

# Optické metody

The slide features a decorative arrangement of five light purple circles. One circle is positioned behind the title 'Optické metody'. Two circles are located below the title, one to the left and one to the right. Two more circles are positioned further down, one on the left and one on the right, partially overlapping the text 'Denzitometrie' and 'Reflexní fotometrie'.

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.

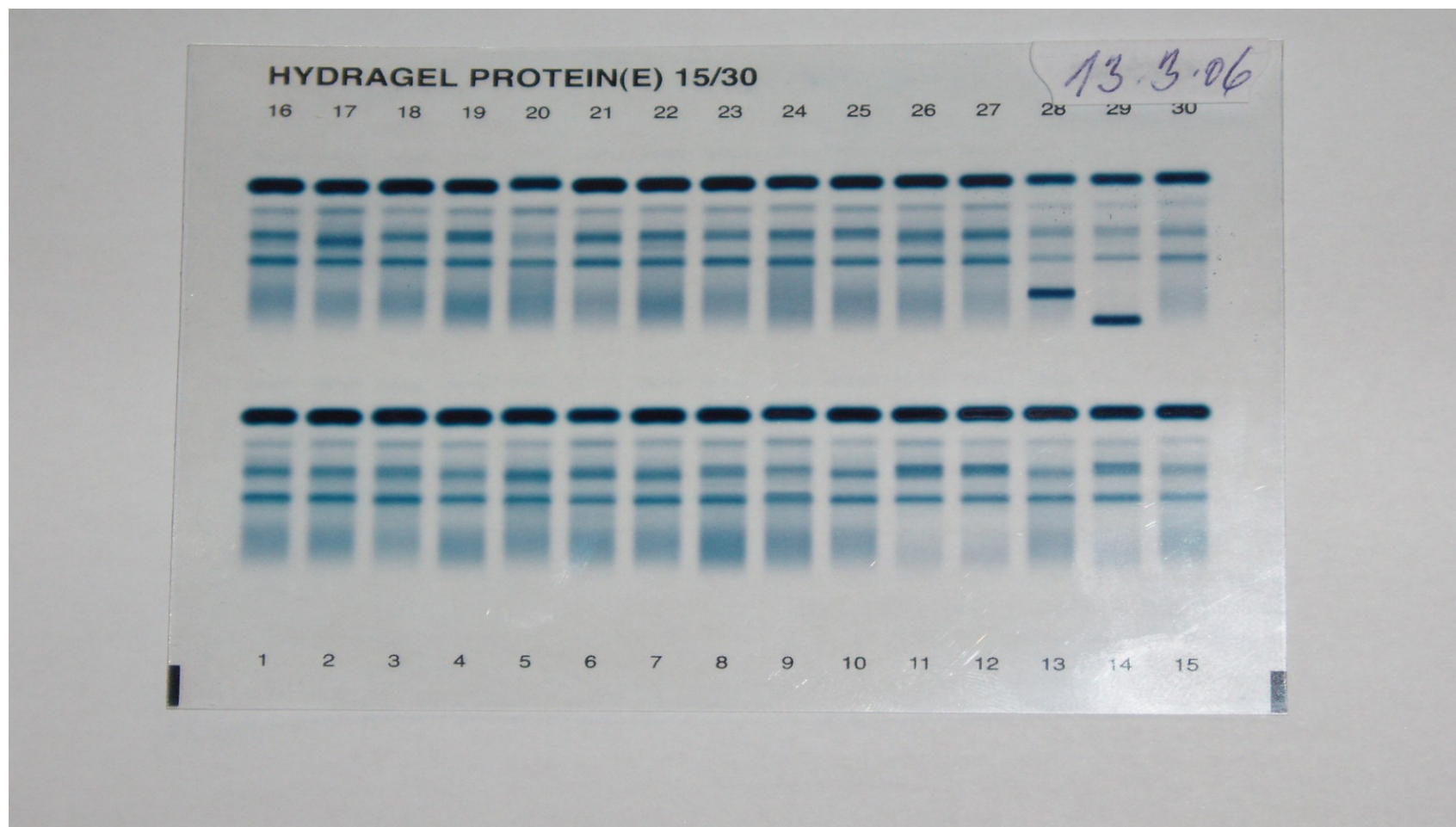
Použití: při hodnocení elektroforeogramů

