

Stanovení hormonů

Hormony

- Látky specificky reagující na metabol. děje v organismu
- Většinou tvořeny v endokrinních žlázách
- Krví přenášejí informace do buněk cílových orgánů po vazbě na specifické receptory (nebo bez spec. receptorů)
- V krvi hormony často vázány na specifické transportní bílkoviny
- Biologicky účinné jen formy volné

Podle chemického složení rozlišujeme hormony

- **bílkovinné a peptidové** (*hormony pankreatu, hypotalamu, hypofýzy, příštítné žlázy*)
- **steroidní** (*hormony pohlavních žláz a kůry nadledvin*)
- **odvozené od aminokyseliny tyrosinu** (*hormony štítné žlázy a dřeně nadledvin*)
- **odvozené od mastných kyselin** (*prostaglandiny*)

METODY STANOVENÍ

- **Chromatografické metody** (HPLC, GC, LC/MS/MS, ID-GC/MS, ID-LC/MS/MS, ID-HPLC/MS) – i metody referenční
Často nutná úprava vzorku (derivatizace, extrakce)
- **Imunoanalytické metody**
s luminometrickou detekcí (LIA, ILMA, CMIA, ECLIA)
s fluorometrickou detekcí (MEIA, FPIA)
s fotometrickou detekcí (ELISA, EMIT)
s detekcí radioaktivity (RIA, IRMA)
- Multiplexové metody

HORMONY ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

TYROXIN (CELKOVÝ A VOLNÝ, T4 A FT4)

- ***Speciální preanalytické požadavky:*** separaci séra nebo plazmy provést do 6h po odběru
- ***Referenční hodnoty:*** 60-150 nmol/l (T4) a 9,1-23,8 pmol/l (FT4)

TRIJODTYRONIN (CELKOVÝ A VOLNÝ, T3 A FT3)

- ***Speciální preanalytické požadavky:*** separaci séra nebo plazmy provést do 6h po odběru
- ***Referenční hodnoty:*** 1,21-2,29 nmol/l (T3) a 2,2-5,3 pmol/l (FT3)

Další látky, které nejsou hormony, ale týkají se metabolismu štítné žlázy

TYREOGLOBULIN (THYROGLOBULIN, THG)

- **Referenční hodnoty:** do 55 ug/l
- glykoprotein obsahující jod, prekursor tyroxinu a trijodtyroninu, tvořený dvěma podjednotkami

PROTILÁTKY PROTI TYREOIDÁLNÍ PEROXIDÁZE (ANTI-TPO, TPOAB)

- **Referenční hodnoty:** do 50 kU/l (U/ml)
- mohou se zúčastnit na poškození tyreocytů

PROTILÁTKY PROTI TYREOGLOBULINU (ANTI-TG, TGAB)

- **Referenční hodnoty:** do 150 kU/l (U/ml)

PROTILÁTKY PROTI RECEPTORŮM TSH (TRAK)

- **Referenční hodnoty:** negativní <1,0 U/l (Brahms)<1,5 U/l (Roche)
„šedá zóna“ 1,0-1,5 U/l 1,5-1,75 U/l
pozitivní >1,5 U/l >1,75 U/l

POHLAVNÍ HORMONY

- Androgeny (*testosteron*)
- Estrogeny (*estradiol, estron, estriol*)
- Gestageny (*progesteron*)

Sekrece pohlavních hormonů řízena hypofyzárními gonadotropiny; luteinisačním hormonem (LH) a hormonem stimulujícím folikuly (FSH)

Hlavním transportním proteinem pohlavních hormonů je *sexuální hormonů vazající globulin (SHBG)*

POHLAVNÍ HORMONY

TESTOSTERON

- **Referenční hodnoty:** ženy 0,2-2,9 nmol/l,
muži 9,9-27,8 nmol/l
- v krvi vázaný na bílkoviny, část je volná
- změny koncentrace vazebných bílkovin mohou ovlivnit koncentraci, v praxi se používá *index volných androgenů (FAI)*, vypočítaný jako poměr testosteronu celkového a SHBG

ESTRADIOL (17-B-ESTRADIOL)

- **Referenční hodnoty:** ženy: folikulární fáze 40-606 pmol/l,
ovulační fáze 536-1930 pmol/l, luteální fáze 121-718 pmol/l,
posmenopauza <136 pmol/l,
muži: <121 pmol/l
- hlavní ženský steroidní pohlavní hormon
- sledování indukce ovulace a ovariální hyperstimulace, anomálií menstruačního cyklu

POHLAVNÍ HORMONY

PROGESTERON (PRG)

- **Referenční hodnoty:** ženy: folikulární fáze 0,5-4,4 nmol/l, ovulační fáze 14,1-89,1 nmol/l, luteální fáze 10,6-81,3 nmol/l, posmenopauza <2,3 nmol/l
muži: 0,9-3,9 nmol/l
- u žen tvořen žlutým tělískem ovarií , v menší míře kůrou nadledvin.
- v šestém týdnu hlavním místem tvorby stává placenta.
- většina progesteronu je v krvi vázána na bílkoviny (albumin, aj.).
- prudký nárůst koncentrace při ovulaci

PLACENTÁRNÍ HORMONY

Lidský choriový gonadotropin (lidský choriogonadotropin, hCG)

- stanovení je také součástí screeningu vrozených vývojových vad
- **Referenční hodnoty:** do 5 U/l
- k potvrzení gravidity a k jejímu sledování, zvýšené hodnoty jsou u nádorů vaječníků, varlat, aj.
- stanovení celkový beta-hCG (intaktní hormon+volná podjednotka beta), intaktní hCG(pouze intaktní hormon), volná beta-podjednotka

HORMONY PANKREATU

INZULIN

- **Referenční hodnoty:** 6-27 mU/l
- stanovení má malou diagnostickou hodnotu
- ruší exogenní inzulin a protilátky proti inzulinu

GLUKAGON

- polypeptid složený z 29 aminokyselin, stimuluje glykogenolýzu a glukoneogenézu, zvyšuje glykémii

C-PEPTID

- **Referenční hodnoty:** 0,78-1,89 ug/l
- C-peptid není hormon, je to jednoduchý peptid vzniklý rozštěpením proinzulinu
- ukazatel endogenní syntézy inzulinu
- neinterferuje exogenní inzulin

HORMONY HYPOFÝZY A HYPOTALAMU

TYREOTROPIN (TYREOTROPNÍ HORMON, TSH)

