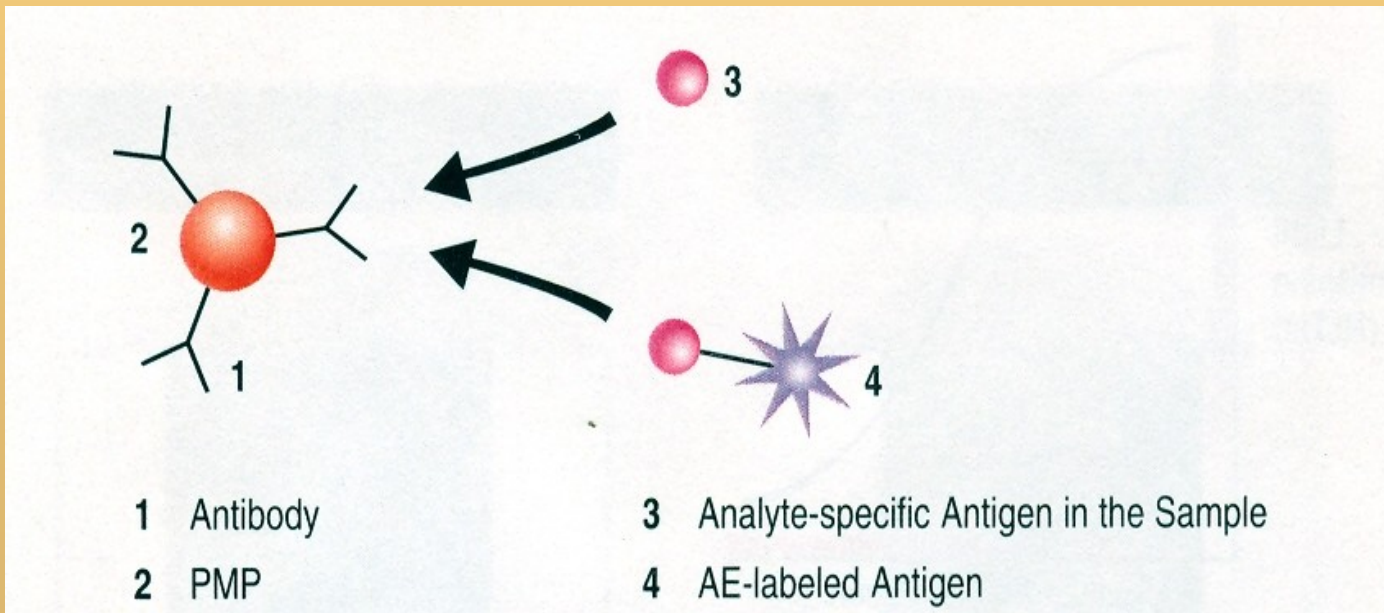
Advia Centaur (Siemens - Bayer)



- Analyzovaným materiálem je sérum/plasma nebo moč
- Pracuje po pacientech při využití principu "RANDOM ACCESS," - analýzy se provádějí v optimálním časovém rytmu
- **Stroj se nemusí zastavovat pro doplnění reagensů a vzorků**
- 240 stanovení za hodinu

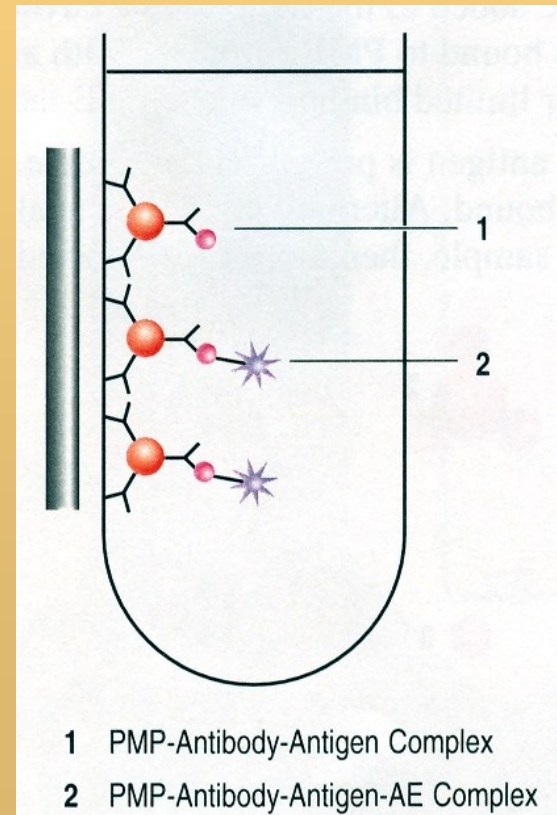
LIA - kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- 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



Advia Centaur (Siemens)

Metody: Thyroidní hormony:	FT4, TT4, FT3, TT3, TSH, TU, TSH-3, neonatal TSH, Anti - TPO
Reproduktivní hormony:	Prolactin, FSH, Progesteron, hCG, Estradiol, Testosteron, LH
Anemie:	B12, Foláty, RBC Foláty, Ferritin
Tumor markery:	AFP, CEA, PSA, komplex PSA, CA 15-3, /B27.29/, CA 125, CA 19-9,
TDM:	Digitoxin, Carbamazepin, Phenobarbital, Tobramycin, Digoxin, Genamicin
Kardio markery:	CKMB, cTroponin I, Myoglobin
Alergie:	total IgE
Ostatní:	Kortizol
Infekce:	Rubella G, Rubella M, Toxoplasma G, Toxoplasma M

Advia Centaur (Siemens)

- **Reagencie:** Kazetový chlazený zásobník s 30 pozicemi - jsou neustále promíchávány. Automatická kontrola hladiny reagencie
- **Vzorky:** Lineární podavač s kontinuálním přístupem totéž pro kontroly, standardy
- **Kyvety:** akrylové, na jedno použití
- **Kalibrace:** Kalibrační křivka se vkládá do analyzátoru pomocí čtečky čárového kódu načtením. Master křivky z příslušného setu
- Doplnění **reagencií**, špiček, destilované vody, kyvet, vylítí odpadu, odstranění použitých špiček či kyvet **za chodu**

Architekt i 2000 SR, Abbott

Technologie ChemiFlex CMIA (chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích)

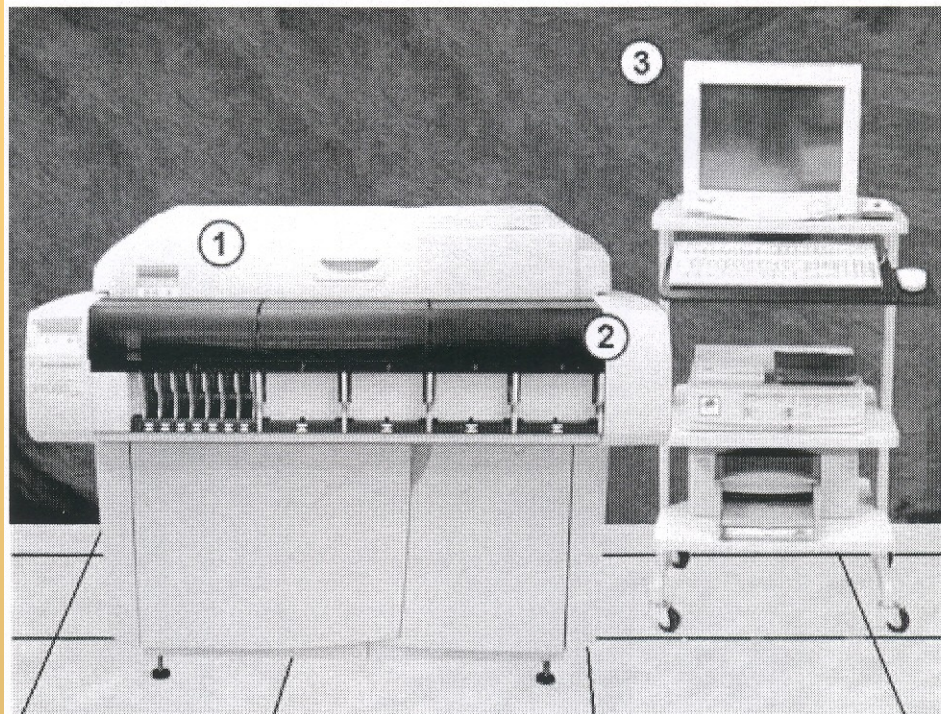
- měření vyzařovaných chemiluminiscenčních emisí v reakční nádobce
- Značení patentovaným **akridiniem**

Stručný postup:

1. Změření pozadí po přidavku peroxidu vodíku
2. Dávkování NaOH (Trigger) do reakční nádobky
3. Zachycení emitovaného světla a jeho odvedení světlovodem do fotonásobiče (PMT)

Architekt i 2000 SR, Abbott

Obrázek 1.4: Primární součásti systému i 2000_{SR}



1. i 2000_{SR}TM modul: Diagnostický modul s přednostním zpracováním vzorků, který pro zpracování vzorků využívá metodu CMIA (chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích).