# 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

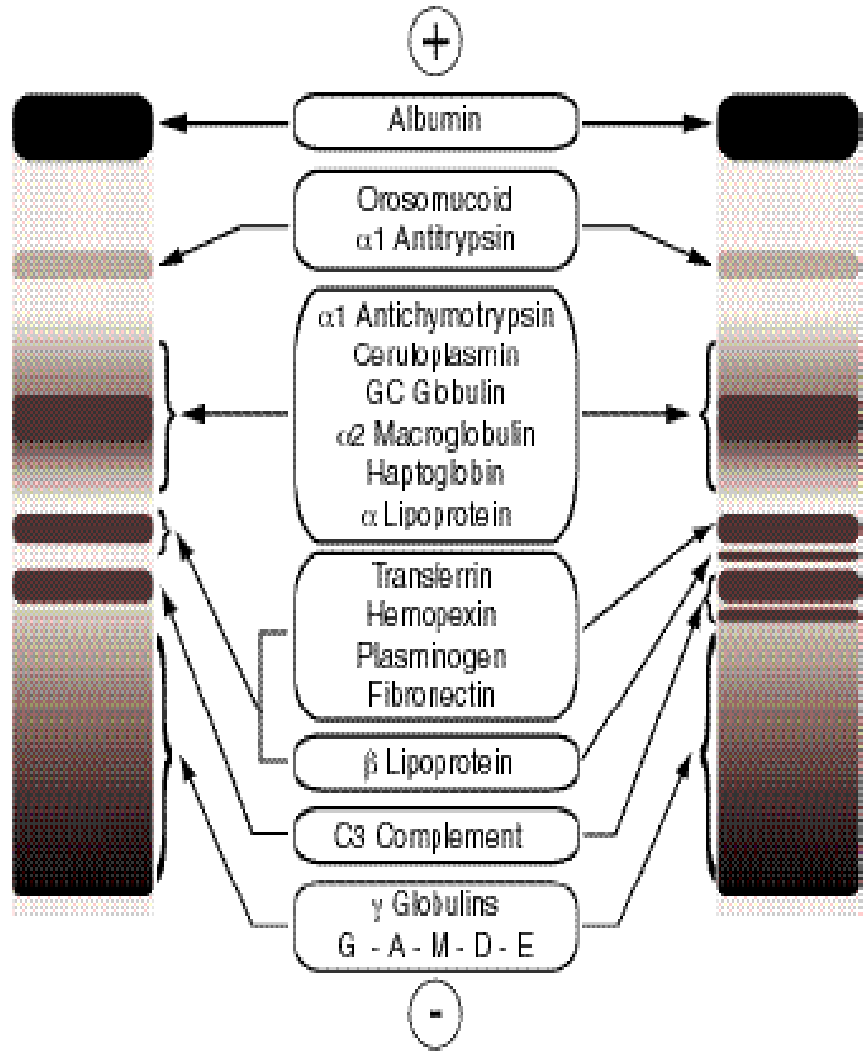
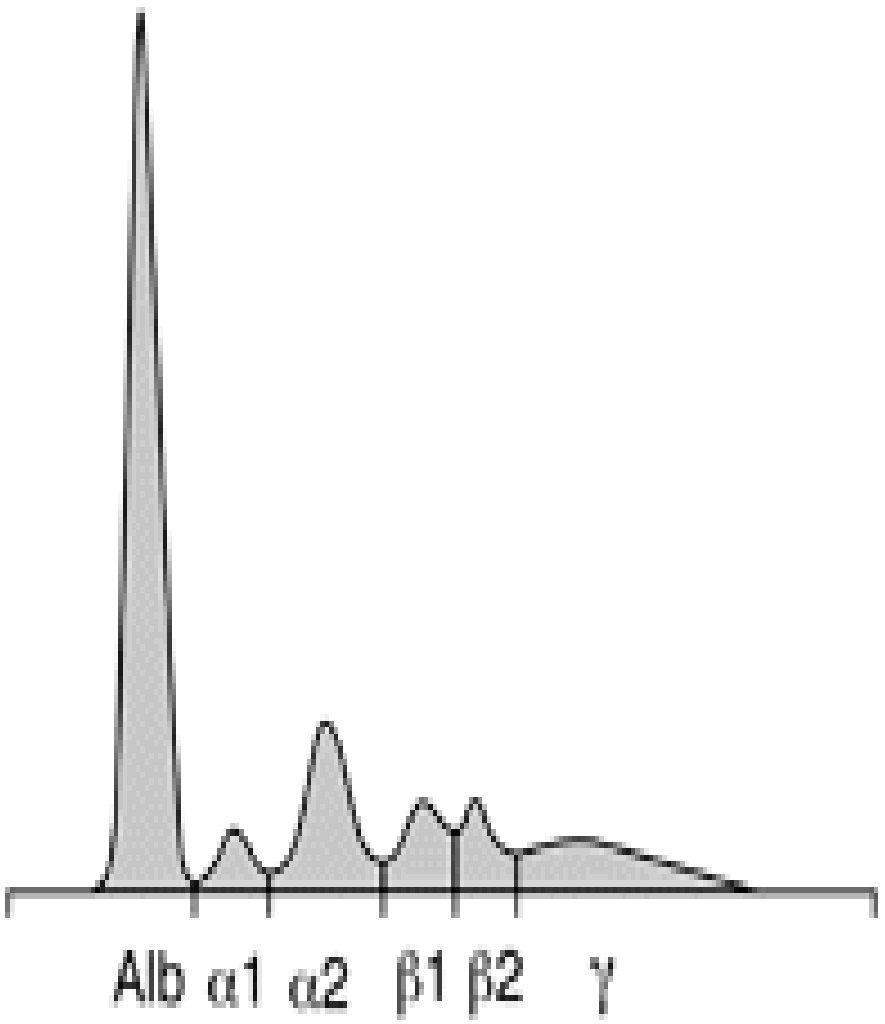
Dělí bílkoviny krevního séra na 5 (6) frakcí:

Frakce albuminu: tvořena jedinou bílkovinou

Frakce globulinové:

- A1-globuliny:  $\alpha$ 1 lipoprotein, orosomukoid,  $\alpha$ 1 antitrypsin
- A2-globuliny:  $\alpha$ 2 makroglobulin, ceruloplasmin, haptoglobin, pre- $\beta$  lipoprotein
- B1-globuliny: transferin, fibrinogen, C3,  $\beta$  – 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				
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$
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; $\gamma$ -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 a<sub>2</sub>- 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

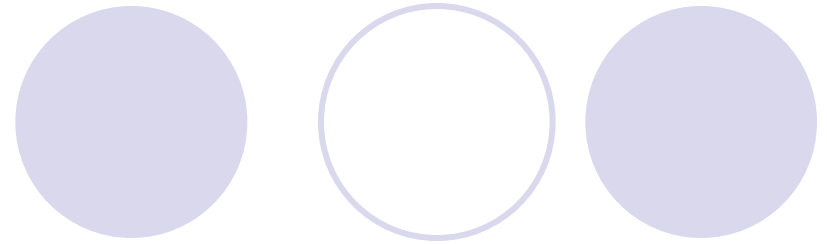
- Celková bílkovina výrazně snížena.  
Velký pokles albuminu a b1-globulinů.
- Chybění aminokyselin, z toho vyplývající porucha syntézy bílkovin.