- ***Speciální preanalytické požadavky:*** pokud je to možné odběr ráno, nalačno, separaci séra nebo plazmy provést do 4h po odběru
- ***Referenční hodnoty:*** 0,2-4,5 mU/l

ADRENOKORTIKOTROPIN (KORTIKOTROPIN, ACTH)

- ***Speciální preanalytické požadavky:*** transport v ledové lázni, ***Referenční hodnoty:*** do 46 ng/l (pg/ml)
- odhalování příčiny nadměrné produkce kortizolu (Cushingův syndrom), nebo nedostatečné sekrece (Addisonova nemoc)
- stimulační a inhibiční testy syntézy ACTH (např. dexametazonový test)

HORMONY HYPOFÝZY A HYPOTALAMU

FOLIKULOSTIMULAČNÍ HORMON (FOLITROPIN, FSH)

- **Referenční hodnoty:** ženy: folikulární fáze 2,5-10,2 U/l, ovulační fáze 3,4-33,4 U/l, luteální fáze 1,5-9,1 U/l, postmenopauza 23,0-116,3 U/l
muži: 1,4-18,1 U/l
- závislost na období menstruačního cyklu s maximem v ovulaci

LUTEINIZAČNÍ HORMON (LUTROPIN, LH)

- **Referenční hodnoty:** ženy: folikulární fáze 1,9-12,5 U/l, ovulační fáze 8,7-76,3 U/l, luteální fáze 0,5-16,9 U/l, postmenopauza 15,9-54,0 U/l
muži: 1,5-9,3 U/l

HORMONY HYPOFÝZY A HYPOTALAMU

PROLAKTIN (PRL)

- ***Speciální preanalytické požadavky:*** doporučuje se odběr 3h po probuzení (optimálně mezi 8 a 10h)
- ***Referenční hodnoty:*** ženy: 59-619 mU/l, postmenopauza 38-430 mU/l, muži: 44-375 mU/l
- základní diagnostická metoda pro diagnostiku adenomu hypofýzy (prolaktinom)
- zvýšené hodnoty jsou přítomny v graviditě a při laktaci

RŮSTOVÝ HORMON (SOMATOTROPIN, STH, TAKÉ GH, GROWTH HORMON)

- ***Referenční hodnoty:*** 0,16-13,00 mU/l

HORMONY KŮRY NADLEDVIN

KORTIZOL

- **Speciální preanalytické požadavky:** kolísání koncentrace kortizolu během dne - nejčastěji se odběr provádí ráno mezi 7-9h a večer mezi 16-20h
- **Referenční hodnoty:** sérum - ráno 101-536 nmol/l,
večer 79-478 nmol/l
moč 12-486 nmol/24h
- většina kortizolu v krvi je vázána na transkortin, dále na SHBG a albumin
- 10 % je ve volné formě

DEHYDROEPIANDROSTERON SULFÁT (DHEAS)

- **Speciální preanalytické požadavky:** oddělit elementy do 30 min po odběru
- **Referenční hodnoty:** jsou závislé na použité metodě, věku, pohlaví
- vzniká téměř výlučně v nadledvinách, u mužů částečně i ve varlatech, u žen v ovariích.
- zvýšené koncentrace u hyperplazie a tumorů nadledvin

HORMONY DŘENĚ NADLEDVIN

adrenalin, noradrenalin (katecholaminy)

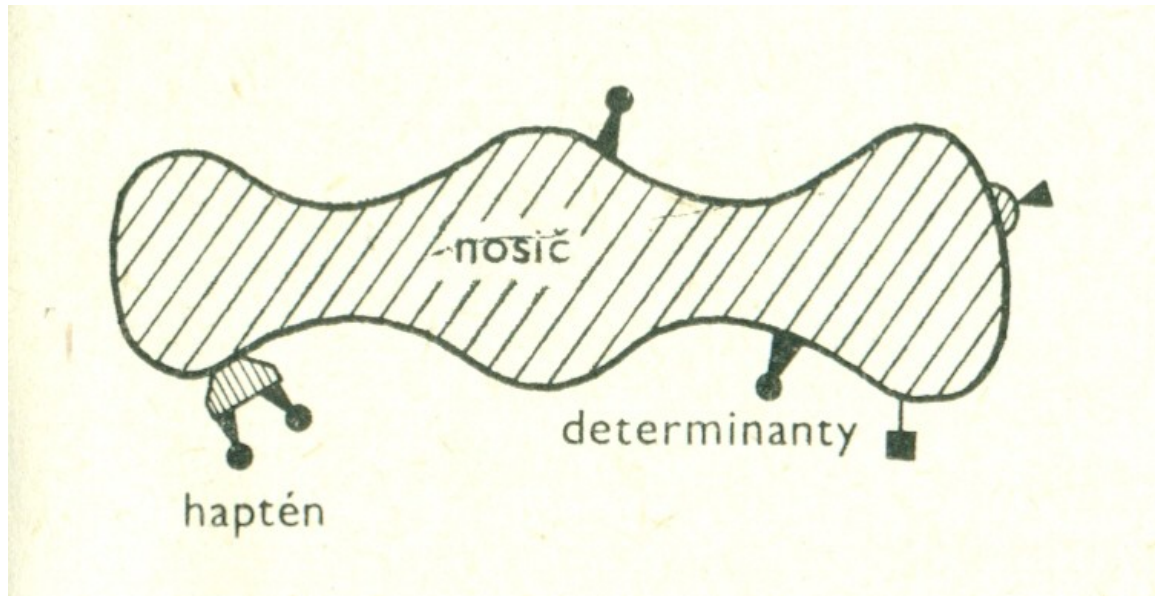
- pro stanovení v plazmě nebo moči se používá HPLC s elektrochemickou detekcí po vyextrahování z bílkovinné matrice
- stanovují se také O-methyl metabolity nazývané *metanefriny*.
- Katecholaminy a metanefriny se stanovují především pro diagnostiku nádoru chromafinních buněk feochromocytomu

PARATHORMON

- ***Speciální preanalytické požadavky:*** transportovat při teplotě tajícího ledu, centrifugovat co nejdříve v chlazené centrifuze a oddělit sérum nebo plazmu
- ***Referenční hodnoty:*** 1,5-7,6 pmol/l
- stanovení slouží pro laboratorní diagnostiku primární hyperparatyreózy

Antigeny

- Látky schopné vyvolat v živém organismu tvorbu specifických protilátek
- Imunitní odpověď může vyvolat pouze kompletní antigen
- 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

Stanovení hormonů

- používají se imunochemické metody
- založeny na specifické reakci antigen – protilátka

