

Imunochemie

Doc. MUDr. Petr Schneiderka, CSc.

**Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci
výuky preklinických a klinických předmětů na LF UP a
FZV UP v Olomouci**
Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/15.0313

Úvod do imunochemických metod

- Klasické imunologické metody, jako jsou imunoprecipitace, imunodifúze, imunoelektroforéza apod., se v klinických laboratořích využívají převážně pro kvalitativní nebo semikvantitativní účely.
- Jsou limitovány svou citlivostí a vzhledem k manuální náročnosti rozsah jejich nasazení v praxi postupně klesá.
- Imunochemické metody jsou také založeny na principu reakce antigenu s protilátkou a tvorby imunokomplexu.

Úvod do imunochemických metod

- U moderních kvantitativních imunochemických metod je na antigen nebo protilátku navázána určitá látka (značka, indikátor), což spolu s odpovídajícím způsobem detekce významně zvyšuje analytickou sensitivitu.
- Soupravy reagensií, stejně jako příslušné instrumentárium jsou komerčně běžně dostupné a provedení je dobře automatizovatelné.
- Imunochemické stanovení analytů o nízké koncentraci v biologickém materiálu, imunoanalýza (imunoesej), dnes patří k rutinním a široce používaným technikám laboratorní medicíny.

Principy imunoanalýzy

- Označení antigenu nebo protilátky vhodnou značkou za účelem zvýšení citlivosti reakce není nové. Již téměř před 100 lety se používalo navázání antigenu na erythrocyty v metodě známé jako inhibice hemaglutinace.
- V r. 1959 byla zveřejněna práce S. A. Bersona a R. S. Yalowové popisující radioimunoanalýzu, v níž jako značka byl použit radioizotop jódu.

Značení v imunoanalýze

- V průběhu dalších let se pro značení v imunoanalýze začaly využívat např.:
 - fluorescenční látky,
 - chemiluminiscenční látky,
 - cheláty lanthanidů,
 - komplexy těžkých kovů,
 - stabilní volné radikály,
 - feritin,
 - koenzymy a enzymy nebo jejich inhibitory.
- Přehled viz tab. 1.

Tabulka 1

Značka	Metoda	Detekce
Radionuklid	Radioimunoanalýza Radioimmunoassay – RIA Immunoradiometric Assay - IRMA	Měření radioaktivity
Enzym	Enzyimoimunoanalýza Enzyme Immunoassay - EIA	Spektrofotometrie barevného produktu
Fluorescenční látko	Fluoroimunoanalýza Fluorescence Immunoassay - FIA	Fluorimetrie
Luminiscenční látko	Luminoimunoanalýza Luminescence Immunoassay - LIA	Luminimetrie
Stabilní volné radikály	Technika volných radikálů Free Radical Assay Technique - FRAT	Elektronová spinová rezonance

(Upraveno podle V. Doležalové, 1995)