# Monoklonální gamapatie

- Nižší koncentrace albuminu. Někde (tj. kdekoli) mezi a<sub>1</sub>- 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



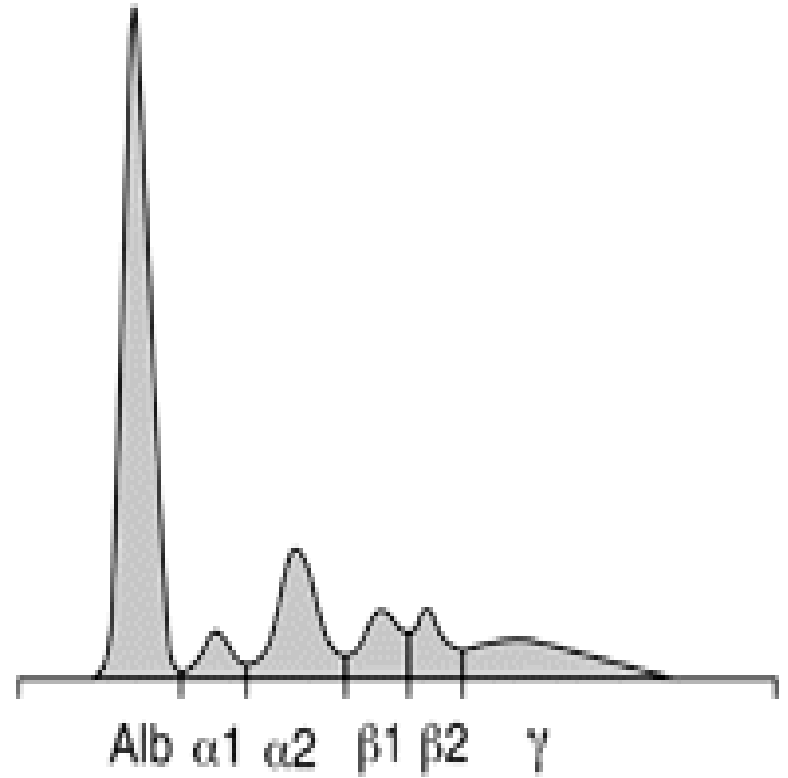
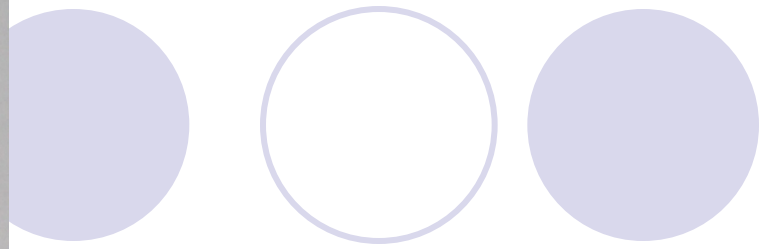
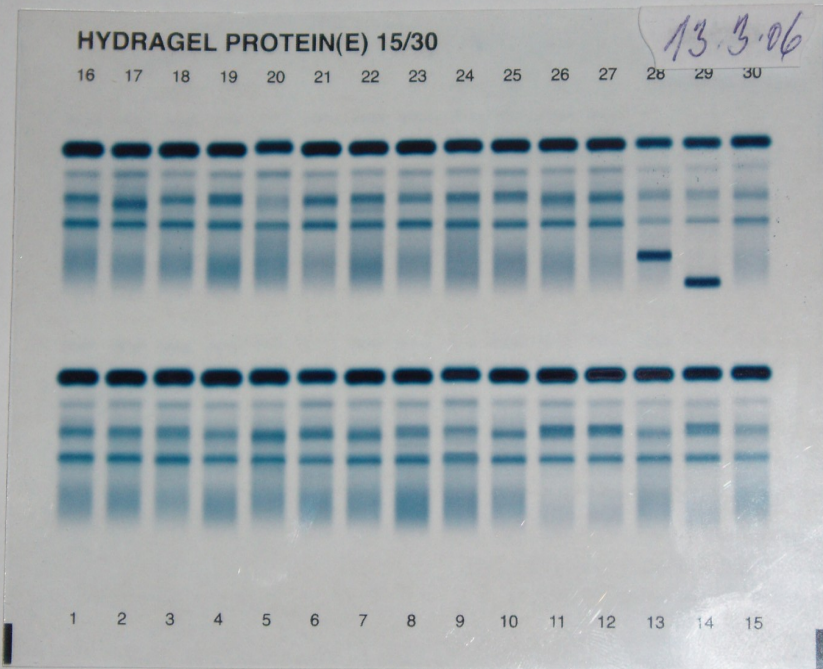
- Bisalbuminémie (zdvojení frakce albuminu), analbuminémie (chybí frakce albuminu), deficit a1-antitrypsinu (chybí a1-frakce), atransferinémie (pokles b1-globulinů), hypogamaglobulinémie (dědičný či získaný defekt syntézy imunoglobulinů); hemolytické sérum (projevy: posun a2-globulinů ke katodě, zvýšení 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  $\alpha_2$ -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