Dělení:

- dle uspořádání reakce – kompetitivní, nekompetitivní (sendvičové)
- dle prostředí
- homogenní imunoanalýza (stanovení a detekce přímo v reakční směsi – fluoroimunoanalýza, př. přístroj Kryptor, firma Brahms)
- heterogenní imunoanalýza (po separaci vytvořeného imunokompl.)
- dle techniky použité k měření signálu – radioimunoanalýza, enzymoimunoanalýza, luminiscenční imunoanalýza, fluoroimunoanalýza
- dle použité značky (často je předmětem patentu konkrétní firmy)

Kompetitivní stanovení:

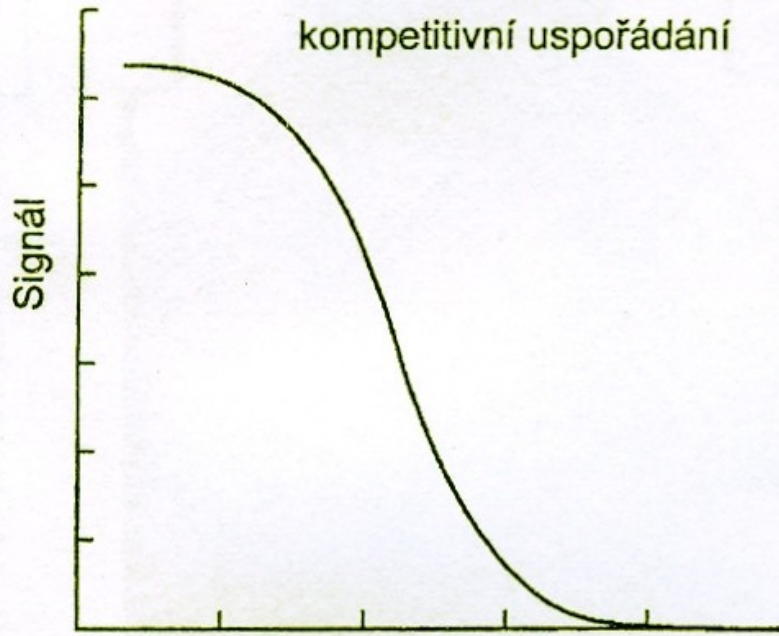
- Stanovovaný antigen soutěží se stejným antigenem, na který je navázána značenka o limitované množství protilátky
- Velikost odezvy je nepřímo závislá na koncentraci stanovovaného analytu
- Kalibrační křivka má hyperbolický tvar
- Metoda je vhodná pro nízkomolekulární analyty s malou molekulou (př. 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
- Často se používají monoklonální protilátky

Můstkové uspořádání:

- Podobné jako sendvičové uspořádání, ale princip je používán ke stanovení protilátek (př. IgA)
- Protilátka reaguje s dvěma antigeny



Analytická koncentrace

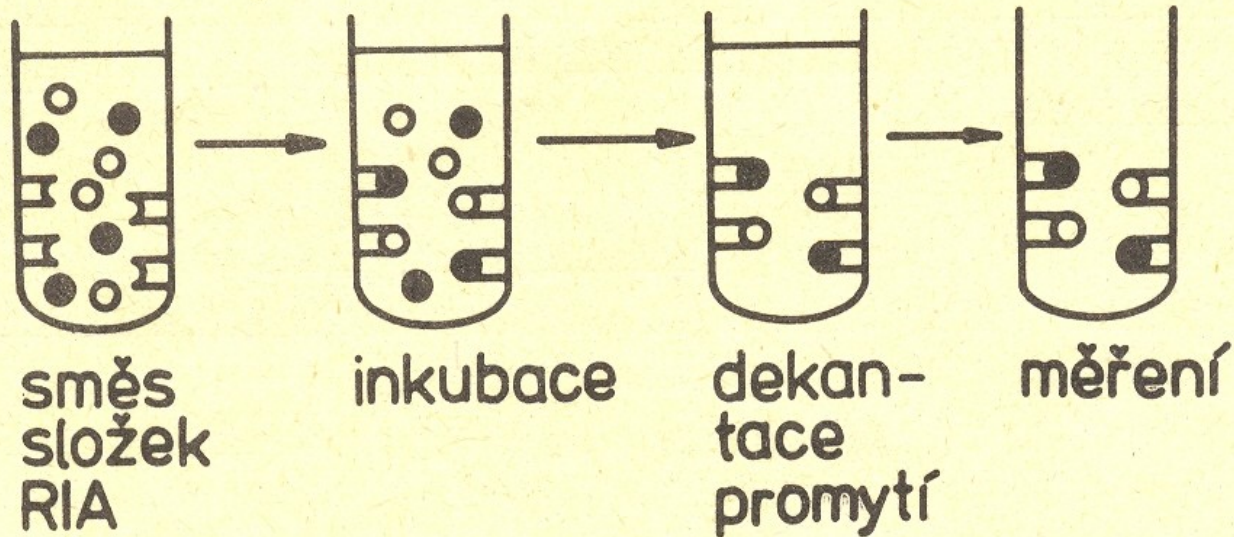
Radioimunoanalýza:

- Patří mezi heterogenní, ruční metody
- Nejstarší imunoanalytická metoda
- Od roku 1959
- Citlivá, náročná na ruční práci a na zachování předpisů při práci s radioizotopy
- Jako značka se používá izotop jódu ^{125}I - γ - zářič s poločasem rozpadu 60 dní (případně β - zářič trícium (^3H) s poločasem rozpadu kolem 12 roků)
- Kompetitivní uspořádání (RIA)
- Sendvičová metoda (IRMA – Imunoradiometrická analýza)
- Nezastupitelné místo
- Metody pro nově používané analyty

Schematické znázornění kompetitivního stanovení (RIA):

smíchání komponent, inkubace (vznik komplexu antigen-protilátka), separace (ukotvení komplexu na pevném nosiči a promytí) a detekce

- ▣ první protilátka
- značený antigen
- neznačený antigen



Příklad - stanovení 17-OH Progesteronu:

- Zvýšené hladiny 17-OHP v krvi nasvědčují vrozenému metabolickému onemocnění kongenitální adrenální hyperplasii (CAH)
- Principem stanovení je kompetitivní RIA ve zkumavkách potažených protilátkou proti 17-OHP
- Inkubace ve zkumavkách potažených protilátkou společně s 17-OHP značeným ^{125}I (radioindikátor)
- Odsátí obsahu zkumavek
- Měření radioaktivity navázaného komplexu ve zkumavce
- Koncentrace 17-OHP ve vzorcích se odečítá z kalibrační křivky

