

Automatické imunochemické analyzátory

- 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

Základní postup:

- 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)

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 značenky, separace a detekce

Advia Centaur (Siemens - Bayer)



- Pracuje s diagnostickými soupravami firmy BAYER Diagnostics
- 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

Advia Centaur (Siemens)

ADVIA Centaur je plně automatizovaný chemiluminiscenční analyzátor pro rutinní i statimová vyšetření.

Výkon: 240 stanovení za hodinu, první výsledek je po 15 minutách, dále každých 15 sekund

Princip měření: Systém měří kvantitativní množství světla emitovaného během chemiluminiscenční reakce, pevná fáze jsou paramagnetické částice (Fe_2O_3), magnetická separace, značkovací je AE (acridinium ester), což je chemiluminiscenční látka, která emituje světlo při oxidaci H_2O_2 v alkalickém prostředí. Reakce probíhá během jedné sekundy a je velice citlivá (10^{-15}).

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

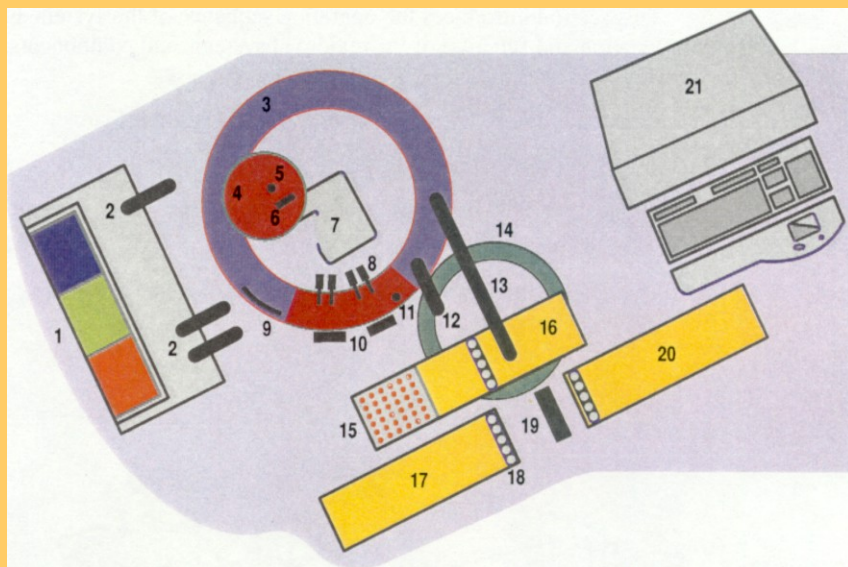
Advia Centaur (Siemens)

- **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.

Advia Centaur (Siemens)

- Optimální produktivita a výkonnost
- Doplnění reagensů, špiček, destilované vody, kyvet, vylítí odpadu, odstranění použitých špiček či kyvet za chodu
- Analyzátor je 24 hodin připraven k práci

Advia Centaur (Siemens)

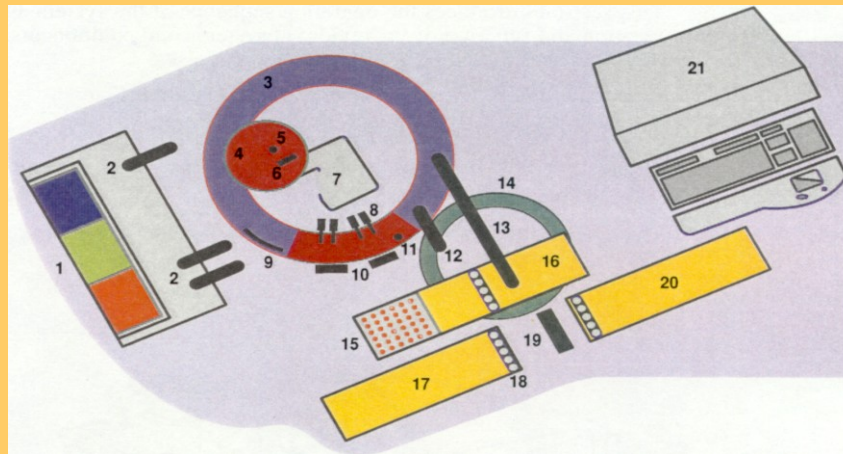


- 1 chlazený zásobník reagensí
- 2 3 reagenční jehly
- 3 inkubační kotouč s kvetami
- 4 luminometr
- 5 jehla pro dávkování NaOH
- 6 odsávací jehla pro odpad
- 7 dodávání kvet
- 8 promývací jehly
- 9 magnety
- 10 promývání
- 11 jehla pro dávkování H_2O_2
- 12 jehla pro dávkování pomocných roztoků
- 13 vzorková jehla
- 14 chlazený zásobník pomocných reagensí
- 15 zásobník špiček
- 16 prostor pro aktuálně dávkované vzorky
- 17 vstup pro vzorky
- 18 stojánek pro vzorky
- 19 vstup pro statim
- 20 výstup hotového vzorku
- 21 softwarové ovládání analyzátoru

Advia Centaur (Siemens)