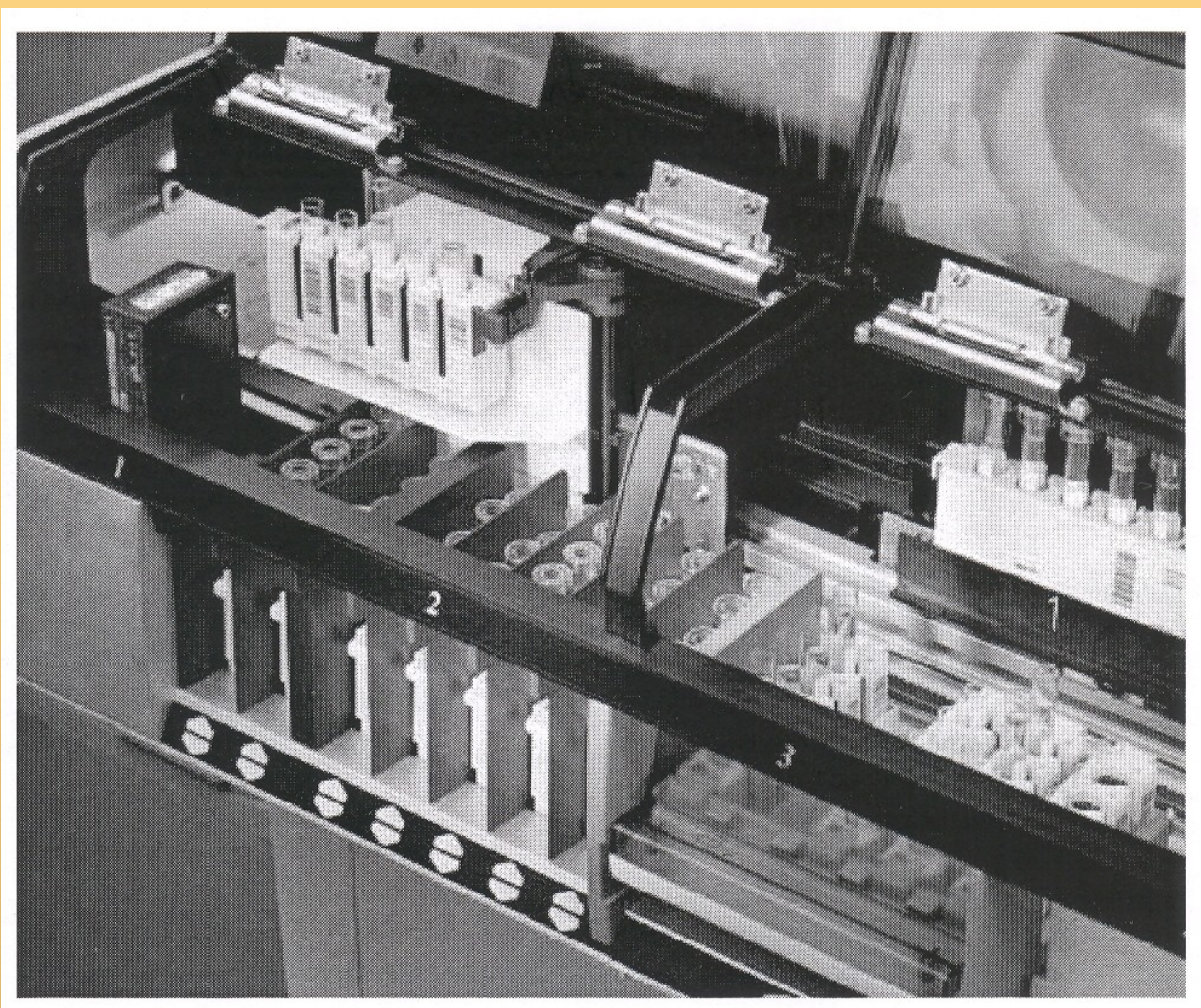
2. Podavač RSH (podavač vzorků pro opakované testování): Převážný modul, který přesunuje vzorky do modulu(-lů) k analýze a opakovanému testování.

3. Jednotka SCC (řídící jednotka systému): Počítačový systém, který uživatelům umožňuje řídit modul(-ly) a příbuzné součásti pomocí jednotného centrálního rozhraní.

ARCHITECT i2000/i2000SR

- **Systemy ARCHITECT i2000SR/i2000 - plně automatizované systémy poskytující vysoký stupeň flexibility**
- 25 metod, chlazený karusel
- **Velikost reagenčních souprav 100 a 500 testů**
- Automatické opakované testování, ředění a reflexe
- Detekce kapalin, detekce sraženin
- Použití čárových kódů
- Možnost integrace s biochemickým analyzátozem ARCHITECT c8000
- Výkon systému je až 200 testů za 1 hodinu (400 pro i4000, 600 pro i6000 a 800 pro i8000)

Architekt i 2000 SR, Abbott – detail distribučního systému



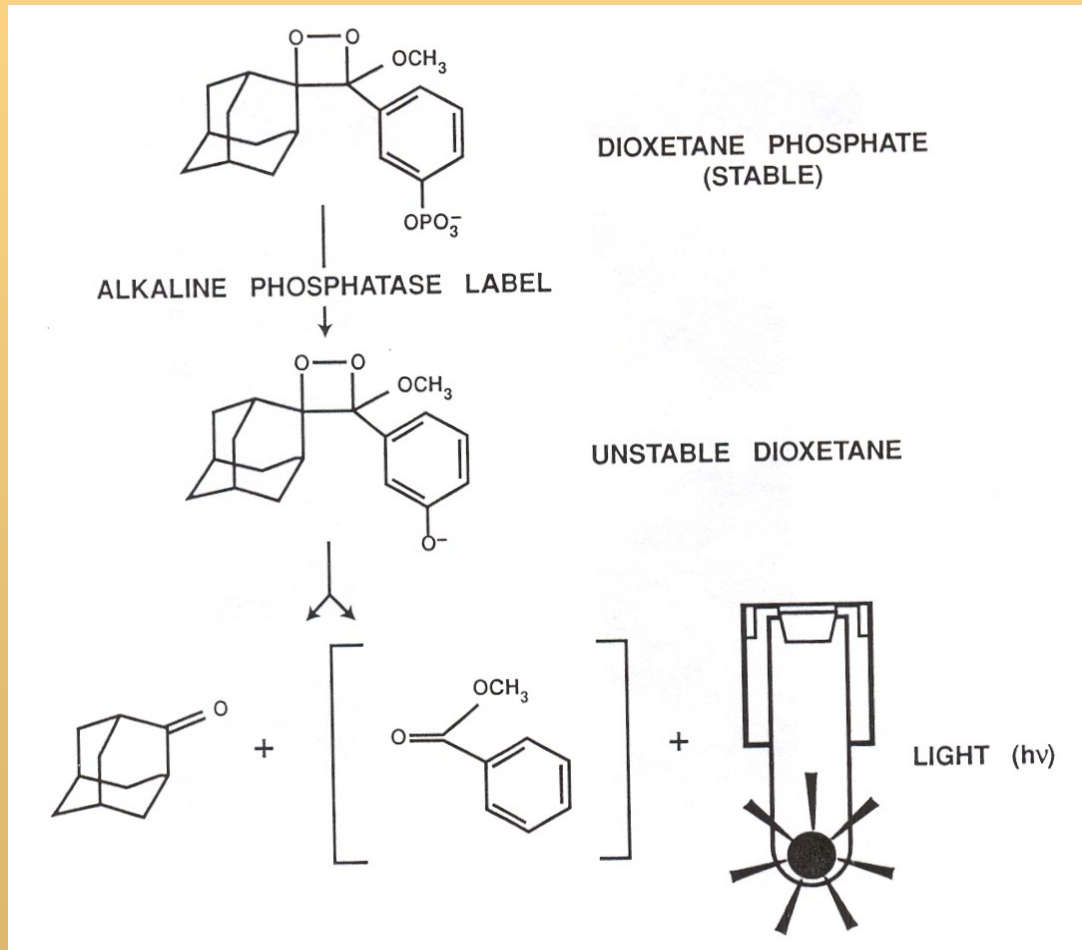
Enzymově zesílená chemiluminiscence

Princip měření:

