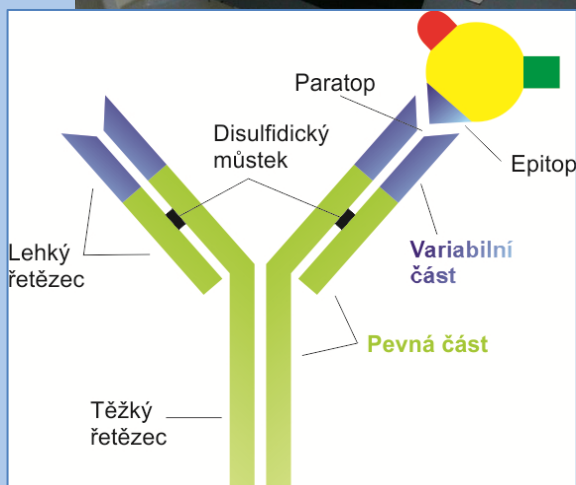
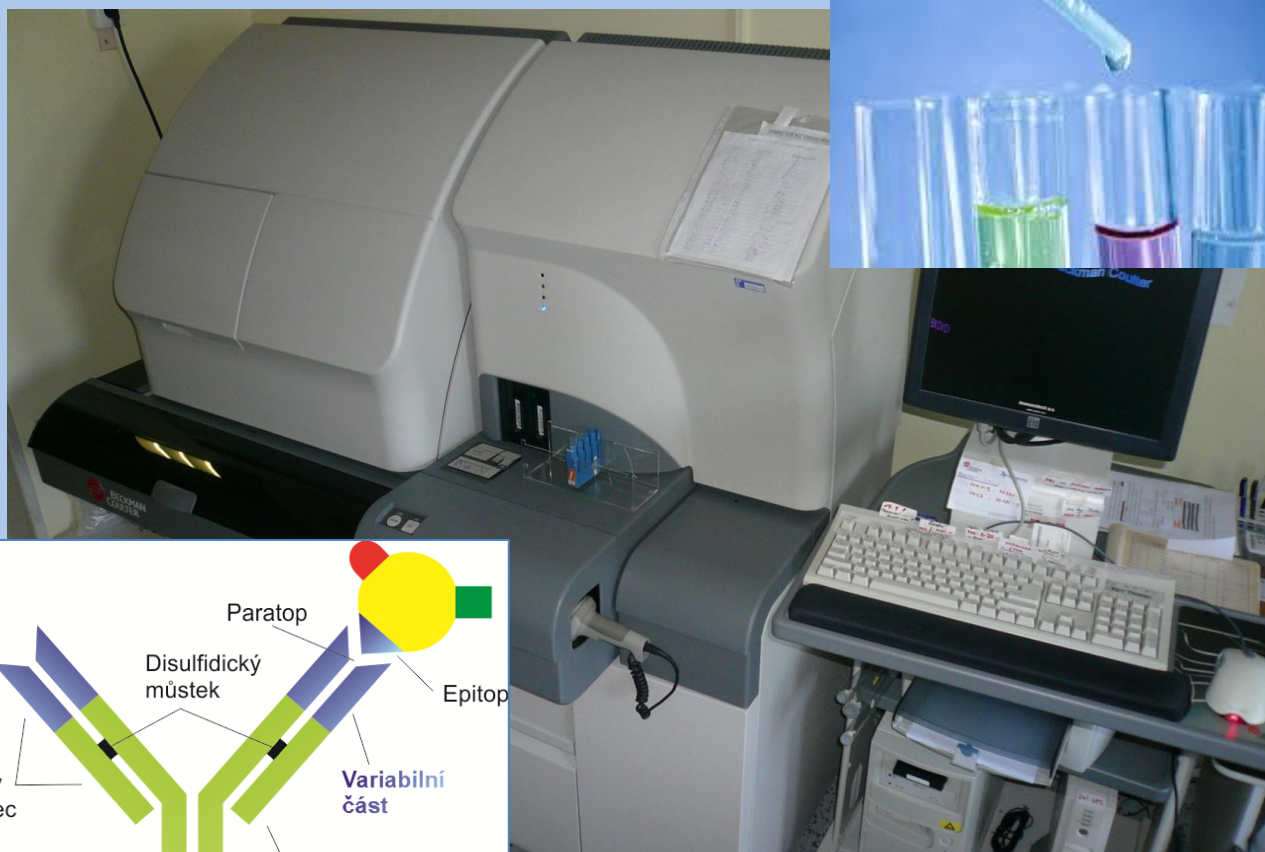


Principy imunoanalytických metod pro mediky

Kolektiv autorů

Editoři: Marie Karlíková, Ondřej Topolčan



Předmluva

Imunoanalytické metody jsou nedílnou součástí metod laboratorní diagnostiky a nezbytným pomocníkem klinických lékařů i odborníků v biomedicínském výzkumu. Lékaři mnoha klinických specializací využívají výsledky imunoanalytických stanovení při klinickém rozhodování v otázkách diagnostiky, určení či posouzení terapie, monitorace onemocnění, a dalším. Lékaři by se však neměli spokojit s pouhým výsledkem číslem, ale měli by znát, jakým způsobem se k výsledku dospělo, jaké faktory mohly ovlivnit jeho spolehlivost a hlavně jak tento výsledek správně interpretovat.

Publikace, kterou držíte v ruce, by měla studentům lékařství i dalším zájemcům pomoci orientovat se v problematice imunoanalytických metod a jejich aplikací. Byla vytvořena na základě přednášek volitelného předmětu „Principy a aplikace imunoanalytických metod – současnost a perspektivy“ v rámci projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/15.0046.

Přejeme příjemné čtení!

Plzeň, prosinec 2013

editoři

Autoři

Ing. Vladimír Bartoš, PhD.

Ostravská univerzita v Ostravě

vladimir.bartos@osu.cz

RNDr. Kristián Šafarčík, CSc.

Ostravská univerzita v Ostravě

kristian.safarcik@usu.cz

RNDr. Marie Karlíková, PhD.

Lékařská fakulta UK v Plzni

karlikovam@fnplzen.cz

prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

Lékařská fakulta UK v Plzni a Fakultní
nemocnice Plzeň

topolcan@fnplzen.cz

PharmDr. Radek Kučera, PhD.

Lékařská fakulta UK v Plzni a Beckman
Coulter ČR s.r.o.

kuucera@seznam.cz

RNDr. Jindra Windrichová, PhD.

Lékařská fakulta UK v Plzni a Fakultní
nemocnice Plzeň

windrichovaj@fnplzen.cz

Editoři

RNDr. Marie Karlíková, PhD.

Lékařská fakulta UK v Plzni

karlikovam@fnplzen.cz

prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

Lékařská fakulta UK v Plzni a Fakultní
nemocnice Plzeň

topolcan@fnplzen.cz

Obsah

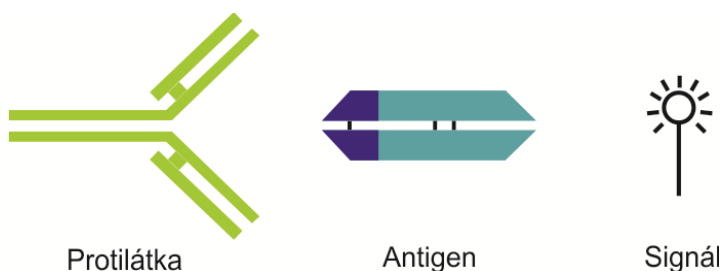
KAPITOLA 1 - ZÁKLADNÍ POJMY A PRINCIPY IMUNOANALÝZY.....	6
REAKCE PROTILÁTKA-ANTIGEN	7
PROTILÁTKY	8
ANTIGEN	13
CHARAKTERISTIKA IMUNOANALYTICKÝCH METOD.....	14
INDIKÁTORY U IMUNOANALYTICKÝCH METOD.....	19
KAPITOLA 2 - IMUNOANALYTICKÉ METODY A TECHNOLOGIE.....	20
IZOTOPOVÉ METODY	20
NEIZOTOPOVÉ METODY.....	22
ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA (EIA)	22
LUMINISCENČNÍ IMUNOANALÝZA	27
FLUORESCENČNÍ IMUNOANALÝZA.....	30
MULTIPLEXOVÉ METODY	33
PLANÁRNÍ MIKROARRAYE – PROTEINOVÉ ČIPY	35
ARRAYE NA MIKROTITRAČNÍCH DESTIČKÁCH	36
MULTIPLEXOVÉ REAKCE NA MIKROKULIČKÁCH (BEAD ARRAYS).....	36
TECHNOLOGIE FLOWCYTOMIX.....	36
TECHNOLOGIE XMAP	37
LABORATOŘ NA ČIPU (LAB-ON-A-CHIP)	40
KAPITOLA 3 - PREANALYTIKA	41
BIOLOGICKÉ VLIVY	42
ODBĚR MATERIÁLU.....	44
SEPARACE A TRANSPORT VZORKU.....	45
SKLADOVÁNÍ.....	46
KAPITOLA 4 - ANALYTICKÉ A KLINICKÉ PARAMETRY	47
CITLIVOST STANOVENÍ.....	47
ANALYTICKÁ CITLIVOST.....	48
FUNKČNÍ CITLIVOST	48
SPRÁVNOST A BIAS	48

PŘESNOST A NEPŘESNOST	49
PŘESNOST VE STANOVENÍ	50
PŘESNOST MEZI STANOVENÍMI	50
PROFIL PŘESNOSTI	50
ZDROJE NEPŘESNOSTÍ.....	50
NEJISTOTA MĚŘENÍ.....	52
REFERENČNÍ MEZE	52
CUT OFF	53
HRANIČNÍ VÝSLEDKY	53
BIOLOGICKÁ VARIABILITA	54
KLINICKÁ SENZITIVITA A SPECIFICITA	55
EFEKTIVITA TESTU	56
PREDIKTIVNÍ HODNOTY	56
ROC KŘIVKA	57
KAPITOLA 5 - NÁVAZNOST A STANDARDIZACE IMUNOANALYTICKÝCH METOD	58
NÁVAZNOST MĚŘENÍ	58
STANDARDIZACE IMUNOANALYTICKÝCH METOD	60
KAPITOLA 5 - ZAJIŠTĚNÍ KVALITY V LABORATOŘI	62
INTERNÍ KONTROLA KVALITY	63
EXTERNÍ HODNOCENÍ KVALITY	66
KAPITOLA 6 - IMUNOANALYTICKÉ METODY V KLINICKÉ PRAXI	69
IMUNOANALYTICKÉ METODY V ENDOKRINOLOGII	70
IMUNOANALYTICKÉ METODY V ONKOLOGII	72
IMUNOANALYTICKÉ METODY V ASISTOVANÉ REPRODUKCI.....	74
IMUNOANALYTICKÉ METODY V PRENATÁLNÍ A NEONATÁLNÍ DIAGNOSTICE	75
IMUNOANALYTICKÉ METODY V DIAGNOSTICE INFEKČNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	77
TERAPEUTICKÉ MONITOROVÁNÍ LÉČIV	78
DALŠÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ IMUNOANALYTICKÝCH METOD	78
IMUNOANALYTICKÉ METODY MIMO OBLAST HUMÁNNÍ MEDICÍNY	79
LITERATURA	79

Kapitola 1 - Základní pojmy a principy imunoanalýzy

Kristián Šafarčík, Vladimír Bartoš, Marie Karlíková

K imunochemické **reakci protilátka-antigen** *in vivo* dochází při imunitní odpovědi organismu. Tato reakce *in vitro* je využívána v imunoanalytických laboratorních stanoveních. Pro detekci a kvantitativní vyjádření výsledku se využívá značení jednoho z účastníků reakce (buď protilátky, nebo antigenu) **indikátorem**, který generuje signál, měřitelný jednoduše a s vysokou přesností a reprodukovatelností. (Obrázek 1).



Obrázek 1. Schéma hlavních komponent imunoanalýzy.

Mimořádně vysoká citlivost imunoanalytických metod (detekční limity dosahují hodnot 10^{-15} až 10^{-20} mol.L⁻¹, což v praxi znamená koncentraci přibližně jedné molekuly na litr) souvisí s přirozenou reaktivitou protilátek, zejména s jejich vlastnostmi:

- 1/ schopností **vázat se na široké množství** přirozených i umělých sloučenin, buněk i virů, které se chovají jako antigeny (protilátky jsou proteinového charakteru a jejich velké množství vazebných míst je odvozeno z obrovského počtu kombinací sekvencí aminokyselin),
- 2/ **specifitou** pro reagující látku, tj. schopnost vázat se právě na tuto látku za přítomnosti dalších sloučenin,
- 3/ **silou vazby** protilátky s antigenem, takže komplex protilátky-antigen zůstane stabilní i během různých, např. separačních procesů.

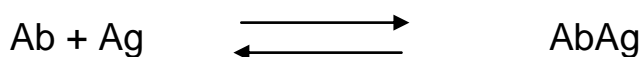
Imunoanalýza se řadí mezi metody klinické diagnostiky i výzkumu, které slouží ke kvantifikaci molekul v biologických tekutinách, extraktech tkání či supernatantech buněčných kultur. Moderní imunoanalytické metody jsou snadno proveditelné a dobře automatizovatelné. Uplatňují se v mnoha odvětvích lékařství i biomedicínského výzkumu. Využívají se zejména ke stanovení látek s velmi nízkou koncentrací, např. hormonů, nádorových markerů, cytokinů apod., ale i imunoglobulinů, virů, léků a mnoha dalších molekul.

Počátky imunoanalýzy

V 50. letech 20. století fyzikové Rosalyn Yalowová a Solomon Berson (pracovní i životní partneři) popsali princip radioimunoanalýzy (RIA), s jejíž pomocí změřili do té doby nedetekovatelná množství inzulínu v krvi. Yalowové a Bersonovi bylo jasné, že obdobné metody, založené na soutěži značeného a neznačeného antigenu o vazebná místa, bude možné vypracovat i pro další analyty, a tuto možnost chtěli poskytnout celému světu. Proto své poznatky uveřejnili bez patentové ochrany. V roce 1977 obdržela Yalowová (Berson se toho již nedožil) Nobelovu cenu za vývoj radioimunoanalýzy pro peptidové hormony. Později se hledaly i jiné možnosti značení molekul tak, aby byla umožněna stejně citlivá detekce. V roce 1971 se objevily metody, které místo radioizotopů využívaly enzymy. Jejich autory byli Eva Engvallová s Peterem Perlmanem ze Švédska a Bauke van Veemen s Antonem Schuursem z Holandska. Zatímco Holanďané svůj systém patentovali, Engvallová a Perlman věnovali světu metodu ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) stejně velkoryse, jako to před nimi s RIA udělali R. Yalowová a S. Berson. (převzato z Lapčík 2009).

Reakce protilátka-antigen

Při reakci antigen-protilátka vzniká **protilátkově-antigenní komplex (imunokomplex)**.



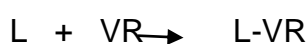
Ab = protilátka, Ag = antigen, AbAg = imunokomplex

Reakce je reverzibilní. Vazba v imunokomplexu je nekovalentní, závisí na několika druzích slabých sil, jako jsou hydrofobní vazby, vodíkové můstky, van der Waalovy síly a interakce

iontů. O pevnosti vazby rozhoduje rovnovážná konstanta; obecně je vazba protilátka-antigen **silná**, což je důležité při separačních a dalších procesech.

Reakce je **specifická**, tj. protilátka je schopná specificky vázat určitý antigen i za přítomnosti dalších sloučenin v mnohonásobně vyšší koncentraci.

Obecně lze imunoanalytické metody zařadit mezi analytické postupy založené na specifické reakci ligandu (L) a vhodného vazebného reagens (VR) za vzniku komplexu (L-VR).



Odtud plyne nejobecnější označení těchto metod jako metody "ligandové analýzy".

Imunoanalytickými metodami můžeme stanovovat jak antigen, tak protilátku. Stanovovaná látka se souhrnně nazývá **analyt**. V následujících kapitolách se zaměříme na stanovení antigenů.

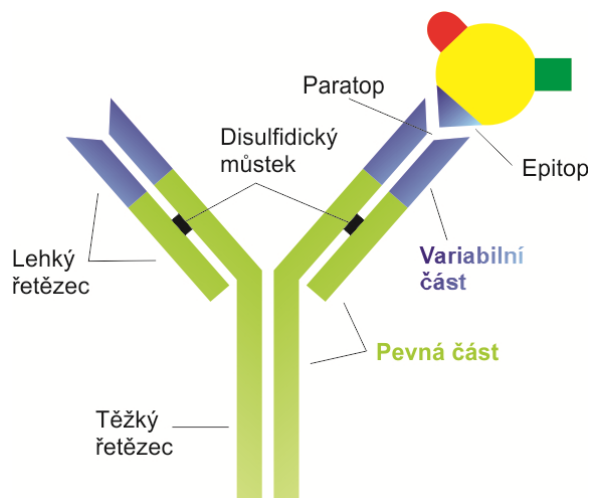
Protilátky

Protilátky (angl. *antibody*, Ab) jsou proteiny produkované vyššími živočichy jako součást imunitní odpovědi. Protilátky patří mezi glykoproteiny, které nazýváme **imunoglobuliny**.

V případě, kdy je analytem antigen, jsou protilátky nejdůležitější komponentou reakce a na jejich kvalitě závisí kvalita výsledku.

Ke stanovení analytu se využívá jedna nebo několik různých protilátek. Analytem může být látka, která je přirozenou součástí organismu (např. hormony štítné žlázy) nebo je v těle produkována, ale typicky přítomna není (např. tumorové markery), nebo látky, které se v těle přirozeně nevyskytují (léky, drogy apod.).

Specifitu protilátky, tj. schopnost vázat se pouze na pro určité místo antigenu (**antigenní determinantu**), určují sekvence aminokyselin na lehkých řetězcích molekuly protilátky (Obrázek 2). Tyto sekvence zároveň vytvářejí vazebné místo pro antigenní determinantu – **paratop**. Systém paratop-antigenní determinantu (nazývaná též **epitop**) se podobá schématu zámek-klíč.



Obrázek 2. Schéma protilátky s navázaným antigenem (žlutě). Různé epitopy antigenu jsou znázorněny modře, červeně a zeleně.

Specifita protilátky závisí i na interferenci s látkami podobného složení a struktury jako látka, pro jejíž stanovení je protilátka určena. Mírou specifity protilátky je procento **zkřížené reakce** s interferující látkou.

Afinita je energie vazby protilátky s jednou antigenní determinantou. Je vyjádřena pomocí asociační konstanty (K_{as}) reakce. Kvalitní protilátky používané pro účely imunoanalýzy by měly mít $K_{as} = 10^{10} - 10^{12} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$. Většina antigenů je však multivalentních, tj. má několik vazebných determinant pro různé protilátky.

Avidita vyjadřuje energii vazby mezi celou molekulou antigenu a protilátkou. Avidita je tedy závislá na afinitě, ale bere v úvahu valenci antigenu a protilátky i nespecifické faktory, které ovlivňují vazby mezi antigenem a protilátkou.

Valence protilátky je počet vazebných míst na její molekule, která jsou schopna reagovat s determinantami určitého antigenu; podobně valence antigenu je počet determinantních skupin, které se mohou vázat s protilátkou. Protilátky tedy jsou buď **monovalentní** (obsahují jedno vazebné místo), nebo **polyvalentní** (obsahují více vazebných míst).

Podle způsobu přípravy a charakteru dělíme protilátky do dvou základních skupin, na:

- protilátky **polyklonální**,
- protilátky **monoklonální**.

Polyklonální protilátky

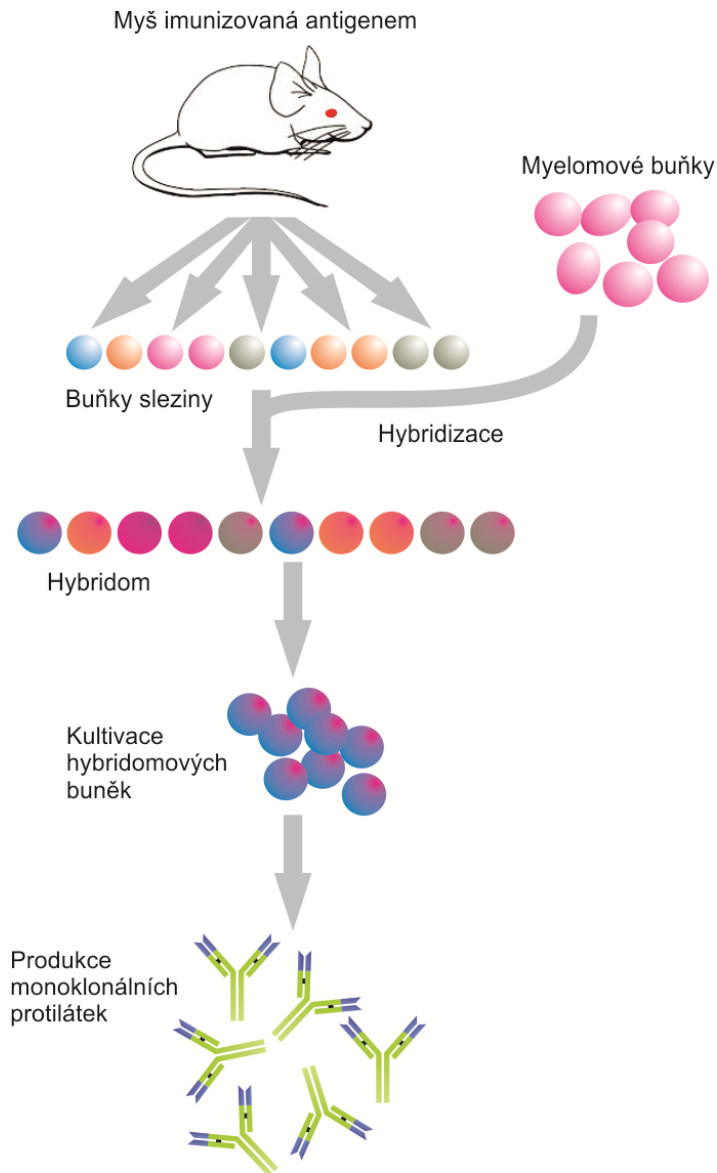
Polyklonální protilátky se připravují cílenou imunizací zvířat. Vybranému zvířeti se aplikuje příslušný antigen v emulzi s tzv. “Freundovým adjuvans” (směs minerálních olejů, vosků a neživých bakterií, která zvyšuje imunitní reakci na podaný antigen). Doba potřebná k tvorbě protilátek, je pro jednotlivé antigeny různá (2 až 6 měsíců).