Detekce - scintilační dektor:

- Multidetektorový gama měřič LB 2104
- Kvantitativní měření radioaktivity gama záření radioaktivních nuklidů
- Založen na vzniku luminiscence při průchodu ionizujícího záření vhodnou látkou - scintilátorem
- Jako scintilační jednotka se používají krystaly NaJ/Tl , tj. jodidu sodného se stopami thalia
- Systém je vybaven 12 scintilačními jednotkami (sondami) a fotonásobičem
- Při průchodu záření gama scintilačním krystalem vznik fotoelektrického jevu a Comptonova rozptylu (foton vyráží elektron a ztrácí část energie)
- Elektrony uvolněné z atomových obalů excitují atomy krystalu
- Vzniká viditelné luminiscenční záření – scintilace
- Fotonásobiče - mění scintilaci na elektrické impulsy
- Lze měřit až 12 zkumavek současně

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- Patří k enzymové heterogenní imunoanalýze - enzym jako značka (křenová peroxidasa), ruční technika
- Enzymová imunoanalýza může být využívána také na imunoanalyzátorech (př. Immulite, Siemens, enzym ALP)
- Kompetitivní nebo sendvičové uspořádání
- Stanovení na mikrotitračních destičkách, potažených protilátkou
- Fáze stanovení jako u radioimunoanalýzy
- Pro usnadnění práce se využívají vícekanálové pipety a automatické promývací stanice
- Detekce - ELISA reader

Vysokoučinná promývačka mikrotitračních destiček (firma TECAN)



ELISA reader ELx800, firma BIO-TEKK
vertikální fotometr pro mikrotitrační destičky, měří koncentrace v celé destičce
současně



ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

- Nevýhodou stanovení je nutnost provedení vícebodové kalibrační závislosti při každém měření. Vzhledem k tomu, že metodika se v současnosti používá většinou pro vysoce speciální analyty, které nebyly dosud převedeny na automatické imunoanalyzátory, bývají vzorky skladovány, dokud se jich neshromáždí větší počet. Mikrotitrační destičky je možno rozložit na jednotlivé použky, takže není nutné zpracovat celou destičku.
- Na pracovištích, kde se provádí větší počet ELISA stanovení je možno zakoupit také systém, kde je pipetování, promývání i měření automatizováno (BRIO od firmy DRG).

ELISA

- Nevýhoda - provedení vícebodové kalibrační závislosti při každém měření
- Skladování vzorků, většinou se neprovádí denně
- Mikrotitrační destičky lze rozložit na jednotlivé proužky
- Možnost automatizace pipetování, promývání i měření (BRIO od firmy DRG)

Příklad ELISA - stanovení luteinačního hormonu:

- Sendvičová technika
- Jamky v mikrotitrační destičce potaženy monoklonální protilátkou proti LH - vychytává LH ze vzorku
- Druhá protilátka je polyklonální, značena křenovou peroxidasou
- Inkubace 1 h při 37 °C, pětinásobné promytí
- Přidat substrát tetrametylbenzidin - reaguje s enzymem
- Zastavení reakce kyselinou sírovou
- Intenzita zbarvení se měří při 450 nm

Luminiscenční imunoanalýza

(heterogenní) – automatické imunoanalyzátoary:

- Analyzátoary s přímou chemiluminiscenční detekcí rozšířené
- Vysoká citlivost - vhodné pro stanovení hormonů
- Luminofoary používané ke značení nemají interference v biologických materiálech
- Zavedení nové metody časově i finančně náročné, trvá několik let
- Nabídka metod bývá proto pozadu za technikou RIA a ELISA
- Výhodou je automatizace, případně provedení klinických a imunoanalytických metod z jedné zkumavky

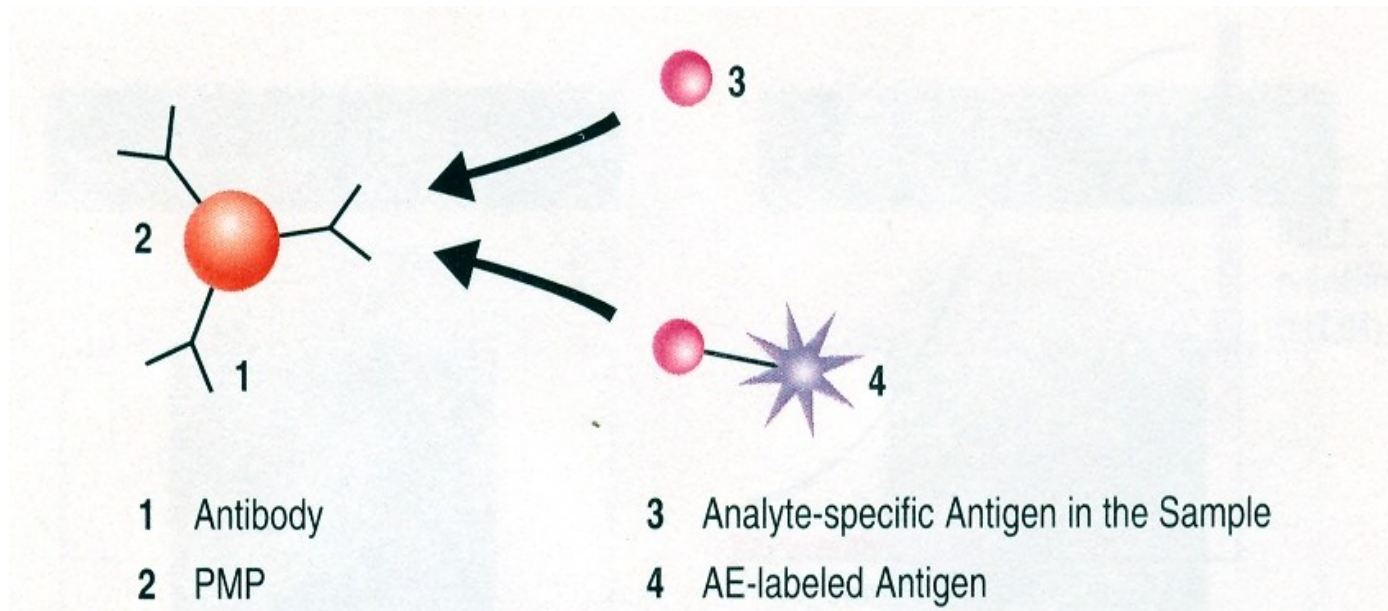
Chemiluminiscence – Centaur, firma Siemens (Bayer)