- Ke konjugátu navázanému na reakční kuličce nebo paramagnetických mikročasticích a značenému alkalickou fosfatázou je přidán luminogenní substrát dioxetan fosfát
- Účinkem alkalické fosfatázy se odštěpí fosfát a dioxetanfosfát se přemění na dioxetan
- Ze substrátu vzniká nestabilní anion, při jehož rozkladu dojde k emisi fotonů (chemiluminiscenční reakce)

Immulite 2000, Siemens

Chemická reakce substrátu



Immolute 2000 (Siemens - DPC)

- Výkon 200 testů
- Random Access
- 24 chlazených reagensů
- Automatické opakování "out of range" vzorků
- Dotyková obrazovka
- Detekce sraženin
- Dlouhá doba inkubace – 35 nebo 70 minut

Unicel Dxl 800 (Beckman Coulter)



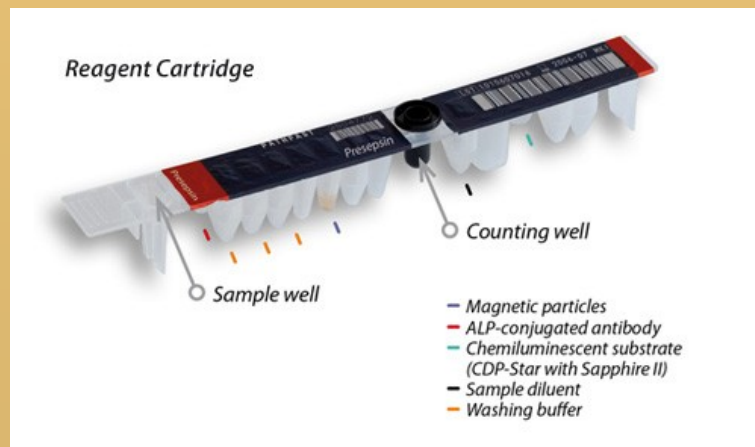
- Kompaktní plně automatický uzavřený systém umožňující provádění imunoanalytických stanovení
- Založen na použití alkalické fosfatázy jako markeru
- Paramagnetických mikročástic jako nosiče protilátek resp. antigenů
- Luminiscenční detekci využívající přeměny dioxetanfosfátu na dioxetan
- Přístroj má vysokou detekční citlivost při širokém koncentračním rozmezí a velmi dobrou přesnost a reprodukovatelnost výsledků

Unicel Dxl 800 (Beckman Coulter)

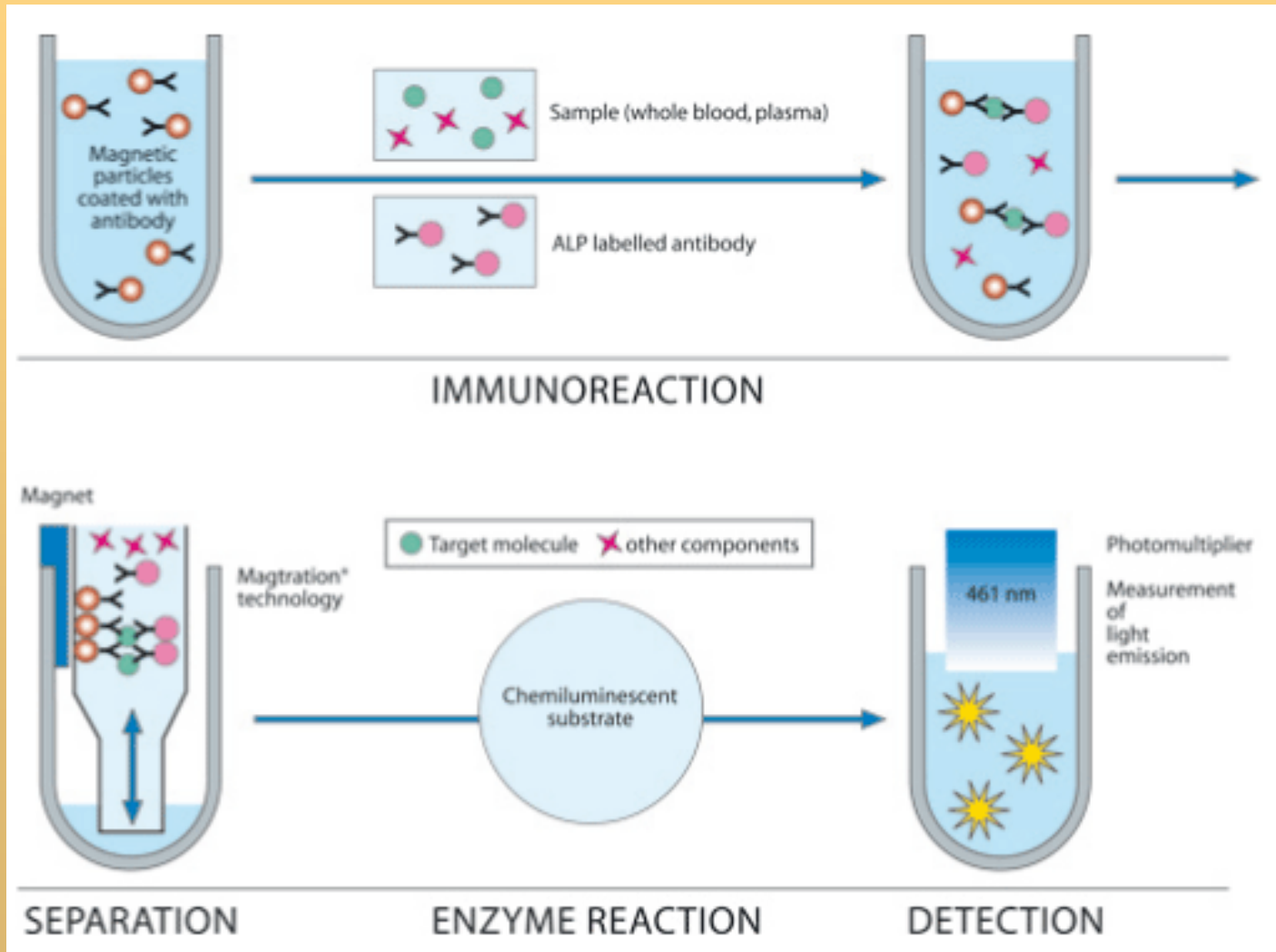
- **Výkon:**
Až 400 testů /hodinu
Rychlé uvolnění vzorku ze systému - systém si vytváří vlastní interní alikvot
- Kompatibilita s biochemickými analyzátory Synchron LX 20, UniCel DxC s automatizací – preanalycká linka, Power Processor
- Doplnování reagensů a spotřebního materiálu za plného provozu (bez nutnosti pauzy)
- Minimální údržba (5min.denně)
- Kontrola integrity vzorků – detekce sraženiny a bublin
- Široká nabídka testů

Pathfast, Mitsubishi chemical

- Plně automatizovaný stolní POCT imunoanalýzátor
- Kombinuje chemiluminiscenční technologii s Magtration technologií (slovo odvozeno od magnetické filtrace – automatizace při genetickém testování), vysoká citlivost
- Reagenční cartridge
- Plná krev, plasma nebo sérum
- 6 vzorků či testů v jednom běhu-17 min.
- Stanovení kard. markerů, hCG, CRP, Presepsinu



