

Optické metody

The image features a decorative graphic consisting of five light purple circles. Three circles are arranged in a top row, and two are in a bottom row. The top-left circle is an outline, while the other four are solid. The text 'Optické metody' is centered over the top row of circles.

Denzitometrie
Vertikální fotometrie
Reflexní fotometrie

Denzitometrie



- Optická metoda, která se zabývá měřením optické hustoty
- Reflexní denzitometrie – v odraženém světle
- přímá denzitometrie – v procházejícím světle

Denzitometr



Přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Jedná se o postup, který je podobný fotometrickému stanovení (liší se v uspořádání), zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení

- Zdroj světelného záření: halogenová žárovka
- Monochromátor: interferenční filtry
- Detektor: fotonásobič



Reflexní denzitometrie

Princip: měření intenzity záření odraženého od neprůhledné podložky. Hodnotí se poměr intenzity dopadajícího světla a světla odraženého od barevné plochy

Použití: v tenkovrstvé chromatografii

Přímá denzitometrie



Princip:

- měření intenzity záření procházejícího průhlednou plochou, získává se grafický záznam fotometrovaného úseku.
- Jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru. Plocha těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi.

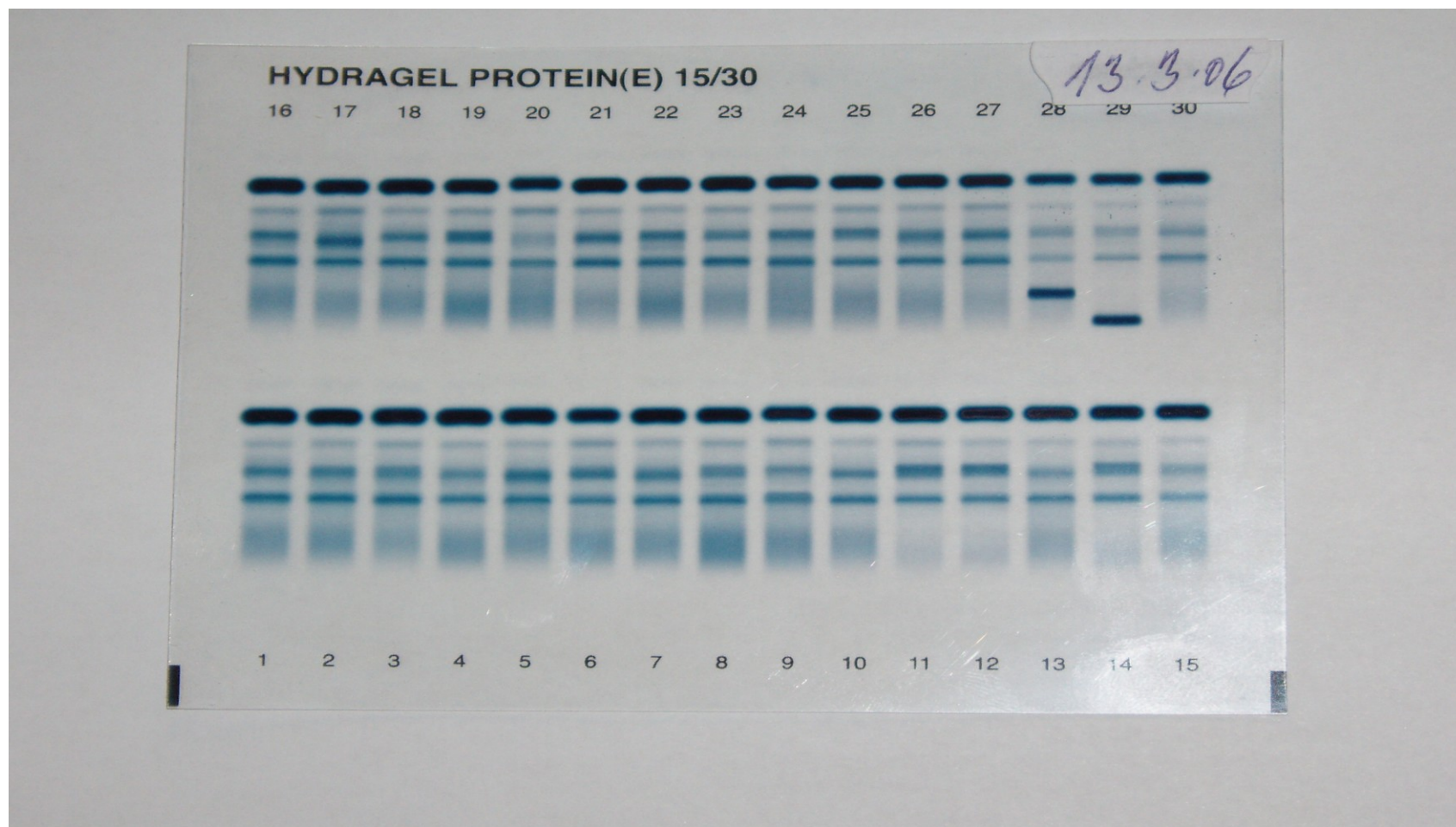
Použití: při hodnocení elektroforeogramů

Denzitometr



- Elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky
- V místě frakcí dochází k částečné absorpci záření – to se projeví při dopadu na detektor
- Po zpracování signálu integrátorem získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí
- Na jedné podložce je současně vyhodnocováno až 30 elektroforetických drah