PADELEK  
2923/10

-11- M

ROUKOVÍŘOVÁ  
2902/13

-11- M

RUSCHKA  
2910/13

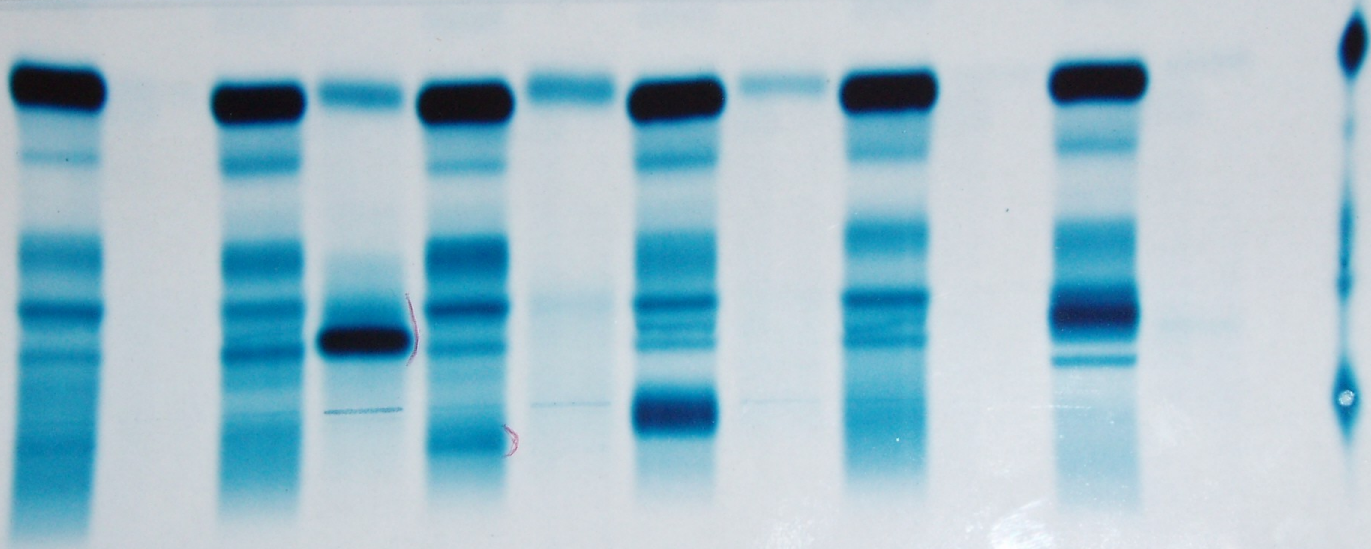
-11- M

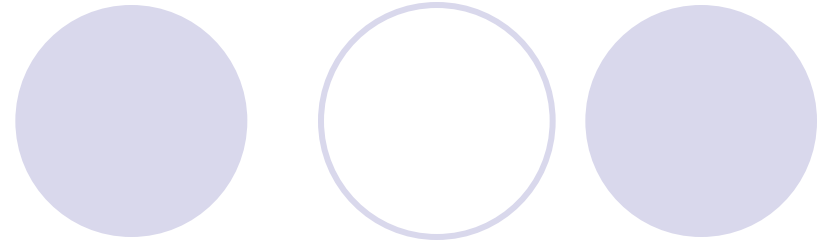
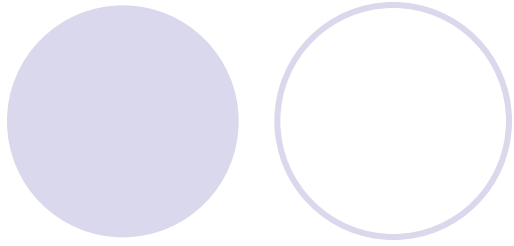
EZIAS  
2912/13

-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

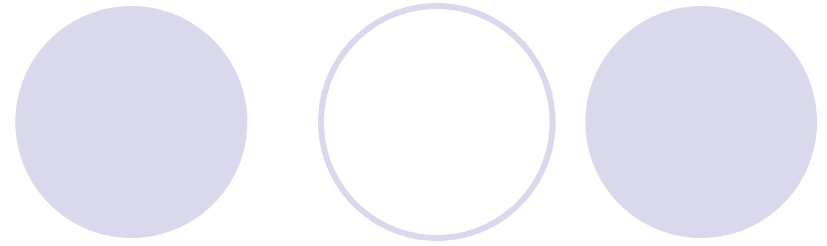


Reader mikrotitračních destiček, který měří absorbanci světelného záření

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.

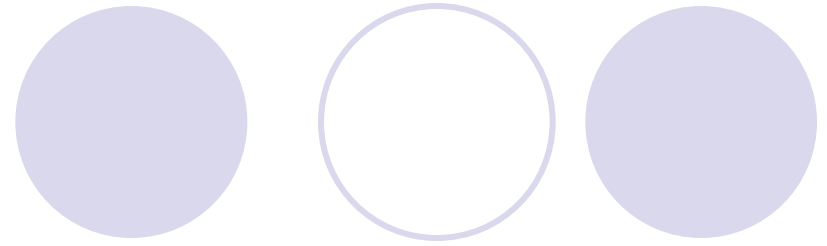
# Vertikální fotometrie



- 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** :