Imunizace je výhradně závislá na konkrétním zvířecím jedinci. Jedná se proto o proces jedinečný a **nereprodukovatelný**. Nelze tudíž předem předpokládat vlastnosti získané protilátky a nikdy nelze připravit identické protilátky. Polyklonální protilátka má schopnost reagovat s **několika antigenními determinantami**.

Monoklonální protilátky

Způsob přípravy těchto protilátek byl roku 1975 publikován G. Köhlerem a C. Milsteinem, kteří v roce 1984 spolu s N. K. Jernem získali Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu, a to za „teorie pojednávají o specifitě ve vývoji a kontrole imunitního systému a za objev principu produkce monoklonálních protilátek“.

Při přípravě monoklonálních protilátek je prvním krokem imunizace myši antigenem (podobně jako u polyklonálních protilátek, viz výše), ale následně se z její sleziny získávají lymfocyty potřebné pro druhý krok přípravy monoklonálních protilátek - fúzi lymfocytů s myelomovými (nádorovými) buňkami. Tento krok je označován jako hybridizace a výsledným produktem je hybridom. Monoklonální protilátky tedy nejsou produkovány přímo organismem, ale buněčnou kulturou (Obrázek 3).



Obrázek 3. Příprava monoklonálních protilátek.

Syntéza protilátky pokračuje v hybridomu, což je dáno geny imunizovaného zvířete (“lymfoidního rodiče”). Vhodnou selekcí hybridomů lze pak vybrat ten klon, který produkuje protilátky proti vybrané požadované jediné antigenní determinantě antigenu. (Monoklonální protilátka tedy rozeznává **jedinou antigenní determinantu**.) Hybridomy lze uchovávat za určitých podmínek (např. zmrazením na nízkou teplotu) a použít pro další produkci protilátek. Příprava monoklonálních protilátek je tedy, na rozdíl od polyklonálních, **reprodukovatelná**.

Monoklonální protilátky (zpravidla myší) jsou využívány i v diagnostice a léčbě rakoviny. Mohou však u pacientů vyvolat imunitní odpověď - produkci anti-myších neboli **protilátek HAMA** (Human-Anti-Mouse-Antibodies), která vede k falešně pozitivním, případně falešně negativním výsledkům u imunoanalytických stanovení.

Jaký typ protilátek pro imunoanalýzu?

Shrnutí nejdůležitějších vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek s ohledem na jejich využití v imunoanalýze je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1. Srovnání vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek

	Polyklonální protilátky	Monoklonální protilátky
Specifita	++	+++
Afinita	+++	++
Avidita	+++	++
Reprodukovatelnost přípravy	ne	ano
Množství připravené protilátky	omezené	neomezené
(Počáteční) náklady na přípravu	nízké	vysoké
Počet epitopů, které rozeznávají	2 a více	1
Zkřížené reakce	ano	ne
Možnost interference HAMA	ne	ano
Reprodukovatelnost výsledků	++	+++
Citlivost	+++	++

+++ = **velmi dobrý**, ++ = **dobrý**

Nelze jednoznačně říci, který typ protilátek je pro imunoanalýzu vhodnější; záleží na konkrétním uspořádání analýzy. V současné době se v klinické diagnostice převážně používají monoklonální protilátky.

Antigen

Antigeny jsou makromolekulární látky přirozeného nebo syntetického původu, které imunitní systém rozeznává jako cizí. Jejich přítomnost v organismu stimuluje tvorbu protilátek, resp. navozuje imunitní odpověď.

Vzhledem ke své reakci může být antigen

- kompletní – **imunogen**, přímo stimuluje tvorbu protilátek (např. hormony o velké molekulární hmotnosti, proteohormony, inzulin), nebo
- nekompletní – **hapten**, z něhož vznikne imunogen vazbou s makromolekulárním nosičem. Příkladem jsou steroidní hormony.

Imunogen je charakterizován dvěma vlastnostmi. Jsou to:

- **imunogenicita**, neboli schopnost navodit imunitní odpověď (tvorba protilátek, zapojení regulačních a výkonných lymfocytů), a
- **specifita**, tj. schopnost reagovat s protilátkami. Imunogen reaguje jen s protilátkami, jejichž tvorbu vyvolal.

Každý imunogen se skládá z makromolekulárního nosiče a nízkomolekulárních determinantních skupin, tzv. antigenních determinant neboli **epitopů**. Antigenní determinanta je tvořena 5-8 aminokyselinami nebo monosacharidovými jednotkami, které se strukturálně nacházejí blízko u sebe. Různé antigeny obsahují různé antigenní determinanty a změna jedné aminokyseliny nebo monosacharidu dává vznik protilátce se zcela odlišnými vlastnostmi. Schopnost protilátek rozlišovat i malé rozdíly epitopů je základem specifity imunitních reakcí.

Imunogen musí splňovat určité fyzikální, chemické a biologické vlastnosti.

Z fyzikálních vlastností je to zejména

- relativní molekulová hmotnost $> 10\,000$,
- rozpustnost
- přítomnost elektrického náboje
- tvar molekuly (konformační struktura)
- dostupnost epitopů.

Z chemického hlediska mohou být imunogeny prakticky všechny biopolymery nacházející se v živých systémech stejně jako řada syntetických antigenů. K nejsilnějším imunogenům se řadí proteiny, následují polysacharidy. Čisté lipidy tvoří často pouze hapteny, jejich imunogenicita stoupá vazbou s proteiny nebo polysacharidy.

Z biologických vlastností je třeba zmínit především **genetickou vzdálenost**. Čím větší bude rozdíl mezi zdrojem antigenu a příjemcem, tím větší bude jeho imunogenicita.

Charakteristika imunoanalytických metod

Předností imunoanalytických metod je jejich **vysoká citlivost a přesnost**, dovolující v různých biologických materiálech běžně stanovovat látky obsažené v koncentracích řádově $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ až $10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$ a to většinou bez předchozí úpravy vzorků

Existuje několik možností a kritérií, podle nichž lze imunoanalytické metody dělit a charakterizovat:

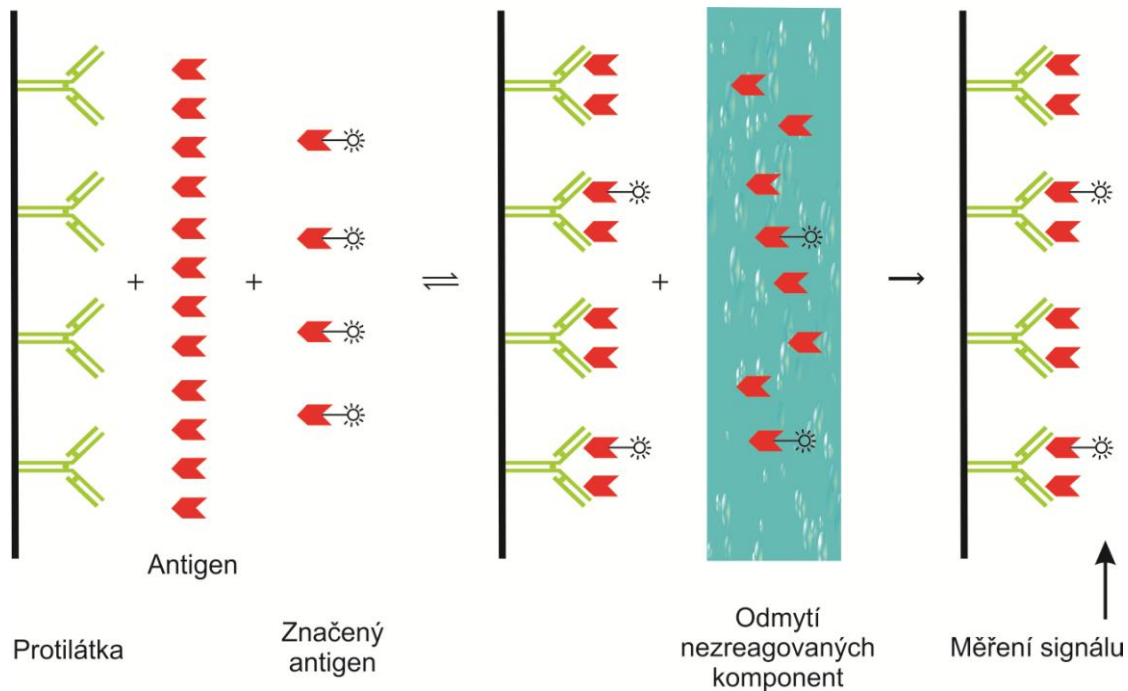
- podle základního metodického principu – **kompetitivní** a **nekompetitivní** metody,
- podle nutnosti separace volné a vázané frakce indikátoru – **heterogenní** a **homogenní** metody,
- podle druhu použitého indikátoru a způsobu detekce.

Kompetitivní a nekompetitivní metody

V případě **kompetitivních metod** je specifická protilátka (Ab) v reakci přítomna v omezeném množství. O její vazebná místa soutěží (kompetují) značený antigen (Ag^*) v nadbytku a stejný, avšak neznačený antigen (Ag), který je přítomen v analyzovaném vzorku a jehož množství stanovujeme. Dochází k saturaci vazebných míst protilátky oběma antigeny:



Graficky je kompetitivní imunoanalýza znázorněna na Obrázku 4.

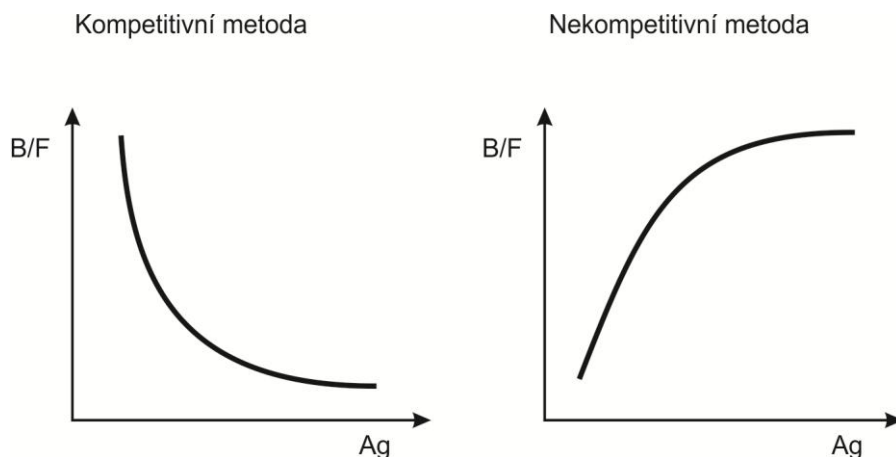


Obrázek 4. Princip kompetitivní imunoanalýzy.

Při praktickém provádění této metody se do všech reakčních zkumavek pipetují konstantní množství protilátky a značeného antigenu; množství antigenu je vždy větší než množství protilátky. Množství protilátky je proto nedostačující k navázání všech přítomných molekul antigenů. Výsledkem reakce je vznik dvou imunokomplexů, neznačeného (Ag-Ab) a značeného (Ag*-Ab). V reakční směsi zůstávají i antigeny nenavázané (Ag*, Ag), tj. volné. V rovnovážném stavu reakční směsi je množství vznikajícího značeného komplexu (Ag*-Ab) nepřímo úměrné množství přítomného neznačeného antigenu (Ag). Podíl značeného antigenu (indikátoru), vázaného na protilátku (množství značeného komplexu Ag*-Ab), se obvykle označuje jako vázaná frakce (B - “bound”). Jako volná frakce (F - “free”) se označuje množství nevázaného indikátoru Ag*. Pro kvantitativní vyhodnocení je nutná vzájemná separace obou frakcí, která se provádí různými fyzikálně-chemickými postupy. Po jejich oddělení je nutné změřit odezvu alespoň jedné z frakcí. Podle druhu použitého indikátoru je měřenou odezvou radioaktivita, absorbance, fluorescence, luminiscence apod.

Na základě analýzy kalibrátorů lze pak znázornit grafickou závislost měřené odezvy (např. poměrů B/F - osa y) na koncentraci antigenu (osa x) a tak sestavit kalibrační závislost (Obrázek 5). V případě kompetitivních metod získáme v lineárních souřadnicích křivku ve

tvaru hyperboly. Jestliže se za stejných podmínek jako kalibrátory analyzuje vzorek s neznámým obsahem antigenu, pak lze určit z kalibrační závislosti jeho koncentraci.



Obrázek 5. Charakteristické kalibrační závislosti u kompetitivních a nekompetitivních metod.

Kompetitivní metody jsou základem nejstarší imunoanalytické metody, radioimunoanalýzy (RIA).

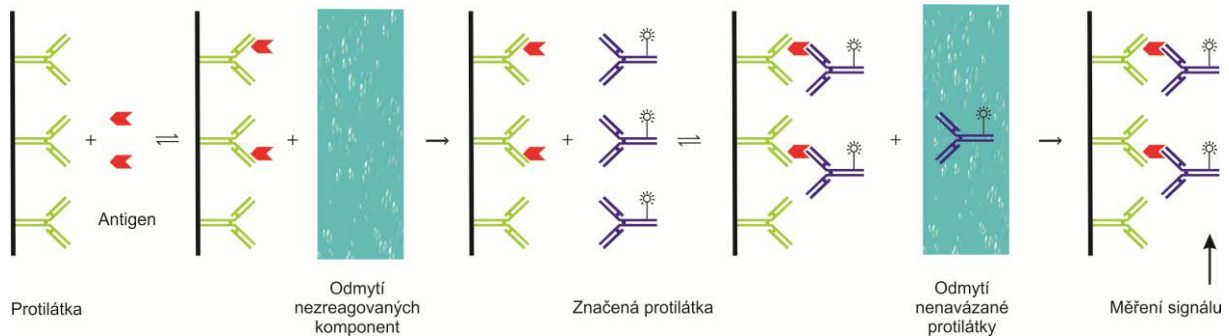
U **nekompetitivních metod** je specifická protilátka (Ab) v reakci přítomna v nadbytku. S ní reaguje stanovovaný antigen (Ag) a pro kvantifikaci slouží vhodně označená specifická protilátka (Ab*). Průběh lze opět zjednodušeně popsat vztahem:



Množství komplexu [Ag-Ab*] je tentokrát přímo úměrné množství stanoveného antigenu. Kalibrační závislost má stoupající charakter, který je v určitém rozsahu koncentrací více či méně lineární (Obrázek 5).

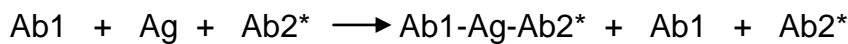
V praxi však není obvykle používán výše popsaný jednoduchý princip reakce. Jeho nejužívanější modifikací je tzv. **"two-site" imunometrická analýza** (Obrázek 6), kdy do reakce vstupují jako vazebné reagensy dvě specifické protilátky, obě jsou přítomné v nadbytku. Každá z nich je namířena proti jiné antigenní determinantě stanovovaného antigenu. Neznačená **protilátka (vychytávací** – „capture“) bývá zakotvena na stěnu reakční zkumavky nebo na jinou pevnou fázi (partikule, kuličky) a slouží k vychytání a připevnění

komplexu antigen-značená protilátka na tuto pevnou fázi, čímž podstatným způsobem usnadňuje separační krok metody. Druhá protilátka slouží jako indikátor průběhu reakce (**signální protilátka**).



Obrázek 6. Nekompetitivní „two site“ neboli „sandwichová“ imunoanalýza.

Schematicky je možno princip metody popsat pomocí vztahu:



I v tomto případě je množství indikátoru konstantní (tentokrát jím však je značená protilátka), a proměnlivé je množství stanovovaného antigenu (ve vzorcích nebo kalibrátorech). Obvykle se měří množství vzniklého značeného komplexu $[Ab1-Ag-Ab2^*]$, které, je přímo úměrné množství určovaného antigenu. Nezreagovaná (přebytečná) signální protilátka je po ukončení reakce odstraněna ze systému.

Nekompetitivní imunoanalytické metody jsou často označovány také jako metody imunometrické. V případě těchto metod našly velké uplatnění monoklonální protilátky.

V Tabulce 2 je shrnutí hlavních charakteristik kompetitivních a nekompetitivních metod.

Tabulka 2. Znaky kompetitivních a nekompetitivních metod.

	Kompetitivní	Nekompetitivní
Co je značeno indikátorem	Antigen	Protilátka
Antigen	Nadbytek	Omezené množství
Protilátka	V nedostatku	Nadbytek
Separace	Separáčn í činidla	Promytí
Automatizovatelnost	Složitá	Jednoduchá
Kalibrační křivka	Různé typy křivek	Přímka

Heterogenní a homogenní metody

Z principu imunoanalytických metod vyplývá, že je potřeba oddělit vzniklý komplex Ab-Ag (značený indikátorem) od ostatních substancí; v některých případech to však nutné není. Na základě toho dělíme metody na heterogenní a homogenní.

Heterogenní metody vyžadují separaci volné a vázané frakce indikátoru.

Obecně lze shrnout, že všechny využívané separační techniky by měly splňovat několik základních požadavků:

- kvantitativní oddělení obou frakcí tak, aby jedna (případně obě) mohly být měřeny,
- stejná účinnost pro kalibrátory i analyzované vzorky,
- dobrá opakovatelnost (tj. přesnost v jednom stanovení) i reprodukovatelnost (mezi jednotlivými analýzami), rychlost, jednoduchost, automatizovatelnost.

K separaci byla a je používána celá řada principů od původně relativně složitých metod používaných v počátcích imunoanalýzy) se metody neustále zjednodušovaly a stále i více automatizovaly.

V případě **homogenních metod** produkuje detekovatelný signál samotná imunochemická reakce, proto zde není potřeba separace volné a vázané frakce indikátoru. Výhodou oproti

heterogenním reakcím jsou kratší časy inkubace a jednodušší protokoly. Nevýhodou a omezením je, že se dají použít pro úzký okruh látek a metod a nedoznaly proto rozsáhlejšího použití.

Indikátory u imunoanalytických metod

Indikátory neboli **značky** jsou látky, které jsou navázány na jednu z komponent reakce (buď se využívá **značená protilátka**, nebo **značený antigen**) a slouží k detekci a/nebo kvantifikaci stanovení. Tyto látky jsou schopny buď samy o sobě produkovat detekovatelný signál, nebo jeho produkci zprostředkovaně vyvolat. Imunoreaktivita značené látky musí být identická s imunoreaktivitou látky neznačené.

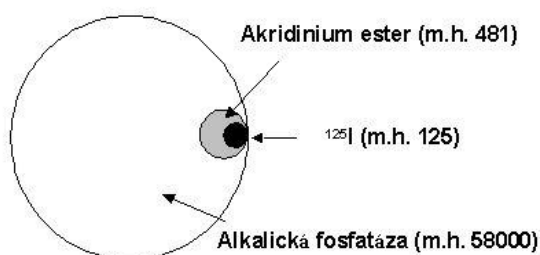
Indikátory lze rozdělit do dvou skupin, na **radioaktivní** a **neradioaktivní**.

Jako první indikátory byly v imunoanalýze používány substance značené vhodným radionuklidem. Nejčastějším radionuklidem využívaným k přípravě indikátorů pro účely radioimunoanalýzy je ^{125}I . Vedle něj se v praxi využívají i jiné radionuklidy, například ^3H , ^{12}C nebo ^{57}Co . Obecným požadavkem na radioindikátor je, aby byl radiochemicky čistý, tedy aby obsahoval radionuklid vázaný pouze v jedné chemické formě.

Později (ve snaze o získání stabilnějších indikátorů s vyšší specifickou aktivitou) byly ke značení využívány i neradioaktivní značky. Místo radionuklidů jsou používány především:

- enzymy
- látky, které přímo vykazují fluorescenci nebo luminiscenci
- enzymy, které katalyzují vznik takovýchto látek
- latexové částice
- molekuly, které tvoří volné radikály
- viry (bakteriofágy).

Tyto značky se však podstatně liší svou velikostí a tím i možným vlivem na imunoreaktivitu značeného indikátoru (Obrázek 6).