Princip měření:

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

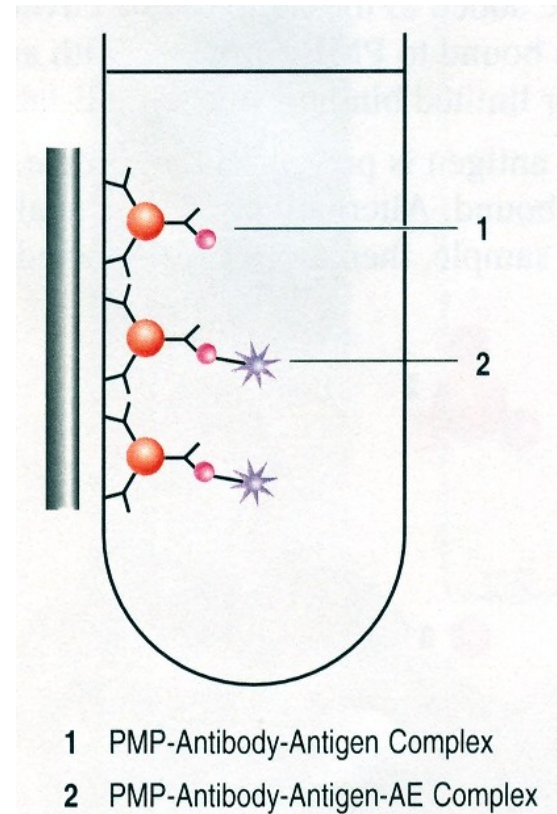
LIA kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- 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



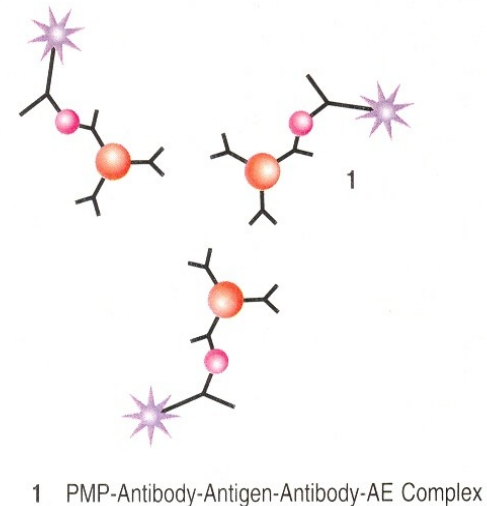
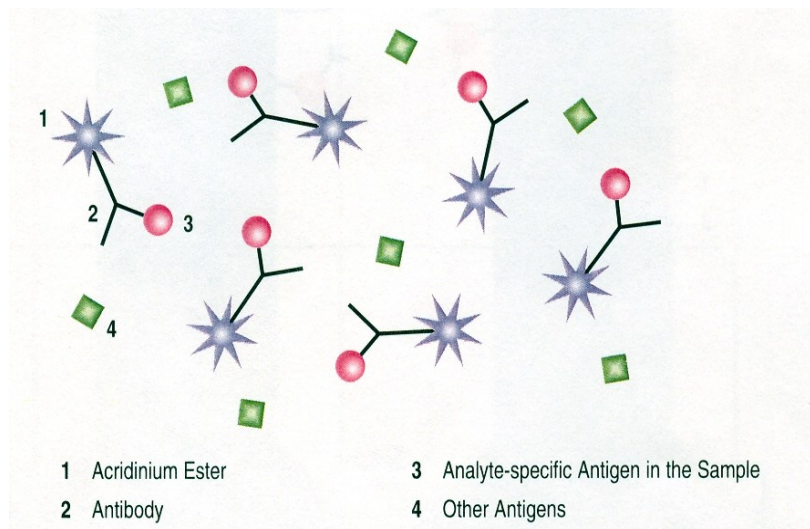
LIA kompetitivní – př. stanovení estradiolu

- 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



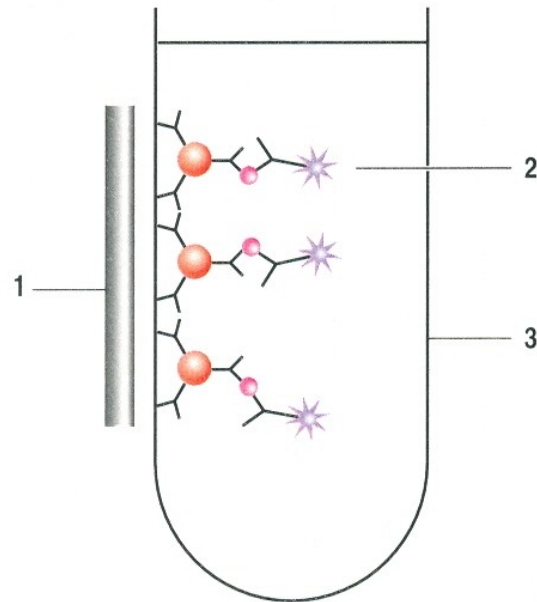
LIA sendvičová – př.stanovení hCG

- Konstantní množství dvou protilátek.
- První polyklonální kozí protilátka proti hCG, označená acridinium esterem
- Druhá, monoklonální myší protilátka proti hCG kovalentně vázaná s paramagnetickými částicemi
- Obě protilátky specifické pro odlišné přítomné epitopy, free betasubjednotku a betasubjednotku intaktní molekuly



LIA sendvičová – př.stanovení hCG

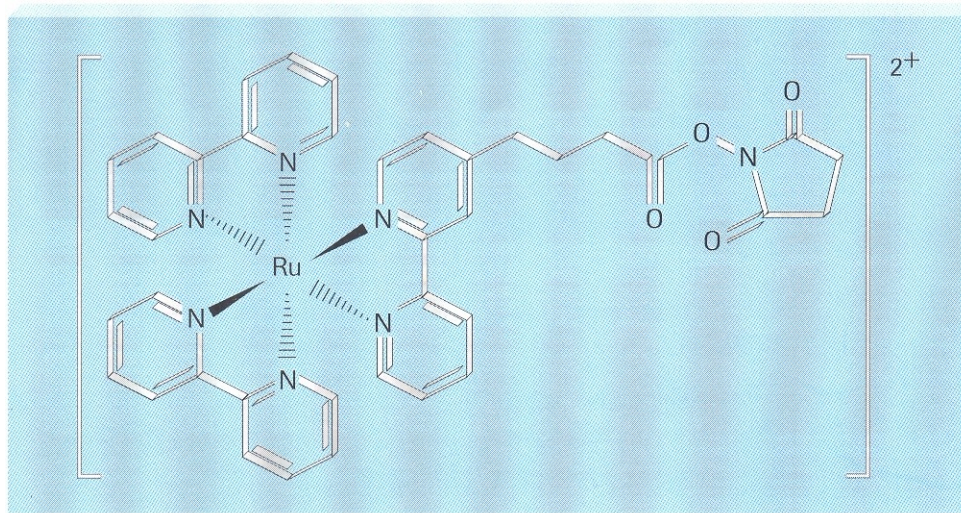
- Po separaci, odsátí a promytí se opět dávkuje reagent a proběhne chemiluminiscenční reakce