PATHFAST - princip



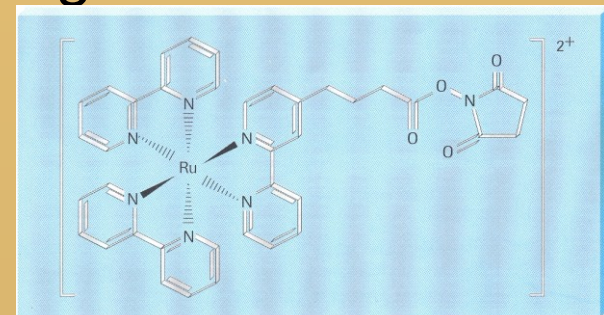
Presepsin

- **Presepsin – nově využívaný analyt (gen sCD 14 subtyp)**
- **Význam při diagnóze, prognóze a stratifikaci pacientů v septických stavech**
- **Zvýšení rychlejší než IL-6 a D-dimer**
- **ROC křivka strmější než pro prokalcitonin**

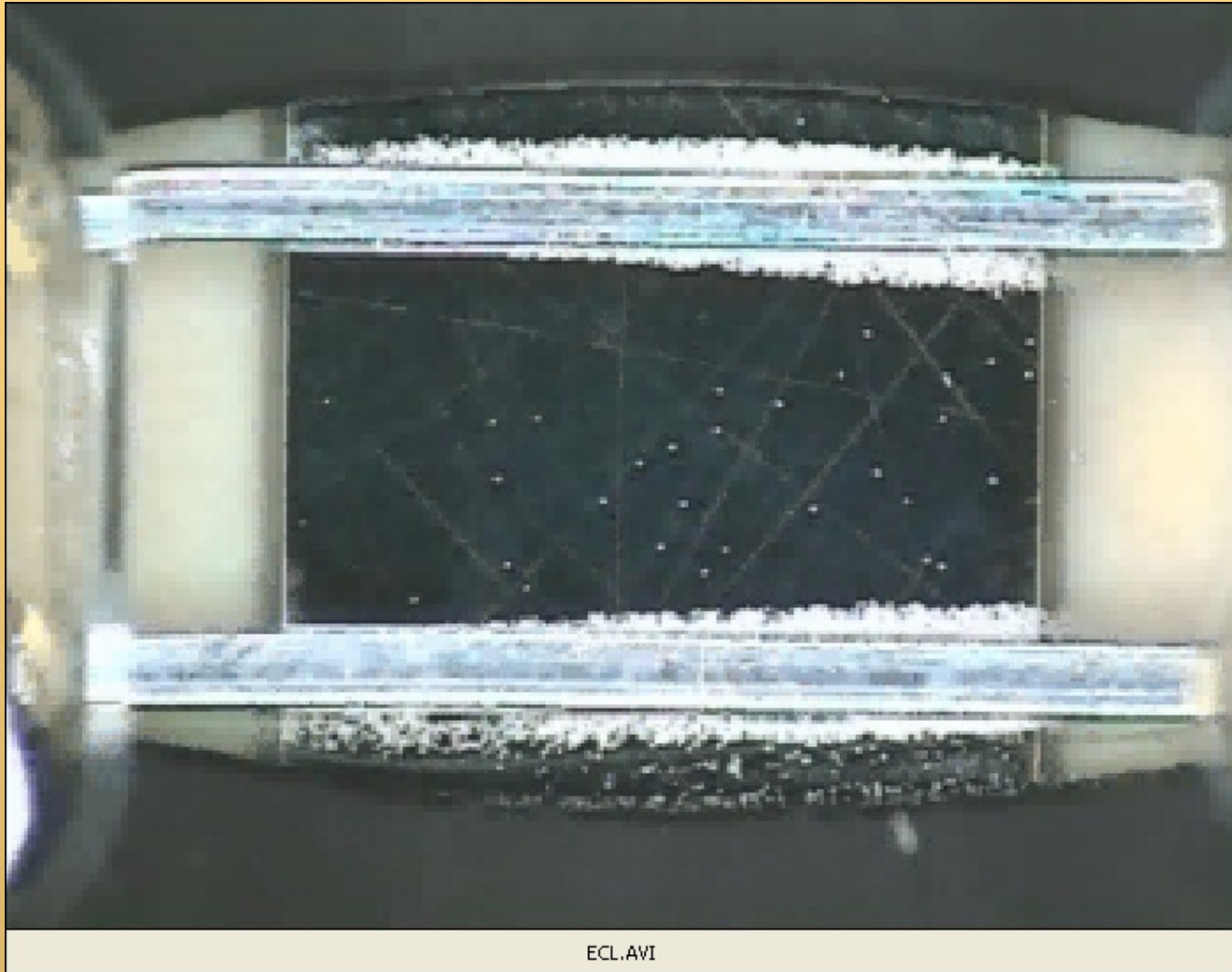
Elektrochemiluminiscence - princip měření

- Metodika využívá protilátky (případně antigeny) značené ruténium(II) tris-bipyridylovým komplexem a další protilátky či antigen s navázaným biotinem
- Paramagnetické kuličky jsou potažené streptavidinem. Afinity biotin-avidin je extrémně vysoká, takže dojde k navázání imunochemického komplexu na mikročástice
- Elektrochemiluminiscence vzniká v průtokové měřící cele po reakci imunokomplexu značeného chelátem ruthenia s tripropylaminem na povrchu elektrody a po vložení napětí na platinovou elektrodu (oxidace na anodě).
- Magnetické kuličky zajistí zachycení imunokomplexu na povrchu elektrody, nenavázané reagensie i značka jsou odstraněny promytím

Rutenium(II) tris-bipyridylový komplex



Elektrochemiluminiscence



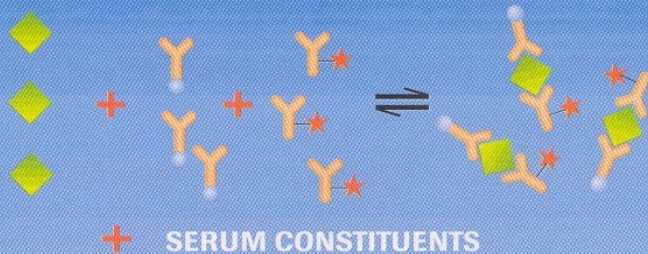
Příklad – nekompetitivní stanovení TSH

- Protilátky reagují s antigenem ve vzorku (např. TSH) za tvorby sendvičového komplexu
- Firma využívá většinou monoklonální protilátky.
- Po přidání mikročastic potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi interakcí biotinu se streptavidinem
- Mikročástice se zachycují magnetickým polem na povrchu elektrody
- Po přidání substrátu tripropylaminu 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

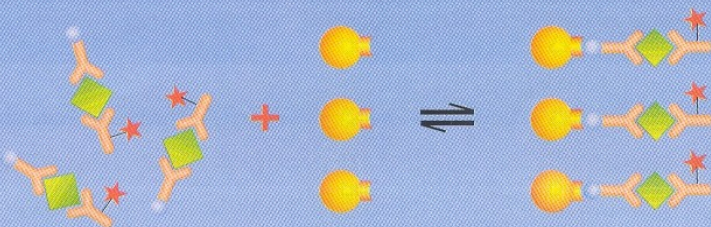
- Na tomto principu pracují imunochemické přístroje nebo imunochemické moduly firmy Roche – např. **modul e 501 systému Cobas 6000, modul e502 systému Cobas 8000 nebo Cobas e411** (délka inkubace – 9 , 18 nebo 27 minut)