Obrázek 6. Relativní velikosti látek k přípravě indikátorů

Podle typu (neradioaktivního) indikátoru je volen optimální způsob detekce. Místo měření radioaktivity se tak užívá principů:

- kolorimetrie - měření absorpce světla roztokem zbarveným po proběhlé enzymatické reakci
- fluorometrie - měření fluorescence indikátorů nebo vzniklého produktu enzymatické reakce
- luminometrie - měření produkce světelných kvant luminiscenční reakce
- nefelometrie - měření rozptylu světelného záření na povrchu částic
- turbidimetrie - měření zeslabení světelného záření vlivem zákalu roztoku
- počítání částic - počítání částic určité velikosti poté, co proběhla imunochemická reakce.

V Kapitole 2 jsou u některých typů imunoanalytických metod blíže vysvětleny principy generování jejich signálu a detekce.

Kapitola 2 - Imunoanalytické metody a technologie

Kristián Šafarčík, Vladimír Bartoš, Jindra Windrichová

Izotopové metody

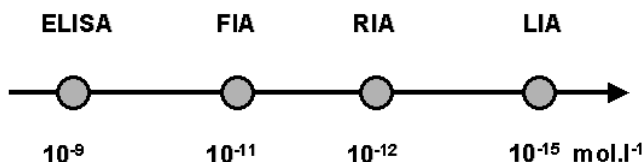
Jako **izotopové** (nebo **radioizotopové**) metody jsou označovány metody, u kterých je pro přípravu indikátoru imunochemické reakce použit vhodný radionuklid některého prvku.

Základní principy uplatňované u tohoto typu imunoanalýz jsou odpovídající modifikací těch variant, které byly zmíněny v obecné části o imunoanalytických metodách. Pro kompetitivní metody používáno označení "**radioimunoanalýza**" - **RIA**. Pro nekompetitivní metody bylo zavedeno označení "**imunoradiometrická analýza**" a zkratka **IRMA**.

Postupem času byly vyvíjeny a aplikovány i jiné principy generování a detekce signálu, potřebného pro kvantifikaci imunoanalytických metod, které nevyužívaly radioizotopy a měření radioaktivity. Zavádění neizotopových technik bylo často zdůvodňováno především snahou vyhnout se používání radionuklidů, které jsou obecně potenciálně ekologicky škodlivé a navíc ohrožují do určité míry laboratorní pracovníky radiační zátěží. Je však nutno konstatovat, že se ani některé neizotopové metody neobejdou bez užití potenciálně kancerogenních, nebo jinak nebezpečných látek. Při splnění obecných podmínek pro práci s otevřenými zářiči a likvidaci radioaktivních odpadů není riziko plynoucím z práce s radionuklidy zásadně větší než při práci s neizotopovými metodami, a je převyšováno rizikem plynoucím z práce s potenciálně infekčním materiálem (infekce HBV, HCV, HIV). Obdobně přístrojové vybavení je zhruba stejně drahé.

Zásadním přínosem izotopových metod je jejich ekonomická výhodnost a také fakt, že pro rutinní stanovení některých analytů alternativní neizotopové metody nejsou k dispozici.

Naopak přínosem některých neizotopových imunoanalýz je skutečnost, že dosahují lepší citlivosti stanovení (Obrázek 7). Byla využita celá řada látek, které teoreticky dosahují vyšší citlivosti detekce než je měření radioaktivity a látky používané pro značení mohou generovat větší množství signálu. Podstatnou výhodou neizotopových imunoanalýz je možnost jejich snazší automatizace.



Obrázek 7. Charakteristické citlivosti imunoanalytických metod. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay, FIA = fluorescenční imunoanalýza, RIA = radioimunoanalýza, LIA = Luminiscenční imunoanalýza.

Neizotopové metody

Enzymová imunoanalýza (EIA)

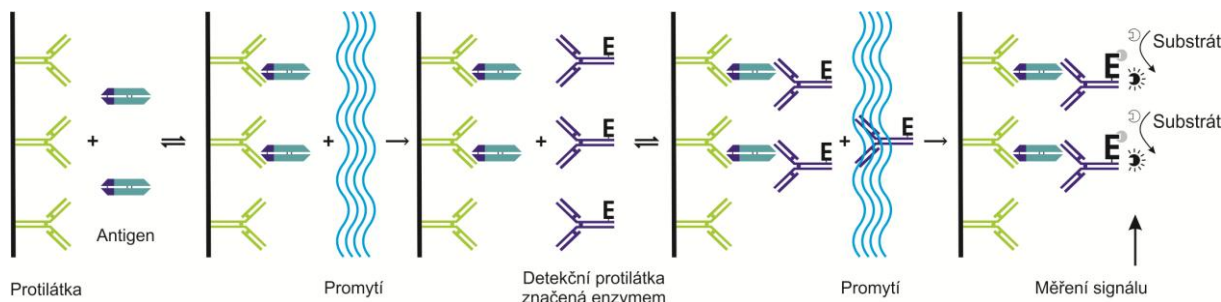
Enzymová imunoanalýza využívá jako indikátor enzym. Enzym je chemicky (kovalentně) vázán buď na antigen, nebo protilátku – vznikne **enzymový konjugát**. Uspořádání je možné jak kompetitivní, tak nekompetitivní. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Stanovuje se pak spektrofotometricky (viz chromogenní substrát), nebo na základě fluorescence (fluorimetrické stanovení). Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku.

Heterogenní enzymové imunoanalýzy

Po proběhnutí imunochemické reakce (inkubaci) je z reakční směsi obvykle odstraněna volná frakce indikátoru většinou s využitím pevné fáze. Následuje přidavek enzymového substrátu a po pevně určené době je reakce mezi enzymem a substrátem zastavena (např. přidáním "stop" činidla) a spektrofotometricky je měřeno zeslabení monochromatického světla roztokem. Pomocí kalibrační křivky lze poté odečítat koncentrace analyzovaných vzorků.

Nejnámější heterogenní enzymovou imunoanalýzou je **ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assai)**. Existuje mnoho variant této metody, společným znakem je zakotvení (adsorpce nebo kovalentní navázání) antigenu nebo protilátky na nerozpustný nosič (často povrch reakční nádoby nebo mikrotitrační destičky), což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul. Nekompetitivní **sendvičová ELISA** je běžně používaná pro stanovení antigenů s více než jednou antigení determinantou, **capture ELISA** se využívá pro stanovení protilátek.

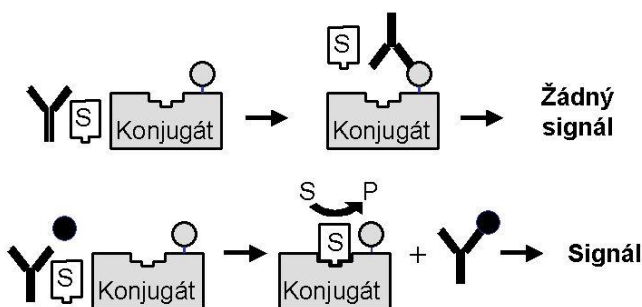
Na Obrázku 8 je schematicky znázorněna sendvičová ELISA.



Obrázek 8. Schéma sendvičové metody ELISA.

Homogenní enzymové imunanalýzy

Využívají efekty, při kterých dochází ke změně aktivity enzymu v imunokomplexu. Příkladem může být **stínění aktivního místa enzymu** - situace, kdy je vlivem stérických podmínek během imunochemické reakce ovlivněna aktivita enzymového konjugátu a tím i rychlost přeměny enzymového substrátu na produkt. Vzorek obsahující stanovovanou látku je v reakční směsi smíchán s indikátorem, kterým je konjugát vhodného enzymu se stanovovaným antigenem. V kompetitivní reakci pak spolu oba soutěží o limitované množství vazebných míst protilátky. Část enzymového konjugátu zůstává volná (její množství je závislé na množství stanovované látky v analyzovaném vzorku) a může tak reagovat se substrátem. Frakce konjugátu navázaná na protilátku pak, vzhledem k zastínění aktivního centra enzymu, enzymovou aktivitu nevykazuje (Obrázek 9).



Obrázek 9. Homogenní enzymová imunanalýza - stínění aktivního místa enzymu. S = substrát, P = produkt

Enzymová aktivita je tedy tím vyšší, čím větší je množství stanovovaného antigenu v analyzovaném vzorku, protože na protilátku se ho naváže více a naopak v nenavázané formě

zůstane více enzymového konjugátu. Enzymová aktivita v reakční směsi je tedy přímo úměrná množství analyzovaného antigenu.

Z hlediska provedení jsou homogenní EIA jednoduché, avšak mnohem méně citlivé než metody heterogenní. Užívají se ke stanovení nízkomolekulárních látek (léků, hormonů a metabolitů). Příkladem je metoda **CEDIA** (Cloned Enzyme Donor Immunoassay) nebo **EMIT** (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), využívané např. v toxikologii.

Enzymové konjugáty

Klíčovým problémem EIA je právě příprava vhodných enzymových konjugátů, tedy látek, kde je enzym chemicky vázán na stanovovaný antigen nebo protilátku. Základní podmínkou úspěšné EIA je rovněž výběr vhodného enzymu, který musí splňovat řadu obecných podmínek:

- musí mít vysoké číslo přeměny,
- aktivita enzymu musí být přesně a snadno měřitelná
- enzym musí zachovávat enzymovou aktivitu po vazbě na antigen nebo protilátku (heterogenní EIA), nebo enzymová aktivita musí být výrazně modulována vazbou konjugátu na protilátku (homogenní EIA)
- enzym musí být snadno dostupný
- enzym se nesmí vyskytovat v tělní tekutině, ve které je prováděno vyšetření

U homogenních EIA se jako enzymy používají například glukozo-6-fosfátdehydrogenáza nebo malátdehydrogenáza. Nejčastěji používanými enzymy v heterogenní EIA jsou křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza.

Jak fungují enzymy v EIA

Křenová peroxidáza katalyzuje reakci peroxidu vodíku s vhodným substrátem, který se oxiduje na barevný produkt. Substráty jsou například TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidin), ABTS (2,2' azino-bis-(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonát) nebo OPD (o-fenylendiamin).

Alkalická fosfatáza v enzymatické reakci štěpí esterickou vazbu kyseliny fosforečné (např. štěpí bezbarvý para-nitrofenylfosfát na žlutý para-nitrofenol, fotometrická detekce při 420 nm). Štěpením umbelliferylfosfátu vzniká umbelliferon, který fluoreskuje a dá se měřit fluorometricky.

Detekce enzymatických imunoanalýz

Kolorimetrická (fotometrická) detekce je nejrozšířenější typ detekce u klasických enzymoimunoanalýz. Principem detekce je zeslabení intenzity světelného toku monochromatického světla zbarveným roztokem produktu enzymatické reakce. Přístroje pro měření absorbance se nazývají spektrofotometry.

Nefelometrická detekce využívá enzym lysozym a jako substrát peptidoglykany. Jako substrátu bylo využito fragmentů buněčných stěn bakterií *Micrococcus luteus*. Paprsek monochromatického světla (např. laserového zdroje) je rozptylován tzv. Faraday-Tyndalovým jevem v zakaleném roztoku částic. Míra rozptylu světla je úměrná množství částic, tedy aktivitě enzymu. Moderní nefelometry jsou vybaveny laserovými zdroji přísně monochromatického světla, což zjednodušuje další konstrukci přístrojů.

Fluorometrická detekce umožňuje dosažení vyšší citlivosti při použití stejného enzymu, například díky opakovanému generování signálu v krátkém časovém úseku. Dosahovaná citlivost metody je ovšem omezena fluorescenčním pozadím biologického materiálu v reakční směsi. To je způsobeno přirozenou fluorescencí séra nebo plazmy (vlivem přítomnosti sérových proteinů, nebo NADH a bilirubinu). Detekce emitovaného světelného záření může být poznamenána i zhášením fluorescence vlivem přítomností některých molekul, které absorbují záření (excitační nebo emitované).

I v homogenních EIA byly využity fluorogenní substráty. Např. redukcí vzniklý NADH emituje fluorescenční záření mezi 450 až 470 nm.

Tento nebo obdobný princip detekce je využíván v celé řadě analytických systémů, například technologie MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) na analyzátoch IMx a AxSYM firmy Abbott (Obrázek 10).



Obrázek 10. Přístroj AxSYM (Abbott Laboratories)

Luminometrická detekce je odvozena od principu bioluminiscence, spojené s enzymatickou reakcí. V tomto případě se však jedná o chemiluminiscenci, kdy je světelné záření produkováno vlivem průběhu chemické reakce iniciované působením enzymu. V praxi jsou i pro tyto účely nejpoužívanějšími enzymy alkalická fosfatáza a křenová peroxidáza. Pro první z nich jsou jako substrát využívány např. látky na bázi adamantyl 1,2 dioxetan arylfosfátů. Ty po odštěpení fosfatové skupiny vytvářejí nestabilní anion, který se stabilizuje vyzářením světla. Tento princip je využíván například u analyzátorů řady IMMULITE firmy DPC nebo analyzátorů Access[®] firmy Beckman Coulter Inc. (Obrázek 11).



Obrázek 11. Přístroj Access[®] (Beckman Coulter Inc.)

Při použití enzymu křenové peroxidázy, dochází v přítomnosti peroxidu vodíku k oxidaci luminolu. Při reakci je však produkce světelného záření slabá. Byla ale objevena řada látek, které zesilují a prodlužují produkci světelných kvant této oxidační reakce. Takovým

zesilovačem je např. luciferin nebo benzthiazoly, které mají ještě vyšší kvantové výtěžky. Reakce dává s použitím těchto zesilovačů kontinuální výstup světelného signálu. Signál tak může být měřen i s časovým odstupem. Tyto metody jsou pak označovány jako **zesílená chemiluminiscence**, "enhanced chemiluminescence". Tento systém byl propracován firmou Amersahm a byl dodáván na trh pod označením Amerlite. Nyní tento princip využívá analyzátor Vitros ECI firmy Ortho-Clinical Diagnostics (Obrázek 12).



Obrázek 12. Přístroj Vitros ECI (Ortho-Clinical Diagnostics).

Luminiscenční imunoanalýza

Luminiscence

Luminiscence je fyzikální jev, kdy látka, označovaná jako luminofor, je schopná produkovat světelné záření. Toto generování světelných záblesků je obvykle iniciováno změnou vnějších podmínek (pH, teploty, elektrického potenciálu apod.), která ovlivní fyzikálně-chemické vlastnosti některých molekul luminoforu. Dříve stabilní látka se tak dostane do energeticky nestabilního stavu s přebytkem vnitřní energie, kterou samovolně uvolňuje vyzářením elektromagnetického záření o vlnové délce v oblasti viditelného světla. Tímto procesem se molekula látky opět stabilizuje, i když v pozměněné podobě.

K měření luminiscence slouží přístroje nazývané luminometry. Jak vyplývá z podstaty jevu, nevyžaduje měření luminiscence žádný excitační zdroj záření, měří se pouze světlo produkované luminoforem.

Jako **luminoimunoanalytické** metody lze označit ty metody, u kterých je pro značení indikátoru imunochemické reakce použit luminofor. Jak bylo uvedeno výše, jsou však mezi luminoimunoanalýzy často zahrnovány rovněž enzymové imunoanalýzy s luminometrickou detekcí. Imunoanalýzy zakončené detekcí luminiscenčního záření lze tedy rozdělit na dvě kategorie:

- enzymové imunoanalýzy se substrátem produkujícím luminiscenční záření
- imunoanalýzy s luminiscenčním indikátorem

Základní principy uplatňované u LIA jsou modifikací těch, které byly zmíněny v obecné části o imunoanalytických metodách. Z hlediska použitého luminoforu je možno LIA metody rozdělit na metody bioluminiscenční a chemiluminiscenční.

Bioluminiscenční metody

Bioluminiscenční metody používají luminofory biologického původu. Vzhledem k tomu, že většinou využívají k inicializaci enzymatické reakce, je možno zařadit je mezi EIA s luminiscenční detekcí.

Chemiluminiscenční metody

Chemiluminiscenční metody využívají jako luminofory různé látky, které jsou k produkci světelného záření iniciovány na základě průběhu chemické reakce. Produkce světla chemickou reakcí je časově omezena a je proto nezbytné, aby měření proběhlo v určitém definovaném okamžiku.

Mezi látky, které vykazují luminiscenci, patří např. již zmíněný luminol, izoluminol, lucigenin, sulfonamidy nebo estery akridinových barviv. Luminiscence umožňuje detekci látek v koncentraci do 10^{-18} mol.L⁻¹. V praxi je tento princip uplatněn v analyzátoru ACS:180 původní firmou Ciba Corning, nyní je dodáván firmou Bayer ve variantě ACS:180 SE nebo automat ADVIA Centaur a systému Architect firmy Abbott Laboratories (Obrázek 13).



Obrázek 13. Přístroj Architect (Abbott Laboratories).

Elektrochemiluminiscenční metody

K vybuzení chemiluminiscence indikátoru je u těchto metod používán elektrický impuls. Příkladem může být indukce luminescence rutheniových iontů, komplexně vázaných v tris(bipyridylu), která probíhá na povrchu platinové elektrody. Molekulová hmotnost rutheniového komplexu (pod 1 kDa) umožňuje přípravu indikátoru, který neovlivňuje interakci protilátka-antigen. Tento princip využila například firma Roche Diagnostics u svých analyzátorů řady Elecsys® nebo Modular® (Obrázek 14).



Obrázek 14. Přístroj Elecsys® (Roche Diagnostics).

Fluorescenční imunoanalýza

Fluorescence a její detekce

Fluorescence je fyzikální jev, kdy látka - fluorofor - je schopna absorbovat energii dodávanou ve formě elektromagnetického záření, (tzv. excitační záření), a následně vyzařovat elektromagnetické záření o jiné vlnové délce (emisní záření). Energetická spektra excitačního i emisního záření úzce souvisí se základní strukturou látky, přičemž emisní spektrum je posunuto do oblasti vyšších vlnových délek než spektrum excitační. Fotony absorbované souborem molekul jsou totiž z části degradovány na tepelnou energii, z části jsou vyslány jako fotony o nižší energii (vyšší vlnové délce), než jakou měl foton původní. Rozdíl maxim excitačního a emisního fluorescenčního spektra se nazývá Stokesův posun. Podíl počtu emitovaných fotonů k počtu fotonů absorbovaných se nazývá kvantový výtěžek fluorescence (n) a může nabývat hodnot $0 - 1$.

Požadavky na fluorescenční indikátor vhodný pro použití ve FIA lze shrnout do tří podmínek:

- vysoká molární absorpance
- vysoký kvantový výtěžek
- velký Stokesův posun

Nejužívanějším fluorescenčním indikátorem je fluorescein. Excitační maximum má při 490 nm a emisní maximum při 520 nm. Některé sérové komponenty, (např. albumin-bilirubinový komplex), při těchto vlnových délkách interferují. Interference při měření biologických materiálů se mohou silně projevit také rozptylem záření nebo jeho zhasením. Proto je měření fluorescence silně ovlivňováno prostředím, ve kterém se provádí. Klasická fluorescence vykazuje po krátkém excitačním osvitu určitou dobu dosvitu fluorescenčního signálu, která je rozdílná pro různé látky. Tento fluorescenční dosvit se u látek běžně vyskytujících v séru pohybuje v rozmezí 1 – 20 ns. U běžně používaných fluorescenčních indikátorů se pohybuje rovněž v řádu nanosekund (fluorescein 4,6 ns). Emisní spektra z různých fluorescenčních zdrojů séra tak mohou interferovat s emisním spektrem indikátoru nejen vzhledem k podobné vlnové délce svých píků, ale překrývají se rovněž časově a nedají se prakticky rozlišit.

Zcela zásadní přínos pro měření fluorescence má technika zvaná časově modulovaná detekce fluorescence (“time resolved fluorescence measurement“ - **TR fluorescence**), založená na použití nových fluorescenčních indikátorů - lanthanidových chelátů - zejména europia, samaria, terbia nebo thulia. Jejich zavedením se podařilo překonat problém fluorescenčního pozadí média, ve kterém se fluorescence měří. Jedná se o indikátory s velmi dlouhou fluorescencí, přičemž její detekce je časově modulovaná. Krátký světelný impuls ze světelného zdroje (xenonové výbojky) nebo pulzního laseru slouží jako excitační zdroj a fluorescence je pak měřena s určitým časovým odstupem.

Dosvit fluorescenčního indikátoru na bázi chelátů vzácných zemin je mezi 10 – 1000 μ s. Excitační spektrum má velmi široký pík, emisní pík pak velmi úzký. Navíc Stokesův posun proti běžným fluorescenčním indikátorům je mnohem větší, pík emisního spektra je posunut až do červené oblasti viditelného spektra. Měření fluorescence, po časové prodlevě v intervalu 400 až 800 μ s po osvit, oddělí parazitní fluorescenci sérových komponent, které mají podstatně kratší dosvit. Excitační osvit se opakuje tisíckrát za sekundu. Problematikou TR fluorescence a její aplikací v imunoanalýze s využitím lanthanidových chelátů jako indikátorů se velmi široce zabývala firma Wallac (ve spojení s firmami LKB a Pharmacia). Byl vyvinut imunoanalytický systém DELFIA, později využitý i u automatického analyzátoru AutoDELFIA. Tímto systémem lze možno v běžné reakční směsi detekovat koncentrace 10^{-17} mol.L⁻¹ Eu³⁺, což vysoce převyšuje detekční mez běžných fluorescenčních měření bez časové modulace (10^{-11} - 10^{-12} mol.l⁻¹).