- 1 Magnets
- 2 PMP-Antibody-Antigen-Antibody-AE Complex
- 3 Cuvette

Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

- Uspořádání metody – kompetitivní nebo sendvičové
- Protilátka nebo antigen biotynilovány
- Další specifická protilátka je značená rutheniovým komplexem



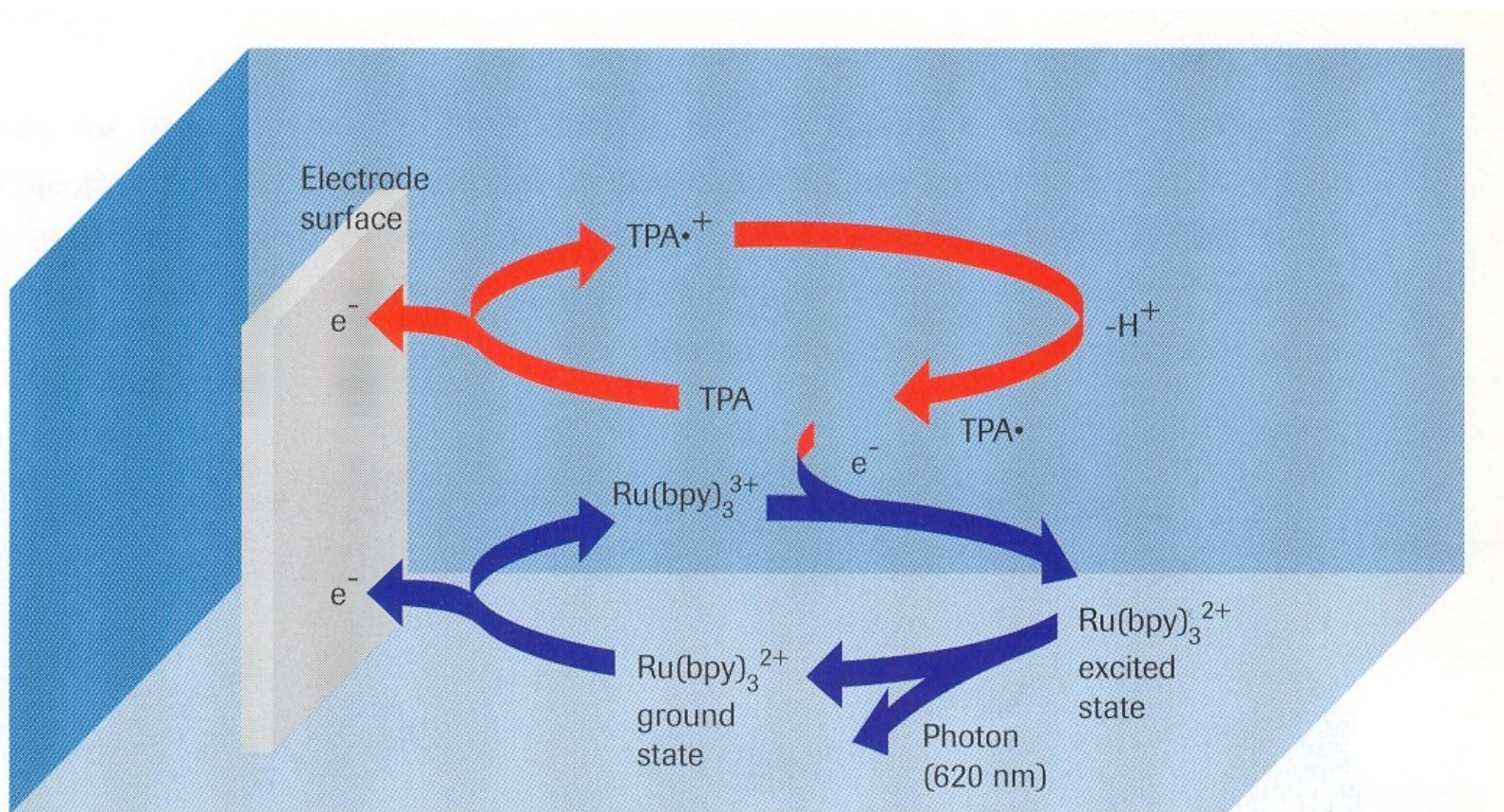
Rutenium(II) tris-bipyridylovým komplex

Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

Sendvičové uspořádání

- 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 (TPA) a přivedení napětí na elektrody vzniká elektrochemiluminiscenční emise – ruthéniový komplex uvolní na elektrodě elektron za vzniku $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ kationtu
- Ruthéniový marker se po luminiscenční reakci regeneruje

Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)