SANDWICH PRINCIPLE

FIRST IMMUNOLOGICAL REACTION



SECOND REACTION



LIGHT REACTION



 ANTIGEN

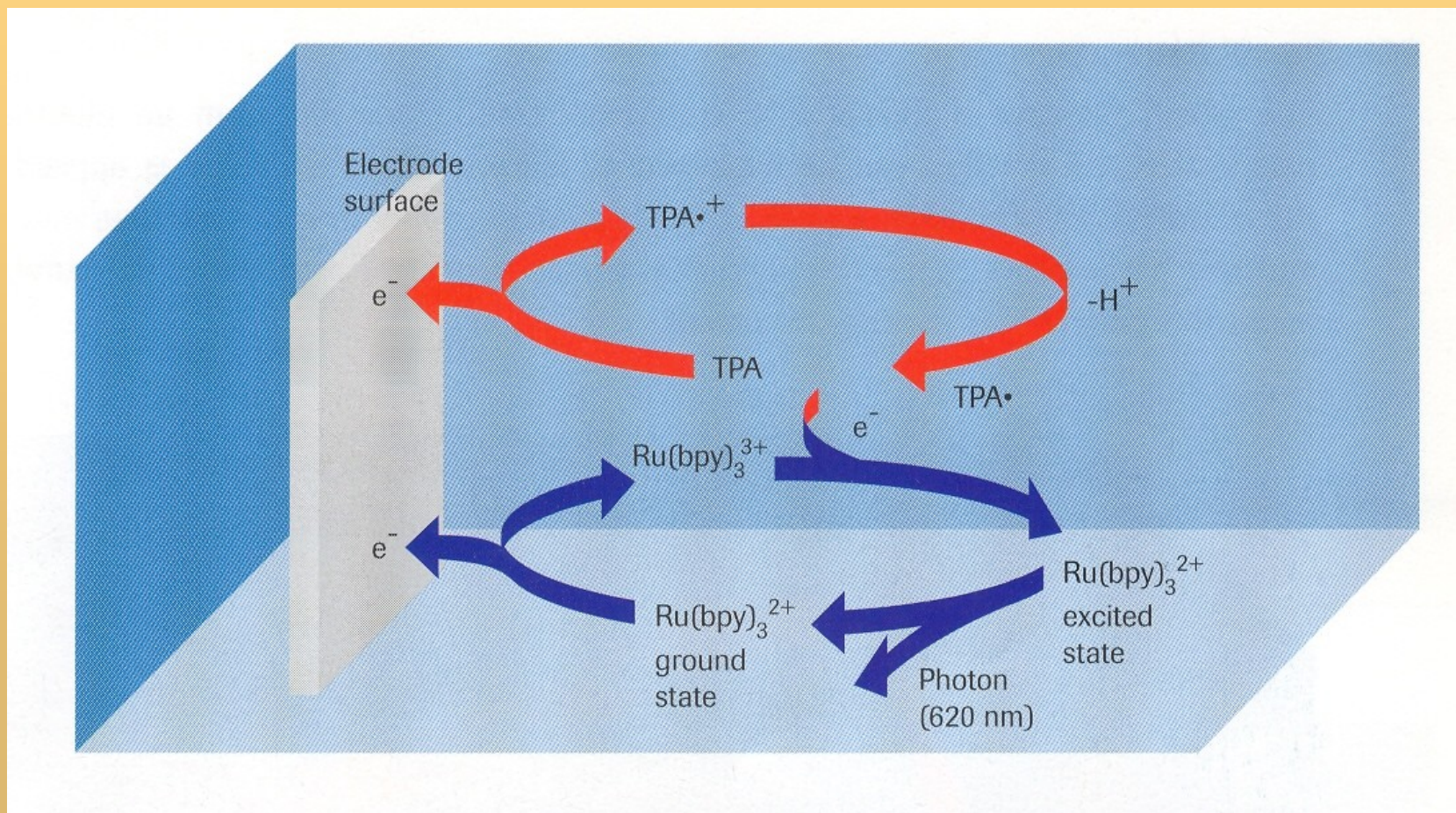
 BIOTINYLATED ANTIBODY

 RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

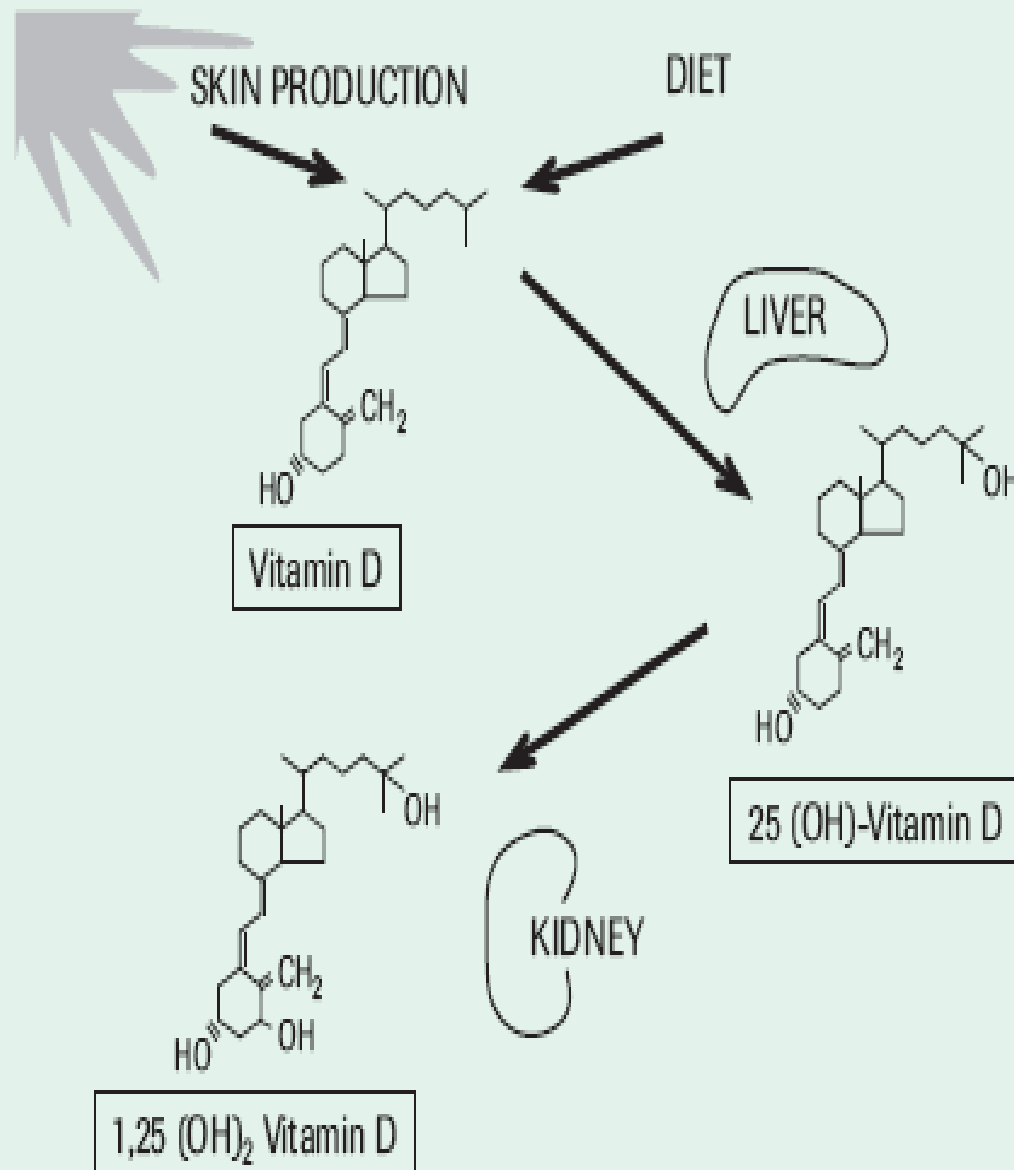
 STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

TPA TRIPROPYLAMINE

Elektrochemiluminiscence – imunoanalýza Roche



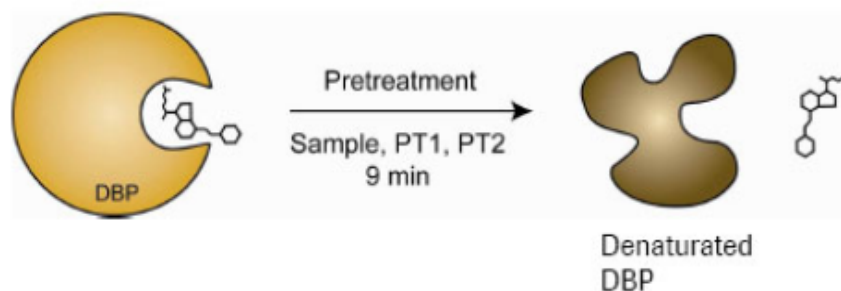
Tvorba účinného vitamínu D



Stanovení Vitamínu D, elektrochemiluminiscence, Roche

Vitamin D (25-OH) total assay procedure

Step 1: Denaturation of the vitamin D binding protein secures release of vitamin D (25-OH)