Imunoanalýzy s detekcí emisního fluorescenčního záření lze opět rozdělit na dvě kategorie:

- enzymové imunoanalýzy se substrátem produkujícím fluorescenční záření
- imunoanalýzy s fluorescenčním indikátorem

Základní principy uplatňované u FIA jsou modifikací těch, které byly zmíněny v obecné části o imunoanalytických metodách.

Heterogenní fluoroimunoanalýza

Výhodou heterogenních metod je oddělení sérové komponenty reakční směsi před měřením fluorescence, což zlepšuje odstup signálu od šumu a zlepšuje tím citlivost metody. Mohou být realizovány jak v kompetitivním, tak v nekompetitivním uspořádání. Jako pevné fáze pro

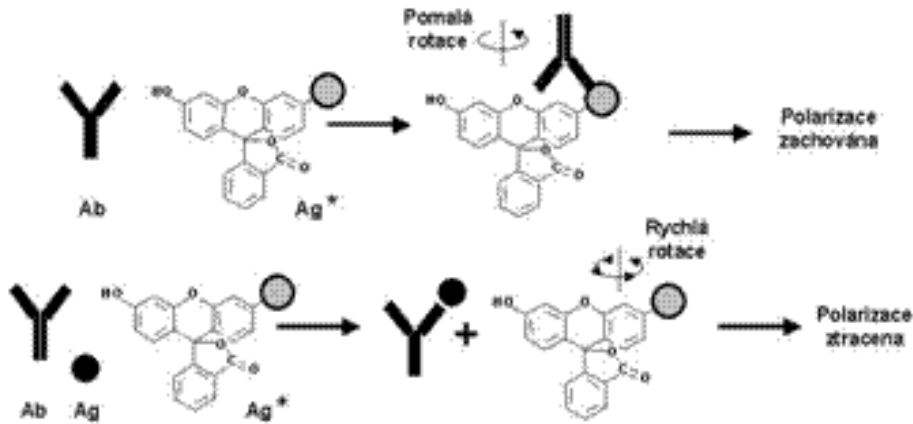
separaci jsou užívány např. polyakrylamidové kuličky, na něž jsou kovalentně vázány příslušné specifické protilátky nebo antigeny. Specifická hustota kuliček je blízká jedné i refrakční index je blízký indexu vody, a proto rozptyl světla na nich je zanedbatelný. Prakticky se stanovení provádí smícháním vzorků séra s antigenem značeným (např. fluoresceinem nebo 7-hydroxykumarinem) a přidáním ke kuličkám s navázanou protilátkou. Po inkubaci a oddělení volné frakce se kuličky resuspendují v pufru a měří se fluorescence.

Homogenní fluoroimunoanalýza

Jedním z příkladů této realizace imunoanalytických metod je **Fluorescence Polarization Immunoassay – FPIA** (Obrázek 15). Tato kvantitativní analytická metoda využívá kombinace dvou principů - kompetitivní imunochemické reakce mezi stanovovaným analytem a vhodným indikátorem o vazebná místa na specifické protilátce a měření vertikálně polarizovaného fluorescenčního záření emitovaného po excitaci vzorku rovněž polarizovaným světlem.

Tato technologie je použitelná pro určení koncentrace malých molekul. Ty se totiž v roztoku otáčejí velkou rychlostí. Pokud je molekula označena vhodnou fluorescenční látkou (fluoresceinem) a je excitována polarizovaným světlem vhodné vlnové délky, emituje fluorescenční záření do mnoha směrů. Detekce ve stejné polarizované rovině naměří jen malou část fluorescence. Pokud tato malá molekula obsadí vazebné místo na protilátce, dojde k vytvoření komplexu (velké molekuly), která se otáčí pomalu, což má za následek zvýšení fluorescence detekované v polarizované rovině.

V kompetitivním uspořádání metoda poskytuje možnost stanovit koncentrace analytu bez nutnosti separace volné a vázané frakce fluorescenčního indikátoru. Postup byl vyvinut firmou Abbott a je využíván v přístrojích TDx, IMx nebo AxSYM.



Obrázek 15. Princip kompetitivní FPIA

Mezi nejpokročilejší technologie homogenní imunoanalýzy patří technologie **TRACE** (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) vyvinutá firmou CIS. Jako fluorescenční indikátory se používají kryptáty vzácných zemin, které vykazují dlouhotrvající fluorescenci v řádu 10 - 1000 μ s, což umožňuje použití časově modulované detekce fluorescence. Ion europia (Eu^{+3}) je inkorporován do kavity makropolycyklické sloučeniny (trisbypyridine diaminu). Tato sloučenina je velmi stabilní a vykazuje výhodné fluorescenční vlastnosti. Sloučeninu je možno excitovat světlem vlnové délky 307 nm, přičemž emisní spektrum vykazuje píky i v oblasti červeného světla (od 550 do 720 nm).

Pro praktické provádění imunoanalýz využívajících princip homogenní FIA byl vyvinut analyzátor KRYPTOR dodávaný firmou B.R.A.H.M.S.

Multiplexové metody

Multiplexové měření – tedy simultánní měření více analytů - je logickým řešením pro popis komplexních fyziologických a patofyziologických dějů, kde nezáleží pouze na absolutní koncentraci jednotlivých členů, ale na poměrech agonistů a antagonistů, faktorů a jejich inhibitorů. Příkladem velmi komplexních regulací jsou cytokiny a růstové faktory. Cílem multiplexových analýz je

- popis zastoupení jednotlivých proteinů (deskriptivní proteomika),
- studium vzájemných vztahů proteinů,
- vyhledávání a validace biomarkerů,
- vyhledávání cílů terapie a
- klinická diagnostika.

Přínosem multiplexového typu měření je

- finanční efektivita,
- redukce potřebného času a práce pro analýzy,
- snížení objemu vzorku a
- validita dat při porovnávání poměrů hladin jednotlivých proteinů.

Multiplexové analytické technologie v oblasti proteinů jsou založeny na třech principech:

- imunoanalýza,
- separační technologie (chromatografie nebo 2D elektroforéza) a
- hmotnostní spektrometrie

nebo na jejich kombinacích.

V následujícím textu se budeme zabývat pouze multiplexovými přístupy založenými na imunoanalytických postupech. Představené technologie mají sloužit jako přehled principů, zvláštní pozornost je věnována technologii xMAP. Konkrétní chemikálie, reagenty a přístroje jsou dosažitelné od mnoha výrobců, jejich spektrum se stále vyvíjí a nejsou zde proto uváděny. Multiplexové měření je dnes nedílnou součástí mnoha výzkumů a v některých oblastech se začíná uplatňovat i v klinické rutinní praxi.

Multiplexové technologie	Cena	Náročnost	Mezilaboratorní srovnatelnost výsledků	Proteom	Genom a transkriptom	Sledování biologicky aktivních lipidů
Tandemová MS + HPLC nebo CZE	😊	😊	😊	😊	😊	😊
Mikročipy planární microarraye	😊	😊	😞	😊	😊	😞
xMAP technologie Luminex	😊	😊	😊	😊	😊	😞

Obrázek 16. Srovnání několika typů multiplexových metod.

Planární mikroarraye – proteinové čipy

Proteinové čipy se vyvinuly z technologií připravených původně pro analýzu DNA. Protilátky nebo antigeny jsou naspotovány na planární povrch – silikonových čipů nebo skleněných sklíček s nitrocelulózovou membránou (FAST slides). Čipy jsou tedy prostorově uspořádané reagenty na pevném povrchu, v případě imunoanalýzy obsahuje každá oblast neboli spot definovanou protilátkou (antibody microarrays) nebo antigenem. Přesná pozice (spot) specifické protilátky/antigeny na čipu definuje typ analytu, který je stanovován. Studované proteiny jsou kvantifikovány díky různým principům vytvářejícím signál a jeho zesílení – kolorimetricky, radioaktivitou, fluorescencí, chemiluminiscencí, enzymovými reakcemi atd. – a intenzita signálu je měřena určeným typem scanneru nebo kamery. Vyhodnocení vyžaduje speciální software, který vyhodnotí intenzitu signálu v daném spotu a porovná ji s kalibrační křivkou, pozitivní a negativní kontrolou popř. alespoň s ostatními spoty na čipu.

Čipové technologie můžou být rozděleny podle jejich filozofie přístupu:

- přímé technologie (forward phase arrays),
- reverzní technologie

- čipy pro studium proteinových interakcí.

Na čípech přímé technologie je inkubován vždy jeden vzorek na čipu, takže může být současně stanoveno větší množství proteinů. Na reverzních čípech je imobilizováno větší množství různých vzorků. V jednom kroku tak může být stanoven jeden konkrétní protein ve velkém množství vzorků zároveň. Tato technika je také používána s malými kousky tkání nebo kousků tkání získaných mikrodisekcí.

Arraye na mikrotitračních destičkách

Jsou přímou modifikací ELISové technologie. V každé jamce destičky je na dně naspotováno až několik specifických protilátek, které vyváží sledované proteiny ze vzorku proteiny a na principu sandwichové reakce je umožněna chemiluminiscenční nebo fluorescenční detekce. Zástupcem je např. Thermo Scientific SearchLight Protein Array technologie, která umožňuje z 50 μl vzorku zachytit až 16 různých analytů, které jsou detekovány přidáním biotinylované protilátky, následované přidáním křenové peroxidázy a chemiluminiscenčního substrátu. Produkce světla je detekována CCD kamerou a analyzována pro každý spot speciálním softwarem.

Multiplexové reakce na mikrokuličkách (Bead Arrays)

Mikrokuličky jsou velmi zajímavou alternativou k planárnímu uspořádání čipů. Používají detekci průtokovou cytometrií a jsou vhodné především pro projekty, kde je již studováno menší množství proteinů – tedy pro studie více cílené než studie na proteinových čípech. Výstupem těchto stanovení je skutečně kvantitativní určení koncentrace proteinu, na rozdíl od čipů, kde jsou výsledky často pouze kvalitativní nebo semikvantitativní.

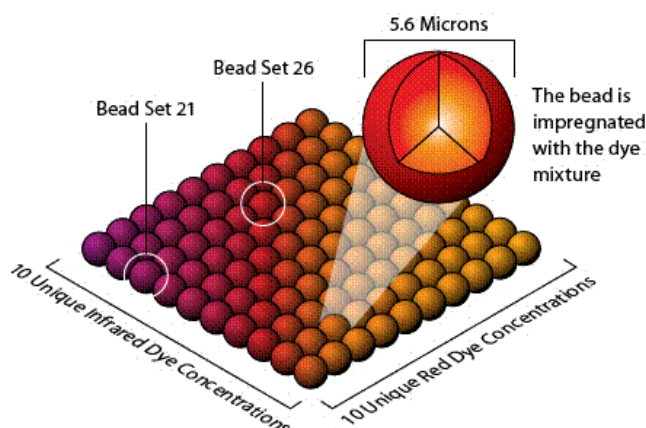
Technologie FlowCytomix

Technologie Flow Cytomix je založena na sadě mikrokuliček o dvou velikostech (4 μm & 5 μm). Každá ze dvou velikostí mikrokuliček je dále rozlišena různými intenzitami fluorescenčního barviva. Na každé sadě mikrokuliček je navázána specifická protilátka, druhá protilátka je značená fykoerytrinem. Měření probíhá na běžném průtokovém cytometru a data

se vyhodnocují speciálním programem. Toto uspořádání umožňuje stanovit zároveň koncentrace 20 analytů.

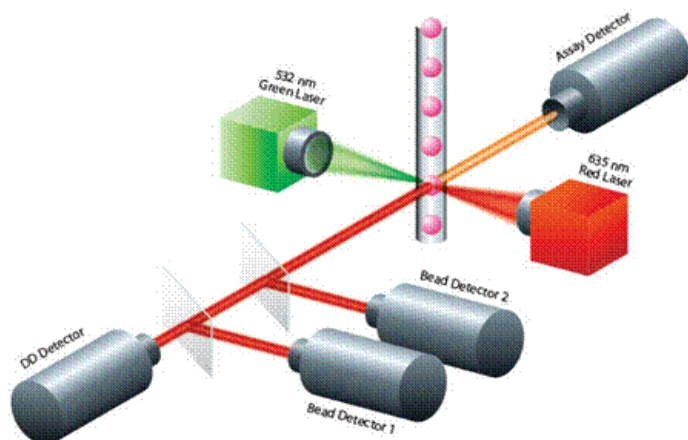
Technologie xMAP

Multi-analyte profiling technologie (xMAP) je založena na sadě 5,6 μm polystyrenových mikrokuliček. V této sadě je 100 populací mikrokuliček, které se liší vnitřním spektrálním kódem vytvořeným kombinací dvou fluorescenčních barviv v různém poměru. Multiplexová analýza je založena na specifických protilátkách navázaných na jednotlivé populace mikrokuliček. Protože jsou mikrokuličky rozlišené spektrálním kódem, mohou být kombinovány v analýze a umožňují tak stanovení teoreticky až 100 analytů v jedné reakční jamce. Množství stanovovaného proteinu je určeno na základě druhé protilátky značené fluorescenční molekulou. Reakce tedy probíhá na principu sendviče.



Obrázek 17. Rozlišení mikrokuliček pro technologii xMAP. Zdroj: www.panomics.com.

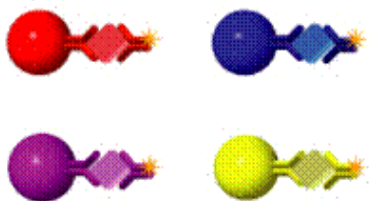
Měření probíhá na speciálním průtokovém cytometru - přístroj Luminex. Mikrokuličky z reakční jamky jsou nasáty do přístroje, kde protékají v nosném proudu jedna za druhou mezi dvěma lasery. Fluorescenční signál po excitaci prvním laserem určuje spektrální kód kuličky – tedy druh měřeného analytu – a fluorescenční signál po excitaci druhým laserem určuje množství druhé protilátky, tedy množství analytu.



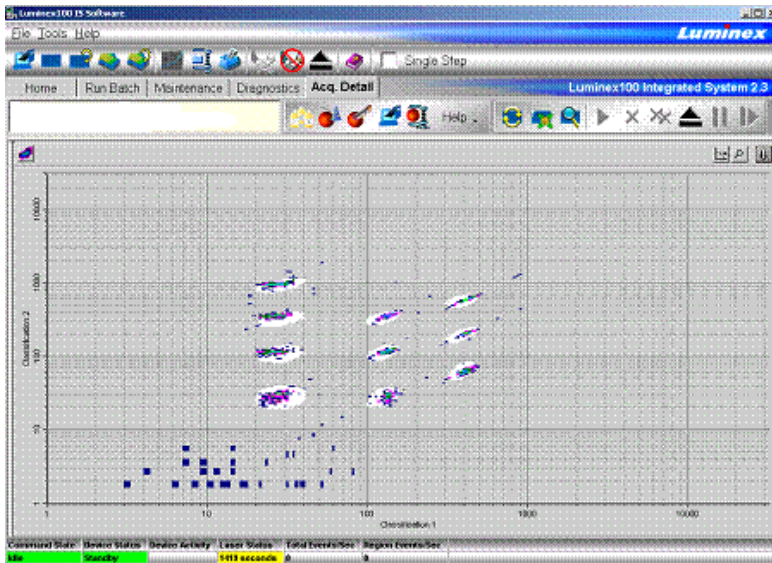
Obrázek 18. Princip xMAP měření. Zdroj: www.panomics.com.

Pro imunochemickou reakci se používají mikrodestičky s filtračním dnem. Nenavázané látky se z reakce odmyývají dnem destičky přes filtry, které udržují mikrokuličky s navázanými proteiny v jamce. Koncentrace jednotlivých analytů je vypočtena na základě kalibračních křivek zkonstruovaných pro každý měřený protein.

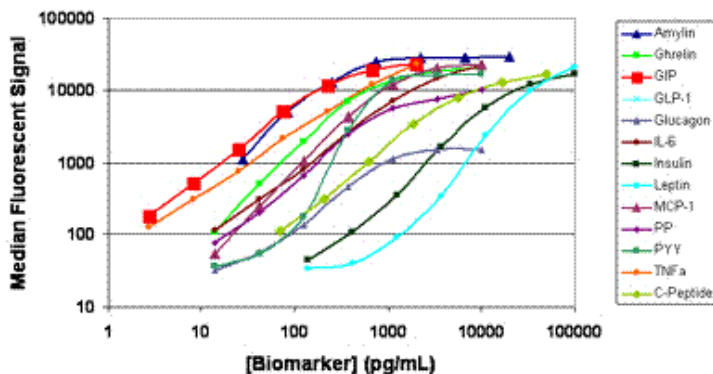
Všechny další imunoanalytické přístupy jsou také použitelné na xMAP platformě, např. kompetitivní imunoanalýza, receptor-ligandová analýza nebo pro stanovení protilátek antigen navázaný na mikrokuličky. Kromě imunoanalytických stanovení umožňuje tato platforma také analýzu DNA nebo RNA molekul, které jsou přímo nebo po jejich amplifikaci multiplexově detekovány specifickými sondami vázanými na mikrokuličky.



Obrázek 19. Protilátky navázané na mikrokuličky s navázanými proteiny ze vzorku a po přidání značené druhé protilátky. Zdroj: www.rndsystems.com



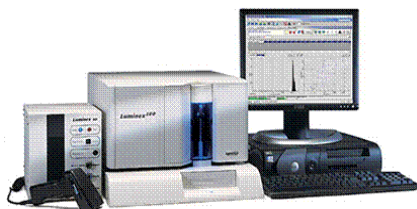
Obrázek 20. Příklad stanovení xMAP technologií – Multiplexová analýza 10 cytokinů.



Obrázek 21. Kalibrační křivky pro 13-plex panel lidských hormonů Zdroj: <http://www.biotek.com/resources/articles/workflows-luminex-xmap-assays.html>

Reagencie pro xMAP technologií

xMAP je otevřená technologie a v současnosti lze nakoupit reagencie pro imunoanalýzu od mnoha světových výrobců. Bohužel pro společné stanovení nelze kombinovat látky, které mají velmi odlišné biologické koncentrace, pokud jejich protilátky vykazují zkříženou reaktivitu a pokud mají příliš rozdílné požadavky na preanalytickou fázi.



Obrázek 22. Přístroj Luminex 200 (Luminex Corporation). Zdroj: www.luminexcorp.com.

Nové typy technologie xMAP

V současnosti jsou již k dispozici reagenty pro Luminexovou platformu obsahující magnetické mikrokuličky (MagPlex®), což umožňuje jednodušší separaci během reakčních kroků a především jejich automatizaci na jednoduchých promývacích stanicích nebo jako součást pipetovacích automatů.

FlexMAP technologie jako další generace multiplexových přístrojů od fy. Luminex umožňuje přidáním třetí rozlišovací barvy do mikrokuliček měření až 500 analytů zároveň v jedné analýze, což při použití 96-jamkové mikrotitrační destičky znamená možnost až 64000 testů za 45 minut.

Zcela novým konceptem od firmy Luminex je přístroj MAGPIX. Ten umožní měření až 50 testů současně v jednom reakčním objemu a měření na tomto přístroji je založeno na principu CCD zobrazovací technologie na rozdíl od přístrojů řady Luminex xMAP.

Laboratoř na čipu (Lab-on-a-chip)

S tlakem na vývoj point-of-care testů dochází k stále vyšší míře miniaturizace laboratorních technologií. Miniaturizace vede k finančním úsporám, šetří životní prostředí a vede k vyšší dostupnosti a mobilitě technologií. Miniaturizace vyžaduje úplnou integraci všech kroků v imunoanalytickém stanovení a její budoucnost je v kombinaci s multiplexovými technologiemi. Laboratoř na čipu (LOC) je zařízení, které integruje laboratorní postupy na ploše o velikosti milimetrů nebo několika málo čtverečných centimetrů. Často je využívána

tzv. mikrofluidika neboli pohyb kapalin v prostorech mikro čipu. Aby mohl být mikrofluidický obvod na čipu použit pro analýzu, musí obsahovat: mikroskopicky malé ventily (rozdávěcí nebo uzavírací), mixéry pro míchání tekutin, mikroreaktory, senzory, oscilátory a výměníky tepla. Princip laboratoře na čipu je dnes aplikován pro miniaturizaci imunoanalýz, biochemických reakcí i PCR a dalších genetických technologií. Cílem miniaturizace je tzv. μ TAS (micro total analysis system) – to je systém, který by integroval odebrání vzorku, transport a před analytickou úpravu vzorku, chemickou reakci a separaci i detekci reakce na jednom čipu.

Větším kolegou těchto technologií je systém Avantra, který umožňuje sendvičovou imunoanalýzu 40 analytů v jednom vzorku. Základem je běžný čip s naspotovanými protilátkami, který je ale uzavřen uvnitř plastické schránky/čipu (MAX BIOCHIP®) obsahujícího vše potřebné k analýze: kanálky, senzory, komory pro reagentie („Suché“ biotinylované protilátky, streptavidin, promývací pufr). Max biochip je vložen do přístroje a poté je nastříknut vzorek – samotným přístrojem neprotéká žádná tekutina, celá reakce probíhá uvnitř max biochipu. Vyhodnocení reakce probíhá CCD kamerou detekující signál ze spotů na čipu.