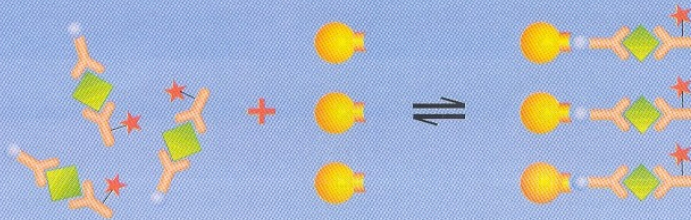
SANDWICH PRINCIPLE

FIRST IMMUNOLOGICAL REACTION

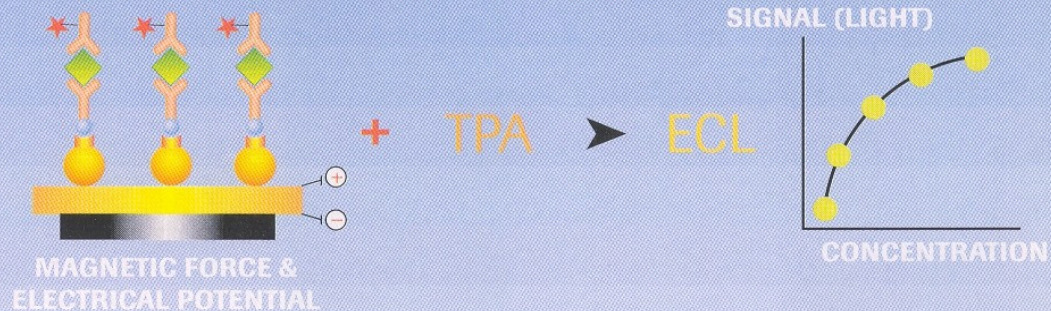


+ SERUM CONSTITUENTS

SECOND REACTION



LIGHT REACTION



 ANTIGEN

 BIOTINYLATED ANTIBODY

 RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

 STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

TPA TRIPROPYLAMINE

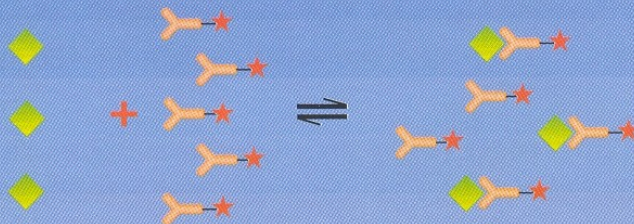
Elektrochemiluminiscence – přístroj Elecsys nebo Modular s modulem E 170 (Roche Diagnostic)

Kompetitivní uspořádání (např. stanovení fT4)

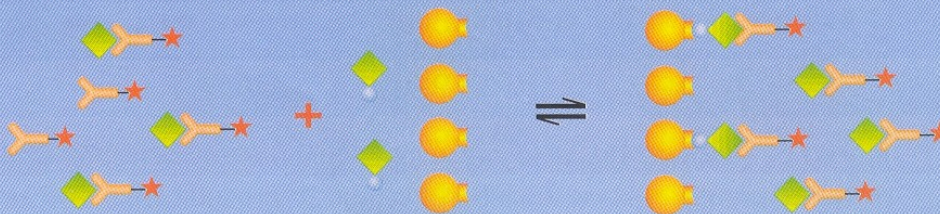
- soutěží stanovovaný antigen s biotynilovaným antigenem o limitované množství značené protilátky (polyklonální)
- Pouze komplex biotynilovaný antigen – protilátka se může vázat na paramagnetické částice
- Komplex stanovovaný analyt – protilátka je při separaci odstraněn
- Dále probíhá reakce stejně jako v předchozím případě
- Velikost signálu je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu

COMPETITIVE PRINCIPLE

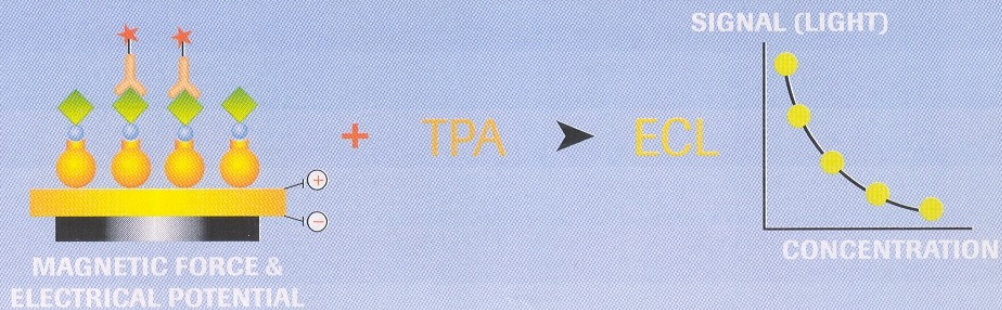
FIRST REACTION



SECOND REACTION



LIGHT REACTION



ANTIGEN

BIOTINYLATED ANTIGEN

RUTHENIUM LABELLED ANTIBODY

STREPTAVIDIN-COATED MICROPARTICLE

TPA TRIPROPYLAMINE

Technologie ChemiFlex CMIA (Abbott)

- CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích
- Značení patentovaným akridiniem
- Možnost dvou promývacích kroků (One Step, Two Step)

CMLA - princip

- Mikročástice (microparticles): mikročástice potažené rekombinantním antigenem ve fyziologickém roztoku s TRIS pufrem
- Konjugát :konjugát rekombinantních antigenů s akridiniem a monoklonální protilátkou proti příslušnému antigenu s akridiniem

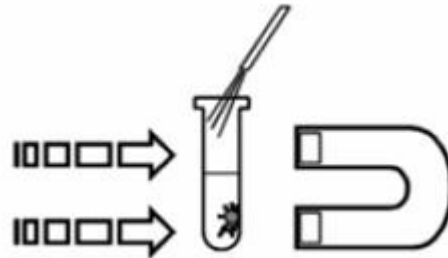
CMIA - princip

1. Dávkování paramagnetických mikročastic obalených záchyťovými molekulami do reakční nádoby se vzorkem
2. Inkubace v třepačce, analyt ze vzorku se naváže na záchyťové molekuly na mikročasticích – vznik imunokomplexu



CMIA - princip

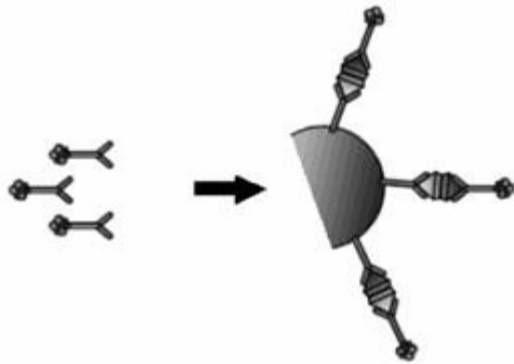
3. Po inkubaci přitáhne magnet paramagnetické mikročástice (navázané na specifický analyt) ke stěně reakční nádoby
Následuje proplach reakční směsi a odstranění nenavázané látky