Vzorek je vložen do stojánku a ten je dán do vstupu pro vzorky. Stisknutím tlačítka START je stojánek posunován v řadě a vsunut do dávkovacího prostoru. Vzorková jehla nabere ze zásobníku pro špičky jednu špičku, nabere vzorek ze zkumavky a nadávkuje jej do kyvety v inkubačním kruhu. Ten je vyhříván na 37°C a neustále se otáčí, čímž umožňuje takt zpracování 15 sekund. Kyveta se vzorkem se otočí k jehle, která event. dávkuje pomocný roztok dále ke 3 reagenčním jehlám, které nezávisle dávkuje primární reagenzie z primárních zásobníků. Kyveta se poté otočí k promývacím jehlám a promývací stanici. Magnetické částice jsou pomocí magnetů přichyceny na stěnu kyvety, promývací jehly odsají tekutinu z kyvety a magnetické částice jsou promyty destilovanou vodou, která je opět odsáta. Inkubační kruh posune kyvetu k jehle, která dávkuje peroxid vodíku a poté k výtahu, který dopraví kyvetu do luminometru. Ten má 3 části: fotonásobič, jehlu, která dávkuje NaOH a jehlu, která odsává vše do odpadu. Po přidání NaOH, proběhne chemiluminiscenční reakce.

Luminometr měří emitované světlo v relativních světelných kvantech a ta převádí na výsledky / koncentrace.



Elecsys (Roche) – nová verze Cobas e411



- Analyzátor ELECSYS 2010® je plně automatizovaný softwarově řízený systém
- Systém je založen na technologii Elektrochemiluminiscence (ECL), dosahující mimořádné citlivosti, širokého měřicího rozsahu a rychlosti stanovení
- Jedná se o benchtop analyzátor s kapacitou 86 testů za hodinu
- Operační systém je založen na vkládání dat prostřednictvím unikátního dvourozměrného čárového kódu

Elecsys (Roche)

- ELECSYS 2010® je uzavřený systém a používá výhradně systémové reagensie, kalibrátory a roztoky firmy Roche
- Elecsys 2010 se vyrábí ve dvou variantách-Disc a Rack
- Reagenční disk_obsahuje 18 pozic pro reagenční soupravy, předzpracující reagensie a diluenty - najednou může být založeno maximálně 15 různých metod v jednotlivých pozicích

Elescys (Roche)

Dávkování vzorků a reagensů

- přístroj je vybaven funkcí detekce hladiny, ale i detekce případné sraženiny či pěny
- promíchávání magnetických mikročástic zajišťuje přesnost a integritu dávkování vzorků a reagensů
- jednorázové špičky - minimalizují kontaminace
- 3 zásobníky špiček po 120 ks a 3 zásobníky cupů

Elescys (Roche)

Inkubační jednotka $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$

- Zde probíhá vlastní imunochemická reakce mezi vzorkem a reagensy
- Délka inkubace – 9 , 18 nebo 27 minut
- Po ukončení reakce je reagenční cup přemístěn na pozici pro dávkování reakční směsi do měřící cely.

Elecsys (Roche)

Měřicí jednotka

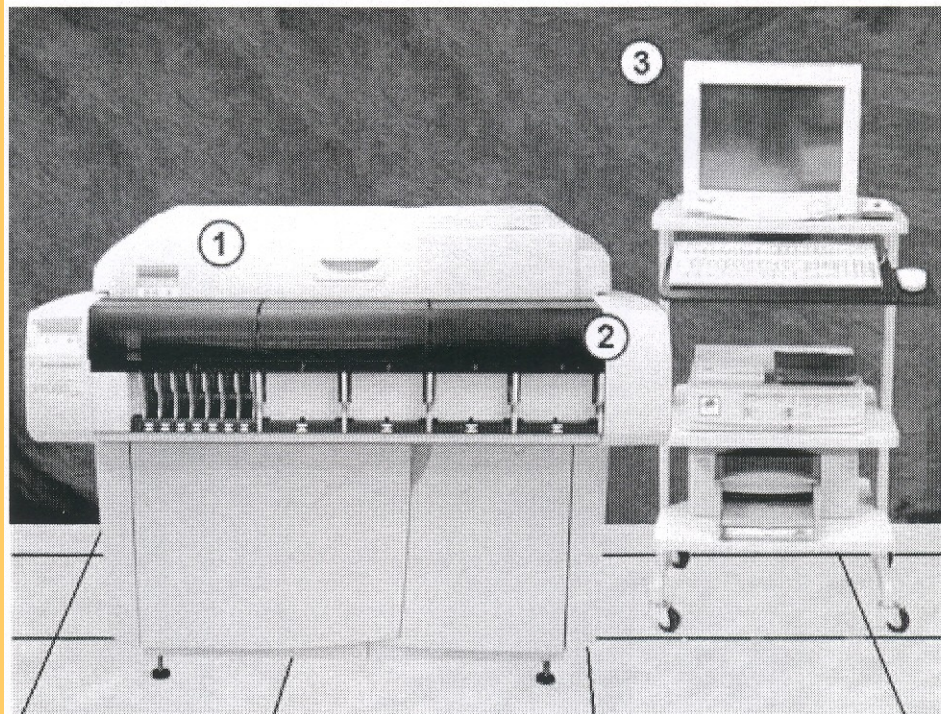
- Je klíčovou jednotkou analyzátoru Elecsys® 2010
- Obsahuje fotonásobič, průtokovou měřicí celu, magnetickou jednotku a zesilující obvod
- Teplota je udržována na hodnotě $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Electrochemiluminescence (Roche)

- Electrochemiluminescence - proces při kterém vysoce reaktivní látky reagují na povrchu elektrody a produkují světlo
- Protilátka (příp. antigen) je označena rutenium(II) tris-bipyridylovým komplexem
- K elektrochemiluminiscenci dochází po vložení napětí na elektrodu a reakci s tripropylaminem (TPA)

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 mikročásticích).