Kapitola 3 - Preanalytika

Jindra Windrichová

Preanalytická část je nedílnou součástí laboratorního vyšetření a lze ji rozdělit na část, která probíhá **mimo laboratoř** a na část, která probíhá **uvnitř laboratoře** před samotným měřením. Pokud posuzujeme frekvenci chyb ve výsledku laboratorního vyšetření, vzniká jejich nadpoloviční většina již ve fázi preanalytické a je proto nutné se jí stále důkladněji zabývat. Součástí preanalytiky jsou na jedné straně vlivy biologické ovlivňující hladinu měřené látky a na druhé straně vlivy mechanické a tepelné při odběru, separaci, transportu a skladování, které

můžou změnit studovanou hladinu v biologickém materiálu. V preanalytické fázi dochází k prolínání těchto faktorů.

Biologické vlivy

Biologické vlivy lze rozdělit na ty, které **můžeme ovlivnit**, a na faktory **neovlivnitelné**, které nezměníme, ale musíme je zaznamenávat a vzít v úvahu při interpretaci výsledku např. odlišnými normálními rozmezími v rutinní praxi nebo rozdělením studované kohorty při statistickém hodnocení výzkumu. Mezi neovlivnitelné faktory patří pohlaví, věk, etnická příslušnost vyšetřovaného a také genetické predispozice. Všechny ostatní preanalytické faktory můžeme, alespoň částečně, ovlivnit, těmi se budeme zabývat v následujícím textu.

Součástí přípravy vyšetřovaného je jeho **dieta před odběrem**. Přinejmenším by se měl pacient před odběry vyvarovat velmi tučných jídel, což způsobuje chylozitu séra, která často interferuje během stanovení. Existuje ovšem mnoho studií, kde je ukázán vliv složení stravy na hladiny biomarkerů, známý je např. posun v hladinách u přísných vegetariánů a souvisí s jejich pozměněným metabolismem. Vliv diety se do změn koncentrací analytů může promítnout různými mechanismy:

- vyplavení hormonů a enzymů před příjmem potravy ,během jídla a bezprostředně po jídle
- metabolismus potravou přijatých látek a zvýšení koncentrací metabolitů
- sekundární důsledky vyplavení hormonů
- interference látek přijatých potravou s analytickou metodou o nižší specifitě (např. vanilin u stanovení katecholaminů)
- vliv alkoholu
- vliv kouření
- leukocytóza po jídle.

Sledovat můžeme u výzkumů spíše extrémy, ale ostatní změny jsou z našeho pohledu součástí biologické variability, standardem by však měl být pokud možno **odběr na lačno**. Je nutné brát v úvahu, že starší pacienti nebo onkologičtí pacienti můžou často trpět podvýživou.

Užívané léky můžou ovlivnit hladiny stanovovaných látek třemi způsoby:

- působí na metabolismus stanovované látky
- ovlivňují vazbu sledované látky na transportní bílkoviny (změna volné frakce)
- lék interferuje v analytické reakci

Ideálem by bylo před odběry vysadit veškeré léky, ale to není v praxi obvykle možné. Je nutné znát alespoň interference léků a studovaného parametru a to zohlednit ve statistice nebo při zařazování pacientů do studie. Bohužel u většiny nových biomarkerů není taková informace vůbec k dispozici.

Hladinu mnoha biomarkerů ovlivňuje **psychika** a především **stres pacienta** – nervozitou nebo strachem jsou ovlivněny především stresové hormony, např. kortizol, katecholaminy, interleukin 6, je tedy nutné před odběrem co nejvíce vyšetřovaného uklidnit a snažit se zamezit tzv. syndromu bílého pláště. Hladinu látek v krvi také ovlivňuje **poloha pacienta** při odběru – tedy zda je odebírán vleže (často u pacientů na lůžkových odděleních) nebo v sedě (nejčastěji u ambulantních pacientů). Pro výsledné hodnoty stanovení je rozhodující také **fyzická činnost vyšetřovaného před náběrem** – zda vyběhl do druhého patra před odběrem po schodech (zvýšené hodnoty stresových hormonů, některých interleukinů...) nebo jel výtahem, zda přijel na kole/na koni (zvýšené hodnoty PSA), zda neuběhl den před odběrem maratón atd.

Mnoho látek cirkulujících v lidském oběhu podléhá **biorytmům** neboli cyklickým variacím. Tyto variace mohou být:

- cirkadiánní – v rámci 24 hodin
- ultradiánní – s periodou mnohem kratší než jeden den
- infradiánní – s periodou delší než jeden den
- cirkanuální – s periodou přibližně 1 rok

Důsledkem jsou změny koncentrací látek v denním, ročním, u žen menstruačním cyklu a v průběhu těhotenství, některé látky jsou vyplavovány v pulzech. Hormony jsou často ovlivněny variacemi jiných látek/hormonů, které jsou nadřazeny při regulaci jejich uvolňování v organismu (nejznámějším příkladem je regulační osa ACTH pro kortizol). Ve výzkumu je z těchto důvodů často důležité provádět náběry v definovanou denní dobu – standardně mezi 7-9 hodinou ránní, v definovanou fázi menstruačního cyklu (pokud je jím studovaná látka ovlivněna) - a provádět např. statistické zhodnocení korelace data náběru a

naměřené hodnoty pro poznání sezónních vlivů. Tento problém se řeší dále opakováním odběrů nebo různými inhibičními nebo stimulačními testy, to však probíhá především v rutinní praxi.

Odběr materiálu

Nejčastějším odběrem biol. materiálu je **odběr periferní krve z kubitální žíly**. Pro tento odběr existují tři základní pravidla, která je nutno dodržet:

- nezaškrcovat paži během odběru,
- nechat oschnout dezinfekci v místě vpichu před odběrem (jinak dochází k hemolýze) a
- neprovádět odběry ze stejné ruky, kde pacient dostává infuzi.

Pokud je prováděn odběr z trvale zavedené kanyly, je nutné nejprve 5 ml krve vyhodit a pak teprve brát krev pro stanovení. Stěžejním pro laboratorní vyšetření je výběr odběrové zkumavky. Je nutné zohlednit, zda je třeba k vyšetření **sérum** (odebírání se krev srážlivá, ve zkumavce proběhne koagulace) nebo zda je třeba **plazma** (krev je odebrána do zkumavky obsahující protisrážlivé činidlo). Zkumavky pro odběry plazmy se liší použitým antikoagulačním činidlem- heparinát, citrát, EDTA soli. Pro imunoanalýzu se nejčastěji používají odběry s EDTA, ale laboratoř by měla pro každé vyšetření i výzkumné stanovit přesně požadavek na odběrové zkumavky, protože hladiny mezi sérem a plazmou se pro některé analýzy mohou výrazně lišit. Pro tvorbu biobank by měly být skladovány jak plazmové tak sérové alikvoty a v publikacích by měl být vždy jasně specifikován typ použitého biol. materiálu a nejlépe i odběrových zkumavek.

Samozřejmostí je nutnost bezchybného a bezpodmínečného označení biologického materiálu – jak primárního materiálu, tak skladovaných alikvotů po separaci – aby se předešlo jakýmkoli záměnám, co se týče pacienta i typu materiálu. V případě speciálních odběrů – např. netradičních míst odběru nebo testů v čase – je nutné jednoznačné rozlišení jednotlivých odběrů např. číslicemi nebo písmeny na zkumavkách i na žádankách.

V biologickém materiálu dochází k **degradaci proteinů** proteolytickou aktivitou některých enzymů. Tato aktivita negativně ovlivňuje stanovitelnost proteinů především v homogenátech

tkáňových vzorků, ale může být nezanedbatelná i pro imunoanalytická stanovení proteinů v plazmě nebo séru. Proteolýze můžeme předejít **přidáním specifických inhibitorů proteáz** nebo jejich koktejlů ke vzorku ihned po odběru u krevních derivátů nebo při homogenizaci (u tkáňových vzorků). Inhibitory proteáz můžeme rozdělit do skupin podle několika kritérií:

- podle typu inhibovaných enzymů
- podle živočišného druhu/rostliny
- podle typu analýzy, která bude prováděna
- podle typu biologického materiálu

Speciálním typem inhibitorů jsou inhibitory fosfatáz, které je nutné využívat při studiích monitorujících stav fosforylace některých proteinů v signálních drahách.

Separace a transport vzorku

Při transportu vzorku je nutné se vyvarovat teplotním extrémům – v létě přehřátí vzorku, v zimě jeho zmrznutí – používáním transportních boxů. Některé analyty vyžadují **speciální teplotu transportu** – např. transport v ledové tříšti, což je směs vody a ledu v poměru jedna ku jedné, led ve vodě postupně odtává, což umožňuje udržet delší dobu vzorek při teplotě těsně nad bodem mrazu. Naopak některé látky při vystavení chladu mohou měnit své hladiny ve směru falešně pozitivního i negativního výsledku. Chybou je vždy zmrznutí zkumavky s odebranou krví před separací séra/plazmy od krevních buněk, protože to vede k hemolýze. Také vystavení vzorku nadměrnému světlu – např. ponechání vzorku na okně při silném slunečním svitu – může způsobit degradaci fotolabilních látek. Zkumavky s náběry pro měření látek velmi citlivých na světlo by měly být transportovány např. obalené v alobalu. Vždy by mělo být zamezeno třepání a prudké pohyby se zkumavkami s krví před separací, nadměrná mechanická zátěž vede nejčastěji k hemolýze.

Důležitým krokem v přípravě biologického materiálu z krve je **centrifugace** – separace séra nebo plazmy od krevních buněk. Jednotlivé laboratoře se liší používanými podmínkami – vždy by měla být uváděna doba centrifugace a použitá centrifugační (odstředivá) síla g (uvádění v otáčkách za minutu rpm je chybné neboť nezahrnuje velikost rotoru, která ovlivňuje odstředivou sílu). Tato odlišnost je jednou z příčin nestejných výsledků mezi

jednotlivými laboratořemi. Speciální nastavení je třeba např. při požadavku na tzv. bezdestičkovou plazmu pro studium některých analytů, aby nedocházelo k ovlivnění měřené hladiny vyplavením intracelulárních komponent z trombocytů. Separace zajišťuje i zamezení vyplavování látek např. interleukinů z aktivovaných leukocytů. Sérum by mělo být před separací ponecháno srážet alespoň 30 min. po odběru. Naopak plazma může být separována ihned.

Skladování

Biologický materiál pro výzkumné účely by měl být skladován **v alikvotech** odpovídajících množstvím potřebám analýzy a při dlouhodobém skladování v teplotách pod -70°C . Moderní analytické postupy vyžadují poměrně malé množství materiálu a je tedy výhodnější skladovat více alikvotů s menším objemem. Zamezí se tak opakovanému rozmrazování, které je nežádoucí. U některých biomarkerů např. cytokeratinů víme, že opakované rozmrazování nezmění výsledek, ale u většiny nových biomarkerů nemáme tušení, a proto se tzv. opakovaným freeze/thaw cyklům vyhýbáme. Důležitý je i správný výběr zkumavek pro dlouhodobé uskladnění – musí být vyrobeny z plastů odolávajícím nízkým teplotám a musí mít víčka dostatečně zamezující odpařování. Dále je nutné si uvědomit, že materiál nemůže být skladován nekonečně dlouho. Maximální doba skladování se liší pro jednotlivé analyty, jejich hladiny se v průběhu let/měsíců mění. Ve výzkumu je proto důležité zvážit, zda bude vhodné jednorázové vyšetření biol. materiálu až po kompletním ukončení sběru (celé kohorty) nebo zda je výhodnější periodické zpracování např. vždy jednou za půl roku nebo dokonce kontinuální zpracování na rutinních analyzátořech, kde ale zase hrozí změna použité metodiky.

Samotná preanalytická fáze začíná již správným výběrem – **indikací laboratorního vyšetření**, v případě výzkumných projektů výběrem studovaného biomarkeru. Je nutné nejprve zjistit, co nejvíce o preanalytických podmínkách, které jsou nezbytné, a poté jim přípravu pacientů, odběry a nakládání s biologickým materiálem co nejlépe přizpůsobit. Velkým problémem většiny studií zůstává nestejné zacházení s náběry tzv. kontrolních skupin. Náběry jsou často zpracovávány v jiných laboratořích (např. transfúzní stanice), za jiných podmínek (doba a nastavení centrifugace), náběry jsou prováděny v jiných denních

dobách (např. pouze ambulantní náběry v kontrolní skupině x celodenní náběry z lůžkových oddělení v cílové skupině). Velkou neznámou, co se týče jednotnosti podmínek a popisu preanalytické fáze, zůstávají velké biobanky, kde jsou pro jednotlivé diagnózy často dlouhodobě skladovány biol. materiály získané buď z mnoha pracovišť za kratší časový úsek nebo naopak z jednoho pracoviště za velmi dlouhé časové období. Při studiích používajících takovýto biol. materiál by mělo být vždy součástí statického hodnocení, zda výsledek neovlivňuje stáří náběru a jeho původ (tedy zda se neliší výsledky náběrů získaných různými pracovišti).

Kapitola 4 - Analytické a klinické parametry

Radek Kučera

U imunoanalytických laboratorních metod je třeba znát jejich analytické parametry, které rozhodují o jejich použití a stupni správnosti a specifčnosti získaných výsledků a tedy o spolehlivosti určité metody pro konkrétní použití. Tyto parametry mají být též pravidelně kontrolovány.

Nejdůležitější analytické parametry jsou popsány v následujících odstavcích.

Citlivost stanovení

(senzitivita, dolní mez detekce, detekční limit, minimum detectable dose (MMD), minimum detectable concentration /MMC/)

Citlivost stanovení je určena podílem změny měřené odezvy a odpovídající změny koncentrace měřeného analytu, neboli směrnici kalibrační závislosti (u metod s dostatečně lineárním kalibračním vztahem). Čím je číselná hodnota směrnice větší, tím je metoda citlivější, neboť menší přírůstek koncentrace vyvolá měřitelnou odezvu.

Citlivost udává minimální množství analytu, který můžeme přesně odlišit od nulového množství analytu. Její znalost je důležitá pro určení rozsahu koncentrací, které lze danou metodou stanovit. Je dána především použitým analytickým principem.

Analytická citlivost

(analytical sensitivity)

Analytická citlivost se zjišťuje opakovaným stanovením nulového standardu a je definována jako průměr koncentrací nulového standardu $+2$ SD (směrodatné odchylky) nebo $+3$ SD. U komerčních testů je její hodnota deklarovaná výrobcem. V praxi se často setkáváme s tím, že deklarovaná analytická citlivost metody není při rutinním stanovení dosahována.

Funkční citlivost

(functional sensitivity)

Klinická praxe si vynutila potřebu znalosti dolní spolehlivě detekovatelné nejnižší hladiny. Proto byla zavedena definice funkční citlivosti. Nejčastěji se definuje jako nejnižší koncentrace ve stanovení, pro kterou je variační koeficient nižší než 20%. U komerčních testů její hladina musí být deklarována výrobcem a při verifikaci metody je tato hladina uživatelem ověřována.

Správnost a bias

accuracy

Správnost metody udává, jak blízko skutečné hodnotě analytu je průměrná hodnota stanovené koncentrace. Pokud existuje absolutní metoda k získání skutečné hodnoty analytu, je možné využít srovnání obou metod k zjištění správnosti daného analytické metody (např. HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie). V mnoha případech je možné jen nepřímé určení správnosti analytické metody (recovery, test ředění).

Bias (z angl. zkreslení, vychýlení, posun) udává míru rozdílu naměřených hodnot od skutečných hodnot daného analytu. Pokud se naměřené hodnoty liší v průběhu celého

stanovení o stejné procento koncentrace, jedná se o bias proporcionální. Pokud se naměřené hodnoty liší v průběhu celého stanovení o stejný počet jednotek, jedná se o bias konstantní. Oba typy bias se mohou vyskytovat ve stanovení současně.

Recovery

Tento anglický výraz se někdy nahrazuje českým označením testu jako metoda standardního přídatku. Slouží k nepřímému hodnocení správnosti analytické metody. Provádí se tak, že se k definovanému množství analytu o známé koncentraci přidá přesné množství stejného analytu opět o známé koncentraci. Naměřené navýšení koncentrace se pak vydělí vypočteným očekávaným navýšením koncentrace. Po vynásobení 100 pak vychází výsledné recovery v procentech. V ideálním případě je recovery 100%.

Test ředění

Další možností nepřímého testování správnosti metody je test ředění. Ředěním původního vzorku připravíme řadu vzorků o sestupné koncentraci. Po stanovení všech vzorků vynásobíme ředěné vzorky příslušným ředícím faktorem. Výsledné koncentrace ředěných vzorků vynásobené ředícím faktorem by se měly rovnat původní koncentraci vzorku, ze kterého se při ředění vycházelo. Jako výchozí vzorek k ředění se obvykle volí vzorek s koncentrací v horní části kalibrační křivky. Vytvořením řady vzorků o sestupných koncentracích získáme přehled o správnosti stanovení v celém kalibračním rozsahu dané analytické metody.

Přesnost a nepřesnost

precision, imprecision

Přesnost charakterizuje opakovatelnost dané analytické metody. Zjišťuje se pomocí opakovaného stanovení vzorku o stejné koncentraci. Vyjadřuje se v procentech jako variační koeficient (%CV) nebo jako standardní odchylka (SD) určité hladiny analytu. Přesnost či nepřesnost stanovení je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří: přesnost pipetace, vlivy během jednotlivých kroků analytického postupu (inkubace, třepání, separace, detekce), dále pak charakteristika protilátky, interference, preanalytické vlivy.

Přesnost ve stanovení

within run (im)precision, opakovatelnost

Zjišťuje se opakovanou analýzou vzorku o stejné koncentraci. Doporučuje se 20 opakovaných měření.

Přesnost mezi stanoveními

between run (im)precision, reprodukovatelnost

Zjišťuje se opakovanou analýzou vzorku o stejné koncentraci v každém stanovení, každý den. Pokud se vzorek stanovuje v duplikátech, triplikátech apod., používá se do výpočtu obvykle průměr naměřených hodnot.

Profil přesnosti

precision profile

Pokud chceme postihnout přesnost metody v celém rozsahu stanovení, používá se pro tento účel profilu přesnosti. K výpočtu se používá rozdíl koncentrací duplikátů rutinních vzorků, které se rozdělí do skupin podle koncentrace. Výsledkem jsou variační koeficienty těchto skupin, které pokrývají celý rozsah kalibrační křivky.

Zdroje nepřesností

Zdrojem nepřesností může být každá složka analytické reakce (reagencie) a každý krok analytického postupu včetně lidského faktoru.

Transport a uchování souprav a reagensů

Reagencie: rozpouštědla, sensorová protilátka, konjugát s protilátkou, promývací roztok, substrátová soustava, standardy, kontrolní vzorky

Pipetace: kalibrace, nastavení a reprodukovatelnost pipet či pipetoru

Reakce antigen-protilátka: čas, teplota, separace, promývání

Enzym substrátová reakce: čas, teplota, světlo či tma

Detekce: měřič radioaktivity, spektrofotometr

Výpočet dat: vynesení dat na osy x a y, proložení kalibrační křivky

Preanalytická fáze odběru a uchovávání vzorků

Interference

Imunoanalytickou reakcí stanovujeme velmi malé množství analytu (10^{-15} až 10^{-20} mol.L⁻¹). Interference jsou proto rušivým elementem, na který je potřeba nezapomínat. S interferencemi se musí vyrovnat výrobci i uživatelé imunoanalytických souprav. Nespecifické interakce vznikají většinou v nevyhovujících vzorcích. Hemolytické, lipemické a ikterické vzorky by se neměly ke stanovení používat.

Specifické interakce se týkají použitých protilátek a jsou uvedeny níže.

Antigen: nemocný užívá ve formě léku stanovovanou látku, např. inzulin, hormony štítné žlázy, apod. (většina imunoanalytických metod neumí odlišit endogenní formu analytu od exonního analytu podávaného jako léčba).

Autoprotilátky: V některých případech (nejčastěji v důsledku autoimunních onemocnění nebo v důsledku léčby) u pacienta může dojít k vytvoření nebo existenci protilátek proti analytu, který je stanovován. Tyto autoprotilátky mohou interferovat při stanovení analyzovaného antigenu.

HAMA protilátky (Human Anti-Mouse Antibodies): Mohou se vyskytovat u pacientů u nichž byla užita k diagnostickým nebo terapeutickým účelům myší (ev. i jiná zvířecí) protilátka. Podobné protilátky se mohou vyskytovat i u osob, které byly např. pokousány domácími zvířaty. HAMA protilátky způsobují u některých stanovení falešně pozitivní výsledky.

Zkřížená reakce (Cross-reactivity): Protilátka rozpoznává epitop na antigenu. Jestliže epitop je společný i pro jiné molekuly, dochází ke zkřížené reakci. Tento problém se vyskytuje zejména u protilátek polyklonálních. U monoklonálních protilátek je to problém odlišení intaktní molekuly a štěpu. Obvykle jsou používány dvě protilátky reagující na délku molekuly. Výběr vhodných monoklonálních protilátek tento problém zmenšil.