Elektroforeogram – elektroforéza v plošném uspořádání na agaróze



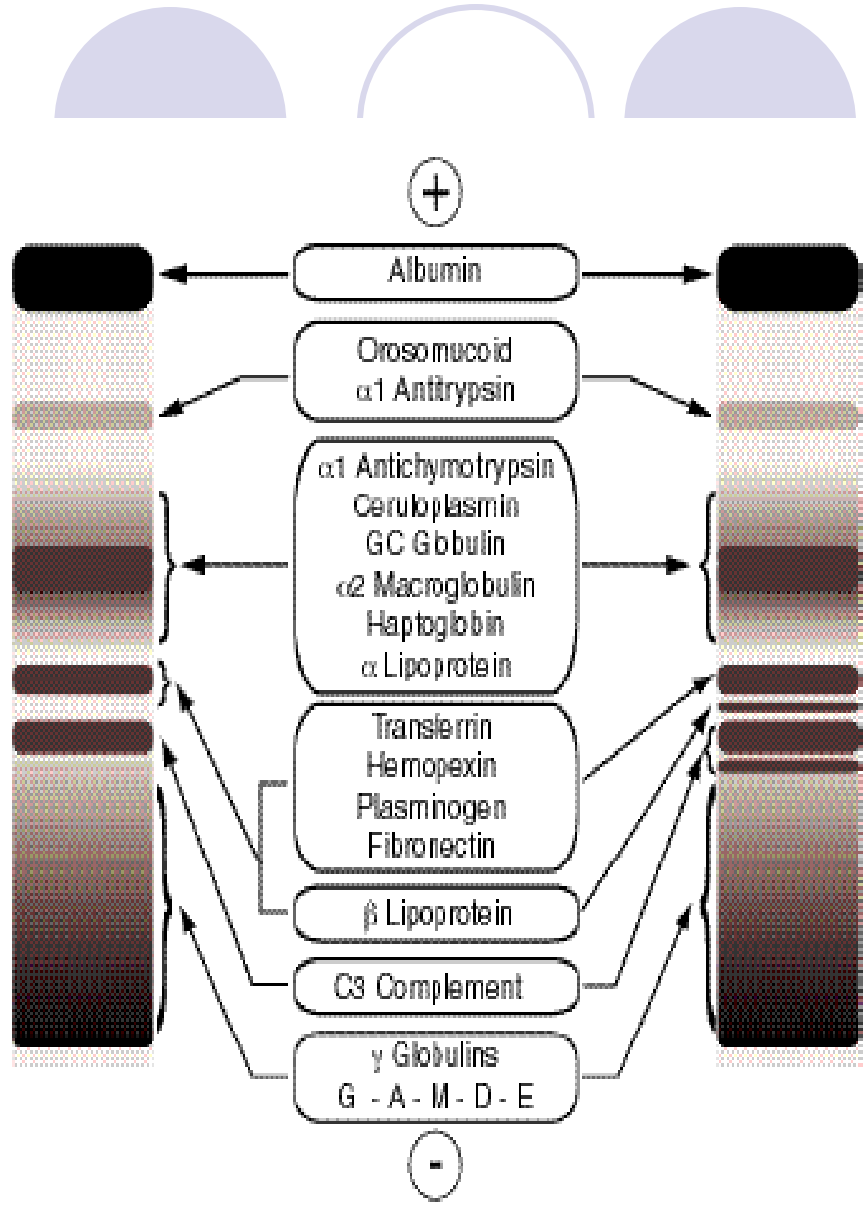
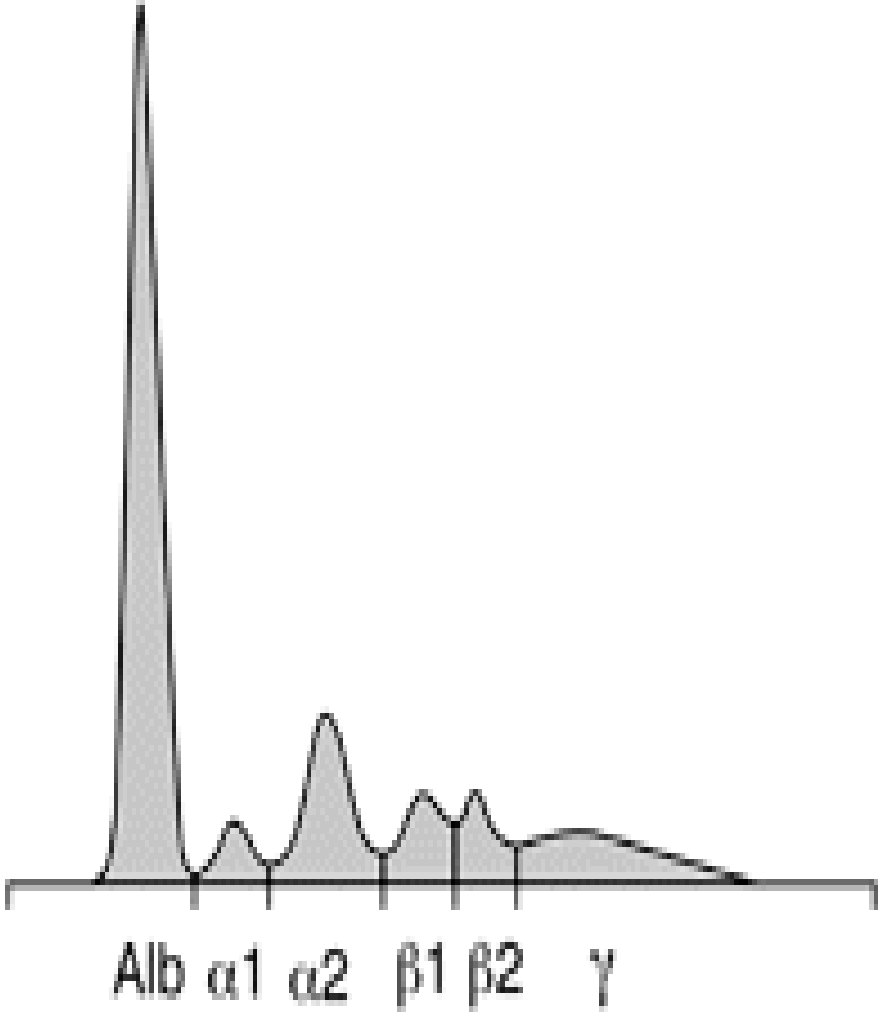
Elektroforéza bílkovin v agarózovém gelu

Dělí bílkoviny krevního séra na 5 (6) frakcí:

Frakce albuminu: tvořena jedinou bílkovinou

Frakce globulinové:

- A1-globuliny: α 1 lipoprotein, orosomukoid, α 1 antitrypsin
- A2-globuliny: α 2 makroglobulin, ceruloplasmin, haptoglobin, pre- β lipoprotein
- B1-globuliny: transferin, fibrinogen, C3, β – lipoprotein
- B2-globuliny: C3
- gama-globuliny: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE



Elektroforetické typy



- Na základě charakteru rozdělení frakcí v elektroforéze - vymizení frakcí, objevení se nových frakcí, nebo jiný vzájemný poměr frakcí, lze usuzovat z určitého elektroforetického typu na určité skupiny chorob. (stavů)

ELFO typ	Elektroforetická frakce					
	Albumin	Globuliny				
		α_1	α_2	β_1	β_2	γ
1. Typ akutního zánětu	↓	↑↑	↑↑	N	(↑)	N
2. Typ chronického zánětu	↓	↑	↑	N	N	↑↑ ^{*)}
3. Typ chronické hepatopatie	↓	↓	↓	↓	↓	↑
4. Typ nefrotického syndromu	↓↓	N	↑↑	↑↑	↑↑	↓
5. Typ malnutrice	↓↓↓	(↑) N	(↑) N	(↓)	N	N
6. Typ monoklonální gamapatie	↓	Kdekoli úzký proužek monoklonálního imunoglobulinu; γ -frakce může zcela vymizet				

Typ akutního zánětu



- Celková bílkovina je normální, lehké snížení albuminu, vzestup a1- a a2-globulinů, případně i b2-globulinů.
- Akutní rozsáhlý zánět, především bakteriální. Nález je u všech akutních stavů (po operacích, úrazech, infarktu myokardu apod.). Akutní hepatitida. Aktivní zánět u revmatoidní arthritidy, u rychle rostoucích malignit (zhoubných nádorů).

Typ chronického zánětu



- Pokles albuminu. Vzestup a1- a a2-globulinů (menší než u typu ad 1.), výrazný vzestup g-globulinů (široký pruh g-globulinů na elektroforeogramu). Jedná se o tzv. polyklonální hyperimmunoglobulinémii.
- Chronické infekční choroby, zánětlivá onemocnění pojiva, autoimunitní choroby, maligní nádory

Typ chronické hepatopatie



- Pokles albuminu, a1-, a2- a b-globulinů (t. j. bílkovin tvořených játry). Vzestup g-globulinů (především IgA, který se nalézá mezi g a b globuliny a tvoří tzv. **b-g můstek** mezi těmito frakcemi, g-globulinová frakce nasedá přímo na frakci b-globulinů)
- Těžká fibróza až jaterní cirhóza, chronická hepatitida.

Typ nefrotického syndromu (ztráty bílkovin)

- Velký pokles albuminu. Pokles g-globulinů. Nárůst a₂- a b-globulinů. (Ztráty především bílkovin s malou molekulou)
- Nefrotický syndrom (chronická glomerulonefritida, postižení ledvin při systémových onemocněních, diabetická glomeruloskleróza, amyloidóza, některá infekční onemocnění)

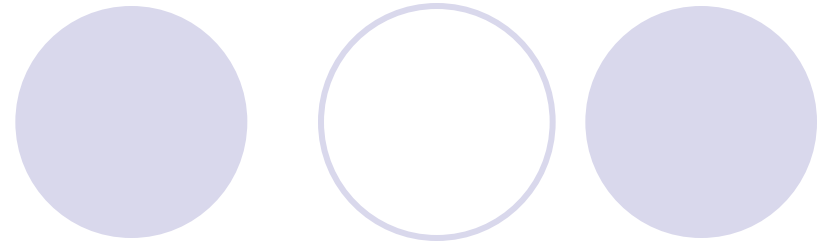
Malnutriční typ

- Celková bílkovina výrazně snížena.
Velký pokles albuminu a b1-globulinů.
- Chybění aminokyselin, z toho vyplývající porucha syntézy bílkovin.