Přitažení paramagnetických mikročástic magnetem

CMIA - princip

4. Přídavek konjugátu značeného chemiluminiscenčním akridiniem
Konjugát se naváže na imunitní komplex



Přidání akridiniového konjugátu

5. Inkubace
6. Promytí a odstranění nenavázaného analytu

CMIA - princip

7. Nadávkuje se Pre-Trigger (peroxid vodíku) a optický systém CMIA provede čtení pozadí
Pre-Trigger plní následující funkce:
 - vytváří kyselé prostředí, které zabraňuje předčasnému uvolnění emise světla
 - pomáhá předcházet shlukování mikročástic
 - slouží k odštěpení akridiniového barviva z konjugátu navázaného na komplex mikročásticeAkridiniové barvivo je připraveno pro další krok.
8. Do reakční směsi se nadávkuje Trigger (hydroxid sodný). Dojde k oxidační reakci a vzniku chemiluminiscence
Vzniká N-methylakridon a při návratu do základního energetického stavu uvolní energii ve formě emise světla
9. Obsah analytu je zjišťován na základě měření chemiluminiscenční emise

CMIA – stanovení kortizolu

- Jednokroková imunoanalýza, kompetitivní
- Vzorek se smíchá s paramagnetickými mikročasticemi potaženými protilátkami proti kortizolu
- Kortizol ze vzorku se naváže na protilátky proti kortizolu na mikročasticích
- Po inkubaci se do reakční směsi přidá konjugát kortizolu s akridiniem
- Konjugát soutěží o dostupná vazebná místa na mikročasticích potažených protilátkami proti kortizolu
- Po druhé inkubaci se mikročástice promyjí a do reakční směsi se přidají roztoky Pre-Trigger a Trigger
- Množství kortizolu ve vzorku je nepřímo úměrné jednotkám RLU (Relative Light Units), ve kterých se měří výsledná chemiluminiscenční reakce

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

Příklad problematického stanovení – **Tyreoglobulin** (glykoprotein s rozhodující úlohou při syntéze T3 a T4)

- V přítomnosti protilátek proti Tg – výsledky mohou být ovlivněny
- Platí pro imunochemické stanovení od různých výrobců
- Doporučeno současné stanovení anti-Tg
- Nebo konfirmační stanovení Tg s přidavkem známé konc. Tg

Výsledky Tg i Tg po přidavku Tg zadat do vzorce – je-li výtěžnost mimo požadované rozmezí, vliv protilátek okomentovat

Homogenní fluorescenční imunoanalýza – TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) - 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

Odpadají promývací a separační kroky

Technologie LOCI - Siemens

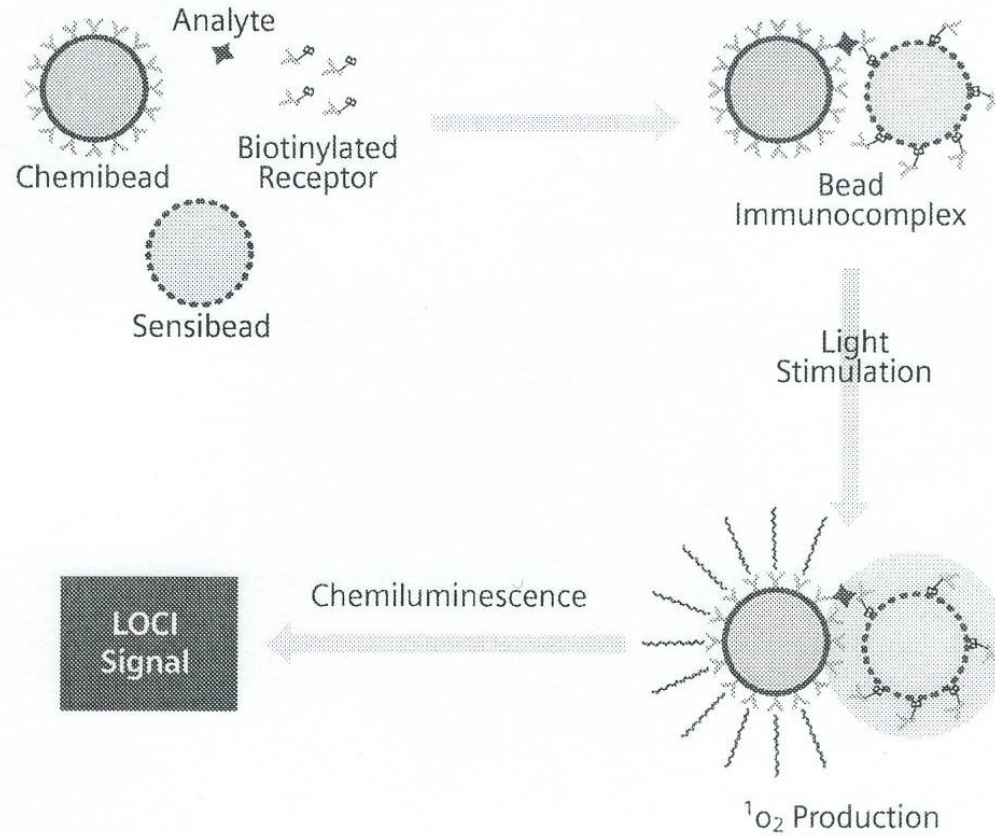
- Technologie založena na přenosu kyslíku
- První **homogenní** imunoanalytická metoda **s chemiluminiscenční detekcí** – novinka
- Vysoká citlivost
- Přístroj Dimension Vista 1500 Intelligent Lab Systém

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 **sensibead** uvolní singletový kyslík, pronikne do chemibead a uvolní chemiluminiscenční záření**

Technologie LOCI - Siemens



MULTIPLIXOVÉ METODY

Princip xMAP technologie (microarraye partical):

- 100 druhů mikrokuliček (magnetické) rozlišených kombinací dvou fluorescenčních barev
- Na každém druhu je navázána molekula vázající specificky jeden analyt
- Na kuličku se naváže analyt a druhá protilátka. Kuličky protékají přístrojem (**Luminex 100 IS, Luminex Corp.**) - **princip flow cytometrie**
- Měří se fluorescence vzniklé po excitaci dvěma lasery – z nich se vyhodnotí – druh a množství analytu

MULTIPLEXOVÉ METODY- vlastnosti

- **xMAP technologie poskytuje možnost simultánního měření až 100 analytů v jedné jamce mikrotitrační destičky**
- **Analýzu je možné provádět pro předem připravené panely vyšetření – př. cytokiny**
- **Potřeba velmi malého objemu**
- **Nižší cena za vyšetření**
- **Dlouhá inkubace a nutnost práce ve větších sériích**
- **Metodika je vhodná pro měření imunochemických metod, nukleových kyselin, enzymů**

Biočipová array technologie:

- **Imunoanalýza založená na simultánní multianalýze**
- **Na jednom biočipu se analyzují celé panely příbuzných testů**
- **Principem stanovení je ELISA (přístroj Evidence, Randox)**