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

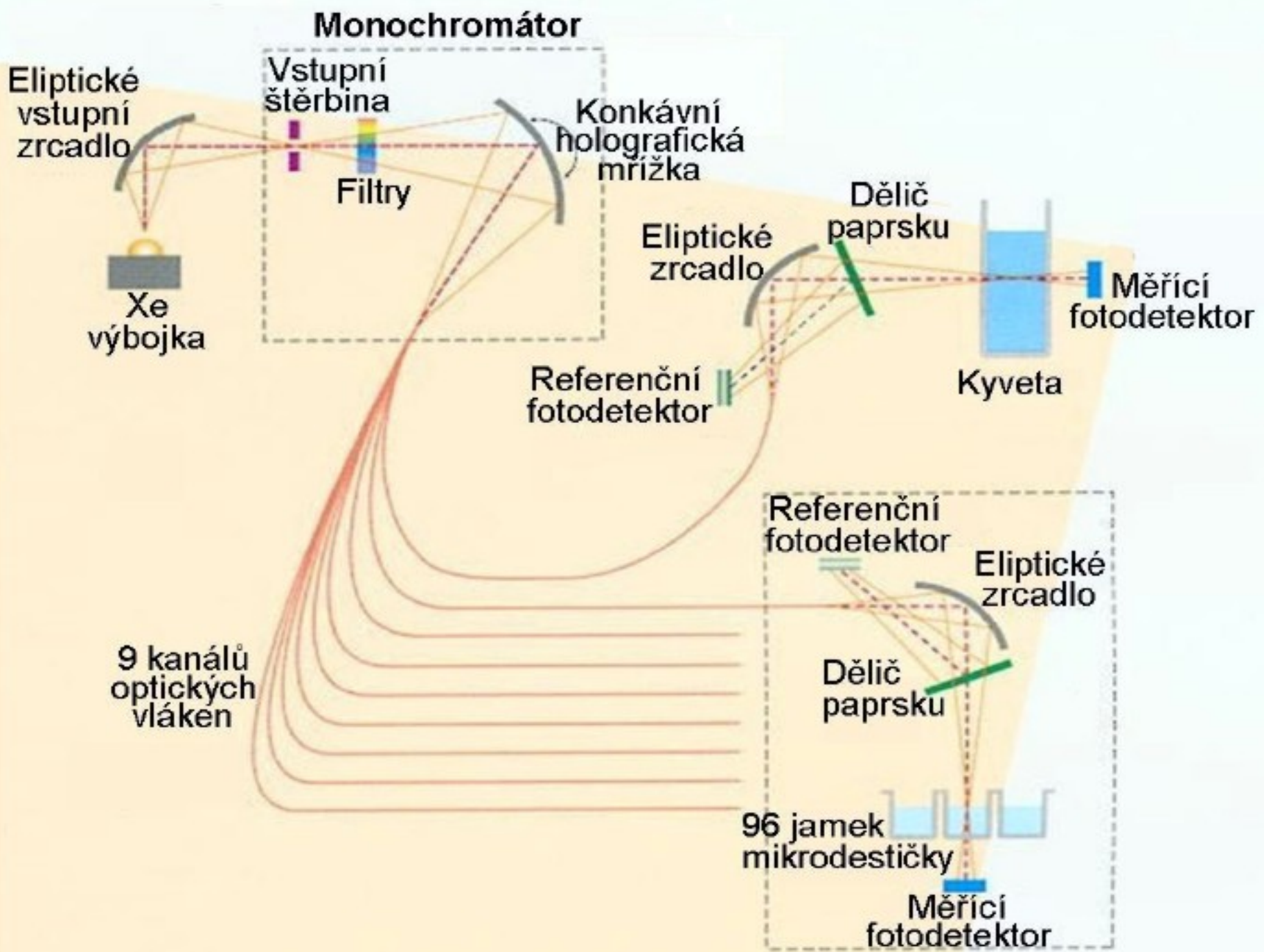
# Vertikální fotometrie



## 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



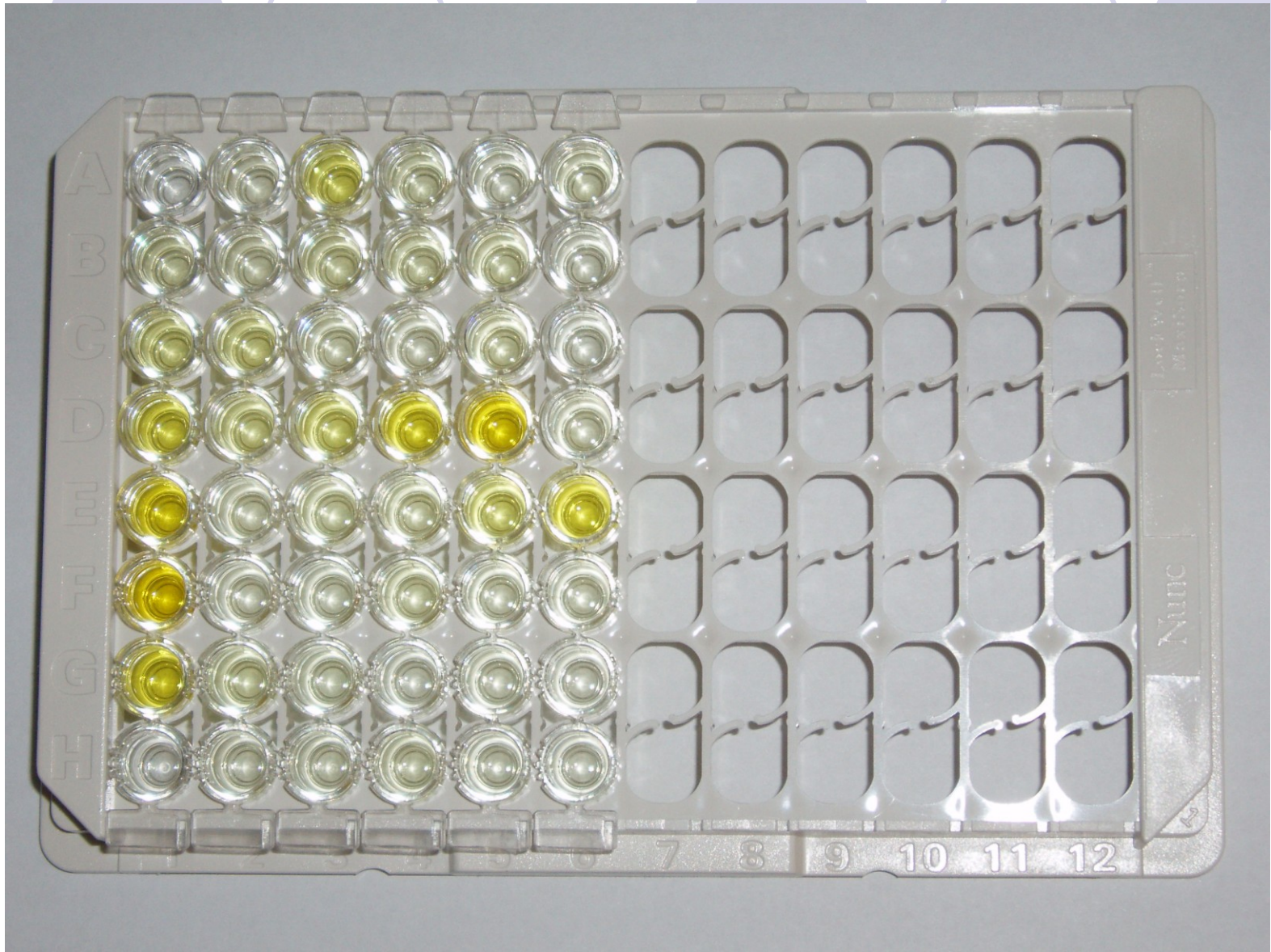




# Hlavní komponenty přístroje:



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











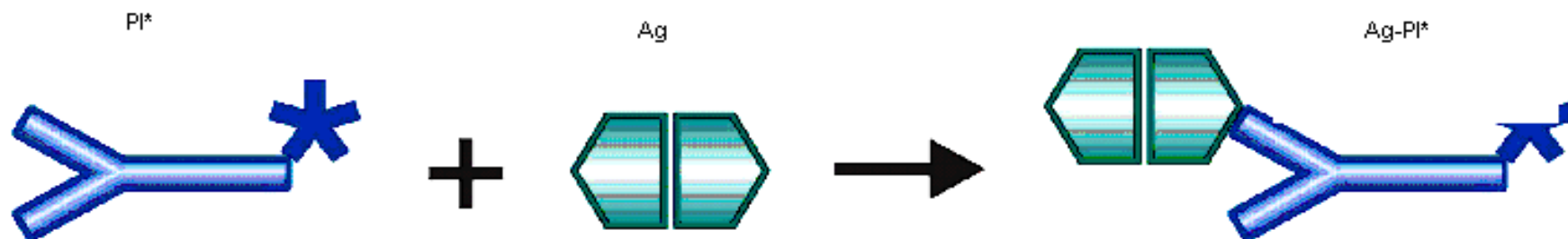
v.č. 1940

 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.