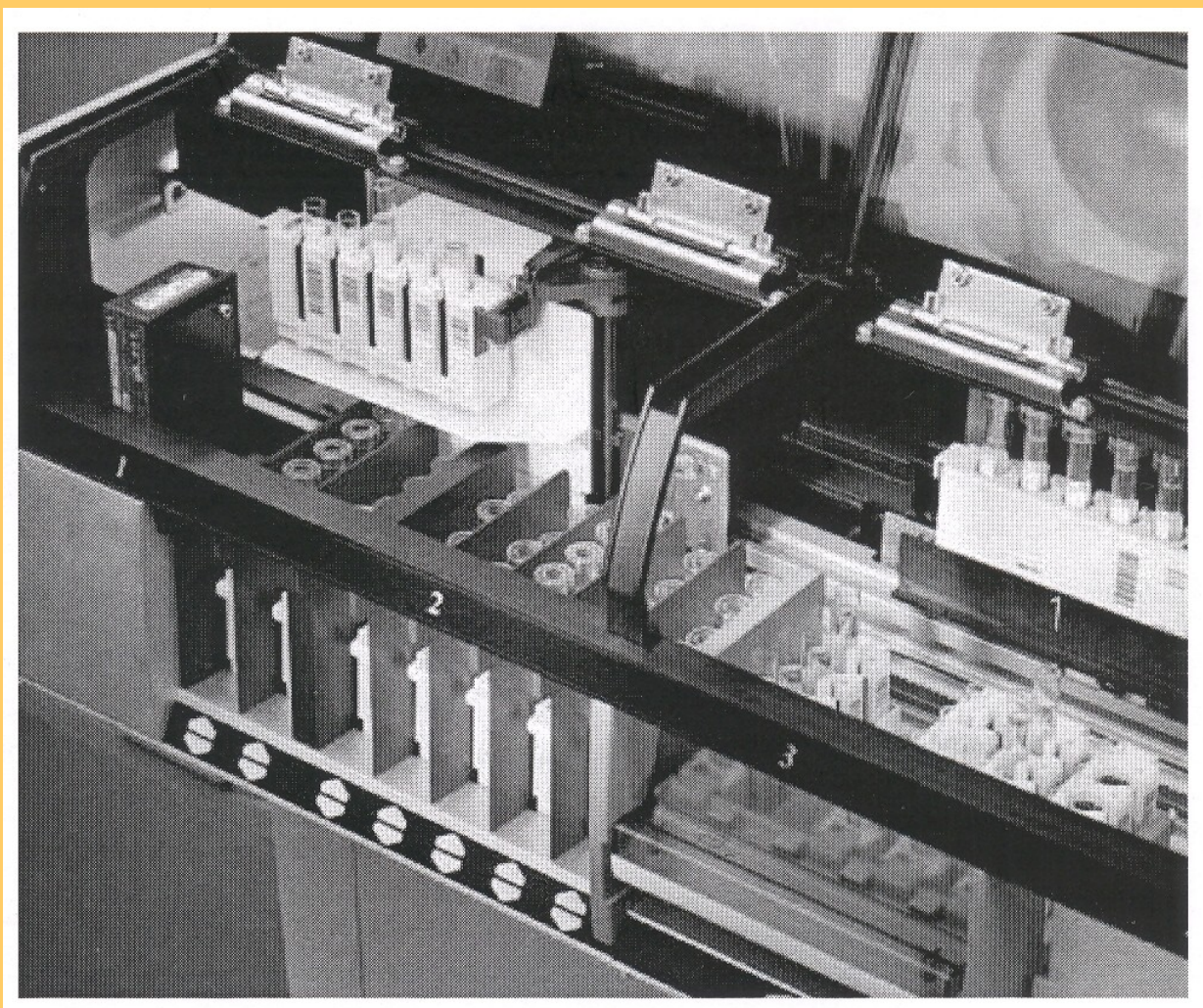
2. Podavač RSH (podavač vzorků pro opakované testování): Převážný modul, který přesunuje vzorky do modulu(-lů) k analýze a opakovanému testování.

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



Architekt i 2000 SR, Abbott - detekce

Technologie ChemiFlex CMIA

(chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích)

- měření vyzařovaných chemiluminiscenčních emisí v reakční nádobce

Stručný postup:

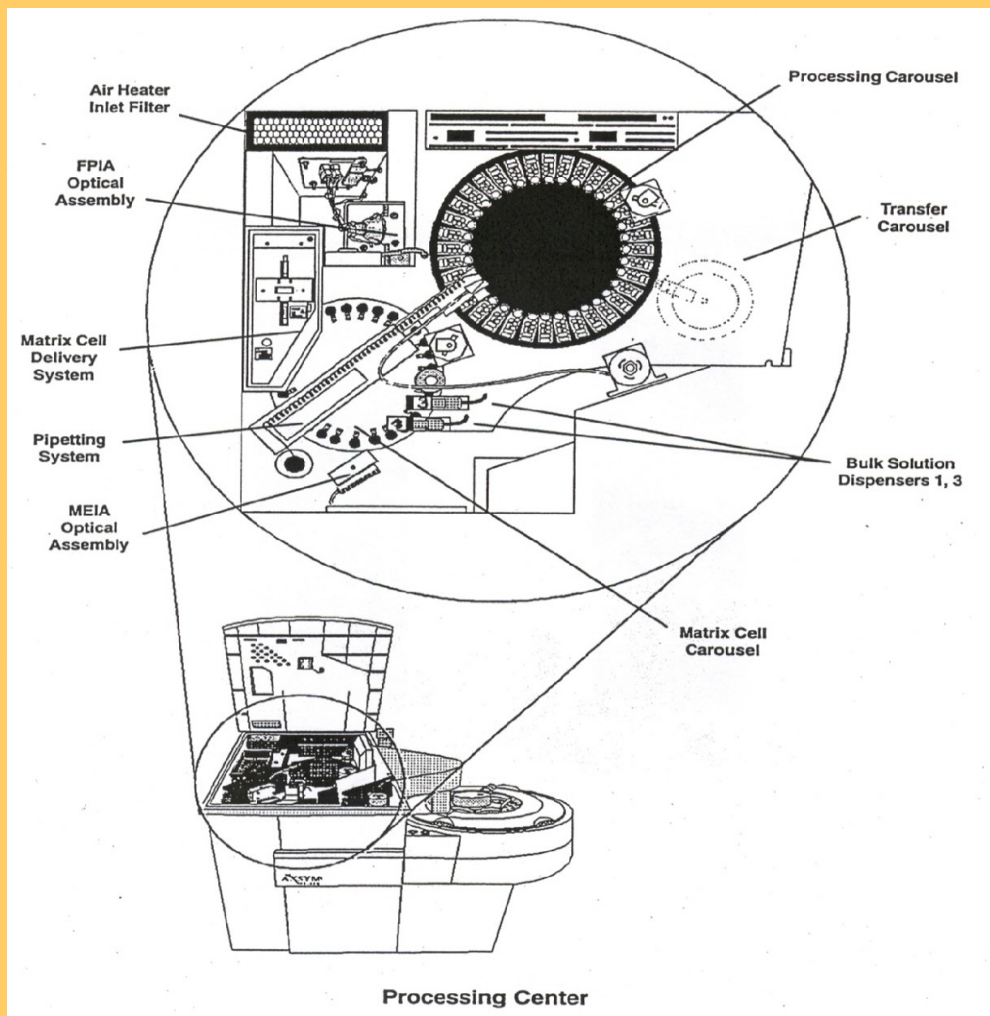
1. Změření pozadí po přidavku peroxidu vodíku
 2. Dávkování NaOH (Trigger) do reakční nádoby
 3. Zachycení emitovaného světla a jeho odvedení světlovodem do fotonásobiče (PMT)
- Značení patentovaným akridiniem

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



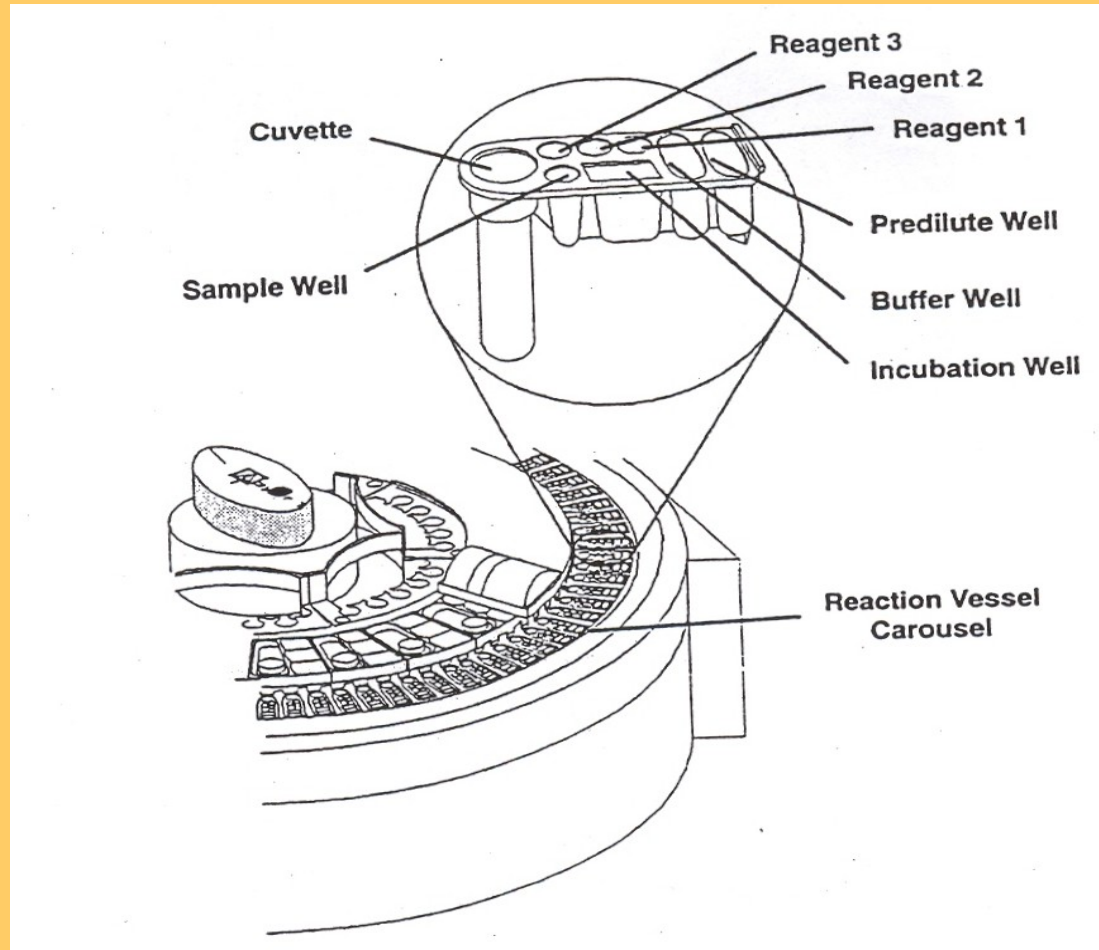
AxSYM (Abbott)

MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay)

- Enzymová analýza na mikročasticích

- Vzorek se smíchá s reagensy, pak se inkubuje
- Separace na skleněných vlákních matricích
- Přídavek konjugátu s alkalickou fosfatázou
- Přídavek substrátu – 4-methylumbelliferylfosfát (MUP)
- Hydrolýza MUP s ALP
- Fluorescence methylumbelliferonu

Axsym - reakční nádobka



Axsym (Abbott)

FPIA – Fluorizační polarizace

- Polarizační fluorescenční záření emitováno z indikátoru, kterým je značený analyt
- Hodnota polarizace emitované fluorescence je úměrná rychlosti rotace molekuly
- Rotace je úměrná velikosti molekuly – malé analyty rotují rychleji než komplexy
- Měří se změna v polarizaci emitované fluorescence po vytvoření komplexu analyt-protilátka

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.
- **Jednoduchá obsluha:**
Minimální „kontakt“ obsluhy s řídicím softwarem.
Doplňování reagensů a spotřebního materiálu prostým provedením úkonu.
- **Nepřetržitý provoz**
Doplňování reagensů a spotřebního materiálu za plného provozu (bez nutnosti pauzy).
Minimální údržba (5min.denně)

Unicel Dxl 800 (Beckman Coulter)

- Kontrola integrity vzorků – detekce sraženiny a bublin
- Kompatibilita s biochemickými analyzátory Synchron LX® 20, UniCel® DxC s automatizací – preanalycká linka, Power Processor®,
- Široká nabídka testů

Immolute 2000 (Siemens - DPC)

Účinnost:

- Výkon 200 testů
- Random Access
- 24 chlazených reagensů
- Automatické opakování "out of range" vzorků

Maximální integrace:

- Primární zkumavky
- LIS interface

Immulite 2000 (Siemens)

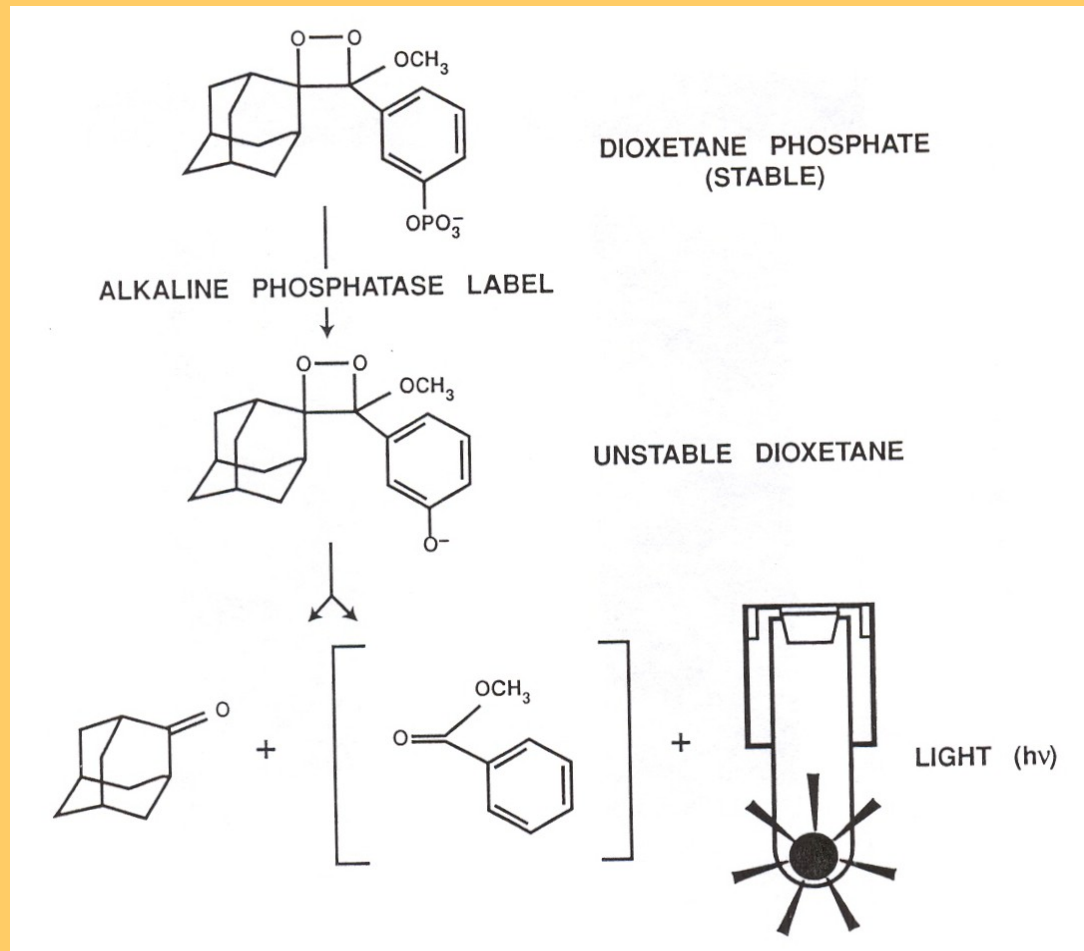
- Detekce sraženin
- Enzymově zesílená chemiluminiscence
- Stanovení 3. generace
- Dotyková obrazovka
- Dlouhá doba inkubace – 35 nebo 70 minut