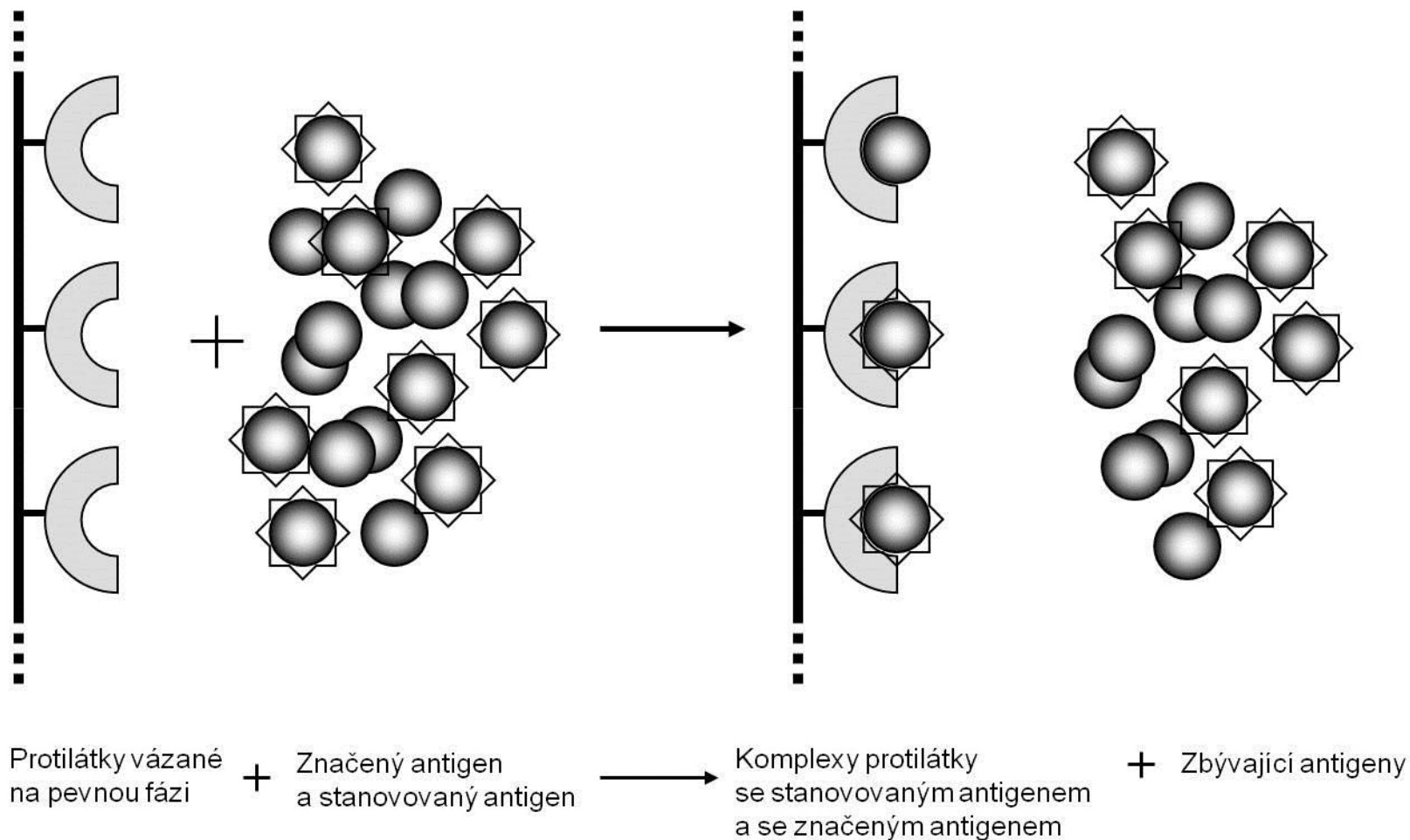
Rozdělení imunoanalytických metod

- Imunoanalytické metody lze v zásadě rozdělit na 2 typy: kompetitivní a nekompetitivní.
- Při **kompetitivní metodě se značeným antigenem** "soutěží" antigen séra, který chceme stanovovat, s tímto značeným antigenem o vazbu na omezené množství specifických protilátek, které jsou nejčastěji vázané na pevnou fázi,
 - např. na stěnu polystyrenových zkumavek nebo mikrotitračních destiček, na kuličky z plastické hmoty nebo ze skla, na různé mikročástice, na celulózu, polyakrylamid apod. (obr. 1).

Metoda kompetitivní se značeným antigenem

- Vznikají komplexy [antigen séra + vázaná protilátka] a [značený antigen + vázaná protilátka].
 - Promytím se zbavíme přebytku sérového i značeného antigenu a vhodnou detekční metodou měříme množství komplexu [značený antigen + vázaná protilátka] zbývajícího na pevné fázi.
- Čím více je stanovovaného antigenu ve vzorku, tím méně se vytvoří tohoto imunního komplexu.
 - Mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací antigenu ve vzorku je nepřímá závislost.

Obr. 1: Kompetitivní imunoanalýza se značeným antigenem



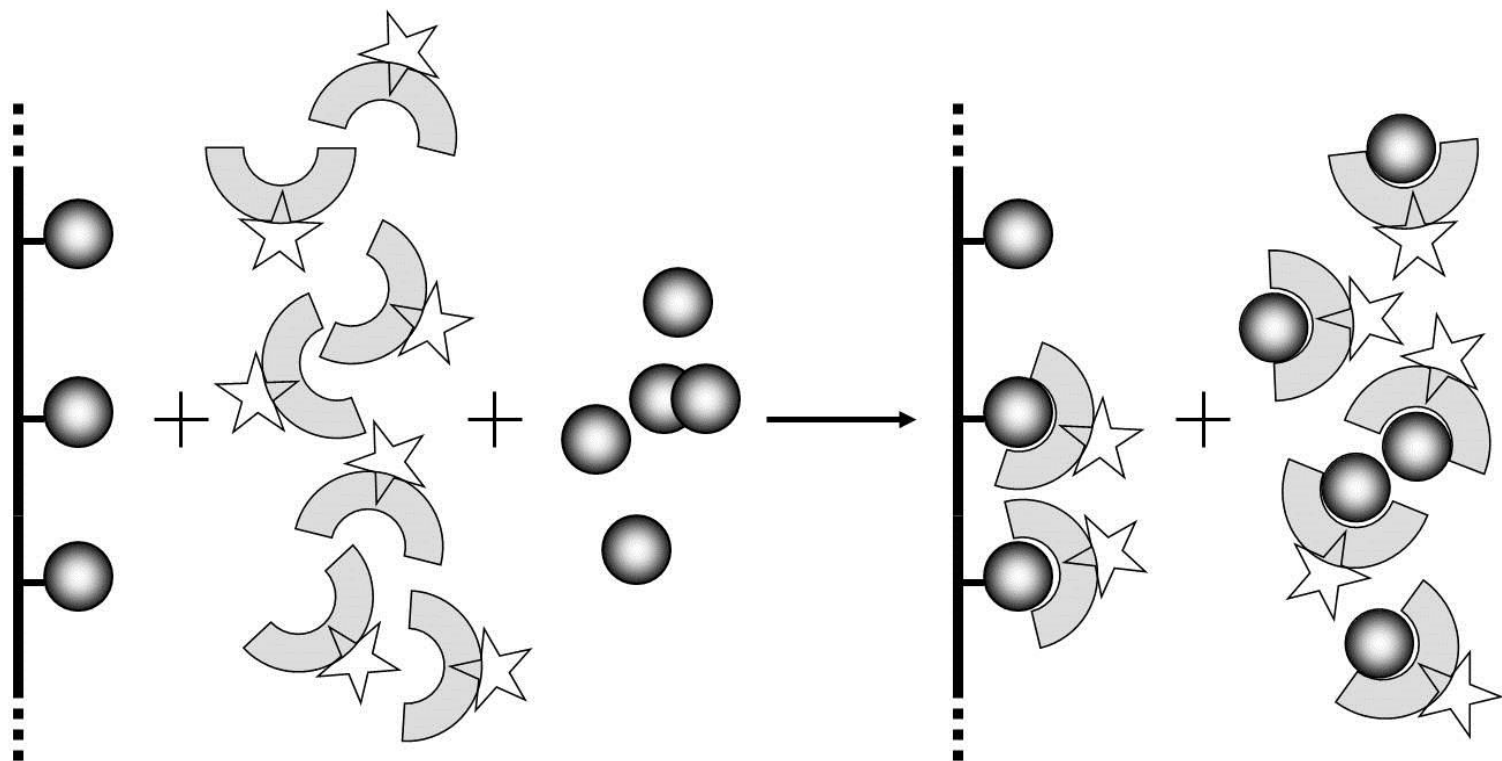
Metoda kompetitivní se značenou protilátkou