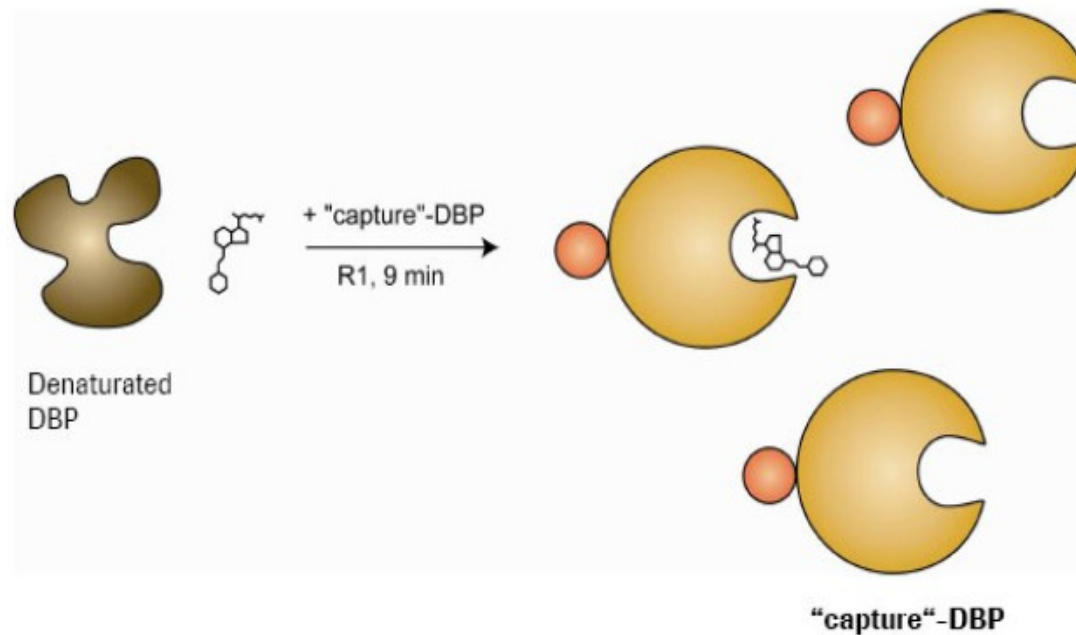


DBP = Vitamin D binding protein
PT1, PT2 = pre-treatment components

Stanovení Vitamínu D, elektrochemiluminiscence, Roche

Vitamin D (25-OH) total assay procedure

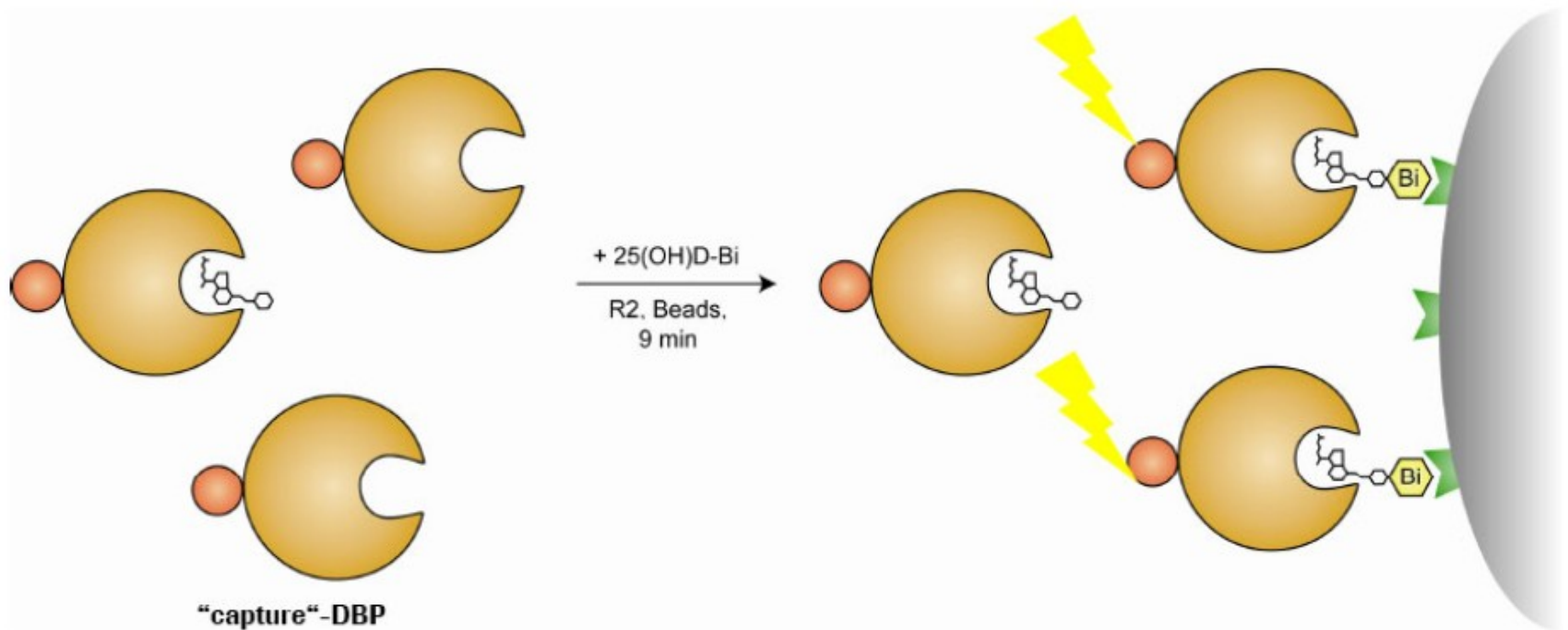
Step 2: Vitamin D (25-OH) is captured by recombinant monoclonal ruthenylated vitamin D binding protein



Stanovení Vitamínu D, elektrochemiluminiscence, Roche

Vitamin D (25-OH) total assay procedure

Step 3: Biotinylated Vitamin D (25-OH) competes with the bound Vitamin D (25-OH) to generate signal complexes



25(OH)D-Bi = biotinylated vitamin D (25-OH)

Cobas e411, Roche (Elescys)



- Systém je založen na technologii Elektrochemiluminiscence (ECL)
- Jedná se o benchtop analyzátor s kapacitou 86 testů za hodinu
- Vkládání dat prostřednictvím unikátního dvourozměrného čárového kódu

Elescys (Roche)

Inkubační jednotka 37 °C ± 0,5 °C

- Zde probíhá vlastní imunochemická reakce mezi vzorkem a reagensy
- Délka inkubace – 9 , 18 nebo 27 minut

Měřicí jednotka 28 °C ± 0,5 °C

- Obsahuje fotonásobič, průtokovou měřicí celi, magnetickou jednotku a zesilující obvod
- Po ukončení reakce je reakční směs nadávkována do měřicí cely, kde proběhne chemiluminiscenční reakce