Monoklonální gamapatie

- Nižší koncentrace albuminu. Někde (tj. kdekoli) mezi a₁- až g-globuliny se nachází úzký proužek monoklonálního imunoglobulinu.
- Nádorové onemocnění mnohočetný myelom. Waldenströmová makroglobulinémie, hemoblastózy, karcinom, plazmocytom aj. S věkem výskyt paraproteinů roste, ve stáří se i u zdravých lidí objevují benigní monoklonální imunoglobuliny, a to bez klinických příznaků onemocnění

Vzácnější nálezy



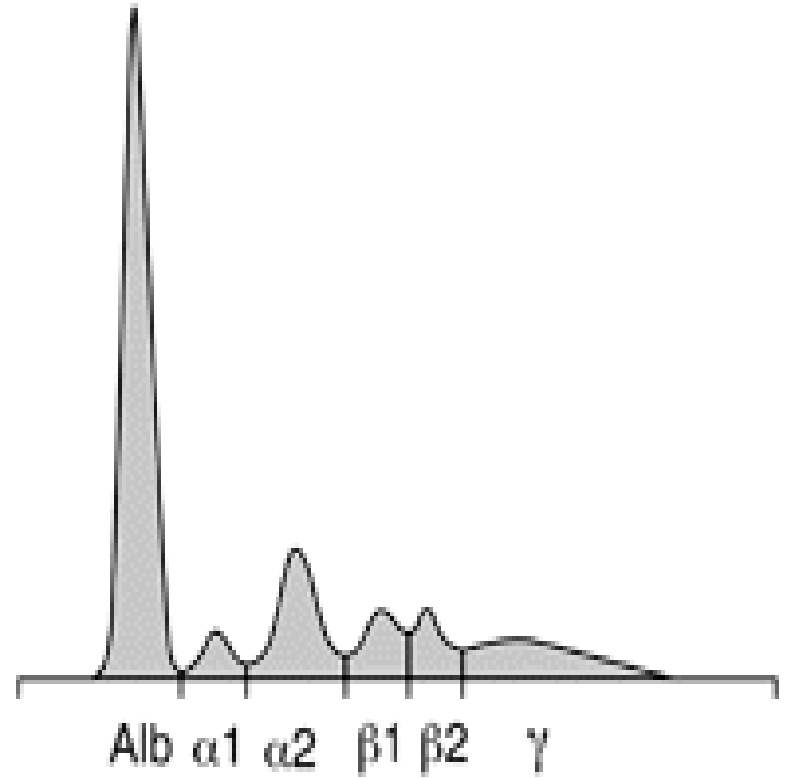
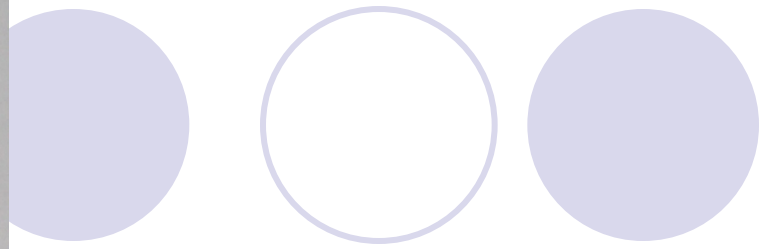
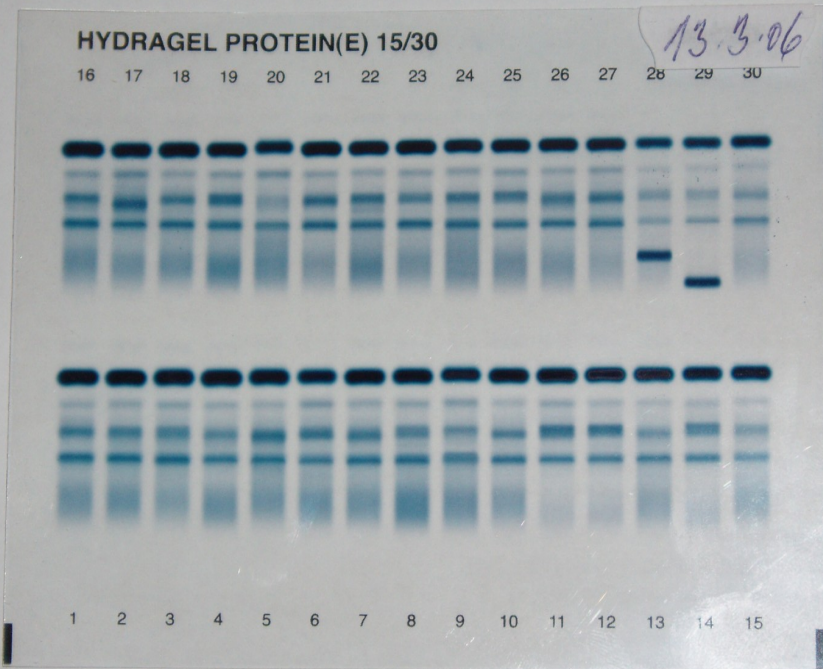
- Bisalbuminémie (zdvojení frakce albuminu), analbuminémie (chybí frakce albuminu), deficit a1-antitrypsinu (chybí a1-frakce), atransferinémie (pokles b1-globulinů), hypogamaglobulinémie (dědičný či získaný defekt syntézy imunoglobulinů); hemolytické sérum (projevy: posun a2-globulinů ke katodě, zvýšení b2-globulinů), fibrinogen (proužek mezi b- a g-globuliny), zvýšení b-lipoproteinů (LDL; intenzivní proužek v b-oblasti)

**Zařízení pro elektroforézu:
poloautomat HYDRASYS (fy SEBIA)**



Denzitometr HYRYS (fy SEBIA)





Význam denzitometrie



- Kvantitativní vyhodnocení jednotlivých frakcí získaných elektroforetickým dělením bílkovin v biologickém materiálu
- Vedle grafického výstupu (křivka elektroforeogramu) , vypočítává software denzitogramu procentuální zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí

Význam v diagnostice MG

- ELFO bílkovin s následnou denzitometrií má klíčový význam pro diagnózu MG
- MG: jsou definovány jako skupina onemocnění, které jsou charakterizovány proliferací jednoho klonu plazmatických buněk produkujících homogenní imunoglobulin. Toto onemocnění má maligní nebo potenciálně maligní charakter

Význam v diagnostice MG

V elektroforeogramu pátráme vizuálně po atypické zóně. V séru mohou mlg migrovat v širokém rozsahu od oblasti α_2 -globulinů až po katodický konec zóny gama-globulinů.

Normální rozsah migrace polyklonálního IgG je celá katodická část počínaje zónou b1, IgM – migruje v anodické zóne gama, IgA – migruje v mezizóně b1 a b2- globulinů.