Immulite 2000 (Siemens)

Princip měření:

- Ke konjugátu vázanému na reakční kuličce a značenému alkalickou fosfatázou je přidán luminogenní substrát (adamantyl dioxetan fosfát)
- Dojde k odštěpení fosfátu a ze substrátu vzniká nestabilní anion, při jehož rozkladu dojde k emisi fotonů (chemiluminiscenční reakce)

Immulite 2000 - Chemická reakce substrátu



AU3000i (DANAHER - Olympus)

- Firma Olympus přišla na trh s imunoanalyzátozem až v roce 2005
- Pevná fáze – magnetické mikročástice
- Detekce – chemiluminiscence prostřednictvím hydrolýzy AMPPD (derivát dioxetanu)
- Enzym – ALP
- 240 testů/ hod
- Detekce sraženiny

RAD 120, Radim



RAD 120, Radim

- Patentovaná technologie nazvaná “**Pegasus**”
- Pevná fáze - železitan potažený zirkoniem
- Částice se silnou vazebnou kapacitou k biologicky aktivním molekulám
- Rychlá a efektivní separace
- Fluorescenční detekce při 450 nm

RAD 120, Radim - charakteristika

- **Kontinuální přidávání reagensů a vzorků za chodu**
- **Primární, sekundární vzorky, pediatrické kyvety**
- **Produktivita: až 120 testů/hod**
- **Reflex test**
- **Kalibrace – stabilní až 4 týdny**
- **Archív pacientů**
- **Operační systém - Windows Xp**
- **Dotyková obrazovka**

Ukázka obrazovky se statusem inkubátoru, předřed'ovacího stojanu a stojanů s kyvetami

CUVETTES

Legend:

- Empty
- In use
- Available
- Used
- Moving

Predilutions

In use	0
Available	82
Empty	40
Used	0

Incubator

In use	0
Available	7
Empty	125
Used	24

Store

Available	49	Available	0	Available	56	Available	0
Empty	7	Empty	56	Empty	0	Empty	56

Rack 1: Unload
Rack 2: Load
Rack 3: Unload
Rack 4: Load

Cuvette available: 112

Remove Cuvettes, Grabber Reset, Ok

Speciální možnost stanovení – autoimunitní markery

A U T O I M M U N I T Y				
ANALYTE	No. of test	Sample Volume (μl)	Incubation (minutes)	Curve Range
ANA	100	25	26	0-332 IU/ml
ENA-6	100	15	26	0-100 IU/ml
RF	100	15	26	0-485 IU/ml
Ds-DNA	100	25	28	0-555 IU/ml

Kryptor (Brahms)

- Využívá pouze homogenní imunoanalýzu
- Odpadají promývací a separační kroky

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

Dimension Vista 1500 Intelligent Lab System - Siemens

- Integrovaný systém - (klin. chem., ISE, imuno)
- Technologie LOCI - založena na přenosu kyslíku
- První **homogenní** imunoanalýza **s chemiluminiscenční detekcí** – novinka
- **Vysoká citlivost**



VIVA-E (Siemens) systém na testování drog



VIVA – E (Siemens)

Princip:

- Technika Emit® II - **homogenní enzymatická imunoanalytická technika - 10 min. test, 65 testů/hod**
- Slouží k analýze v moči a séru
- Test založen na kompetici mezi látkou ve vzorku a látkou **značenou enzymem glukoso-6-fosfát dehydrogenázou (G6PDH)** o vazebná místa na protilátce
- Aktivita enzymu klesá při vazbě na protilátku, proto lze koncentraci látky ve vzorku měřit podle změny aktivity enzymu
- Aktivní enzym mění nikotinamidadeninukleotid (NAD) na NADH --> změna absorbance (spektrofotometricky)
- Endogenní sérová G6PDH neinterferuje, koenzym NAD působí pouze s bakteriálním enzymem (*Leuconostoc mesenteroides*) použitým v testu
- **Metoda je semikvantitativní – skupinový test**

Nabídka drog prováděných na přístroji VIVA-E

Syva® Emit® DAT Assays

Amphetamines
6 Acetyl Morphine*
Barbiturate
Benzodiazepine
Cocaine Metabolite
Cannabinoid
Ecstasy
Ethyl Alcohol
LSD
Methadone
Methaqualone
Opiate
Phencyclidine
Propoxyphene

Elisys Quattro - HUMAN

Plně automatický ELISA analyzátor středního výkonu



Více než 40 ELISA testů

Až 7 desek naráz

4 nezávislé inkubátory

Čtečka čárového kódu zkumavek

Automatická kontrola množství

reagencií

Analyzátory na multianalýzu

Luminex 100 IS, Luminex Corp.