- Při **kompetitivní metodě se značenou protilátkou** je na pevnou fázi navázán stejný antigen, jako je ten, který stanovujeme (obr. 2).
- Do zkumavek nebo mikrotitračních destiček se přidává značená protilátka a vyšetřovaný vzorek obsahující stanovovaný antigen.
- Vznikají komplexy
[značená protilátka + vázaný antigen] a
[značená protilátka + stanovovaný antigen séra].

Metoda kompetitivní se značenou protilátkou

- Po vypláchnutí zůstane na pevné fázi pouze komplex [značená protilátka + vázaný antigen] a vhodnou metodou se měří jeho množství.
- Čím více je stanovovaného antigenu ve vzorku, tím méně se vytvoří tohoto imunního komplexu.
- Mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovovaného antigenu ve vzorku je nepřímá závislost.

Obr. 2: Kompetitivní imunoanalýza se značenou protilátkou



Antigen vázaný na pevnou fázi + Značená protilátka + Stanovovaný antigen ve vzorku $\longrightarrow$ Komplex protilátky a vázaného antigenu + Komplex protilátky a antigenu ze vzorku

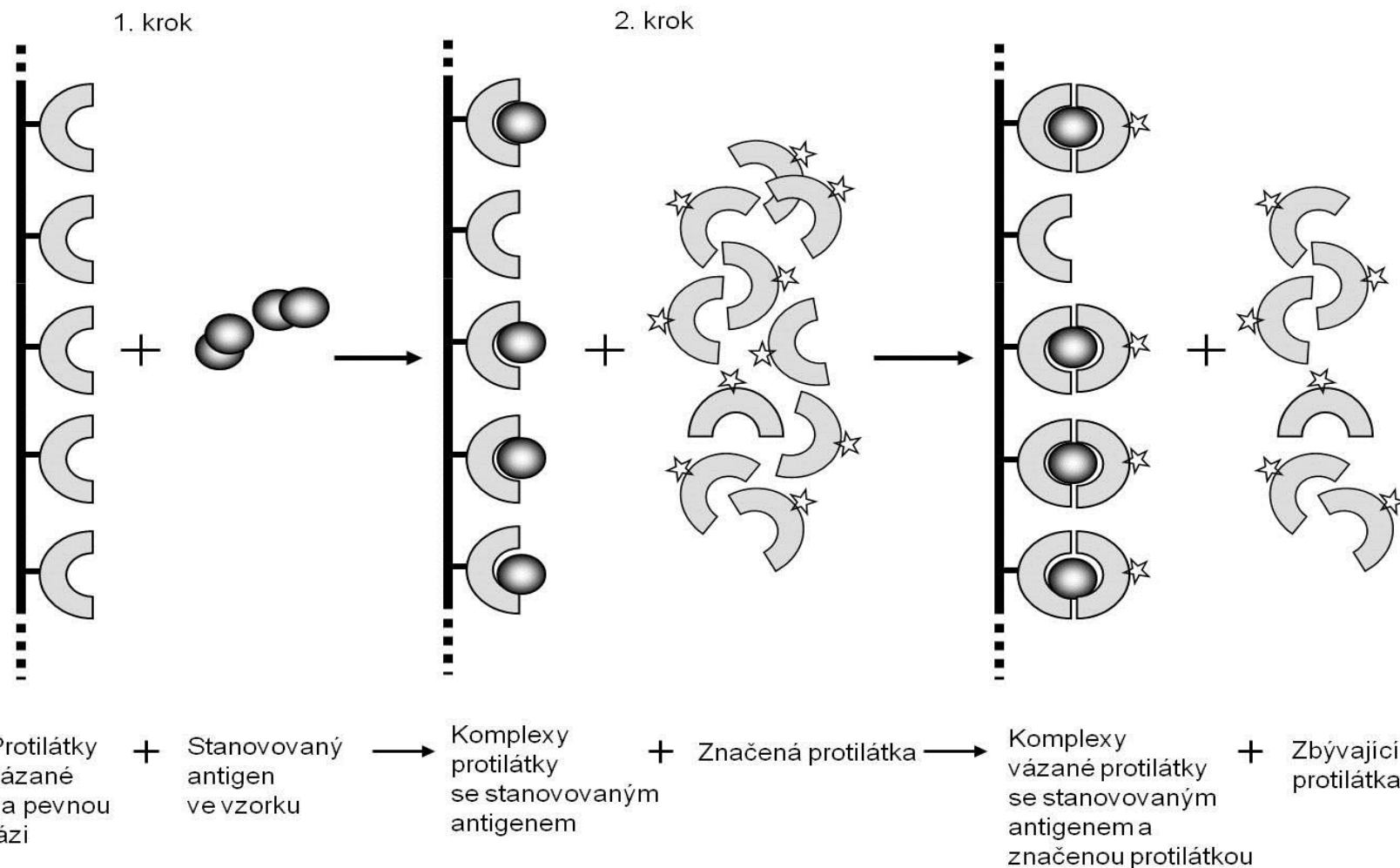
Metoda nekompetitivní se značenou protilátkou