Hook efekt: Speciální problém u analytů s velmi širokým koncentračním rozsahem. Při extrémně vysokých koncentracích mohou být vazebná místa saturována antigenem a protilátka nemůže vytvářet komplex antigen - protilátka. Konečné výsledky jsou pak v kontrastu velice nízké - podhodnocené. Hook efekt se nevyskytuje u dvojkrokových metod.

Nejistota měření

V praxi nejsou žádná měření absolutně přesná. Nejrůznější vlivy způsobují odchylku mezi skutečnou a naměřenou hodnotou. Výsledek měření se tak vždy pohybuje v jistém rozmezí kolem skutečné hodnoty. Nejistota měření udává rozsah naměřených hodnot kolem výsledku měření. Nejistota měření se netýká pouze výsledku, ale i měřicích přístrojů, použitých konstant, zavedených korekcí apod. Nejistota měření se zjišťuje statistickými výpočty. Předpokládá se určitá pravděpodobnost, s jakou se v intervalu daném nejistotou může nacházet skutečná hodnota měřené veličiny.

Mírou nejistoty měření je směrodatná odchylka (SD). Takto vyjádřená nejistota se označuje jako **standardní nejistota** (u). Udává se buď samostatně bez znaménka, nebo se znaménkem \pm za výsledkem. Standardní nejistoty se dělí na několik typů. Standardní nejistoty typu A (u_A), které jsou způsobovány náhodnými chybami a se stoupajícím počtem opakovaných měření se zmenšují. Typ B (u_B) vychází z různých známých a odhadnutelných příčin a výsledná nejistota je dána jejich součtem a nezávisí na počtu opakovaných měření. **Kombinovaná standardní nejistota** (u_C) je součtem nejistot typu A a B. Hodnotí-li se výsledek měření touto nejistotou, není třeba rozlišovat mezi typem A a B. Kombinovaná standardní nejistota udává interval, ve kterém se s velkou pravděpodobností bude vyskytovat skutečná hodnota měřené veličiny. V praxi se tato nejistota užívá nejčastěji.

Referenční meze

Při hodnocení laboratorních výsledků nás zajímá, zda je naměřená hodnota normální, zvýšená či snižená. Výsledek je tedy třeba porovnat s rozmezím normálních hodnot. Podle způsobu, jak se toto rozmezí určuje, hovoříme buď o **referenčních hodnotách** nebo o rozhodovací hladině (*cut off level*). Jako referenční rozmezí je nejčastěji definován centrální 95% interval

referenční populace t.j. hodnoty mezi 2.5 až 97.5 percentilem. Do referenční populace pak zahrnujeme nejčastěji zdravé jedince. Určování referenčního rozmezí v populaci zdravých osob, doporučený nejmenší počet je 120 jedinců, se provádí tak, že všechny naměřené výsledky seřadíme vzestupně a na spodním i horním konci výsledkové řady odřízneme 2,5 % výsledků. Uvnitř referenčního rozmezí zůstane právě požadovaných 95 % výsledků. Krajní hodnoty výsledkové řady představují dolní a horní referenční mez. Je třeba si rovněž uvědomit, že u některých analytů závisí referenční rozmezí na věku, jindy se liší u mužů a u žen. Referenční rozmezí se může lišit i v závislosti na použité metodě. Každá laboratoř by proto měla uvádět své referenční hodnoty, což je značně problematické. V některých případech jsou místo vypočtených referenčních hodnot používány tzv **arbitrální referenční hodnoty**, které jsou navázány na klinickou definici, např rizika progresse onemocnění, riziko vzniku komplikací atd.

Cut off

Od referenčního rozmezí je třeba odlišovat tzv. **rozhodovací hladiny (cut off)**. Je-li rozhodovací hladina překročena, významně narůstá riziko přítomnosti určitého onemocnění. Cut off se používá např. při hodnocení sérových hladin nádorových markerů. U nádorových markerů se někdy využívá individuální cut off. U pacienta po operačním odstranění nádoru se opakovaně stanoví hladina nádorového markeru. V dalším sledování lze odhadnout individuální cut off nádorového markeru typickou pro daného jedince bez přítomnosti nádoru. Překročení této individuální cut off pak může znamenat recidivu nádoru, i když hodnota ještě nepřekročila cut off pro referenční populaci.

Hraniční výsledky

Pokud je referenční rozmezí definováno jako centrální 95% interval referenční populace, je třeba si uvědomit, že u 5 % zdravých jedinců najdeme výsledek, který se nachází mimo referenční rozmezí. Je třeba si to uvědomit při hodnocení výsledků, které jsou těsně nad nebo pod referenčním rozmezím. Jedná se tedy o individuální odchylku, nikoliv přítomnost onemocnění. K odlišení takových jedinců se v praxi doporučuje opakování laboratorního testu s určitým časovým odstupem.

Biologická variabilita

Schopnost testu dát při dvou po sobě jdoucích opakovaných měření shodné výsledky je ovlivněna řadou faktorů. Nejvýraznějším z nich je biologická variabilita. Biologické vlivy, dělíme na **neovlivnitelné** a **ovlivnitelné**.

Neovlivnitelné podmínky:

Biologické rytmy – cirkadiánní rytmus, sezónní vlivy, menstruační cyklus

Pohlaví – např. rozdílné hodnoty hormonů

Věk – hladiny některých analytů se během života jedince mění, mění se proto také příslušné referenční meze pro danou věkovou kategorii

Rasa – některé laboratorní parametry se liší v černošské, bílé či asijské populaci apod.

Vlivy prostředí – nadmořská výška, expozice slunečnímu záření atd.

Ovlivnitelné podmínky

Poloha těla – ovlivňuje sekreci katecholaminů, kortizolu, reninu

Fyzická zátěž a tělesná aktivita - ovlivňuje složení tělních tekutin a je závislá na délce a intenzitě

Těhotenství – zahrnuje výraznou změnu biochemických pochodů a změny celé řady parametrů

Kouření - kouření zvyšuje hladiny kracinoembryonální antigenu (CEA) a některých hormonů, naopak snižuje koncentraci imunoglobulinů

Alkohol - změny obsahu analytů závisí na intenzitě a délce konzumace alkoholu, jednorázové požití alkoholu v mírné a střední dávce ovlivňuje měření jen minimálně

Vliv léků – pokud je antigenní struktura exogenní látky shodná s endogenně produkovanou látkou, je výsledná hodnota testu ovlivněná, obvykle zvýšená (inzulín, hormony štítné žlázy)

Mechanické vlivy (vliv diagnostických a terapeutických zásahů) – např. zvýšení hladiny PSA po palpálním vyšetření prostaty, zvýšení CEA po vyšetření *per rectum*

Mentální stres - zvyšuje sekreci hormonů aldosteronu, angiotenzinu, katecholaminů, kortizolu, prolaktinu, reninu, inzulinu

Stravovací návyky - hormony a enzymy se vyplavují a přesouvají před příjmem potravy i během a po její konzumaci.

Klinická senzitivita a specifita

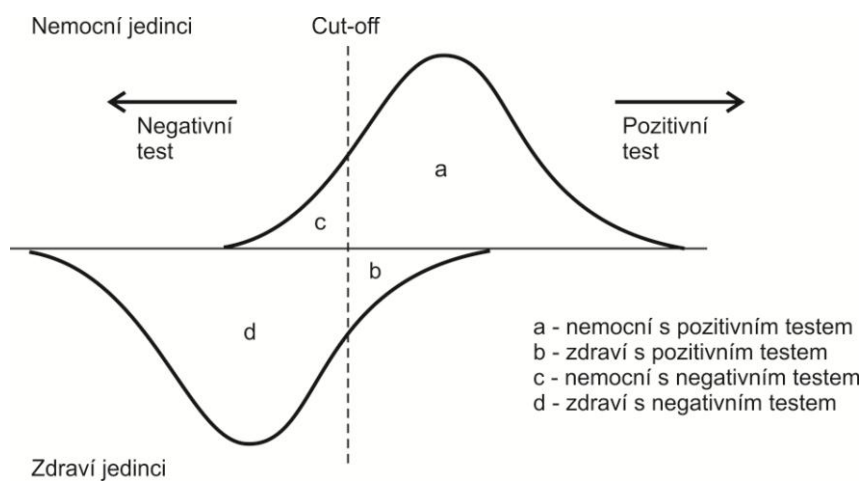
Klinická senzitivita je schopnost testu správně určit nemocné jedince, jinými slovy počet správně nemocných.

$$\frac{\text{správně pozitivní (TP)}}{\text{správně pozitivní (TP)} + \text{falešně negativní (FN)}} \times 100 = \text{senzitivita}$$

Místo senzitivity se někdy používá výraz *detection rate* (DR)

Klinická specifita je schopnost testu správně vyloučit jedince, kteří nemají dané onemocnění, jinými slovy počet správně zdravých.

$$\frac{\text{správně negativní (TN)}}{\text{správně negativní (TN)} + \text{falešně pozitivní (FP)}} \times 100 = \text{specifita}$$



Obrázek 23. Klinická senzitivita a specifita. (upraveno prodlé Wild 2013)

Efektivita testu

Efektivita testu je procento správně klasifikovaných pacientů jako zdravých nebo nemocných.

$$\frac{\text{správně pozitivní (TP)} + \text{správně negativní (TN)}}{\text{správně pozitivní (TP)} + \text{falešně pozitivní (FP)} + \text{falešně negativní (FN)} + \text{správně negativní (TN)}} \times 100 = \text{efektivita}$$

	Pacient s pozitivním výsledkem	Pacient s negativním výsledkem	Celkem
Nemocný jedinec	TP	FN	TP + FN
Zdravý jedinec	FP	TN	FN + TN
Celkem	TP + FP	FN + TN	TP + FN + TN + FN

správně pozitivní (TP), falešně pozitivní (FP), správně negativní (TN), falešně negativní (FN)

Prediktivní hodnoty

Je třeba určit pravděpodobnost, že stanovení poskytne správnou diagnostickou informaci.

Zahrnují klinickou senzitivitu, specificitu, a efektivitu testu

Pozitivní prediktivní hodnota (PPV)

Pravděpodobnost, že osoba je opravdu nemocná, když test reagoval pozitivně

$$\frac{\text{správně pozitivní (TP)}}{\text{správně pozitivní (TP)} + \text{falešně pozitivní (FP)}} \times 100 = \text{PPV}$$

Negativní prediktivní hodnota (NPV)

Pravděpodobnost, že osoba je zdravá při negativním výsledku testu

$$\frac{\text{správně negativní (TN)}}{\text{falešně negativní (FN)} + \text{správně negativní (TN)}} \times 100 = \text{NPV}$$

ROC křivka

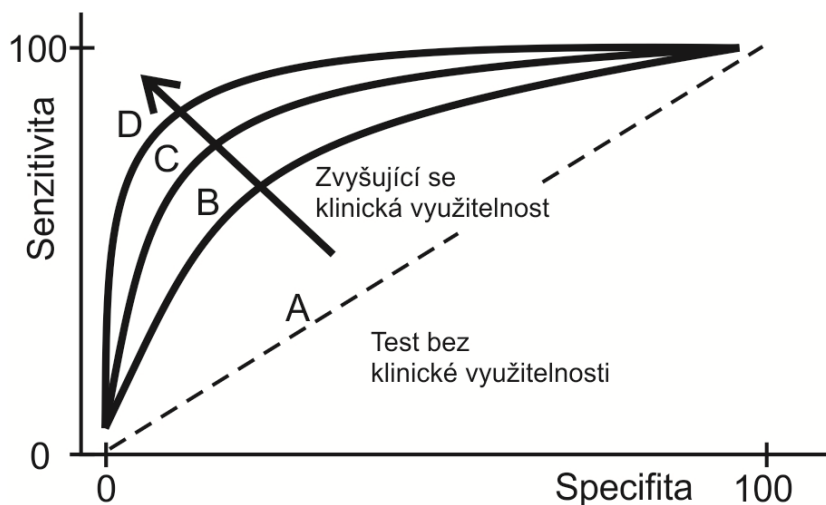
receiver operating characteristic curve

ROC křivka je grafické vyjádření umožňující posoudit vypovídací schopnost diagnostického testu v závislosti na jeho senzitivitě a specifitě.

Na svislé ose grafu je relativní četnost skutečně pozitivních případů (TP), tedy pravděpodobnost, že jako správný bude vyhodnocen pozitivní případ.

Na vodorovné ose je relativní četnost falešně pozitivních případů (FP), tedy pravděpodobnost, že jako správný bude vyhodnocen negativní případ.

Na grafu ROC se bude nejlepší diagnostický test vyznačovat ROC křivkou s největší plochou pod křivkou (Area Under Curve – AUC). Je-li plocha rovná 1, je test ideální a má 100% senzitivitu i specifitu. Pokud je plocha pod křivkou 0.5, pak není test lepší než házení mincí. V praxi bude diagnostický test někde mezi těmito extrémy.



Obrázek 24. Křivky ROC. (upraveno podle Wild 2013).

Kapitola 5 - Návaznost a standardizace imunoanalytických metod

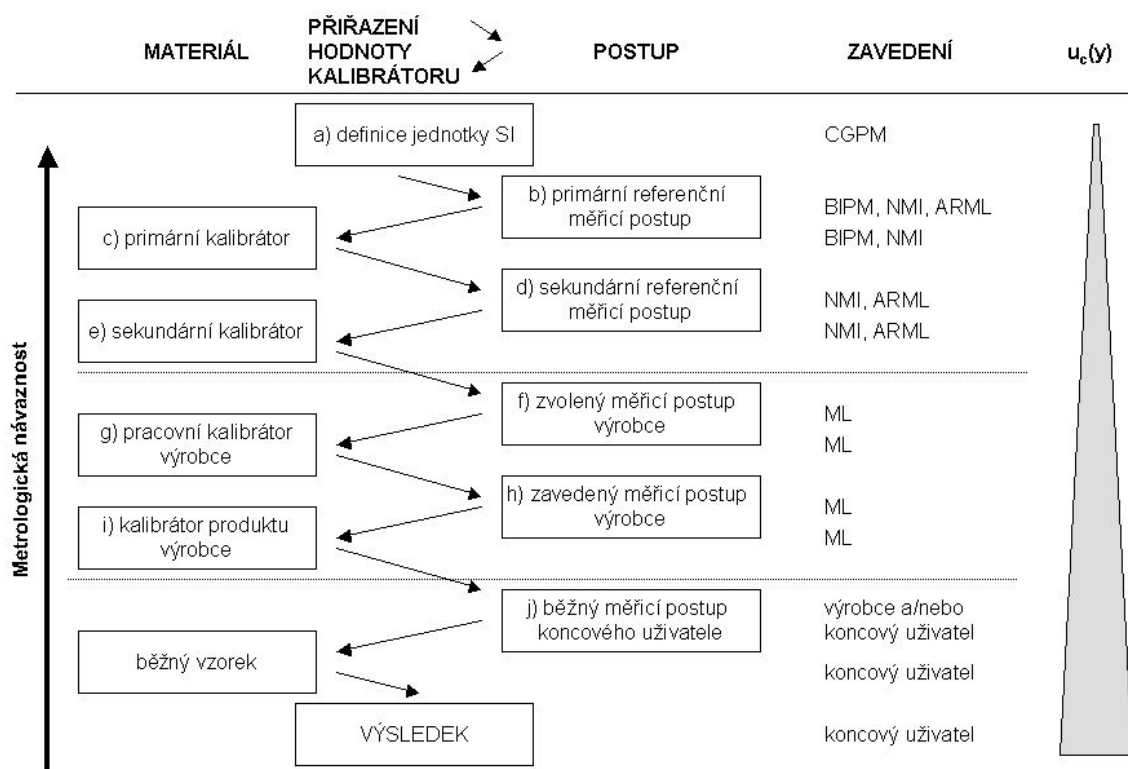
Kristián Šafarčík, Vladimír Bartoš

Návaznost měření

Obdobně jako v každé oblasti aplikované metrologie je i v případě provádění imunoanalytických kvantitativních měření různých veličin (analytů) základním požadavkem zajištění jednotnosti a správnosti měření. Důsledkem tohoto požadavku pak je dosažení smysluplné úrovně vzájemné srovnatelnosti výsledků a to jak mezi výsledky měření stejné veličiny prováděnými v jedné laboratoři ale v různém čase, tak také při měřeních realizovaných v různých laboratořích.

Předpokladem pro dosažení takového stavu je, aby různé rutinní postupy používané k měření určité veličiny měly vazbu na mezinárodně uznávaný a platný **referenční materiál**. Tato vazba je založena na neporušené hierarchii měřicích postupů a kalibrátorů, směřující od primárního referenčního materiálu nejvyššího metrologického řádu ke kalibrátorům řádů nižších. V této nepřerušené posloupnosti je tak hodnota veličiny referenčního materiálu pomocí odpovídajících měřicích procedur postupně přenášena na kalibrátory nižšího řádu a končí až na úrovni měřicího postupu, určeného k rutinnímu měření běžných vzorků. Hodnota primárního standardu je pomocí primární referenční metody odvozena přímo od odpovídající jednotky SI. Současně s přenosem hodnot kalibrátoru je na každém stupni stanovena nejistota těchto hodnot, která se postupně, směrem ke kalibrátorům nižšího řádu, zvyšuje. Existence výše popsané posloupnosti je základem vlastnosti, označované pojmem metrologická návaznost. Ve smyslu definice podle mezinárodního metrologického slovníku (VIM) se metrologickou návazností rozumí vlastnost výsledku měření nebo hodnoty etalonu, která umožňuje určit jejich vztah k uvedeným referencím, zpravidla národním nebo mezinárodním etalonům, a to pomocí nepřerušenoho řetězce porovnávání, jejichž nejistoty jsou uvedeny.

Schematicky je model hierarchie kalibrací a návaznosti na jednotku SI zobrazen na Obrázku 26.



Obrázek 25. Hierarchie kalibrace a metrologická návaznost na SI. (převzato podle ČSN EN ISO 17511:2004; CGPM – Všeobecná konference pro váhy a míry, BIPM – Mezinárodní úřad pro váhy a míry, NMI – národní metrologický institut, ARML – akreditovaná referenční měřicí laboratoř, ML – laboratoř výrobce)

Bohužel v případě měření, která bývají realizována pomocí imunoanalytických metod, je prokázání návaznosti často velmi problematickou úlohou. V praxi je stanovováno mnoho veličin (analytů), pro které nejsou dostupné certifikované primární referenční materiály ani měřicí postupy. Díky tomu nemohou být tyto veličiny ani „kompletně“ návazné až na jednotku SI a jejich návaznost končí v hierarchii kalibrací na některém z nižších stupňů. Těmi mohou být referenční materiály konvenčně přijaté nějakou obecně uznávanou autoritou (například organizací WHO), nebo v horším případě jen pracovní kalibrátory výrobce IVD.

Problematikou zajišťování návaznosti měření v oblasti laboratorní medicíny se zabývá Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM), fungující na základě společné deklarace tří mezinárodních organizací – CIPM, IFCC a ILAC. Cílem JCTLM je podpořit dosažení srovnatelnosti a standardnosti výsledků měření v laboratorní medicíně v zájmu

naplnění požadavků směrnice Evropské komise 98/79/EC (EC IVDD). Jedna ze dvou pracovních skupin JCTML-WG1 „Referenční materiály a referenční postupy“ poskytuje přehledy, seznamy, charakteristiky a literární informace o existujících referenčních materiálech a metodách. V databázi přístupné na stránkách JCTLM jsou k dispozici informace o referenčním materiálech a referenčních metodách [<http://www.bipm.org/jctlm/>].

Standardizace imunoanalytických metod

Standardem se obecně rozumí určená látka (analyt) s deklarovanou koncentrací. Musí jít o čistý, homogenní, stabilní preparát analyzované látky, který má v ideálním případě definovanou strukturu a molekulovou hmotnost. Tato podmínka však v mnoha případech v praxi nemůže být splněna. Lze proto hovořit o dvou skupinách standardů v závislosti na vlastnostech látek, ze kterých jsou připravovány a pro jejichž stanovení jsou používány.

Do první skupiny patří látky se známým složením (tím i strukturou a molekulovou hmotností), které mohou být produkovány chemickou syntézou s velmi vysokou čistotou (99,9%). Příkladem mohou být jednodušší biologicky aktivní látky, jako jsou steroidy, thyreoidální hormony nebo léky, které jsou komerčně dostupné v čisté formě. Tyto látky mohou sloužit pro i přípravu primárních standardů nejvyšší metrologické kvality. Pracovní roztoky standardů (kalibrátory pro měřicí metodu) je možno připravit rozpuštěním přesné navážky standardu v přesně známém objemu vhodného rozpouštědla.

Do druhé skupiny patří látky, jejichž struktura naopak není úplně jednoznačně definovatelná. Tyto látky není možné připravit chemickou syntézou a získávají se tak jinými postupy, například izolací z biologických materiálů, často s obtížným zajištěním reprodukovatelnosti výsledku. U těchto preparátů mohou nastávat problémy s homogenitou, znečištěním látkami s příbuznými vlastnostmi, prekursory a metabolity. Takovéto látky nemohou být dostatečně definovány chemickými a fyzikálními metodami, takže u nich není možné zajistit návaznost na jednotku SI a pro numerické vyjadřování velikosti odpovídajících veličin jsou pak používány mezinárodně dohodnuté jednotky (IU). Tak je tomu např. u řady složitějších biologicky aktivních látek jako například proteinových či peptidických hormonů, nádorových markerů bílkovinné povahy apod. Ze skutečnosti, že se v těchto případech nejedná o

adekvátně definované analyty pak vyplývá i fakt, že pravá hodnota měřené veličiny je v těchto případech tudíž reálně neznámá.