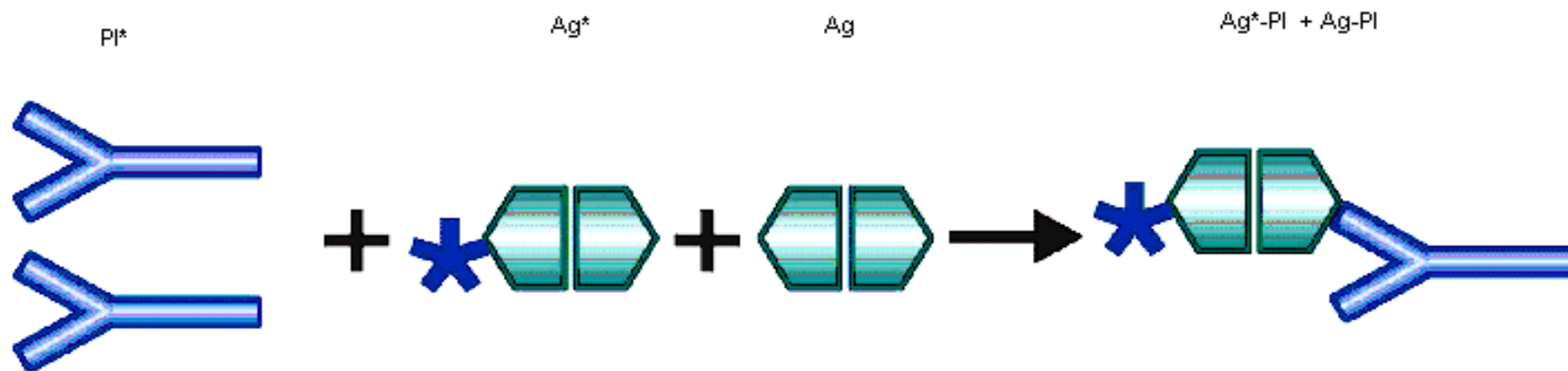


reagencie s označenou protilátkou

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



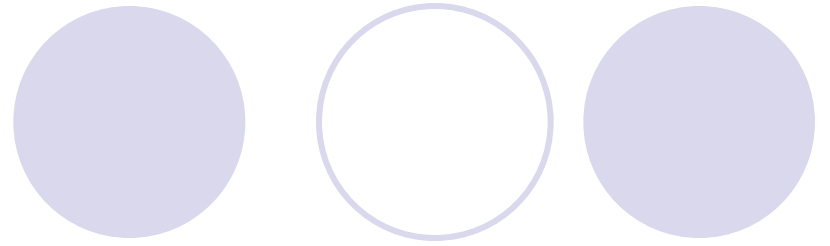
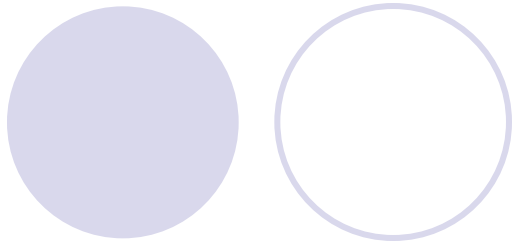
Heterogenní imunoanalýza: vyžaduje separaci volné a vázané frakce indikátoru (značené protilátky, antigenu)

- 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).





