

na příkladu radioimunoanalýzy inzulinu (3). Za tento počin získali mnoho vědeckých ocenění, které se v roce 1977 završilo Nobelovou cenou pro R. Yalowovou. Vstup imunoanalytických metod umožnil poměrně jednoduchou a přesnou kvantifikaci látek, které se doposud nedaly stanovit, anebo se používaly metody velmi pracné a méně přesné. Imunoanalytické metody se postupně rozšířily za hranice endokrinologie a začaly se využívat v biochemii, imunologii a také v TDM při stanovení koncentrace léčivých látek.

Základem všech imunoanalytických metod je reakce antigenu s protilátkou, z nichž jedna složka (častěji antigen-léčivá látka) je označena tak, aby mohlo dojít k následné identifikaci volné a vázané frakce. Protilátky jsou imunoglobuliny, které vykazují specifickou vazebnou aktivitu k antigenu, proti kterému byly připraveny. Protože léčiva patří mezi nízkomolekulární látky (tzv. hapteny), mohou vyvolat imunitní reakci a tvorbu protilátek jen když jsou navázány na bílkovinný nosič. Protilátky mohou být polyklonální nebo monoklonální a jejich kvalita významně ovlivňuje specifitu a selektivitu imunoanalytických metod.

Imunoanalytické metody se v podstatě dělí na heterogenní a homogenní podle toho, zda se musí před vlastním měřením vázaná a volná frakce antigenu oddělit (heterogenní), anebo zda separace vázaného imunokomplexu není nutná a celý proces proběhne tzv. v jedné zkumavce (homogenní). Dále se dělí na kompetitivní (kdy dochází k soutěži o protilátku/antigen) a nekompetitivní s protilátkou/antigenem v nadbytku většinou navázanou na vhodný nosič. Kvantifikace dané látky je pak umožněna buď

měřením koncentrace označeného imunokomplexu, který vzniká v rovnováze mezi značeným a nezačeným antigenem nebo stanovením koncentrace volného značeného antigenu. V obou případech se jedná o nelineární závislost.

Mezi první imunoanalytické metody patřila radioimunoanalýza (Radioimmunoassay RIA), kdy se k označení antigenu/protilátky používal radionuklid, především jód 125 nebo jód 131. Později se hledal jiný způsob značení, který by méně zatěžoval životní prostředí než radioizotopy. Vznikly první enzymoimunoanalýzy (Enzymoimmunoassay EIA), které k označení antigenu nebo protilátky používaly enzymy jako je alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza, beta-galaktozidáza, glukózo-6-fosfát dehydrogenáza apod. Mezi prvními byla heterogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza ELISA s enzymem peroxidázou (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), kde se detekce imunokomplexu prováděla fotometricky za vzniku barevného produktu. Mezi další heterogenní imunoanalýzy patří enzymová analýza na mikročásticích (Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA) která používala ke značení alkalickou fosfatázu a k detekci fluorescenční methylumbelliferon.

Dále se vyvíjely především homogenní kompetitivní enzymové imunoanalýzy jako EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) s glukózo-6-fosfát dehydrogenázou, kde se spektrofotometricky v UV oblasti detekovala měnící se koncentrace NADH. Další homogenní imunoanalýzou byla v analýze léků poměrně rozšířená polarizační fluoroimunoanalýza (Polarisation Fluorescence Immunoassay FPIA) s beta galaktozidázou a s fluoresceinem. Měřila se změna

v polarizaci emitované fluorescence po vytvoření imunokomplexu (4).

K dalším významným imunoanalytickým metodám na stanovení léků patří metody luminiscenční (Luminiscence Immunoassay LIA), které mohou pracovat na principu chemiluminiscence nebo elektrochemiluminiscence. Mezi první typ patří heterogenní chemiluminiscenční imunoanalýza (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay, CMIA), kde je antigen označený akridinium esterem a protilátka je vázána na paramagnetické částice v pevné fázi. Měří se kvantitativní množství světla emitovaného během oxidace peroxidu vodíku v alkalickém prostředí. Dalším typem je elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (Electro-chemiluminescence immunoassay ECLIA). Antigen je označen rutheniovým komplexem a protilátka je obvykle vázána na mikročástice, které se zachytí na povrchu elektrody. Po vložení napětí na elektrodu dochází k emisi světla, která je úměrná koncentraci analytu (5).

V současnosti patří mezi rozšířené imunoanalytické metody takové, které využívají k detekci imunokomplexu nefelometrii nebo turbidimetrii.

Imunoanalytické metody se často používají pro rutinní stanovení koncentrace léčiv vzhledem k možnosti automatizace, rychlosti analýzy a velké průchodnosti vzorků. Soupravy činidel spolu s přístrojovou technikou (automatickými analyzátory) jsou dodávány celou řadou firem především pro nejčastěji monitorované léky, jako jsou antiepileptika první a druhé generace, digoxin, teofylin, vankomycin, aminoglykosidová antibiotika a imunosupresiva.

Tab. 1. Přehled metod používaných pro TDM

látko	Fotometrie	Fluorescence	Luminiscence	Imuno turbidimetrie	HPLC	LC-MS/MS
digoxin	21		214	122		
gentamicin	28	20	47	143		
teofylin	19	15	47	104	4	9
kofoin					10	7
karbamazepin	28	15	78	106	9	7
ethosuximid					44	19
fenobarbital	15	8	34	69	32	8
fenytoin	18	12	45	71	27	8
primidon					44	17
valproát	98	20	89	89		
cyklosporin A	7		113			57
takrolimus			95			61
sirolimus			29			63
everolimus	5		9			64

Údaje z prvního cyklu EHK RfB (Referenzinstitut für Bioanalytik) pro rok 2019 CS1/19 a AK1/19. V tabulce je uveden přehled používaných metod a počty analýz pro jednotlivé léčivé látky.

Zastoupení jednotlivých firem: Fotometrie (Roche, Becman Coulter, Siemens), Fluorescence (Roche), Luminiscence (Abbot, Roche, Siemens), Imunoturbidimetrie (Abbot, Becman Coulter, Roche, Siemens), HPLC (Chromsystems, Recipe, vlastní), LC-MS/MS (Chromsystems, Recipe, vlastní)