- Nekompetitivní metody mohou pracovat se značenou protilátkou, se značeným antiimunoglobulinem nebo s dvojí protilátkou.
- U **nekompetitivní metody se značenou protilátkou** je na pevnou fázi navázána specifická protilátka proti stanovovanému antigenu (obr. 3).
- Přidáním vyšetřovaného vzorku s tímto antigenem vznikne primární komplex
[vázaná protilátka + stanovovaný antigen].

Metoda nekompetitivní se značenou protilátkou

- Po vypláchnutí zbytku vzorku se přidá nadbytek značené protilátky proti stejnému antigenu. Ta se naváže na stávající komplex, a tím vznikne větší sekundární komplex [vázaná protilátka + stanovovaný antigen + značená protilátka].
- Čím více je stanovovaného antigenu ve vzorku, tím více se vytvoří primárního i sekundárního imunního komplexu, který se měří.
- Mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovovaného antigenu ve vzorku je přímá závislost.

Obr. 3: Nekompetitivní imunoanalýza se značenou protilátkou



Nekompetitivní metody se značeným antiimunoglobulinem

- Tyto metody se používají ke stanovení protilátek v biologickém materiálu (obr. 4). Při této metodě je na pevnou fázi navázán antigen.
- Přidáním biologického materiálu se stanovovanou protilátkou vznikne primární komplex [vázaný antigen + stanovovaná protilátka].
- Po odstranění biologického materiálu se přidá značený antiimunoglobulin, a tím se vytvoří širší sekundární komplex [vázaný antigen + stanovovaná protilátka + značený antiimunoglobulin].

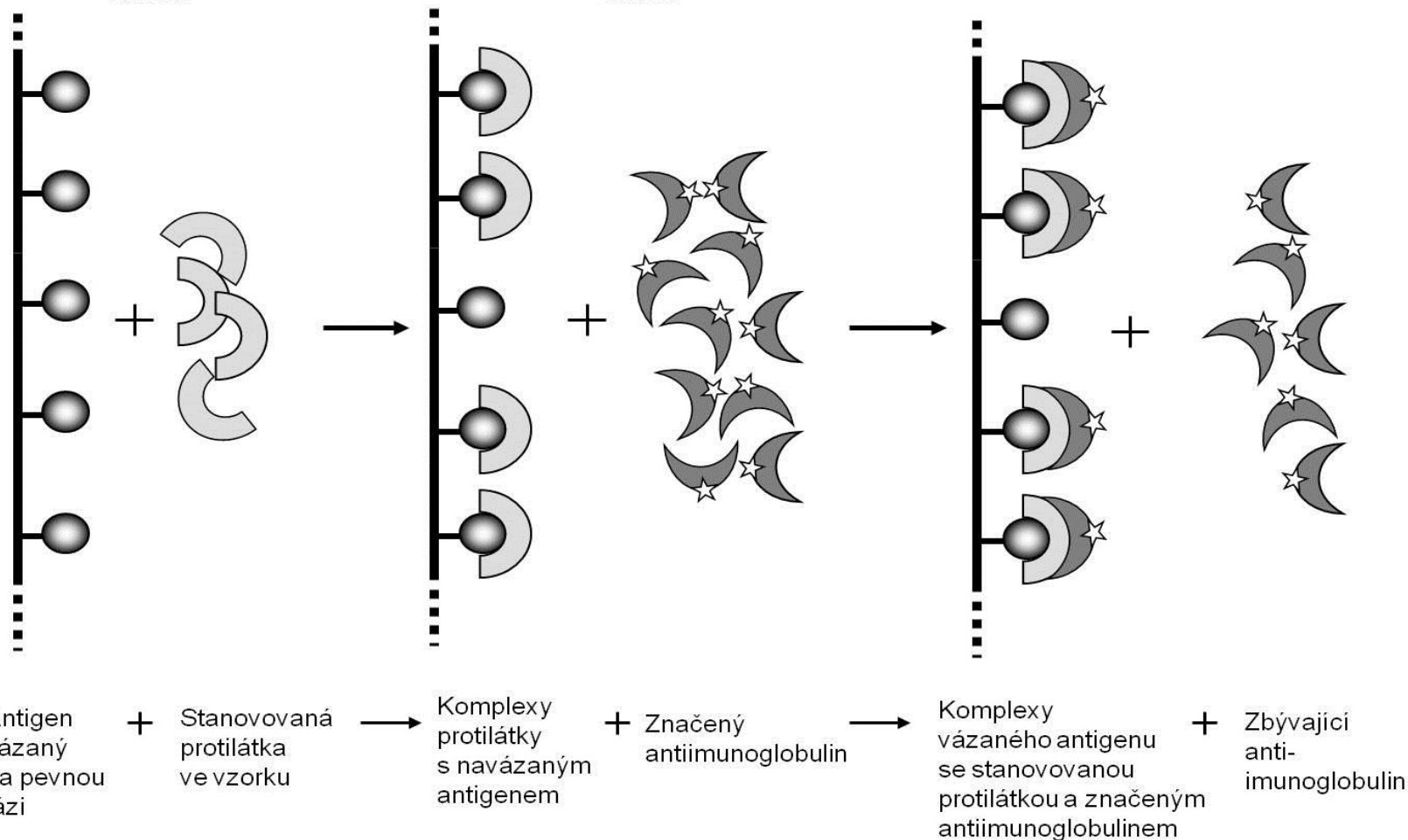
Nekompetitivní metody se značeným antiimunoglobulinem