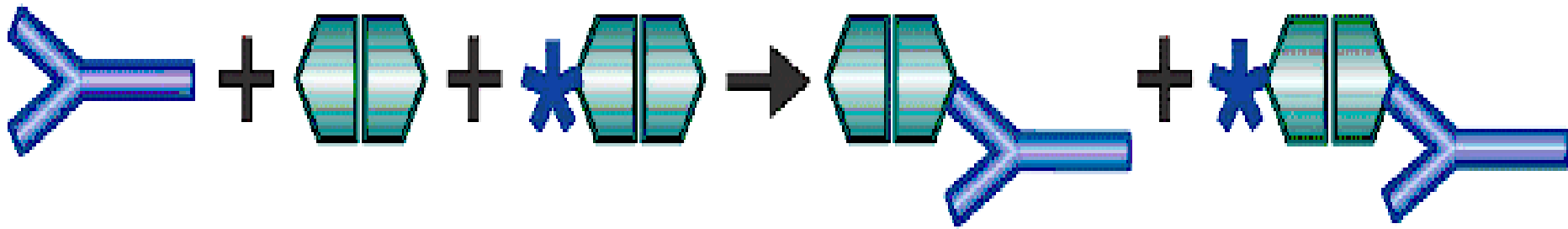
PI

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

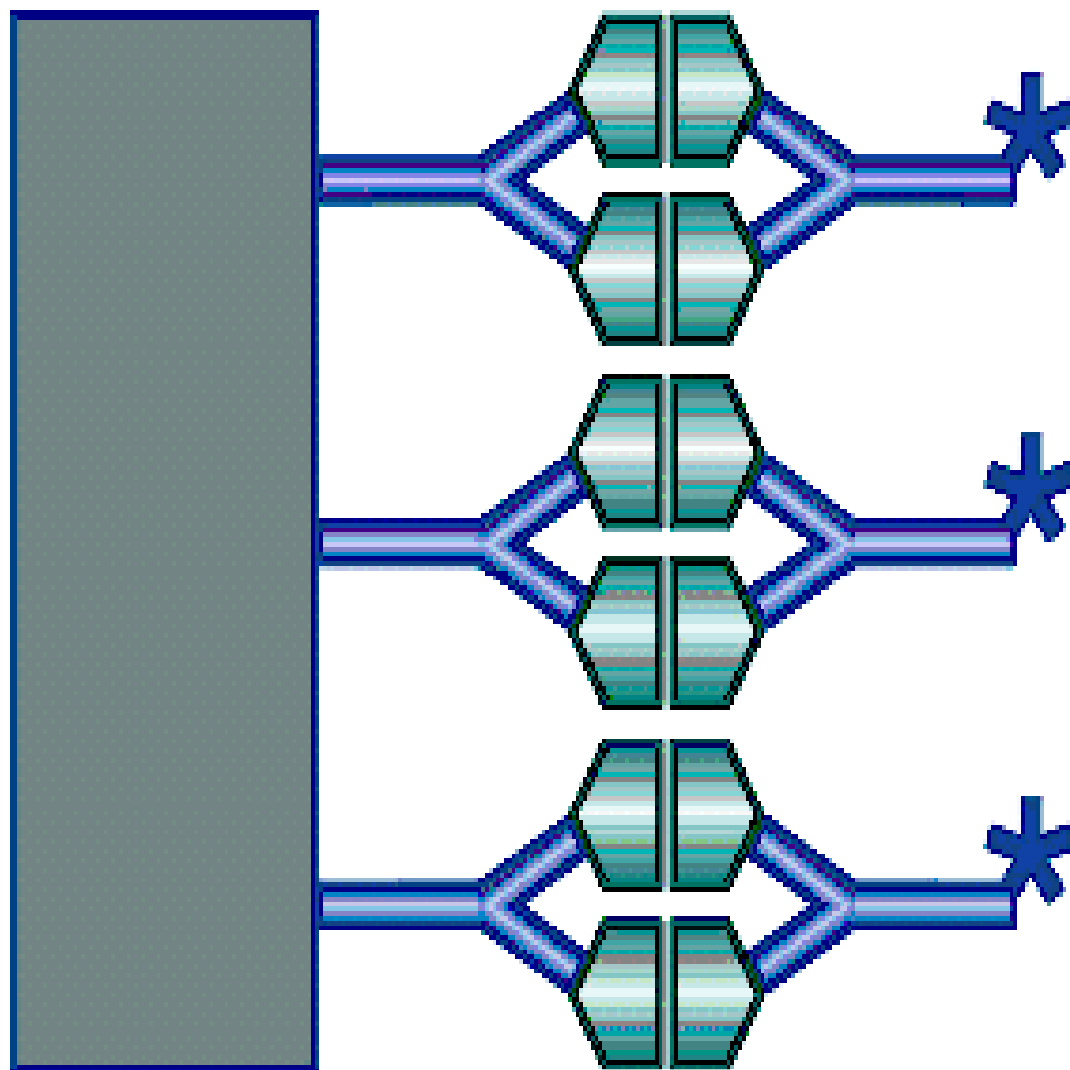
# Heterogenní nekompetitivní ELISA – „sendvičová“

- 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

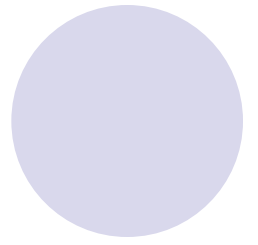
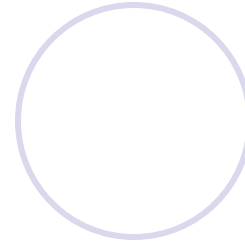
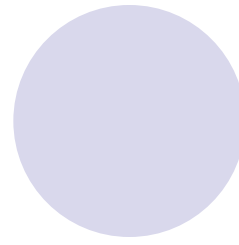
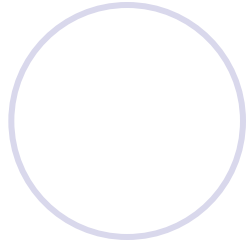
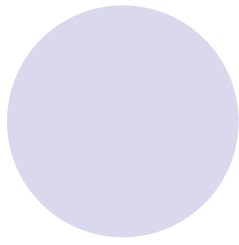