Z hlediska použití standardu v imunoanalytické metodě je rovněž nutným požadavkem, aby se jednalo o preparát, který je v maximální míře imunochemicky shodný s určovanou látkou.

Pro analyty, které bývají stanovovány imunoanalytickými metodami, jsou referenční metody a primární referenční materiály zatím dostupné pro měření koncentrací velmi omezeného počtu látek nepeptidické povahy, jako jsou například:

- celkový tyroxin (T4 celkový)
- aldosteron
- testosteron
- 17- β -estradiol
- progesteron
- kortizol

Pouze u těchto látek tak existuje předpoklad pro zajištění návaznosti jejich měření až na jednotku SI. V ostatních případech (bez takovéto návaznosti) nelze dosáhnout dostatečné míry jednotnosti a vzájemné porovnatelnosti výsledků měření. I když byly pro některé z těchto látek připraveny a schváleny mezinárodní referenční materiály, není tato skutečnost vzhledem k charakteru analytu automatickým předpokladem zajištění vzájemné porovnatelnosti výsledků měření.

Vedle problémů spojených jednoznačným definováním stanovovaného analytu jako chemického individua existují rovněž problémy spojené s přípravou vhodných pracovních kalibrátorů a kontrolních materiálů a s jejich komutabilitou, projevující se například rozdílnou imunoreaktivitou referenčních materiálů nebo kalibrátorů a měřených nativních vzorků.

Kalibrační materiály jsou často připravovány izolací z produkčních žláz a tkání a nejsou například glykosylovány, zatímco zkoušené biologické materiály ano. Purifikace analytů po jejich izolaci může vést k částečné nekontrolovatelné degradaci. I látky připravované rekombinantními technikami, "pozměňují" často svoji strukturu, a v důsledku toho se zvyšuje pravděpodobnost výrazných vlivů matrice.

Významnou roli pro zhoršenou porovnatelnost výsledků imunoanalytických metod sehrávají rovněž skutečnosti vyplývající z přímé podstaty imunochemické reakce, tedy vazby specifické protilátky a antigenu, ovlivněné nejen charakterem stanovovaného analytu, ale i vlastnostmi použitých protilátek. Ovlivňujícími faktory mohou být například:

orientace protilátek k epitopům, nacházejícím se v málo stabilních oblastech proteinových molekul, například v oblastech podléhajících proteolýze v podmínkách in-vitro,

orientace protilátek k oblastem, které nejsou nositeli specifických fyziologických vlastností molekul (hCG, TSH)

používání protilátek, které nejsou schopné reflektovat různý stupeň glykosylace, ale i syalilace, sulfatace, degradace či agregace imunochemických analytů

různá úroveň glykosylace často typická pro specifické chorobné stavy a projevující se často také přítomností různých izoform imunochemického analytu (použité analytické systémy nejsou obvykle schopné postihnout ani základní poměr jednotlivých izoform).

Konečně průběh imunochemické reakce může být poměrně zásadním způsobem ovlivněn také samotnými reakčními podmínkami, jako jsou například pH, iontové síly, přítomnost detergentů apod. Tyto vlivy nejsou někdy dostatečně známy a respektovány.

Ve svém důsledku jsou uvedené skutečnosti důvodem vysoké závislosti výsledků imunochemických měření na použitém analytickém systému (kombinace použitých protilátek, podmínky imunochemické reakce apod.). Z hlediska praktické aplikace tak u těchto metod neexistují předpoklady pro obecně akceptovatelné jednotné hodnoty referenčních intervalů a diagnostických rozhodovacích limitů.

Kapitola 5 -Zajištění kvality v laboratoři

Marie Karlíková, Radek Kučera

Kontrola kvality v klinické laboratoři je systém, jehož cílem je zajistit, aby výsledky vydané laboratoří byly analyticky validní, správně interpretované a použitelné lékaři při

diagnostickém a terapeutickém rozhodovacím procesu. Tento systém musí mít vybudovanou fungující organizační infrastrukturu a dodržovat platné postupy týkající se výběru a školení personálu, vybavení laboratoře atd. Uznáním, že laboratoř tyto postupy skutečně dodržuje, je její **akreditace** neboli oficiální uznání způsobilosti. Prověřování systému kontroly kvality se provádí průběžně formou auditů.

Akreditovaná laboratoř musí splňovat tyto podmínky:

- Zajistit si **vnitřní** neboli **interní kontrolu kvality** (VKK, angl. IQC),
- Účastnit se některého z programů **vnějšího** či **externího hodnocení kvality** (EHK, angl. EQA).

Interní kontrola kvality

Interní kontrola kvality zahrnuje postupy prováděné personálem laboratoří pro průběžné sledování přesnosti a správnosti provádění analytických metod a pro rozhodnutí, zda jsou výsledky platné pro lékaře. Postupy VKK mají **okamžitý** efekt na laboratorní práci a vedou ke schválení dané série laboratorních výsledků nebo naopak k jejímu vyloučení.

Vhodně nastavený systém řízení kvality vždy zahrnuje

- 1) indikativní složku- včasné odhalení neshody
- 2) kurativní složku - analýzu a odstranění příčin
- 3) zpětnou vazbu - úpravu systému tak, aby se zamezil další výskyt podobné neshody.

Sledují se vybrané parametry (tzv. **kontrolní parametry**), které charakterizují jednotlivé metody stanovení. Dále se používají **kalibrátory** a **kontrolní materiály** zařazené do jednotlivých sérií měření. K pravidelnému vyhodnocování analýz kontrolních vzorků se používají **statistické metody** a **regulační grafy** s cílem monitorovat a minimalizovat chybu měření a získat podklady pro určení **nejistoty měření**.

Kontrolní parametry jsou různé pro různé metody. Například v případě radioimunoanalytických metod se používá **intercept** – koncentrace určované látky, která odpovídá 20%, 50%, 80% snížení radioaktivity vzorku B vzhledem k nulové hodnotě B₀ (B/B₀) pro metody RIA a zvýšení (B/B_{max}) pro metody IRMA. Nejčastěji se hodnotí 50%

intercept. (B_{max} - je hodnota radioaktivity nejvyššího standardu, B_0 - je hodnota radioaktivity nulového standardu. U metod ELISA se zase používá absorbance (bezrozměrná veličina uvádějící, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem).

Kontrolní materiál je vzorek či roztok, který je analyzován pouze pro účely kontroly kvality. Kontrolní vzorek by měl splňovat určitá kritéria: matrice kontrolního vzorku identická nebo co nejbližší měřeným vzorkům (např. lidské sérum); koncentrace analytů v klinicky relevantním rozmezí; stabilní a homogenní; dostatečné množství vzorku v jedné šarži; přijatelná cena. Pro interní kontrolu jsou používány:

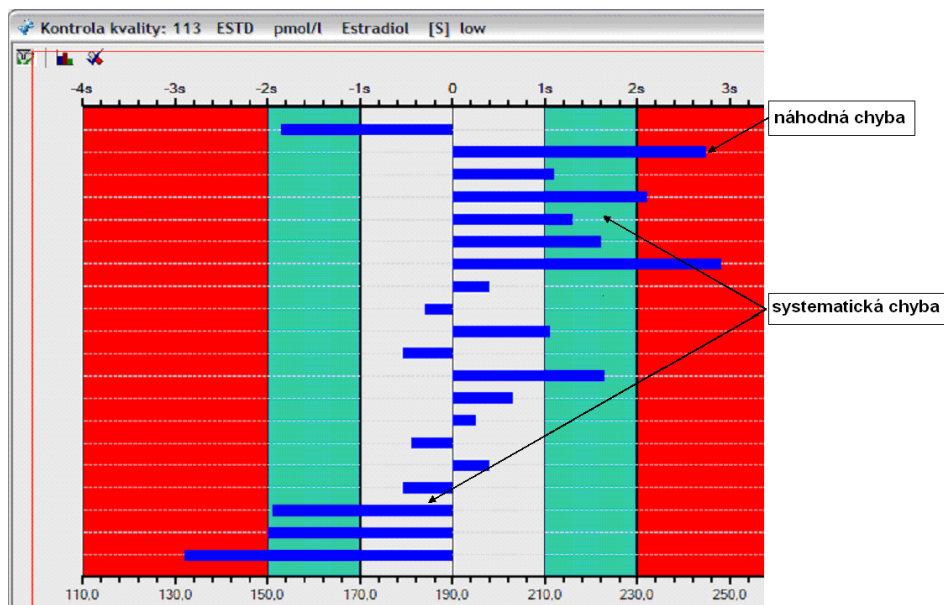
1. **kontroly závislé** – kontroly dodávané výrobcem diagnostické soupravy. Jsou většinou součástí diagnostické soupravy, koncentrační rozmezí je stanovené výrobcem. Jejich nevýhodou je, že často mají odlišnou matrix od vzorků nebo obsahují analyt v purifikované formě a chovají se tedy jinak než vzorky. Navíc se nedají použít pro dlouhodobé sledování stability výsledků vzhledem k časté změně šarží od výrobce.

2. **kontroly nezávislé** - kontrolní materiál dodávaný nezávislými výrobci kontrolních materiálů. Koncentrační rozmezí stanovuje výrobce kontrolního materiálu. Jsou pro rutinní vnitřní kontrolu kvality vhodnější než závislé kontroly.

Doporučuje se analyzovat dvě až tři hladiny kontrolních sér v každé sérii stanovení. Z ekonomických důvodů se dnes řada laboratoří uchyluje k úspornějším metodikám např. pro metody, u kterých je denně průměrný počet analyzovaných vzorků < 10 , je denně analyzován pouze jeden kontrolní vzorek. Více hladin kontrolních materiálů je analyzováno v jedné sérii pouze v případě neshody.

Regulační grafy jsou vítanou pomůckou především v automatizované imunoanalýze, protože řada imunoanalytických automatů již obsahuje software pro jejich tvorbu.

Levey -Jenningsův graf (Obrázek 27) - na ose x je znázorněna průměrná hodnota výsledku (\bar{x}) a násobky směrodatných odchylek (s), na ose y datum či jiná identifikace měření kontrolního vzorku. Lze na něm dobře vidět systematickou chybu (posun výsledků jedním směrem) a odlišit ji od náhodné chyby (obrázek...).



Obrázek 27. Levey-Jenningsův graf – kontrola kvality stanovení estradiolu.

Kritéria pro přijetí či vyloučení výsledků

Pro posouzení výsledků kontrolních vzorků se používají **Westgardova pravidla**. Je to soubor kritérií pro rozhodování, jejichž nastavením lze sledovat jak náhodné, tak systematické chyby měření. Westgardova pravidla zajišťují nízkou pravděpodobnost, že budou správné série vyloučeny, a vysokou pravděpodobnost, že budou odhaleny chybné série.

Více o Westgardových pravidlech na www.westgard.com.

Co dělat, když výsledky kontrolního vzorku v sérii nesplní kritéria pro jejich přijetí?

- znovu analyzovat kontrolní vzorek (5% výsledků bude vně referenčního rozmezí při použití $\pm 2SD$ jako kritéria přijatelnosti)
- připravit čerstvé kontrolní vzorky a znovu je analyzovat (mohla být chyba v rekonstituci vzorků, mohly být poškozené nebo částečně evaporované)
- připravit čerstvé reagenty a reanalyzovat (reagenty mohly být kontaminované nebo částečně evaporované)
- recalibrovat přístroj.

Praktické provádění VKK v laboratoři

Kontrola laborantkou

První kontrolu kvality provádí laborantka bezprostředně po vyhodnocení výsledků. Většinou se posuzuje, zda použité kontroly jsou v deklarovaném rozmezí. U radiosaturační analýzy se posuzuje hodnota interceptů. U plně automatizované imunoanalýzy se sledují parametry nebo regulační grafy nastavené v přístroji.

Kontrola analytikem

Následuje většinou po kontrole laborantkou. Pokud sledované parametry neodpovídají nastaveným pravidlům interní kontroly v dané laboratoři, učiní analytik taková opatření, aby se sledované parametry vrátily do stanovených mezí. V případě potřeby zadrží naměřené výsledky a nařídí opakovat již provedené stanovení.

Kontrola lékařem

Pokud výsledek stanovení vzorku pacienta neodpovídá fyziologickému rozmezí hodnot či anamnéze pacienta, lékař konzultuje výsledek s klinickým lékařem a navrhne buď opakování stanovení vzorku, nebo opakovaný náběr pacienta (v případě, kdy zřejmě došlo k chybě v preanalytické fázi mimo laboratoř).

Externí hodnocení kvality

Externí hodnocení kvality (EHK) je systém objektivního hodnocení laboratorních výsledků externí nezávislou organizací. Jeho cílem je **dosažení a sledování vzájemné porovnatelnosti výsledků jednotlivých laboratoří** (nezávislých zkoušek) na národní i mezinárodní úrovni. Provádí se pravidelným porovnáváním výsledků měření hodnocených laboratoří navzájem a porovnáním s referenčními hodnotami měření (pravdivost výsledků měření).

Při EHK se sledují tyto parametry:

- Návaznost
- Srovnatelnost
- Hodnocení výkonnosti

- Nejistoty měření.

Návaznost výsledku na vyšší metrologickou úroveň byla popsána v Kapitole 4.

Srovnatelnost: Výsledky měření musí být porovnatelné nezávisle na čase, místě a způsobu jejich získání!

Nejistota měření: je to parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, které by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině. Nejistota vymezuje hranice, v nichž je výsledek považován za přesný. Výsledná nejistota se skládá z několika dílčích nejistot:

- Typ A - ze statistických distribucí výsledků série měření, charakterizovaných směrodatnou odchylkou.
- Typ B - nejistota způsobená známými nebo odhadnutelnými příčinami - nedokonalostí měřících přístrojů, vlivem operátora, vlivem použitých metod měření apod.

Z těchto dvou nejistot se určuje tzv. **kombinovaná nejistota**.

Výsledek vyjadřovaný se svojí nejistotou se vyjadřuje jako $x = \text{hodnota} + \text{nejistota} + \text{jednotka}$, např. koncentrace C-reaktivního proteinu CRP = $32 \pm 3 \text{ mg.l}^{-1}$.

Externí hodnocení kvality je realizováno formou tzv. **kontrolních cyklů**, kdy externí organizace zajišťující EHK rozešle skupině laboratoří, které se kontrolního cyklu účastní, vzorky o neznámé koncentraci. V ideálním případě by se měly používat certifikované kontrolní materiály, u kterých je certifikovaná koncentrace analytu.

Laboratoře stanoví koncentrace daného analytu a zašlou své laboratorní výsledky zpět k vyhodnocení. Subjekt zajišťující externí kontrolu kvality provede statistické vyhodnocení a jeho výsledky oznámí zúčastněným laboratořím. Pokud laboratoř uspěje a koncentrace nalezené ve vzorku v dané laboratoři vyhovují pravidlům externí kontroly, získá certifikát pro zkoušený analyt. Certifikát má většinou platnost jednoho roku.

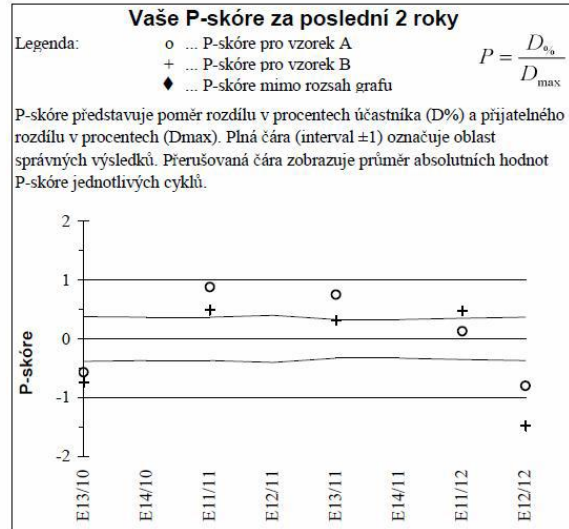
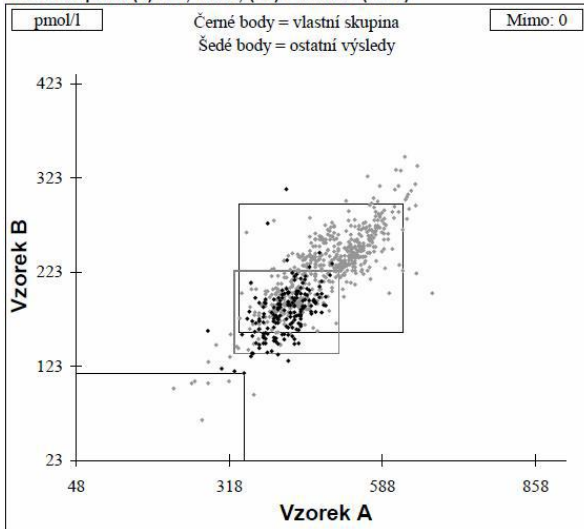
V České republice zajišťuje externí kontrolu kvality firma SEKK spol. s r.o. se sídlem v Pardubicích (Obrázky 28 a 29).

SEKK

E12/12 - Endokrinologie 1 Estradiol

Vaše výsledky [pmol/l]: A = 344 B = 115

Vaše skupina: (4) LIA, ILMA; (29) Siemens (DPC)



Obrázek 28. Protokol externího hodnocení kvality firmy SEKK s.r.o.

SEKK spol. s r.o., Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice, Česká republika,
poskytovatel programů zkoušení způsobilosti č. 7004 akreditovaný ČIA
Podrobnosti o předmětu a rozsahu akreditace naleznete na <http://www.sekk.cz>

CERTIFIKÁT

Cyklus EHK: AKS2/11 - Analyty krevního séra

Stop termín (uzávěrka cyklu EHK): 22.04.2011

Odborná garance: Česká společnost klinické biochemie
Referenční laboratoř pro klinickou biochemii

Účastník: [redacted]

Osvědčujeme, že výše uvedené pracoviště se úspěšně zúčastnilo kontrolního cyklu systému externího hodnocení kvality pro následující zkoušky:

Certifikace srovnatelnosti výsledků

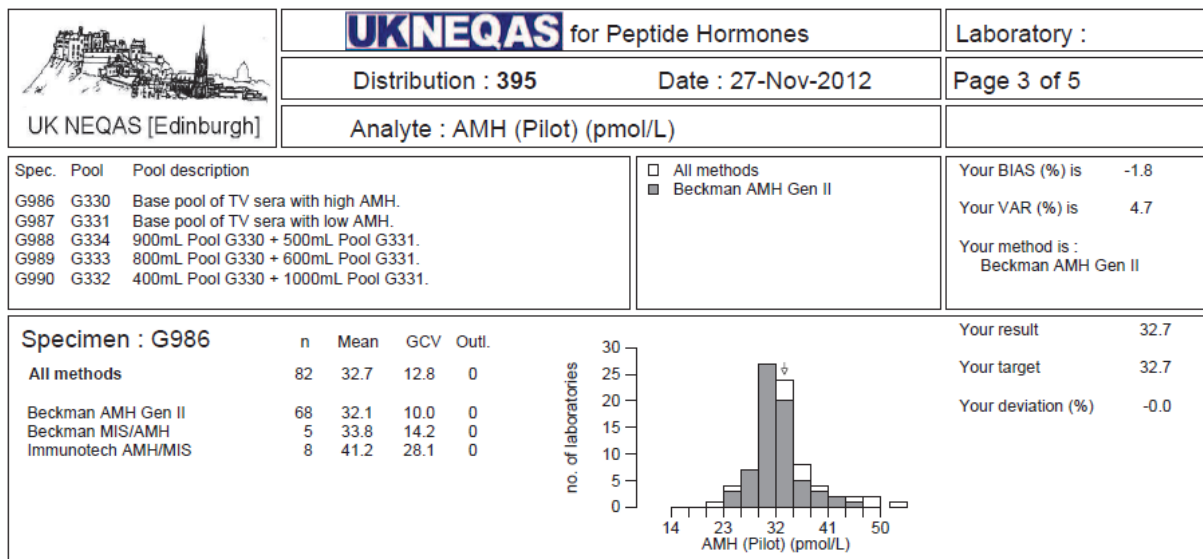
(srovnatelnost se pro tuto zkoušku nehodnotí)
(srovnatelnost se pro tuto zkoušku nehodnotí)
(srovnatelnost se pro tuto zkoušku nehodnotí)
(srovnatelnost se pro tuto zkoušku nehodnotí)
(srovnatelnost se pro tuto zkoušku nehodnotí)
Železo celkové (Metoda s ferrozinem)
(srovnatelnost se pro tuto zkoušku nehodnotí)

Certifikace návaznosti na vztažnou hodnotu referenčního materiálu

Sodný kation (ISE s ředěním)
Draselný kation (ISE s ředěním)
Chloridový anion (ISE s ředěním)
Vápník celkový (ISE)
Fosfáty anorganické (UV-molybdatová metoda)
(návaznost se pro tuto zkoušku nehodnotí)
Hořčík celkový (Fotometrie)

Obrázek 28. Certifikát úspěšnosti - externí hodnocení kvality firmy SEKK s.r.o.