- Čím více je stanovované protilátky ve vzorku, tím více se tvoří primárního i sekundárního imunního komplexu, který se měří.
- Mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovované protilátky ve vzorku je přímá závislost.

Obr. 4: Nekompetitivní imunoanalýza se značeným antiimunoglobulinem

1. krok

2. krok



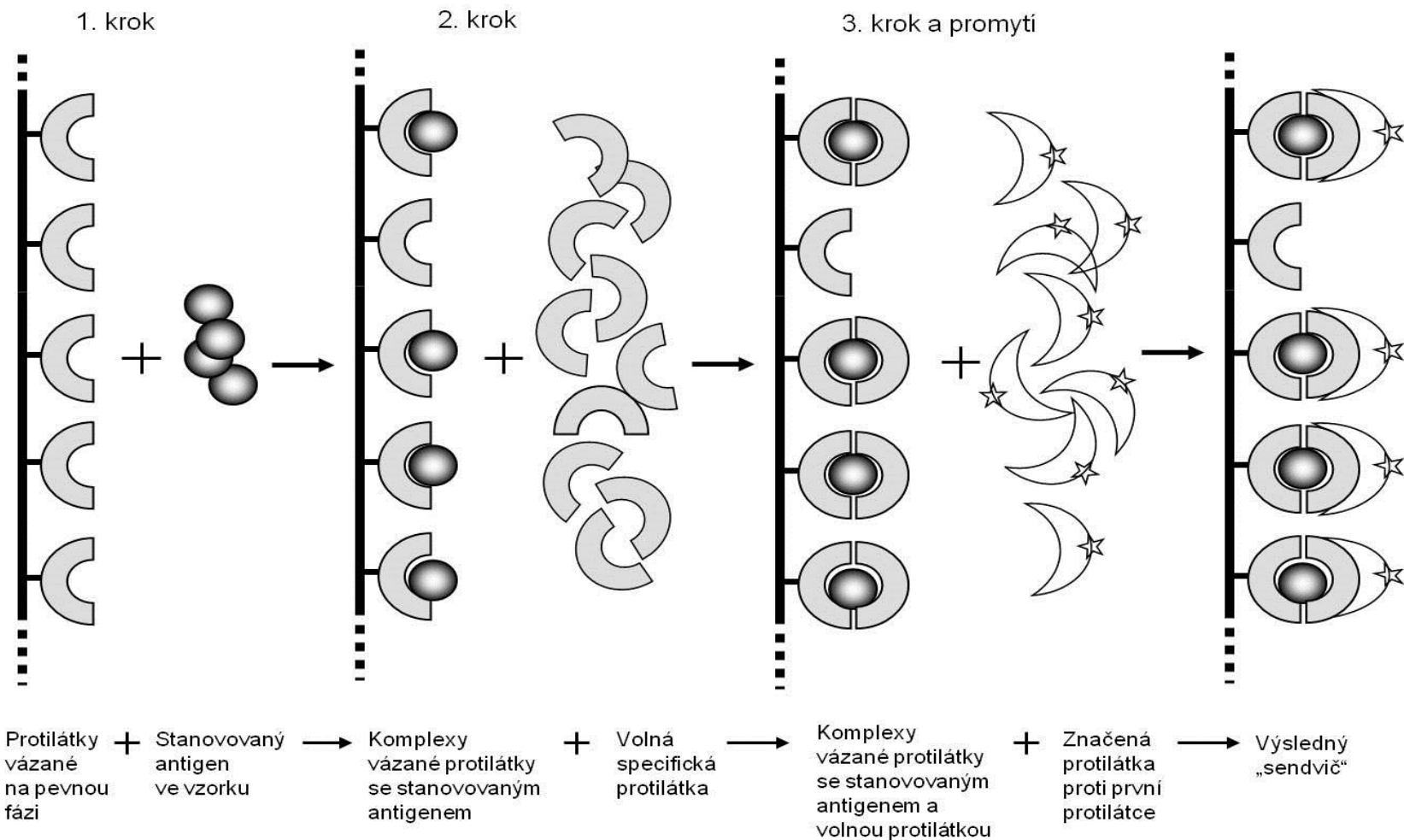
Nekompetitivní metoda s dvojí protilátkou

- Touto metodou se stanovují antigeny (obr. 5). Specifická protilátka proti stanovovanému antigenu je vázána na pevnou fázi.
- Spolu s antigenem ve vzorku biologického materiálu se vytvoří primární komplex [vázaná protilátka + stanovovaný antigen].
- Po promytí se přidá nadbytek stejné specifické první, "volné" protilátky proti stanovovanému antigenu, a tak vznikne sekundární komplex [vázaná protilátka + stanovovaný antigen + volná protilátka].