1. pipetování kalibrátorů, kontrol, vzorků
2. Inkubace: navázání antigenu ze vzorku na protilátku (ukotvenou na jamce mikrotitrační destičky)
3. Promytí: separace volné a vázané frakce
4. Přidání druhé protilátky značené enzymem
5. Inkubace: navázání druhé protilátky značené enzymem - vytvoření komplexu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

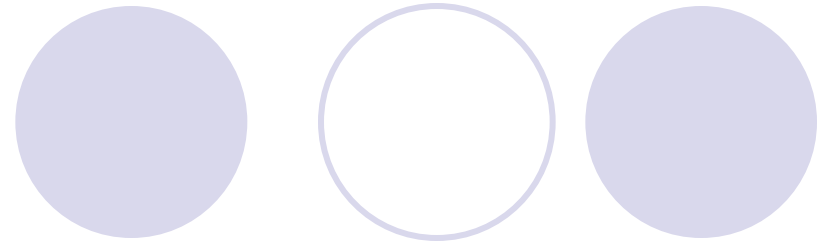


- Přístroj slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi. Pevná fáze slouží jako nosič obsahující činidla aktivovaná vodou obsaženou v naneseném vyšetřovaném biologickém materiálu (krev, moč).
- Měří se intenzita záření odraženého od homogenně zbarvené podložky.(matrice)

# 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

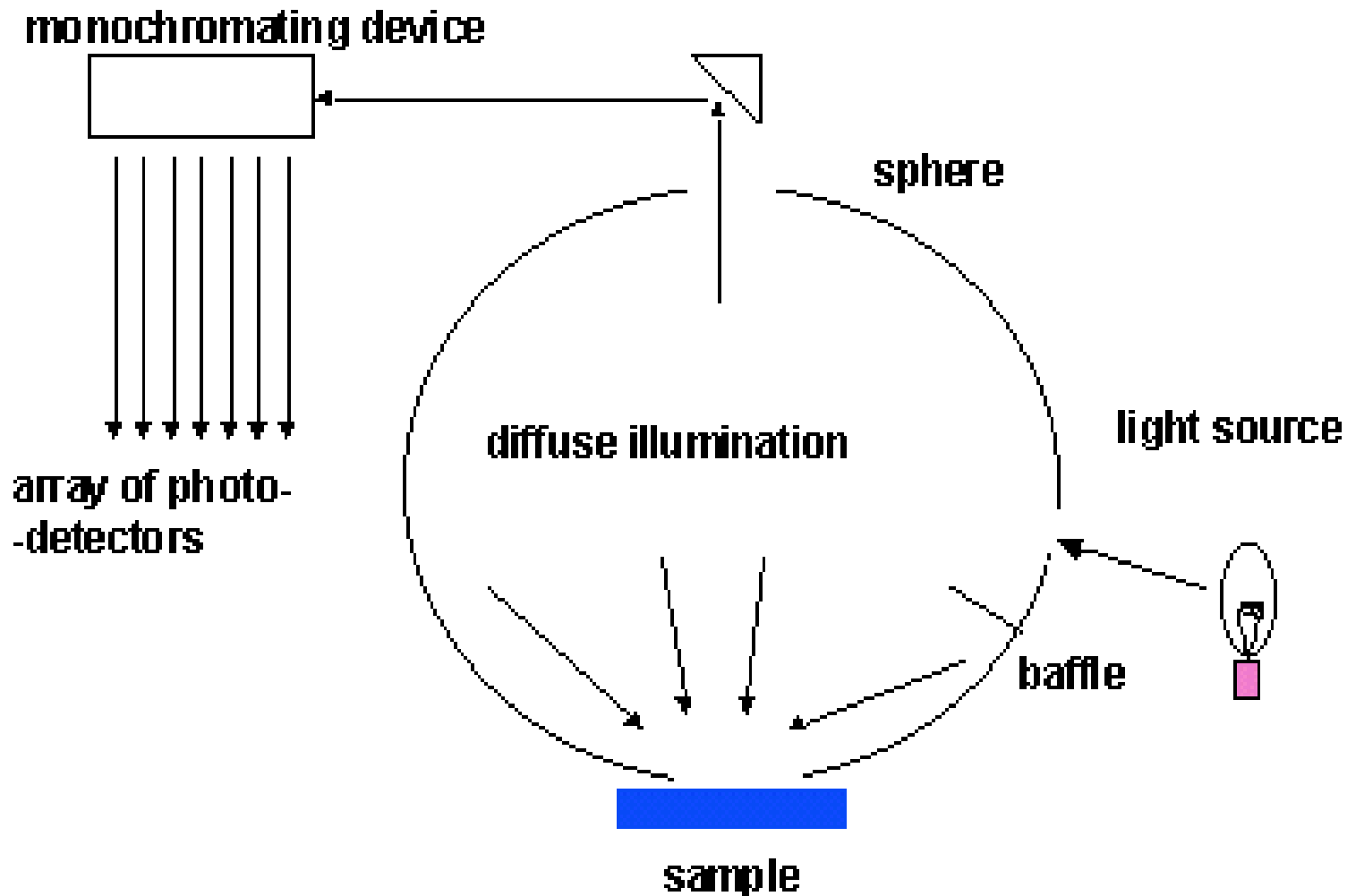
## Ulbrichtova koule (jako zdroj difuzního světla):

- 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**