Metodou volby pro identifikaci mlg v séru a moči je elektroforéza s vyšší rozlišovací schopností.
(HR)

HR - elektroforéza



- Automatizovaný systém – Hydrasys (fy Sebia)
- Manuální postup podle Johanssona

V obou případech probíhá dělení při vyšším napětí (15-20 V/cm) a elektroforeogram je delší (6-8 cm)

MATĚJEK
2921/10

-11- M

POPOVOVÁ
2922/10

-11- M

PAZDĚLEK
2923/10

-11- M

ROUKOVÍŘOVÁ
2902/13

-11- M

RUSCHKA
2910/13

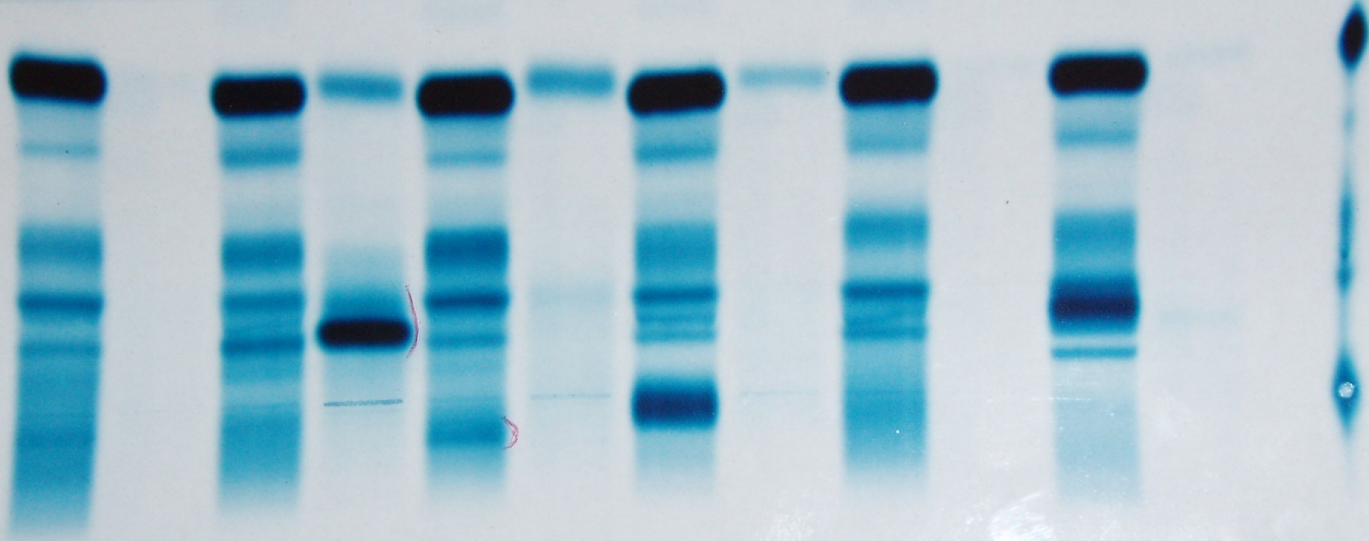
-11- M

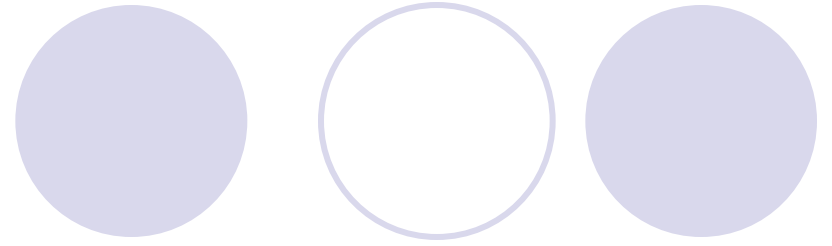
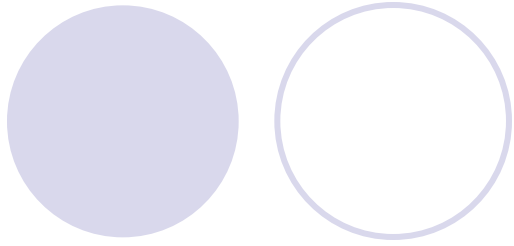
EZIAS
2912/13

-11- M

14.3.06

(1)





Vertikální fotometrie

Vertikální fotometrie



- Spektrofotometrická metoda, s uspořádáním kdy světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru

Využití : proměření absorbance (fluorescence) v jamkách mikrotitračních destiček, které se používají hlavně pro imunochemická stanovení na principu ELISA (analýzy s navázaným enzymem za využití imunosorbce)

Vertikální fotometr

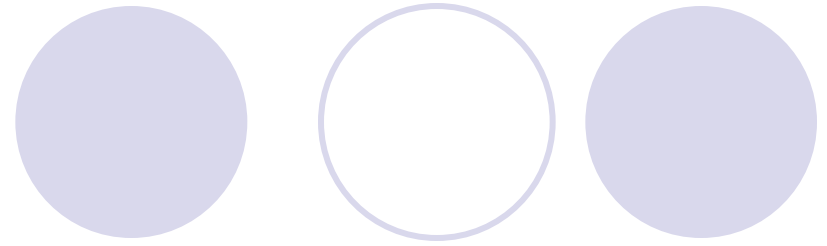


Reader mikrotitračních destiček, který měří absorbanci světelného záření

Princip

- Světelný paprsek ze zdroje prochází přes zvolený interferenční filtr do optických kabelů, které zabezpečují distribuci do 9 oddělených kanálů.
- 8 z nich vedou přes jamky mikrotitrační destičky a dopadají na pole fotodiod, které detekují intenzitu světla. Devátý optický kabel je použit na kontrolu intenzity záření vycházející ze zdroje.

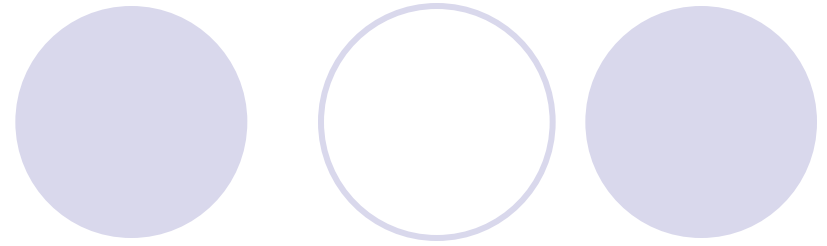
Vertikální fotometrie



- Ve zlomku vteřiny se změří celá řada jamek (8), mikrotitrační destička se posune a může se měřit řada následující
- Výsledky měření závisí na přesnosti pipetování
- Jamka mikrotitrační destičky má konstantní plochu kruhové základny a pro stejnou koncentraci je **konstantní součin absorbance a délky optické dráhy** :