Nekompetitivní metoda s dvojí protilátkou

- Po dalším promytí se přidá nadbytek značené druhé protilátky proti první protilátce a vznikne tak komplex [vázaná protilátka + stanovovaný antigen + volná protilátka + značená druhá protilátka].
 - Čím více je stanovovaného antigenu ve vzorku, tím více se vytvoří primárního, sekundárního i terciárního imunního komplexu, který se nakonec měří.
- Mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovovaného antigenu ve vzorku je přímá závislost.
 - Pro vrstevnatost imunního komplexu byla tato metoda už zpočátku označována jako "**sendvičová**". Tento termín se však dnes často používá pro veškeré nekompetitivní metody.

Obr. 5: Nekompetitivní imunoanalýza s dvojí protilátkou



Homogenní a heterogenní způsoby provedení imunoanalýz

- Rozdíl mezi **homogenními** a **heterogenními** způsoby provedení imunoanalýz spočívá v nutnosti oddělit z reakční směsi antigen vázaný v imunním komplexu od antigenu volného (viz tab. 2).
- U homogenní imunoanalýzy, která je jedním z druhů saturační analýzy, toto oddělení není nutné.

Tabulka 2

Rozdělení imunoanalytických metod

Typ metody	Provedení	Příklady
Kompetitivní	Heterogenní	RIA, ELISA, FIA
	Homogenní	EMIT, LIA
Nekompetitivní	Heterogenní	EIA, IRMA, DELFIA
	Homogenní	PACIA

(Upraveno podle V. Doležalové, 1995)

Homogenní imunoanalýza

- Při homogenní imunoanalýze se ke vzorku obsahujícímu stanovovaný antigen přidá v mírném, ale konstantním přebytku specifická protilátka. Dojde ke kvantitativní vazbě s antigenem.
- Následuje přidání značeného antigenu, který se váže na zbývající protilátku. Jsou tedy současně přítomny komplexy [stanovovaný antigen + specifická protilátka] a [značený antigen + specifická protilátka].

Homogenní imunoanalýza

- Jestliže je jako značky použito enzymu v homogenní enzymové imunoanalýze (enzyme multiplied immunoassay technique, EMIT), potom se k měření může využít buď aktivace nebo inhibice enzymové aktivity vazbou značeného antigenu na specifickou protilátku.
- Homogenní enzymová imunoanalýza našla největší uplatnění při stanovování hladin léků pro účely monitorování léčby (therapeutic drug monitoring, TDM).

Tabulka 3.1

Nejčastěji používané názvy a zkratky imunoanalytických metod

Název	Zkratka
Chemiluminescence Immunoassay	CELIA, CLIA
Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay	DELFLIA
Enzyme Immunoassay	EIA
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
Enzyme Multiplied Immunosorbent Assay	EMIT
Fluorescence Energy Transfer Immunoassay	FETIA
Fluorescence Immunoassay	FIA
Fluorescence Polarisation Immunoassay	FPIA
Free Radical Assay Technique	FRAT
Immuno Fluorometric Assay	IFMA

Tabulka 3.2

Nejčastěji používané názvy a zkratky imunoanalytických metod

Název	Zkratka
Immuno Luminometric Assay	ILMA
Immuno Radiometric Assay	IRMA
Luminescence Immunoassay	LIA
Magnetic Antibody Immunoassay	MAIA
Microparticle Enzyme Immunoassay	MEIA
Particle-counting Immunoassay	PACIA
Radioimmunoassay	RIA
Solid Particle Immunoassay	SPIA
Time-resolved Fluoro Immunoassay	TRFIA
Time-resolved Immuno Fluorometric Assay	TRIFMA

Enzymová imunoanalýza

- Zakrátko po objevu radioimunoanalýzy vznikly první enzyimoimunoanalýzy
- Enzyme Immunoassay, (EIA) - zkratka se používá jak všeobecně pro veškeré enzyimoimunoanalýzy, tak speciálně pro nekompetitivní heterogenní enzyimoimunoanalýzy.
- Metody enzymové imunoanalýzy můžeme též dělit na kompetitivní a nekompetitivní a jejich provedení na homogenní a heterogenní.

Enzymová imunoanalýza

- Ke značení antigenu nebo protilátky se v této rozsáhlé skupině metod používá různých enzymů:
 - alkalické fosfatázy,
 - beta-galaktosidázy, glukózaoxidázy,
 - křenové peroxidázy,
 - glukóza-6-fosfát dehydrogenázy,
 - lysozymu, aj.
- Indikační a současně měřicí reakcí pro vznik imunokomplexu je potom nejčastěji barevná reakce příslušného enzymového produktu.

Homogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza

- **Homogenní kompetitivní** enzymová imunoanalýza je známa pod názvem Enzyme Multiplied Immunassay Technique, **EMIT**.
- Stanovovaný antigen ve vzorku soutěží o vazebná místa na protilátce s antigenem značeným enzymem.
- Při vzniku imunokomplexu je enzymová aktivita inhibována, takže měřítkem proběhlé imunoreakce je barevný produkt enzymové reakce zbývajícího nezreagovaného konjugátu [antigen + enzym].

Homogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza

- Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.
- EMIT se používá nejčastěji ke stanovení nízkomolekulárních antigenů (pod Mr 20 000) a haptenu, např. peptidových hormonů a léčiv. Jde o relativně jednoduchou a rychlou jednostupňovou metodu, která je vhodná k automatizaci.

Heterogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza

- **Heterogenní kompetitivní** enzymová imunoanalýza se označuje jako Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA.
- Od EMIT se liší tím, že se zde měří enzymová aktivita imunního komplexu a že je nutno před přidáním substrátu (nastartováním enzymové reakce) odstranit nezreagovaný značený antigen.
- Existuje řada modifikací této techniky.

Heterogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza

- U klasické kompetitivní ELISA se smíchají všechny reaktanty v tekutém stavu a vzniklé imunokomplexy se oddělují srážením a centrifugací, podobně jako u radioimunoanalytických metod.
- Imunokomplex enzymem značeného antigenu a protilátky se nechá reagovat s příslušným enzymovým substrátem a fotometricky se měří zbarvení produktu.
- Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

Heterogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza

- Při kompetitivní ELISA s pevnou fází je limitované množství protilátky navázáno na nějaký druh pevné fáze (polystyrenové kuličky, zkumavky, mikrotitrační destičky, apod.).
- Nezreagované reaktanty se odstraní promytím a v dalším kroku vázaný imunní komplex značený enzymem reaguje s příslušným substrátem za vzniku barevného produktu.
- ELISA se v praxi používá pro stanovení antigenů s vyšší M_r (nad 20 000) nebo pro stanovení protilátek.

Nekompetitivní enzymové imunoanalýzy

- **Nekompetitivní enzymové imunoanalýzy** lze rozdělit podobně jako bylo uvedeno výše při popisu všeobecného rozdělení nekompetitivních imunoanalýz, a to na:
 - stanovení antigenů pomocí značené protilátky,
 - stanovení protilátek pomocí značeného antigenu,
 - stanovení protilátek pomocí značeného antiimunoglobulinu, apod.
- Jde o "nesoutěživé" metody, které pracují s nadbytkem antigenu nebo protilátky a vzhledem k vrstevnatosti výsledného imunokomplexu se vesměs označují jako "sendvičové".



Videosekvence „Imunochemický analyzátor“



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Videosekvence „Imunochemický analyzátor“

- Příkladem imunochemického analyzátoru, na němž je možno automatizovaně provádět mnoho druhů imunoanalytických stanovení, je přístroj Architect i2000SR (Abbott Laboratories, USA).
 - Jedná se o plně automatizovaný systém, který pracuje systémem „random access“, tj. po vzorcích s možností vložení urgentních vzorků a analýzy provádí na principu chemiluminiscenční imunoanalýzy na mikročasticích (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay, CMIA).
- Zařízení se nejčastěji používá k sériovému stanovení hormonů, nádorových markerů, antigenů a protilátek u hepatitid, a některých dalších analytů v biologických materiálech.

Videosekvence „Imunochemický analyzátor“

- Analyzátor se skládá z části vzorkové včetně podavače, části procesní a části řídicí. Vzorková část se nachází na čelní horní straně přístroje.
- Vzorky v označených zkumavkách uložených do speciálních stojánků (zásobníků) se zasouvají do podávacích míst, odkud jsou přepraveny do prostoru pipetování.
- Procesní část je umístěna na „pultu“ přístroje. Po pravé straně je zásobník reakčních nádobek z plastické hmoty (kyvet), uprostřed je chlazený karusel na 25 sad činidel a karusel pro kyvety v nichž probíhá vlastní reakce a měření.

Videosekvence „Imunochemický analyzátor“

- Vlevo je vidět dávkovací jehla pro rutinní vzorky a vpravo jehla pro statimové vzorky. Na čelní straně dole jsou dvířka uzavírající prostor pro zásobní pufr a pro odpad.
- Řídicí část analyzátoru tvoří počítač s monitorem, klávesnicí, tiskárnou a čtečka čárového kódu.
- Funkce přístroje a základní kroky pracovního postupu jsou zde demonstrovány na příkladu kalibrace metody pro stanovení hormonu TSH, tj. thyreotropinu, thyreoideu stimulujícího hormonu hypofýzy.