- princip flow cytometrie
- možnost simultanního měření až 100 analytů
- měření v jamce mikrotitrační destičky nebo po přepipetování ve zkumavce (panely – př. cytokiny)
- potřeba velmi malého objemu
- cenově výhodné
- možnost měřit imunochemické metody, nukleové kyseliny, enzymy



Luminex 100 IS, Luminex Corp.

Princip xMAP technologie

- 100 druhů mikrokuliček (magnetické) rozlišených kombinací dvou fluorescenčních barev
- Na každém druhu je navázána molekula vazající specificky jeden analyt
- Na kuličku se naváže analyt a druhá protilátka
- Kuličky protékají přístrojem
- Měří se fluorescence vzniklá po excitaci dvěma lasery – jeden určuje barvu – druh analytu (kvalita)
druhý - množství analytu (kvantita)

Evidence, Randox

- Biočipová array technologie
- Imunoanalýza založena na simultánní multianalýze
- Na biočipu panel příbuzných testů
- Princip ELISA



Chemická analýza moče

- automatizace od 80. let minulého století
- přístroje využívají stanovení parametrů pomocí diagnostických proužků (suchá chemie)
- semikvantitativní stanovení bilirubinu, urobilinogenu, bílkoviny, ketonů, hemoglobinu, leukocytů, dusitanů, pH, glukosy a specifické hmotnosti
- standardizace měřící procedury
- namáčení proužků x pipetování na jednotlivé reakční zóny
- analýza na principu reflexní fotometrie

Chemická analýza moče

Reflexní fotometrie:

- zdroj světla - světlo emitující diody
- emitují světlo o různých přesně definovaných vlnových délkách – světlo pak dopadá v různých úhlech na reagenční zóny diagnostického proužku
- světlo je odraženo na fotodiodu , která slouží jako detektor
- intenzita odraženého světla závisí na vybarvení reakční zóny (od bílé zóny se odráží prakticky 100%, čím tmavší zóna, tím víc světla je absorbováno)

Chemická analýza moče

Příklady analyzátorů:

- pro malé laboratoře -
Meditron Junior, Urisys 1800 (Roche Diagnostic)
Aution Mini (Arkray)
- vysokokapacitní –
Urisys 2400 (Roche Diagnostic)
Aution Max (Arkray)

Urisys 2400 (Roche Diagnostic)



- plně automatický močový analyzátor pro střední a velké laboratoře
- kazety s 400 vyšetřovacími proužky
- snadné vkládání vzorků ve stojanech, posuv po pásovém dopravníku
- identifikace vzorků integrovanou čtečkou čárového kódu
- pozice pro statimové vzorky
- minimální objem vzorku 1.5ml