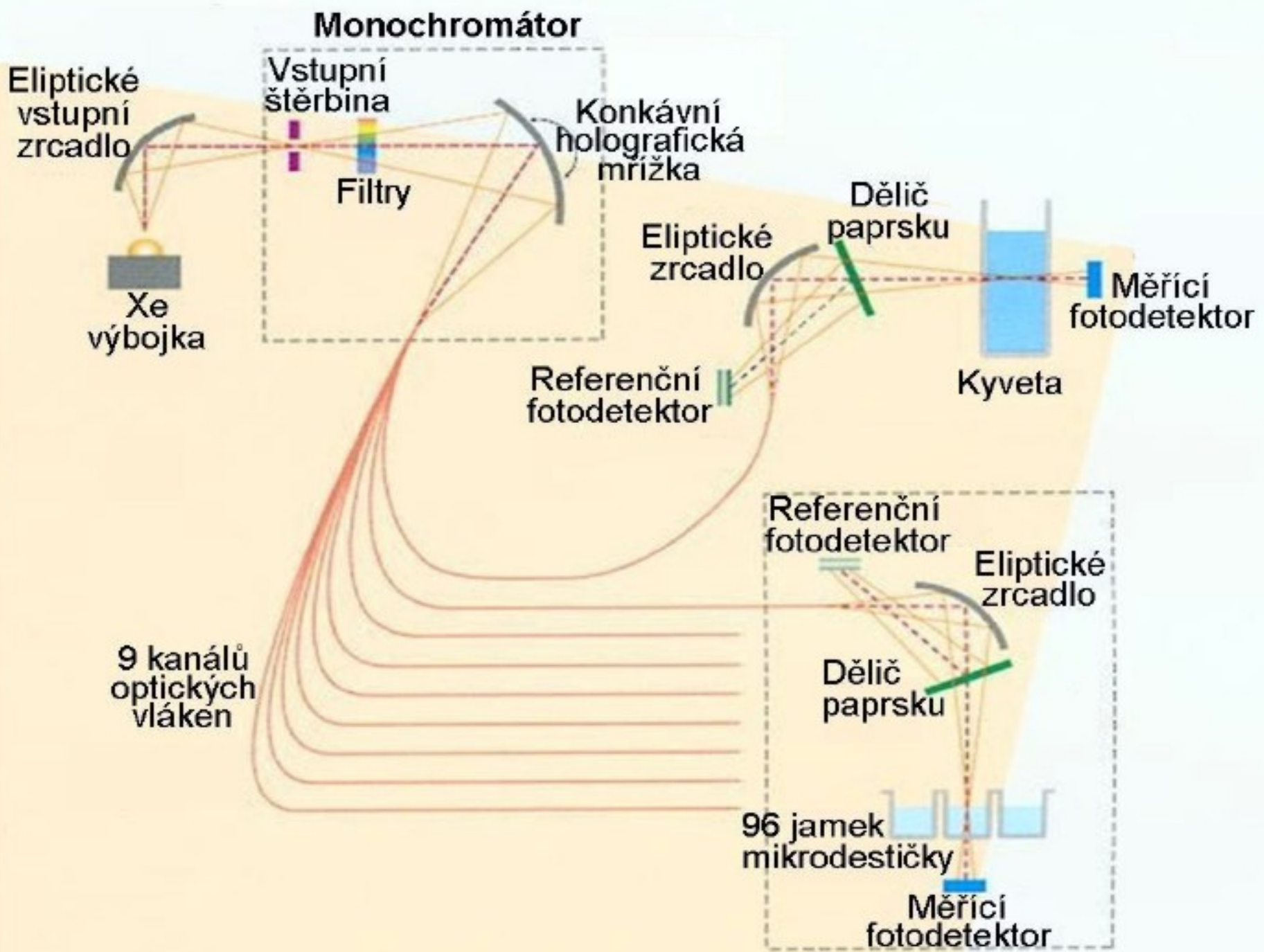
$$A_1 \cdot l_1 = A_2 \cdot l_2 = \frac{c}{a}$$

Vertikální fotometrie



Výhody

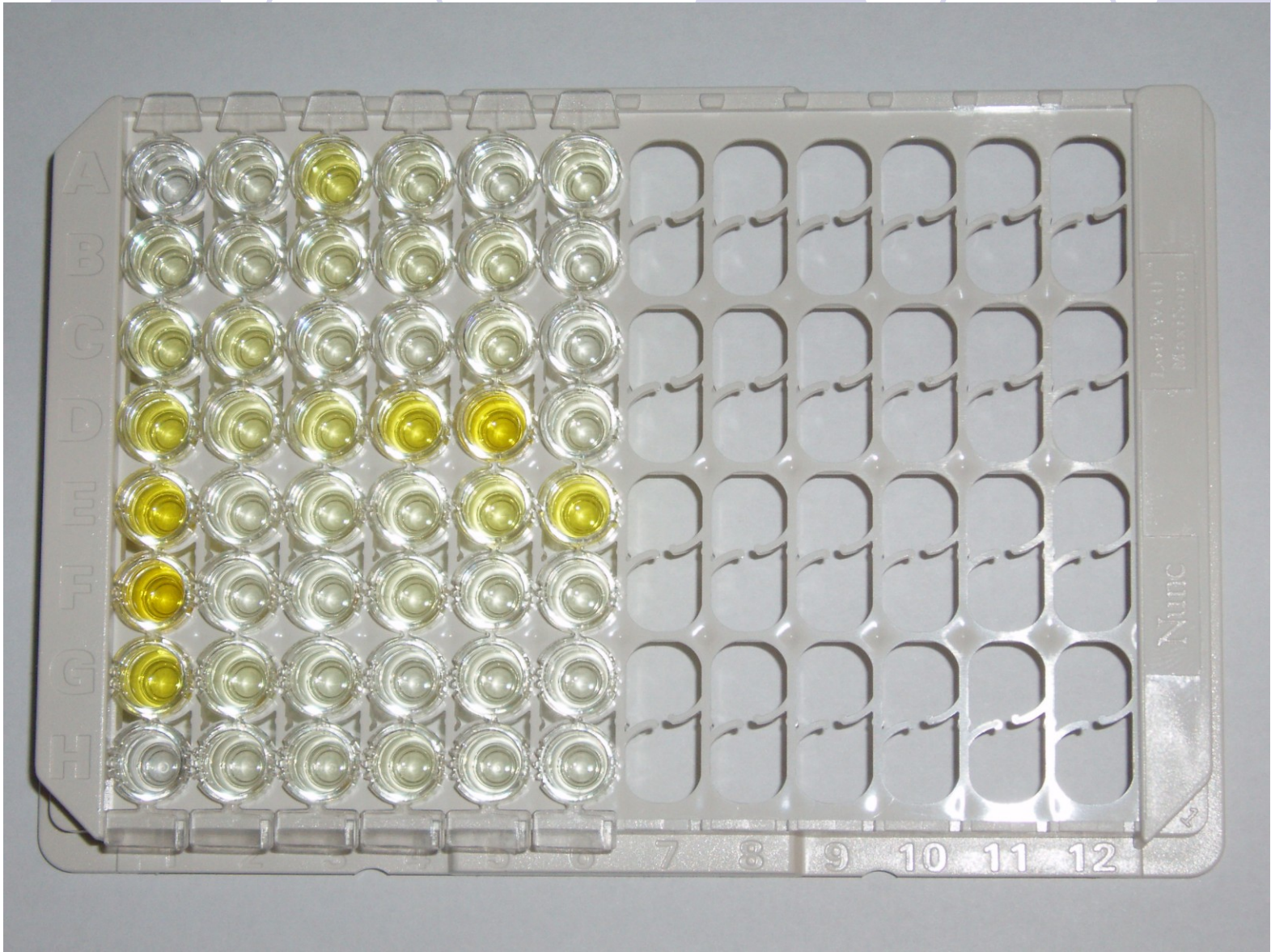
- Když napipetujeme např. ke stejnému množství vzorku méně činidla, zkrátí se optická dráha roztokem (tj. tloušťka vrstvy roztoku), ale měřený roztok bude mít větší absorbanci a výsledná koncentrace bude stejná jako v prvním případě
- tzn., že i při poměrně krátké optické dráze (asi 3 mm) a s dosti nepřesnými pipetami (chyba asi 10%) získáme solidní výsledky

