

P. Schneiderka, Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc

Imunoanalytické metody

Úvod

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. 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 reagensů, stejně jako příslušné instrumentarium jsou komerčně běžně dostupné a provedení je dobře automatizovatelné. Imunochemické stanovení analytů o nízké koncentraci v biologickém materiálu, imunoanalýza, proto dnes patří k rutinním a široce používaným technikám laboratorní medicíny.

Principy imunoanalýzy a základní informace

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 pionýrská práce S. A. Bersona a R. S. Yalowové popisující radioimunoanalýzu, v níž jako značka byl použit radioizotop jódu. V průběhu dalších let se pro značení v imunoanalýze začaly využívat např. fluorescenční a chemiluminiscenční látky, cheláty lanthanidů, komplexy těžkých kovů, stabilní volné radikály, feritin, koenzymy a enzymy nebo jejich inhibitory (tab. 1).

Tab. 1 Příklady imunoanalytických metod
(Upraveno podle V. Doležalové, 1995)

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

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

Při **kompetitivní metodě se značenou protilátkou** je na pevnou fázi navázán stejný antigen jako je ten, který stanovujeme (obr. 2). Do zkuševých 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]. 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 tedy opět nepřímá závislost.

Nekompetitivní metody mohou pracovat se značenou protilátkou, se značeným antiimunoglobulinem nebo s dvojitou 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]. 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.

Nekompetitivní metody se značeným antiimunoglobulinem 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]. 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.

Nekompetitivní metodou s dvojitou protilátkou 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]. 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.

Rozdíl mezi **homogenními** a **heterogenními** způsoby provedení imunoanalýz spočívá v nutnosti oddělit z reakční směsi antigen vázaný v imunním komplexu od antigenu volného (tab. 2).

Tab.2 Rozdělení imunoanalytických metod
(Upraveno podle V. Doležalové, 1995)

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

U homogenní imunoanalýzy, která je jedním z druhů saturační analýzy, toto oddělení není nutné. 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]. 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 (therapeutic drug monitoring, TDM).

Tab. 3 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
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	TRFLIA
Time-resolved Immuno Fluorometric Assay	TRIFMA

Enzymová imunoanalýza

Zkrátka po objevu radioimunoanalýzy vznikly první enzymoimunoanalýzy (Enzyme Immunoassay, EIA, zkratka se používá jak všeobecně pro veškeré enzymoimunoanalýzy, tak speciálně pro nekompetitivní heterogenní enzymoimunoanalýzy). Ke značení antigenu nebo protilátky se v této rozsáhlé skupině metod používá různých enzymů: alkalické fosfatázy, beta-galaktosidázy, glukózoaxidázy, křenové peroxidázy, glukóza-6-fosfát dehydrogenázy, lysozymu, aj. Indikační a současně měřicí reakcí pro vznik imunokomplexu je potom nejčastěji barevná reakce příslušného enzymového produktu.

Také metody enzymové imunoanalýzy můžeme dělit na kompetitivní a nekompetitivní a jejich provedení na homogenní a heterogenní.

Homogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza je známa pod názvem Enzyme Multiplied Immunoassay 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]. 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 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.

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.

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. Jeho absorbance je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

ELISA se v praxi používá pro stanovení antigenů s vyšší Mr (nad 20 000) nebo pro stanovení protilátek.

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“

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 způsobem „random access“, tj. po vzorcích s možností vložení urgentních vzorků. Analýzy provádí na principu chemiluminiscenční imunoanalýzy na mikročásticích (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.

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 stojánek (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. 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 stimujícího hormonu hypofýzy.

Komerční soupravy činidel pro stanovení tohoto hormonu obsahují paramagnetické mikročástice s navázanou 1. protilátkou proti TSH, akridinový konjugát s 2. protilátkou, tzv. Trigger (NaOH) a Pre-Trigger (H_2O_2) roztoky a 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.

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 antigenu).

V posledním kroku se k imunokomplexu přidávají roztoky NaOH a peroxidu vodíku. Jejich působením se oxidačně odštěpí N-methylakridon a komplex emituje viditelné záření, které se detekuje optickým systémem analyzátoru.

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, 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 endokrinológii. Georg Žilina, 2005.