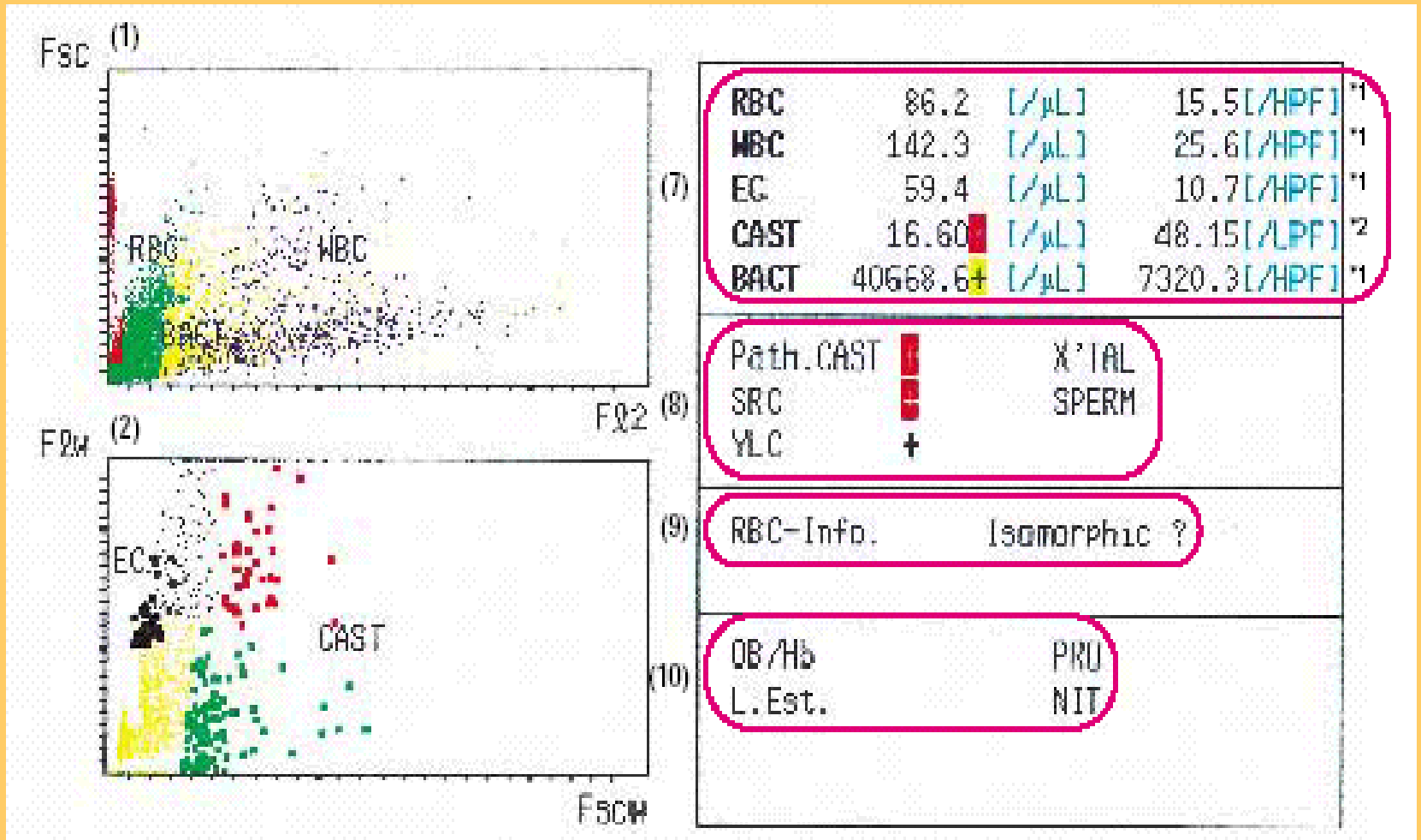
Průtoková cytometrie



UF 100 (Sysmex)

- vzorek moče je automaticky naředěn a obarven a obklopen kapalinou neobsahující žádné buňky
- prochází měřicí celou, kde je ozářen argonovým laserem
- fluorescence a rozptyl světla vznikající po ozáření se detekuje a je specifická pro jednotlivé buňky
- výsledky jsou vydány jako počet buněk /ul (erythrocyty, leukocyty atd.)
- nevýhoda - jednotlivé částice nemůže obsluha prohlížet

Grafický výstup z přístroje UF 100 (Sysmex)



IQ 200 (IRIS) – mikroskopická analýza



- plně automatizovaná mikroskopická analýza
- 60 vzorků/hod
- možnost prohlížení částic na obrazovce
- možnost přeřazení do jiné kategorie
- přístroj rozlišuje 12 základních kategorií (např. erytrocyty, leukocyty, epiteliie, válce) a umožňuje tvorbu podkategorií
- archivace zobrazení

IQ 200 (IRIS)

Princip přístroje:

- tenká vrstvička vzorku sendvičovitě uzavřená mezi vrstvy suspendované tekutiny se dostává do mikroskopu, který je spojen s digitální kamerou.
- kamera s využitím stroboskopu zachytí 500 obrázků z jednoho vzorku - výsledný obraz je digitalizován
- jednotlivé obrazy částic jsou izolovány do rámečků – každá částice zvlášť

Erythrocyty – zobrazení z IQ 200

The screenshot displays a medical device interface for hematology analysis. At the top, there is a status bar with 'OFF' on the left and three buttons: 'Specimens', 'Found List (1)', and 'Instrument'. Below this is a large grid of 10x10 microscopic images of erythrocytes. The top-left corner of the grid shows 'RBC' and '11064 /uL'. To the right of the grid is a control panel with a left and right arrow, and several buttons: 'WBC', 'BACT', 'RBC' (highlighted), 'Crystals...', 'SQEP', 'Casts...', 'WBCC', 'Others...', 'NSE', and 'ART'. Below the control panel is a text area containing the following information:

<<Released>>
IRIS32157
2003-03-25 15:53:36
0/1(10414)
H BLD: +3
BIL: -
URO: Normal
KET: -
GLU: Normal
PRO: +1
NIT: -
H LEU: 25 Leu/ul
PH: 6.0
SG: 1.015
COL: Yellow
CLA: Clear
Small particle/bacteria: 0/uL

At the bottom center of the interface is a 'SuperScan' button.

Kompletní systém močové analýzy

IQ 200 (Iris) v kombinaci s Aution Max AX-4280 (Arkray)

- zjednodušení provozu
- vložíme vzorek a získáme kompletní výsledek



LabUMat and UriSed – dodává DOT diagnostic



UriSed

- **Hlavní výhody přístroje:**
- není potřeba žádných drahých reagentů, pro provoz stačí pouze destilovaná voda k promývání pipety
- každý vzorek je prohlížen v jednorázové kyvetě
- pokud analýza proběhne standardní cestou, výsledky mohou být jednoduše porovnány
- výsledkem jsou jasné, ostré obrázky jednotlivých částic močového sedimentu. Obsluha si může prohlédnout obrázky libovolného vzorku pro kontrolu.
- lze si prohlížet obrázek jednotlivé částice nebo celého zorného pole. Mohou být prohlédnuty všechny částice, nejen ty, které přístroj rozpoznal.
- všechny obrázky jsou pak uloženy v databázi, odtud mohou být kdykoli vyvolány