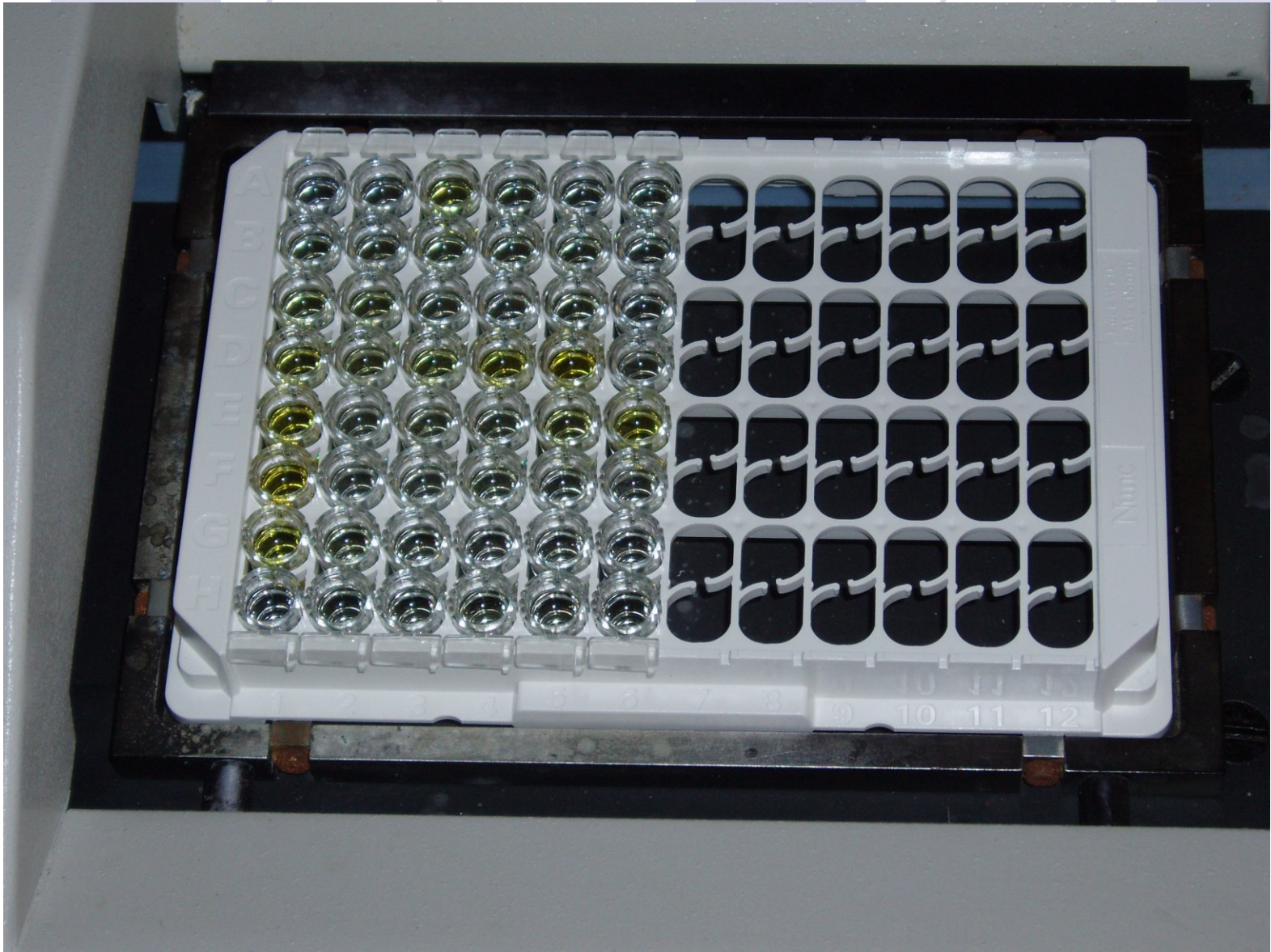


Hlavní komponenty přístroje:



- Zdroj záření: halogenová žárovka
 - Interferenční filtry: umístěny v posuvném držáku filtrů, obvykle 6 (pro λ 400-800 nm)
 - Optický systém: 9 optických kabelů (světlovodiče)
 - Detektor: fotodiody
- Rychlost měření: 5s







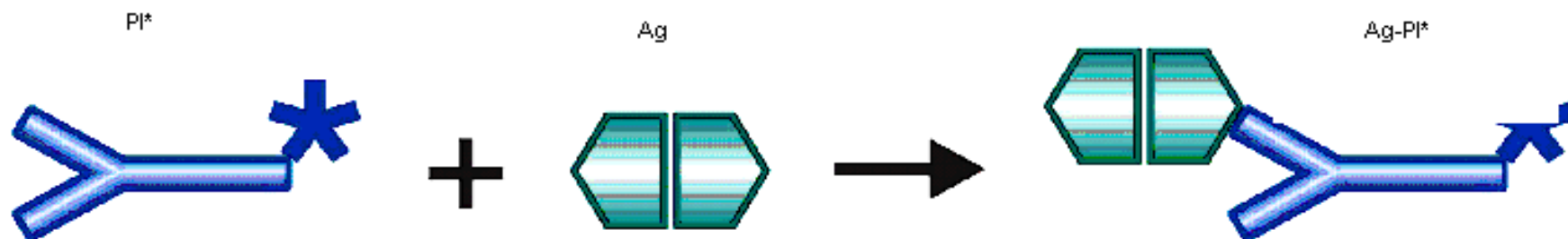
v.č. 1940

 DYNATECH
MR5000

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assays

Princip:

- Reakce antigenu (analytu) s protilátkou. Protilátka, nebo antigen je určitým způsobem označen.
- Při ELISA stanovení se ke značení protilátky (antigenu) používají **enzymy** (alkalická fosfatáza, peroxidáza, b-galaktozidáza), které po přidání substrátu do reakční směsi katalyzují reakci, na jejímž konci je barevná látka vhodná k fotometrické detekci.

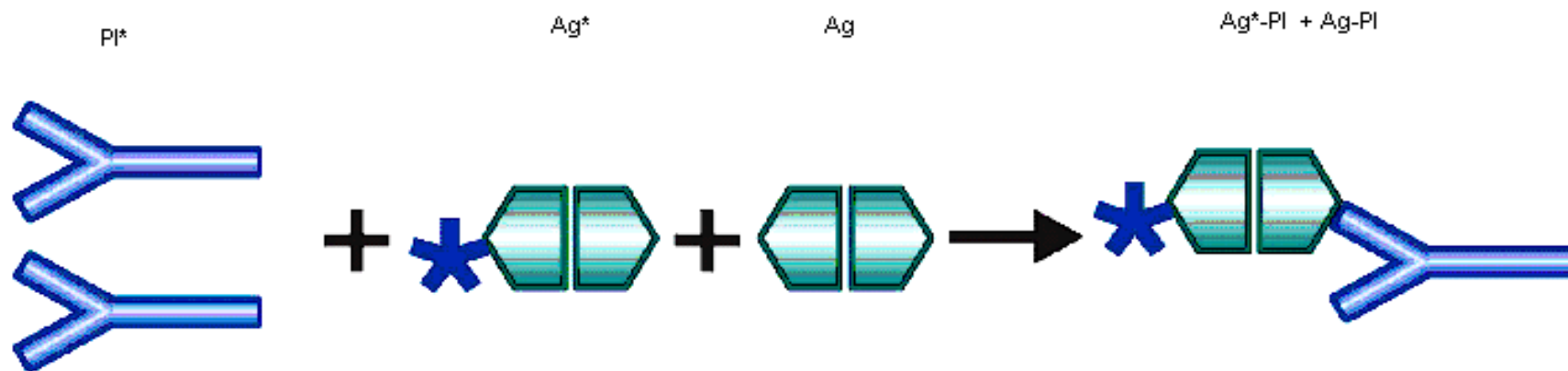


reagencie s označenou protilátkou

stanovovaný analyt ve vzorku

komplex antigen-protilátka

Označená protilátka umožňuje při imunanalýzách detekci komplexu antigen-protilátka



reagencie s protilátkou

reagencie s označným analytem

analyt ve vzorku

komplex antigen-protilátka

Označený antigen také umožňuje při imunanalýzách detekci komplexu antigen-protilátka