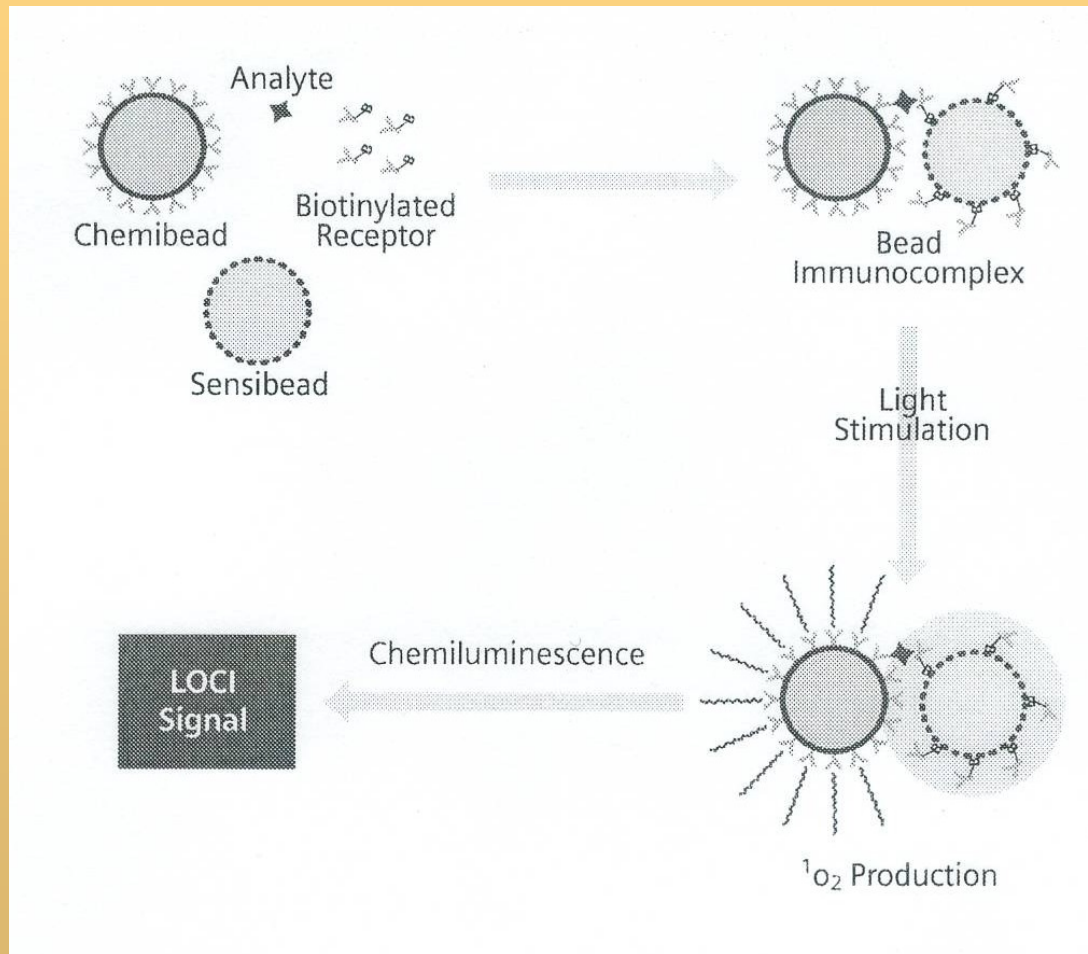
Chemiluminiscenční techniky v automatizované imunoanalýze – homogenní imunoanalýza

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 sensibilizované kuličky uvolní singletový kyslík, pronikne do chemibead a uvolní chemiluminiscenční záření**

Technologie LOCI - Siemens



Technologie LOCI - Siemens

- První **homogenní** imunoanalytická metoda **s chemiluminiscenční detekcí** – novinka 2011
- Technologie založena na přenosu kyslíku
- Přístroj Dimension Vista 1500 Intelligent Lab Systém

Dimension Vista 1500 Intelligent Lab System, Siemens

- **Integrovaný systém** - (mimo fotometrii, ISE a chemiluminiscence také nefelometrie)
- **Technologie LOCI**
- **Vysoká citlivost**



Fluorescenční techniky v automatizované imunoanalýze - heterogenní imunoanalýza

MEIA (Enzymová imunoanalýza na mikročasticích; Microparticle Enzyme Immunoassay)

- Technika patří mezi heterogenní enzymovou imunoanalýzu na mikročasticích
- Immunokomplex značený enzymem (ALP)
- Jako fluorogenní substrát metylumbelliferylfosfát (MUP) - s ním reaguje enzym (ALP) - vzniká 4-metyumbelliferon (MU) a po jeho excitaci fluorescenční záření
- Jako světelný zdroj se používá Hg-výbojka ($\lambda = 365 \text{ nm}$), MU emituje fluorescenční záření ($\lambda = 448 \text{ nm}$)
- Příklad: Přístroj AxSYM, Abbott
- Příklady stanovení – BNP, anti –CCP, hCG

MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay)

- enzymová analýza na mikročásticích

Postup:

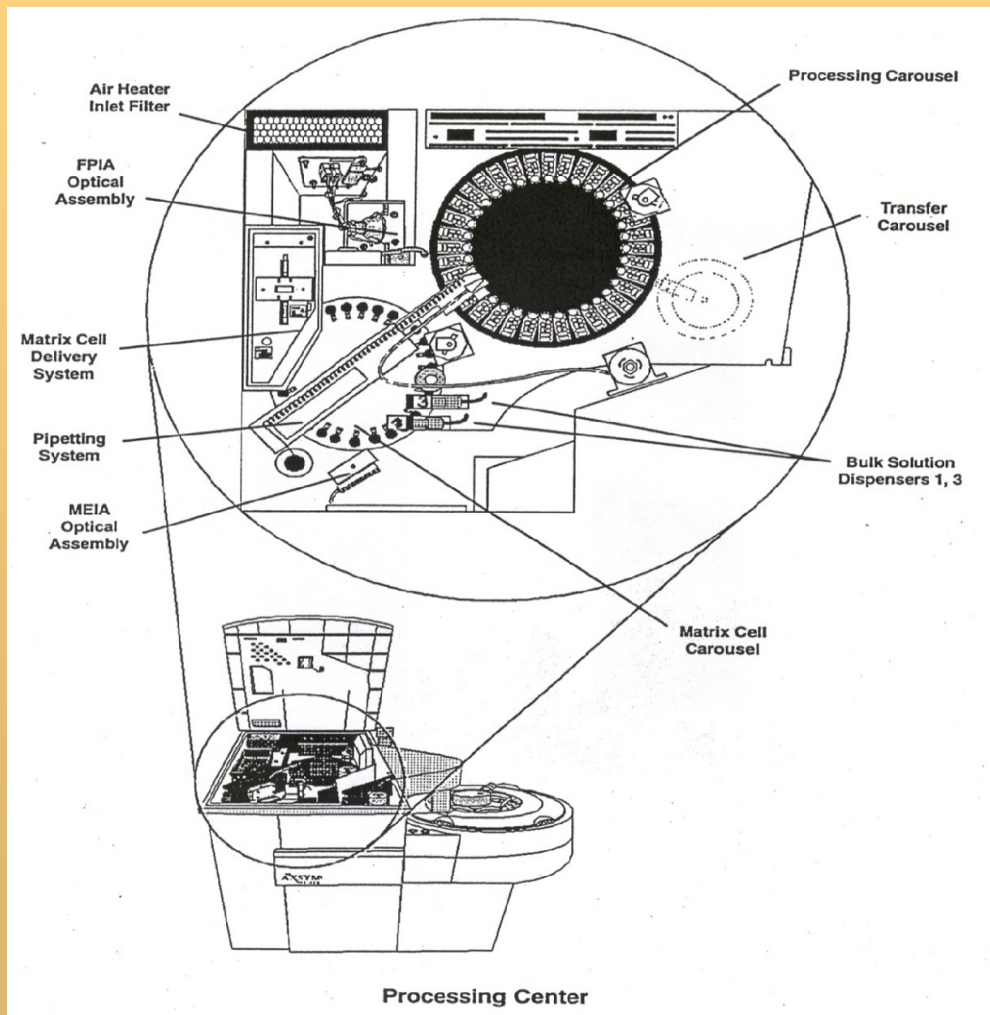
- **Vzorek se smíchá s reagensiemi, pak se inkubuje**
- **Separace od nepotřebné matrice a reagensií na skleněných vlákních válečku**
- **Přídavek konjugátu s alkalickou fosfatázou**
- **Přídavek substrátu – 4-methylumbelliferylfosfát (MUP)**
- **Hydrolýza MUP s ALP**
- **Fluorescence methylumnelliferonu**

Axsym (Abbott)