Obdobný systém je zaveden v řadě evropských zemí. Jedním z nejrozšířenějších systémů v Evropě je britský systém externí kontroly kvality UK-NEQAS. Probíhá podobným způsobem jako český SEKK. Na Obrázku 30 je ukázka protokolu vyhodnocení.



Obrázek 30. Protokol vyhodnocení kontrolního cyklu UK NEQAS.

Kapitola 6 - Imunoanalytické metody v klinické praxi

Radek Kučera, Ondřej Topolčan

Používání imunoanalytických metod mělo největší přínos pro medicínu v oblasti:

- stanovení exogenních látek v tělních tekutinách nebo tkáních (lékové hladiny, látky produkované vlivem infekce mikroorganismy apod.)
- stanovení biologicky významných látek produkovaných v lidském těle (hormony, sérové proteiny, nádorové markery, cytokiny, důležité metabolity)

V následujícím přehledu uvádíme příklady nejčastějšího použití imunoanalytických metod v různých oblastech medicíny. Detailní popis a výčet všech metod zdaleka přesahuje možnosti této publikace.

Imunoanalytické metody v endokrinologii

Imunoanalýza přinesla zásadní změny znalostí týkajících se jednak fyziologie žláz s vnitřní sekrecí, jednak etiopatogeneze chorob endokrinních žláz. Tyto nové poznatky se okamžitě přenášely do rutinní praxe a jsou dále využívány především pro **posouzení funkce žlázy s vnitřní sekrecí**, tzn. zda jde o normální funkci (eufunkci) nebo sníženou funkci (hypofunkci) či naopak zvýšenou funkci (hyperfunkci). Většinou také umožní i rozlišení, zda jde o poruchu centrální (řídící endokrinní žlázy) nebo periferní (poruch výkonné cílové endokrinní žlázy). Vzhledem k tomu, že hormony jsou ve vlastní žláze vázány na **vazebný protein**, je účelné v řadě případů určovat i hladinu tohoto proteinu. (např. inzulín – C-peptid, hormony štítné žlázy – tyreoglobulin, atd.). Imunoanalytické metody umožňují stanovit i kromě celkového hormonu i **volný, skutečně aktivní hormon**. Vzhledem k tomu, že nejčastějším onemocněním endokrinních žláz v současnosti jsou onemocnění autoimunní, má pro jejich diagnostiku a monitoraci efektu léčby význam stanovení protilátek proti enzymům endokrinní žlázy jako např. protilátky proti tyreodální peroxidáze (antiTPO) nebo proti nadledvinkové 21-OH-hydroxyláze, nebo přímo proti hormonu (inzulinové protilátky) atd.

Přehled stanovovaných typů látek uvádí Tabulka xx. V endokrinologii můžeme stanovovat následující parametry jak pro diagnostiku, tak terapii endokrinologických onemocnění.

Tabulka 3. Stanovované typy látek v endokrinologii

Hormony	Celkové	Volné
Bílkoviny	Vazebné	Transportní
Protilátky proti	Enzymům	Hormonům a tkáni

Prvním hormonem, který byl stanoven v lidském séru, byl inzulín. Dnes se stanovuje celé spektrum hormonů a jejich metabolitů. Využití řady stanovovaných analytů je sdílené i s dalšími medicínskými obory, takže je velmi těžké u některých látek vymezit úzce endokrinologické indikace.

Tabulka 4. Stanovení hormonů a jejich význam

Hormon	Biologická funkce	Význam
TSH	Stimulace tvorby sekrečního epitelu štítné žlázy	Diagnostika poruch funkce štítné žlázy a monitorace léčby Diagnostika poruch funkce hypofýzy monitorace léčby karcinomu štítné žlázy
T4 a T3 (FT4 a FT3)	Stimulace metabolických pochodů	Diagnostika poruch funkce štítné žlázy
Kortizol	Metabolismus cukrů, proteinů a tuků	Diagnostika onemocnění nadledvin
Inzulin a C-peptid	Regulace metabolismu cukrů a tuků	Diagnostický a prognostický faktor diabetu, metabolického syndromu
Gonadotropiny (FSH, LH)	U žen: Regulace menstruačního cyklu a sekrece pohlavních hormonů U mužů: stimulace Leydigových buněk	Diagnostika onemocnění hypofýzy, diagnostika příčin poruch menstruačního cyklu, a sterility Diferenciální diagnostika hypogonadizmu.
Ženské pohlavní hormony (estradiol a metabolity)	Vývoj ženských druhotných sexuálních znaků	Poruchy menstruačního cyklu, hypogonadismus, osteoporóza
Progesteron	Příprava dělohy pro nidaci vajíčka, udržování těhotenství	Poruchy menstruačního cyklu, hypogonadismus
Testosteron	Vývoj mužských druhotných pohlavních znaků	Hypogonadismus, virilizační syndrom u žen
hCG	Těhotenský hormon : udržování funkce žlutého tělíska, sekrece progesteronu	Těhotenský test, nádory plodu
Prolaktin	Růst mléčné žlázy, iniciace sekrece mléka	Poruchy menstruačního cyklu
Renin	Regulace krevního tlaku	Diferenciální diagnostika sekundární hypertenze, nádory produkující renin
Aldosteron	Hlavní mineralokortikoid, zvyšuje resorpci sodíku a sekreci draslíku	Primární hyperaldosteronismus, diferenciální diagnostika sekundárních hypertenzí, selhání nadledvin
Parathormon	Hormon příštítných tělísek, reguluje hladinu vápníku v krvi	Primární a sekundární hyperparatyreóza, diferenciální diagnóza hypo a hyperkalcémie, selhání ledvin
Vitamin D	Řízení metabolismu vápníku v kostech	Hyperkalcémie nejasné etiologie, rachitis - diferenciální diagnostika, selhání ledvin
STH, GH	Řízení růstu buněk v organismu	Diagnostika poruch růstu

Vysvětlivky: TSH = tyreoidu stimulační hormon; T3 = trijodtyronin; T4 = tyroxin; FT3 = volný trijodtyronin; FT4 = volný tyroxin; FSH = folikulostimulační hormon; LH = luteinizační hormon; hCG = lidský choriový gonadotropin, STH, GH = somatotropní hormon, růstový hormon

Imunoanalytické metody v onkologii

Imunoanalýza má své pevné místo v onkologické diagnostice především díky stanovení nádorových markerů. Podle klasické definice jsou nádorové markery laboratorně prokazatelné biochemické látky, přítomné v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu. Nádorové markery prokazatelné v séru či jiných tělesných tekutinách jsou solubilní (sérové či humorální nádorové markery) nebo se vyskytují v nádorových buňkách či na jejich povrchu celulární (tkáňové nádorové markery). V následujícím textu je věnována pozornost především sérovým nádorovým markerům, rutinně stanovovaným v imunoanalytické laboratoři.

Optimální požadavky kladené na ideální nádorový marker jsou následující:

- je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- koreluje
 - s velikostí nádoru
 - se stádiem onemocnění
 - s prognózou
 - s účinností terapie.

V klinické praxi neexistuje v současné době žádný nádorový marker, který by tato kritéria splňoval!

Pro praxi je důležité, že nádorové markery nejsou ani nádorově ani orgánově specifické. Je proto nutné si vždy uvědomit optimální indikace a současně i limitace těchto vyšetření. Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především k včasnému zachytu recidivy či progresu onemocnění a tím i k rychlejšímu terapeutickému zákroku, který může prodloužit život nemocného.

Tabulka 5. Nádorové markery

Skupiny látek	Nádorový marker	Indikace
Hormony	hCG	Nádory plodu, nádory varlat, choriokarcinom
	Prolaktin	Nádory plic, neuroendokrinní nádory
	PTH	Neuroendokrinní nádory
	Kalcitonin	Medulární thyroideální nádory
	Tyreoglobulin	Thyroideální nádory
	GH	Neuroendokrinní nádory
Onkofetální antigeny	AFP	Nádory jater, germinální nádory
	CEA	Nádory kolorekta, plic, prsu, štítné žlázy
Karbohydrátové antigeny	CA 125	Nádory vaječnicků
	CA 15-3	Nádory prsu
	CA 19-9	Nádory jater, pankreatu, žlučových cest
	CA 72-4	Nádory žaludku, jícnu
Cytokeratiny	Cyfra 21-1	Nádory plic, děložního čípku, žaludku, hlavy a krku, nemalobuněčný karcinom plic
	TPA	Nádory prsu, vaječnicků, děložního čípku, žaludku
	TPS	Nádory prsu, děložního čípku
Enzymy	PSA	Nádory prostaty
	LDH	Nádory varlat, lymfomy
	TK	Hematoblastomy, lymfomy, leukémie
	HE4	Nádory vaječnicků
	NSE	Neuroendokrinní nádory, malobuněčný karcinom plic
	Chromogranin A	Nádory pankreatu, plic, neuroendokrinní nádory

Vysvětlivky: hCG = lidský choriový gonadotropin; PTH = parathormon; GH = růstový hormon; AFP = alfafetoprotein; CEA = karcinoembryonální antigen; Cyfra 21-1 = cytokeratinový fragment 21-1; TPA = tkáňový polypeptidický antigen; TPS = tkáňový polypeptidický specifický antigen; PSA = prostatický specifický antigen; LDH = laktát dehydrogenáza; TK = thymidinkináza; HE4 = human epididimis protein 4; NSE = neuron specifická enoláza;

Imunoanalytické metody v asistované reprodukci

Asistovaná reprodukce zahrnuje všechny metody, léčebné postupy a techniky, které vyžadují manipulaci se zárodečnými buňkami (ocyty, spermie). Imunoanalytické laboratorní metody pomáhají v metodách asistované reprodukce především stanovením hormonálních hladin u žen, které mají problémy s otěhotněním. Nejvíce jsou tyto metody využívány při léčbě neplodnosti způsobem in vitro fertilizace (IVF).

Poprvé byla tato metoda úspěšně použita v roce 1978. Metoda je vhodná pro případy ženské neplodnosti s neprůchodností vejcovodů, pro těžší případy mužské neplodnosti a pro některé další případy neplodnosti zejména imunologické povahy. IVF spočívá v hormonální stimulaci ovarií ženy k vývoji a dozrání většího počtu vajíček v pokud možno obou ovariích. Vajíčka se po dosažení optimálního stupně vývoje získávají z ovarií transvaginální punkcí a aspirací. Získaná vajíčka se ve zkumavce smísí se speciálně upravenými spermii z ejakulátu jejího partnera event. dárce. Oplozená vajíčka se kultivují za speciálních podmínek a vyvíjejí se v embrya. Po několika dnech kultivace (většinou 2-5 dnů) se nejlepší embrya přenesou do dělohy ženy. Nejčastěji se transferují do dělohy 2 embrya. Zbylá embrya je možno zamrazit a uchovat pro pozdější použití. Jedním z vyšetření před zařazením do IVF cyklu je stanovení hormonálního profilu. Hormonální profil pomůže odhalit příčinu neplodnosti způsobenou nerovnováhou v hladinách hormonů.

Tabulka 6. Analyty vyšetřované při asistované reprodukci

Hormon	Vysvětlivky
FSH a LH	K vyloučení selhávání ovarií. Abnormální hladiny FSH a LH mohou ukazovat na neplodnost způsobenou hyperprolaktinémií. Poměr LH-FSH může být užitečný v diagnostice PCOS (syndromu polycystických ovarií) a ve výběru vhodné léčby
Prolaktin	Hyperprolaktinémie blokuje působení LH a FSH. Vysoké hladiny mohou znamenat přítomnost nádoru hypofýzy a způsobují menstruační a ovulační poruchy.
Estradiol	Stanovení funkce ovarií. Hladiny se užívají ke sledování vývoje folikulů.

Testosteron	K vyloučení virilizace. Vysoká hladina může ukazovat na možný tumor ovarii či nadledvin nebo na PCOS. Hladinu též zvyšují některá antikonvulziva (barbituráty, klomifen).
Progesteron	Prokazuje přítomnost ovulace. Používá se k rozlišení adekvátnosti luteální fáze.
Androgeny, DHEAS, kortizol, androstendion, 17-OHP, SHBG	Ke stanovení produkce androgenů. Příliš vysoké hladiny mohou být důvodem neplodnosti u žen. Příliš nízké hladiny mohou být důvodem neplodnosti u mužů. Lze rozlišit původ nadměrné sekrece androgenů.
TSH, FT3, FT4, anti-TPO	Užívá se k diagnóze snížené činnosti štítné žlázy, která může vést k málo časté ovulaci.
AMH	Užívá se ke stanovení ovariální rezervy. Umožňuje stanovení individuálního IVF protokolu a minimalizovat tím riziko OHSS (ovariálního hyperstimulačního syndromu).

Vysvětlivky: FSH = folikulostimulační hormon; LH = luteinizační hormon; DHEAS = dihydro-epiandrosteron sulfát; 17OHP = 17-hydroxyprogesteron; SHBG = sexuální hormony vázající globulin; TSH = tyreoidu stimulující hormon; FT3 = volný trijodtyronin; FT4 = volný tyroxin; anti-TPO = protilátky proti tyreoidální peroxidáze; AMH = anti mülleriánský hormon

Imunoanalytické metody v prenatální a neonatální diagnostice

Obecná pravidla medicínského screeningu byla zformulována Světovou zdravotnickou organizací (WHO) již v roce 1968.

Prenatálním screeninem se rozumí testování rizika přítomnosti poruchy u plodu v období nitroděložního vývoje. Prenatální screening je obvykle zaměřen na detekci Downova syndromu a dalších vrozených chromosomálních aberací (VCA), dále pak vrozených vývojových vad (VVV) plodu jako jsou poruchy uzávěru neurální trubice, vrozené vady srdce, orofaciální rozštěpy. Diagnostika geneticky podmíněných onemocnění plodu je dle etiologie poruchy a charakteru patologického fenotypu založena na molekulárně genetických, biochemických a zobrazovacích metodách.

Ideální prenatální screeningový test by měl splňovat řadu protichůdných požadavků: přinášet nízká rizika pro těhotnou ženu i plod, být relativně jednoduchý, nenákladný a přítom

poskytovat vysokou senzitivitu a specificitu. Současný systém prenatalního screeningu se snaží tomuto ideálu přiblížit využitím několika přístupů a kombinací jejich výsledků.

Tabulka 7. Prenatální screeningové markery

Screeningový marker	Klinické zhodnocení
hCG	Vysoké hodnoty v maternálním séru jsou využívány pro screening Downova syndromu v I. i II. trimestru těhotenství. Snížené hladiny jsou u Edwardsova syndromu, triploidie aj.
AFP	Snížené hodnoty u Downova syndromu a jiných VCA plodu.
uE3	Snížené hodnoty u Downova syndromu a jiných VCA plodu.
PAPP-A	Snížené hodnoty u Downova syndromu a jiných VCA plodu.
Inhibin A	Vysoké hodnoty v I. i II. trimestru při Downově syndromu

Vysvětlivky: hCG = lidský choriový gonadotropin; AFP = alfafetoprotein; uE3 = nekonjugovaný estriol; PAPP-A = Pregnancy Associated Plasma Protein A

Prenatální screening se provádí v 1. a 2. trimestru těhotenství.

- 1. trimestr - kombinovaný test (PAPP-A, HCG)
- 2. trimestr - double test (HCG, AFP)
- triple test (HCG, AFP, uE3)
- kvadruple test (HCG, AFP, uE3, inhibin A)

Novorozenec po narození je předmětem zájmu další screeningové aktivity zdravotnického systému - tzv. **neonatálního screeningu** (NS). NS celoplošně vyhledává vrozená nebo dědičná onemocnění či poruchy v jejich časném, preklinickém stadiu. NS v užším smyslu je vlastně vyhledávání chorob na základě stanovení koncentrace specifické látky – analytu, resp. někdy i průkazu genové mutace v kapce krve odebírané na filtrační papír všem novorozencům v dané populaci. V ČR je prováděn NS celkem pro 13 onemocnění. U čtyřech z nich se uplatňuje nebo uplatňovala při jeho provádění imunoanalýza.

Tabulka 8. Neonatální screening

Onemocnění	Screeningový marker
Fenylketonurie	Fenylalanin, Tyrosin
Kongenitální hypotyreóza	TSH
Kongenitální adrenální hyperplazie	17-OHP
Cystická fibróza	IRT

Vysvětlivky: TSH = tyreoidu stimulující hormon; 17OHP = 17-hydroxyprogesteron;
IRT = imunoreaktivní trypsinogen;

Imunoanalytické metody v diagnostice infekčních onemocnění

Imunoanalýza je využívána v diagnostice řady infekčních onemocnění a její zavedení do praxe umožnilo výrazný diagnostický i léčebný pokrok.

Zásadní přínos měla imunoanalýza pro diagnostiku hepatitidy. Bylo identifikováno pět typů virů, které způsobují hepatitidu (A–E). Počáteční symptomy jsou velmi nespecifické a individuální. Díky imunoanalýze je možné specificky odlišit jednotlivé virové infekce, což je pro klinickou praxi velmi důležité, protože jednotlivé typy hepatitid se z hlediska závažnosti výrazně liší.

Imunoanalytické metody jsou dále využívány pro testování infekčních chorob u těhotných žen zejména pro infekce, které mohou způsobit ohrožení plodu. Využívají se zejména testy pro expozici rubeolou, toxoplazmózou a cytomegalovirem. Testují se především protilátky a to jak typu IgM, tak také IgG. Přítomnost IgM protilátek znamená, že pacient přišel čerstvě do styku s infekčním agens. Při pozitivitě IgG protilátek se jedná o chronickou infekci. Typ protilátky nalezený u novorozence tak může lékaři pomoci určit, zda novorozenec je imunizován pasivně od matky, nebo zda došlo k přímé k infekci plodu.

Výše uvedené testy se využívají vedle skríningu těhotných žen také pro osoby se sníženou funkcí imunitního systému (pacienti s AIDS, onkologičtí pacienti, pacienti s transplantovanými orgány).

Terapeutické monitorování léčiv

Monitorování léčiv se provádí s cílem dosáhnout optimální koncentrace léčiva v systémové cirkulaci. Monitorovány jsou léky, u kterých existuje úzké terapeutické rozmezí, ve kterém se musí koncentrace léku pohybovat, aby podaný lék byl účinný a zároveň nebylo dosaženo toxických hladin. Dále se monitorují léky, po jejichž podání není ihned patrný přímý biologický efekt. Při monitorování léků je třeba znát chování léku v organismu po jeho podání, důležité je načasování odběru vzorku (před podáním nebo po podání léčiva) a jaký vzorek se použije ke stanovení (krev, plazma, moč).

Druhou možností monitorace léčby je, že netestujeme vlastní lék, ale jeho léčebný efekt v organismu, to je např. změnu látky, která má být léčbou ovlivněna (homon, nádorový marker apod.).

Tabulka 9. Monitorování léčiv

Léková skupina	Příklady monitorovaných léčiv
Antiarytmika	Digoxin
Antiastmatika	Teofylin
Antibiotika	Amikacin, Gentamycin, Tobramycin
Antidepresiva	Amitriptilin, Imipramin
Antiepileptika	Fenytoin, Karbamazepin, Kys. valproová
Imunosupresiva	Cyklosporin
Cytostatika	Metotrexat

Další možnosti využití imunoanalytických metod

Imunoanalytické metody našly své uplatnění i v dalších medicínských oblastech jako jsou např.:

- kardiologie
- kostní metabolismus
- alergie a autoimunitní onemocnění
- zánětlivá onemocnění
- toxikologie

- biomedicínský výzkum
- a další.

Imunoanalytické metody mimo oblast humánní medicíny

Imunoanalýza se také uplatňuje ve veterinární medicíně, nebo v analytických laboratořích sloužících pro monitorování vody a životního prostředí nebo při kontrole potravin.

Literatura

1. Lapčík O. Od vyvrácené hypotézy k Nobelově ceně. *Vesmír* 2009:88, 704-707.
2. Wild D. (Ed.). *The Immunoassay Handbook*, 4rd Edition. Elsevier Ltd., 2013, 1013 p.
3. Yalow, R.S., Berson, S.A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184, (1959)
4. Wild, D.: *The Immunoassay Handbook*. Elsevier Ltd. Fourth Edition (2013)
5. Price, Ch.P., Newman, D.J.: *Principles and Practices of Immunoassay*. Macmillan Reference Ltd. Second Edition (1997)
6. Zima, T. et al.: *Laboratorní diagnostika*, Galén, (2007)
7. Duffy MJ: Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Med Princ Pract*;22:4–11, 2013
8. Valík D., Zima T., Topolčan O.: Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP), České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) -sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi. (ke stažení na odkazu http://www.cskb.cz/res/file/doporuzeni/TM/TM_dopor.pdf)
9. Friedecký B., Kratochvíla J., Kubiček Z. et al.: Doporučení k vnitřní kontrole kvality. ČSKB, 2008. Ke stažení na odkazu <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuzeni--vnitri-kontrola-kvality>.
10. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi – verze 9, (prosinec 2009), dostupná (po registraci zdarma) na <http://www.enclabmed.cz/>
11. Jabor A., Zámečník M. (eds.) *Preanalytická fáze*. ČSKB a SEKK, 2005, 144 p.
12. Racek J., *Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření* v Racek J., *Klinická Biochemie*, druhé vydání, 2006, Galén