ELISA

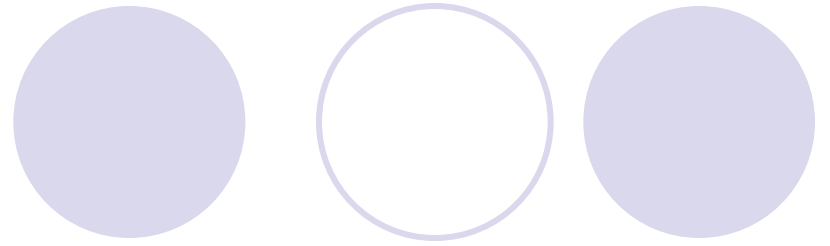
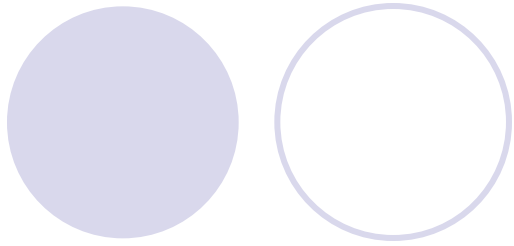


Heterogenní imunoanalýza: vyžaduje separaci volné a vázané frakce indikátoru (značené protilátky, antigenu)

- Kompetitivní: se značenou protilátkou
se značeným antigenem
- Nekompetitivní: se značenou protilátkou

Heterogenní kompetitivní se značeným antigenem

- Soutěživá reakce mezi stanovovaným antigenem a antigenem značeným enzymem o vazebná místa na protilátce.
- Po separaci volné frakce a frakce vázané na protilátku proběhne detekční enzymatická reakce.
- Platí zde přímá úměra, čím více (neznačeného) antigenu ve vzorku, tím více komplexu s neznačeným antigenem a méně komplexu se značeným antigenem (více značeného antigenu zůstane nezreagováno v reakční směsi).



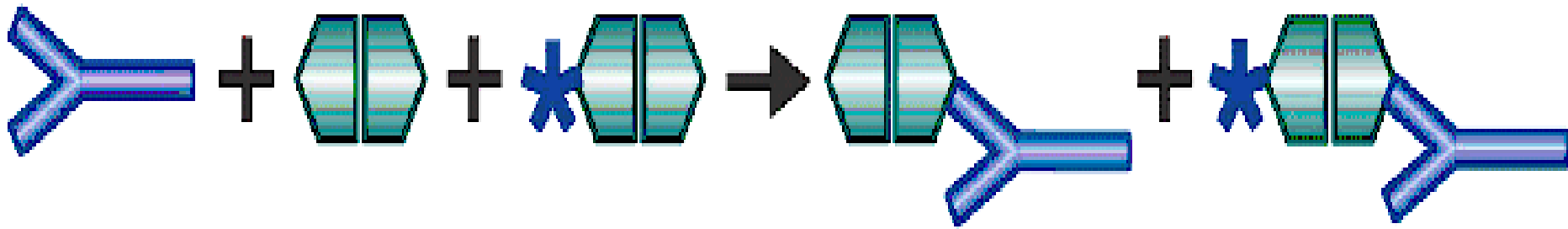
PI

Ag

Ag*

PI-Ag

PI-Ag*



Heterogenní kompetitivní se značenou protilátkou

- V tomto případě je antigen navázán na pevnou fázi (stěnu mikrotitrační destičky) a dochází k soutěživé reakci s antigenem v neznámém vzorku o vazebné místo protilátky.
- Promytím je z reakční směsi odstraněn nenavázaný konjugát
- konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem

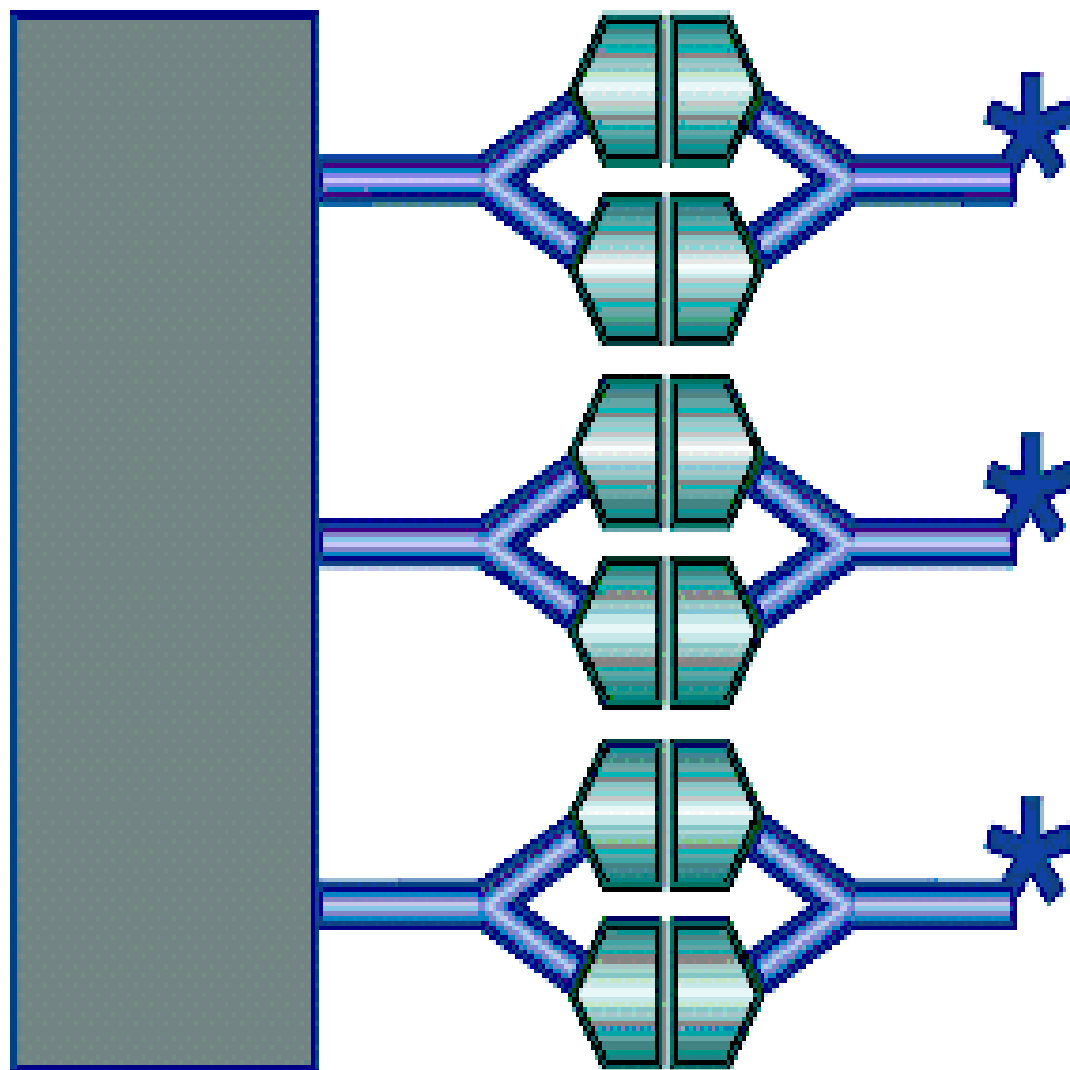
Heterogenní nekompetitivní ELISA – „sendvičová“

- Při **nekompetitivním** (tzv. sendvičovém) uspořádání je analyt vázán mezi dvě vysoce specifické protilátky (jako v „sendviči“).
- Jedna z nich je vázána na pevnou fázi (jamku destičky), druhá je značená a přidává se až k vytvořenému komplexu.
- Platí, že čím více antigenu ve vzorku, tím více antigenu v komplexu a tím více značené protilátky v následném „dvojitém“ komplexu.