Chemiluminiscenční imunoanalýza TSH na mikročasticích

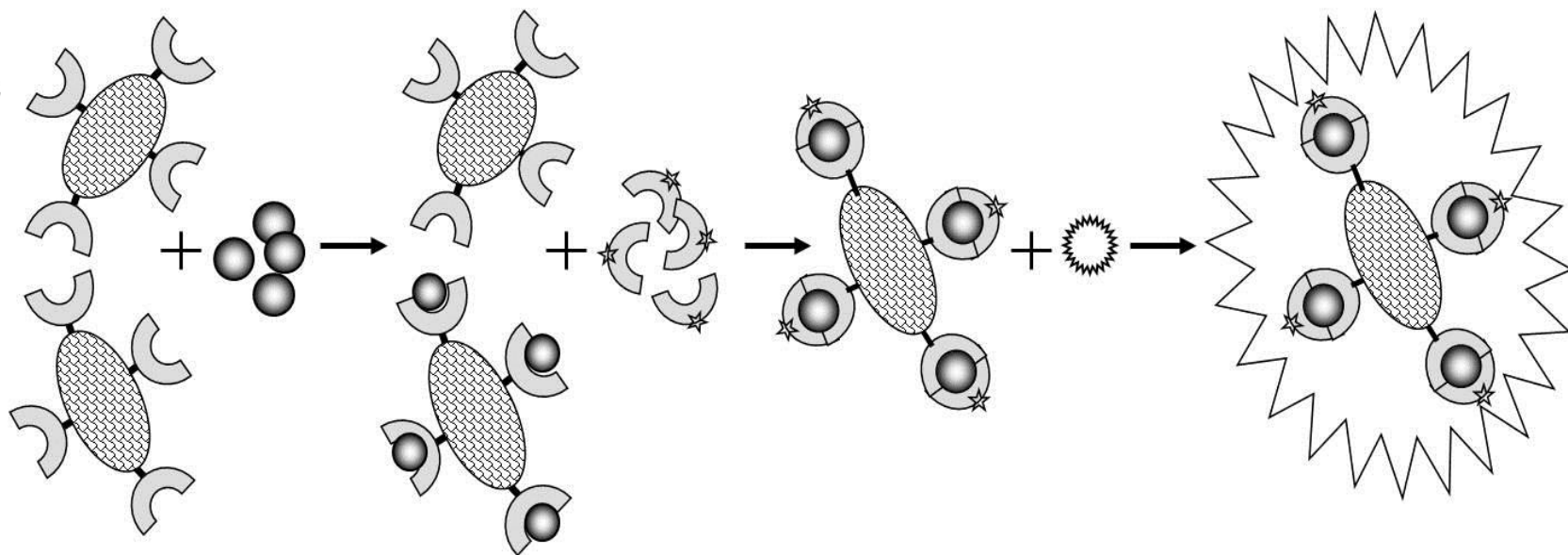
- Komerční soupravy činidel pro stanovení hormonu TSH obsahují:
 - paramagnetické mikročástice,
 - s navázanou 1. protilátkou proti TSH,
 - akridinový konjugát s 2. protilátkou,
 - tzv. Trigger (NaOH) a Pre-Trigger (H_2O_2) roztoky,
 - dva kalibrátory, tj. roztoky o známé koncentraci hormonu.
- Pracovní postup zahrnuje 3 kroky (obr. 6). Nejdříve se ke vzorkům pipetují paramagnetické částice s první protilátkou. Po určité době inkubace se v dalším kroku přidává konjugát s druhou protilátkou.

Obr. 6: Chemiluminiscenční imunoanalýza TSH na mikročasticích

1. krok

Promytí a 2. krok

3. krok



Protilátky vázané na paramagnetické mikročastice + Stanovovaný antigen = TSH ve vzorku → Komplexy vázané protilátky se stanovovaným antigenem TSH + Konjugát anti-TSH s akridinem → Komplexy vázané protilátky s TSH a značenou protilátkou + „Pre-Trigger“ a „Trigger“ → Chemiluminiscence

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Videosekvence „Imunochemický analyzátor“

- Po další inkubaci následuje promytí obsahu v magnetickém poli s cílem odstranit nezreagovaný kapalný podíl.
- V kyvetách zůstane komplex magnetických částic s první protilátkou, antigenem (TSH) a druhou protilátkou značenou akridiniumsulfátem (plus magnetické částice s protilátkou, ale bez anigenu).
- V posledním kroku se k imunokomplexu přidají roztoky NaOH a peroxidu vodíku. Jejich působením se oxidačně odštěpí N-methylakridon a komplex emituje viditelné záření, které se detekuje optickým systémem analyzátoru.

Chemiluminiscenční imunoanalýza TSH na mikročasticích

- Při kalibraci metody se místo vzorků pacientů zpracovávají kalibrátory. Výsledky je možno zobrazit na monitoru řídicího počítače nebo vytisknout.
- Výsledky analýz vzorků pacientů se po odsouhlasení předávají do laboratorního informačního systému (LIS) a stávají se součástí nálezu, který žadatel o vyšetření obdrží cestou nemocničního informačního systému (NIS).

Doporučená literatura

- Štern P. a kol.: Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Karolinum Praha, 2. vydání 2011.
- Schneiderka P. a kol.: Stanovení analytů v klinické biochemii, 1.část, Karolinum Praha 1999.
- Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Učební text IDVPZ Brno, 1995. ISBN 80-7013-198-5
- Sedlák J., Štolba P.: Enzymová imunoanalýza v klinické praxi. Novinky v medicíně 29. Avicenum Praha, 1983.
- Stárka L. a kol.: Aktuální endokrinologie. Maxdorf 1999.
- Kreze A. Jr., Vaňuga P., Pura M.: Prehľad testov v endokrinologii. Georg Žilina, 2005.