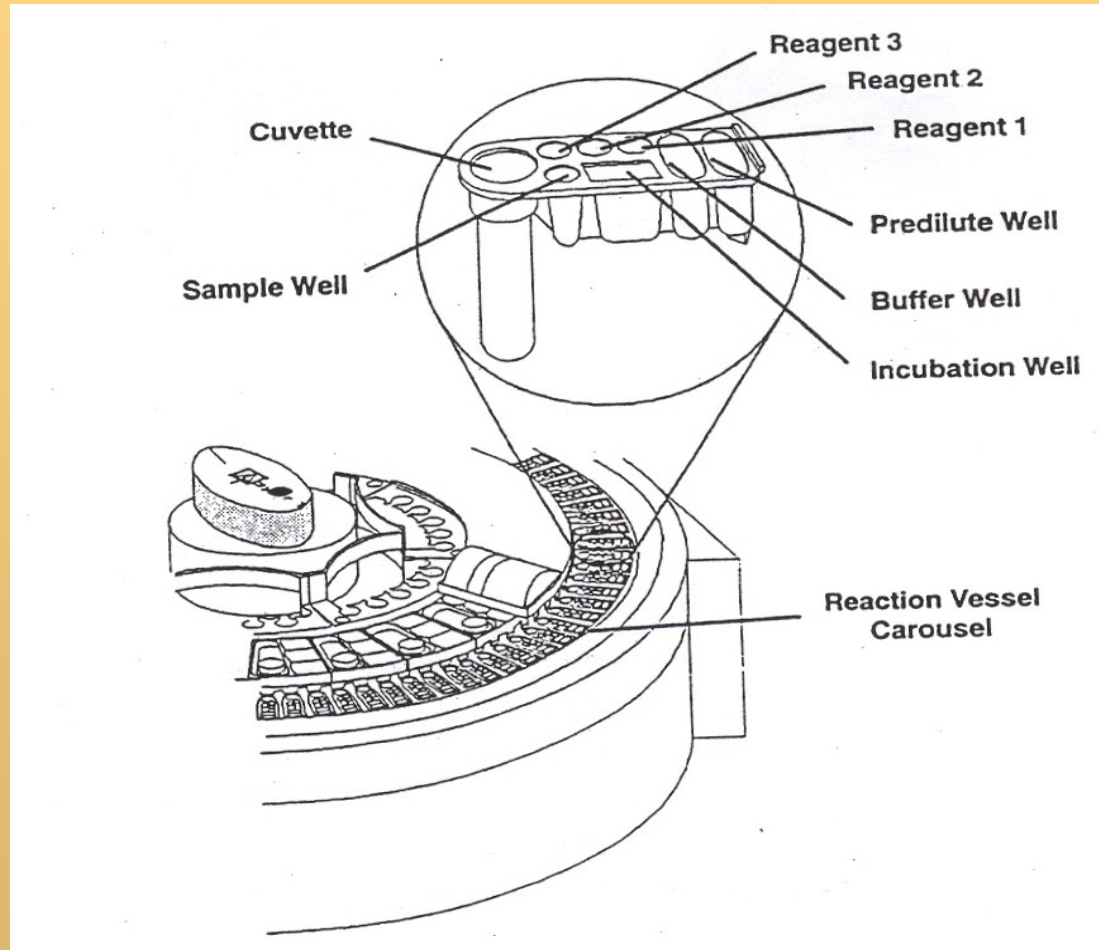


- Velmi rozšířený analyzátor
- 80-120 testů/ hod
- Měřící principy – MEIA, FPIA, REA a ICIA
- Robustnost
- Dotyková obrazovka
- Doba analýzy 15 - 20 min
- Technologie zabráňující tvorbě pěny

AxSYM - procesní centrum



Axsym - reakční nádobka



Technologie “Pegasus” - RAD 120, Radim

- Heterogenní imunochemická technika
- Pevná fáze - železitan potažený zirkoniem
(Částice se silnou vazebnou kapacitou k biologicky aktivním molekulám)
- Rychlá a efektivní separace
- Substrát – 4-methylumbelliferyl fosfát
- Fluorescenční detekce při 450 nm
- Kontinuální přidávání reagensů a vzorků za chodu
- Produktivita: až 120 testů/hod

RAD 120, Radim



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

Fluorescenční techniky v automatizované imunoanalýze - homogenní imunoanalýza

Homogenní fluorescenční imunoanalýza – **TRACE** (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) – přístroj 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
- Technika oceněna Nobelovou cenou

Přístroj nepříliš rozšířený

Odpadají promývací a separační kroky

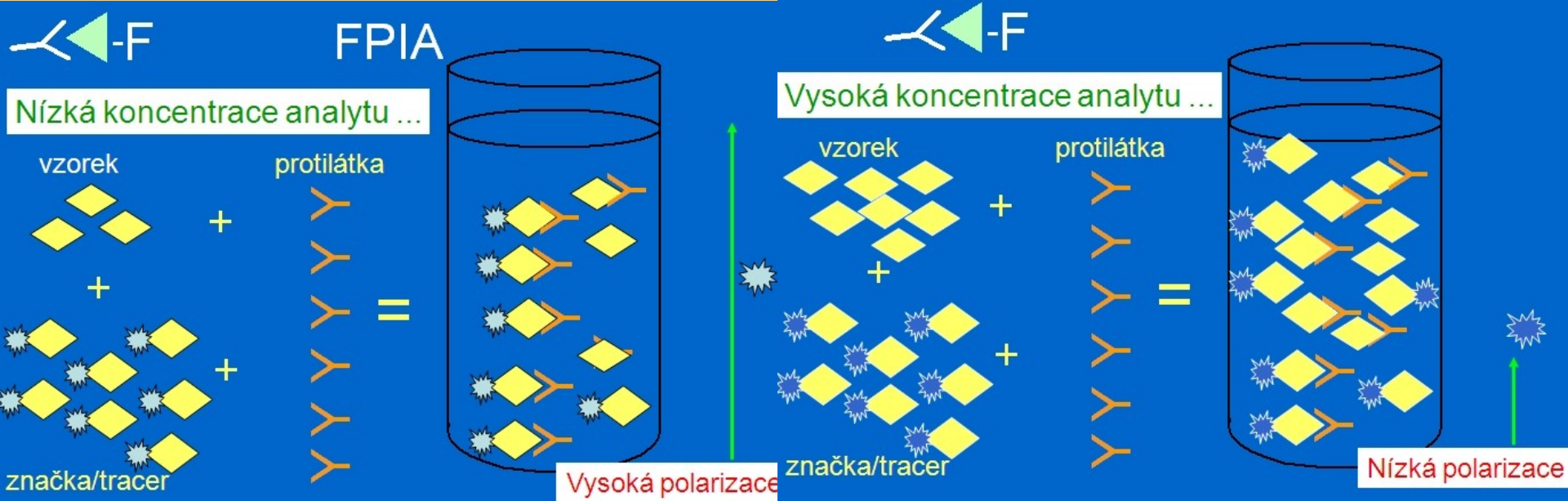
FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza; Fluorescence Polarization Immunoassay)

- Patří mezi homogenní kompetitivní imunoanalýzu
- **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**
- **Vhodná pro stanovení malých antigenů (např. léků)**

FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza; Fluorescence Polarization Immunoassay)

- **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 na značeném analytu do základní stavu se měří emise zeleného světla přes polarizační filtr - vzniká polarizační fluorescenční záření**
- **Hodnota polarizace emitované fluorescence je úměrná rychlosti rotace molekuly**
- **Měří se změna v polarizaci emitované fluorescence po vytvoření komplexu analyt-protilátka**
- **Intenzita polarizovaného světla je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu**

FPIA



Fluorescenční detekce

- Využívají ji také multiplexové metody popsané v kapitole flow cytometrie

Diagnostický přínos

- Příklad imunoanalytických metod založených na principu chemiluminiscence a fluorescence velmi různorodý
- Stanovení hormonů - např. při monitorování funkce štítné žlázy (hormony TSH, T4, T3)
- Stanovení tumorových markerů - při sledování vývoje, vlivu léčby a případné remise nádorového onemocnění (např. PSA)
- Stanovení kardiomarkerů (zejména troponinu T nebo I) k potvrzení infarktu myokardu a zjištění jeho rozsahu
- Stanovení hladiny léků - k ověření, že aplikovaná dávka je pro daného pacienta v terapeutickém rozmezí