Sendvičová imunoanalýza: protilátky jsou vázány na analyt oboustranně

Pevná fáze:

- mikročástice
- náplň speciálních nádobek (matrix), např. skelná vlákna
- stěny mikrotitračních jamek



ELISA - průběh



1. pipetování kalibrátorů, kontrol, vzorků
2. Inkubace: navázání antigenu ze vzorku na protilátku (ukotvenou na jamce mikrotitrační destičky)
3. Promytí: separace volné a vázané frakce
4. Přidání druhé protilátky značené enzymem
5. Inkubace: navázání druhé protilátky značené enzymem - vytvoření komplexu Ab-Ag-Ab*

ELISA - průběh

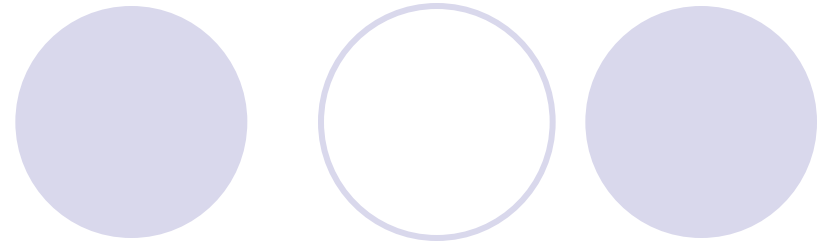


6. Promytí
7. Přidání substrátu
8. Inkubace: dojde k barevné reakci mezi substrátem s enzymem
9. Přidání stop reagensie – zastavení barevné reakce
10. Stanovení absorbance



Reflexní fotometrie

Reflexní fotometrie



Princip

- měření intenzity záření odraženého od neprůhledné (homogenně zbarvené) podložky. Hodnotí se poměr intenzity dopadajícího světla a světla odraženého od barevné plochy
- Použití: suchá chemie, močová analýza, denzitometrické hodnocení tenkovrstevných chromatografů

Reflexní fotometr



- Přístroj slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi. Pevná fáze slouží jako nosič obsahující činidla aktivovaná vodou obsaženou v naneseném vyšetřovaném biologickém materiálu (krev, moč).
- Měří se intenzita záření odraženého od homogenně zbarvené podložky.(matrice)

Reflexní fotometr - pevná fáze (matrice)

- Činidla jsou v reagenční zóně proužku impregnována vlákna proužku (fy Roche, Reflektion)
- Činidla jsou nanesena v reagenční zóně proužku jako vícevrstevný film (fy Kodak)

Reflexní fotometr



Odraz světla od reagenční zóny:

- zrcadlový – na reflexní ploše zrcadla
- difuzní - je výsledkem interakce dopadajícího světla s molekulami reakční zóny (zahrnuje i absorpci a rozptyl)

Hlavní komponenty reflexního fotometru

Zdroj záření:

- halogenová lampa
- xenonová výbojka
- světloemitující dioda

Hlavní komponenty reflexního fotometru

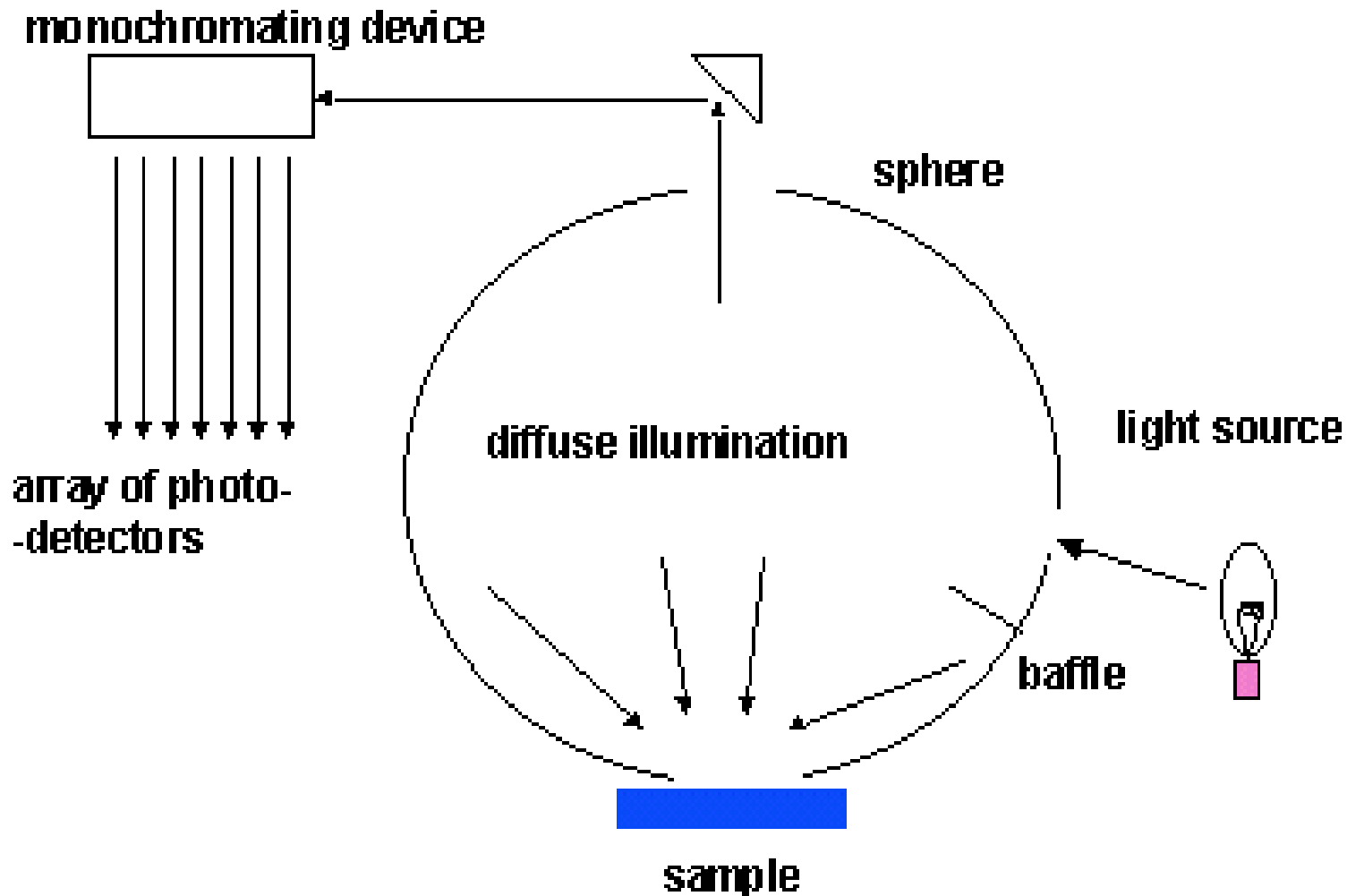
Ulbrichtova koule (jako zdroj difuzního světla):

- dutá koule jejíž vnitřní povrch je potažen vysoce reflexním materiálem (síran barnatý).
- Světlo ze zdroje se po vstupu do koule mnohonásobně odráží od stěn a jako dokonale difuzní dopadá na reagenční plošku

Hlavní komponenty reflexního fotometru

- **Detektor záření:**
- uvnitř koule jsou umístěny dva detektory.
- Jeden měří světlo difuzně odražené od reagenční plošky a druhý je referenční

reflectance spectrophotometer



Reflexní fotometr pro chemické vyšetření moče pomocí diagnostických proužků



Děkuji za pozornost

