

# Optické metody

The slide features a decorative arrangement of five light purple circles. One circle is positioned behind the title 'Optické metody'. Below the title, there are two more circles on the left and two on the right. The text 'Denzitometrie', 'Vertikální fotometrie', and 'Reflexní fotometrie' is located to the right of the bottom-right circle.

Denzitometrie  
Vertikální fotometrie  
Reflexní fotometrie

# Denzitometrie



- Optická metoda, která se zabývá měřením optické hustoty
- přímá denzitometrie – v procházejícím světle přes průhledný nosič

# Denzitometr



Přístroj, který slouží k vyhodnocení optické 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

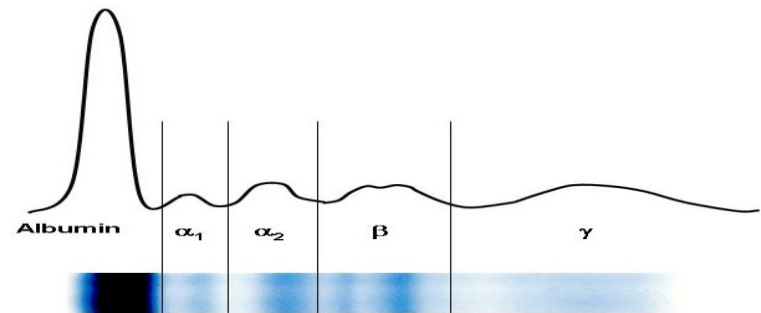
- Zdroj světelného záření: halogenová žárovka
- Monochromátor: interferenční filtry
- Detektor: fotonásobič

# 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



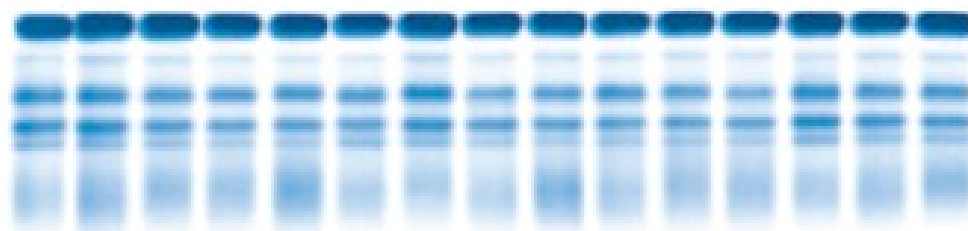
- Elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky
- V místě frakcí dochází k částečné absorpci záření – to se projeví při dopadu na detektor
- Po zpracování signálu integrátorem získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí
- Na jedné podložce je současně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

# Elektroforeogram – elektroforéza v plošném uspořádání na agaróze

HYDRAGEL 01-02 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

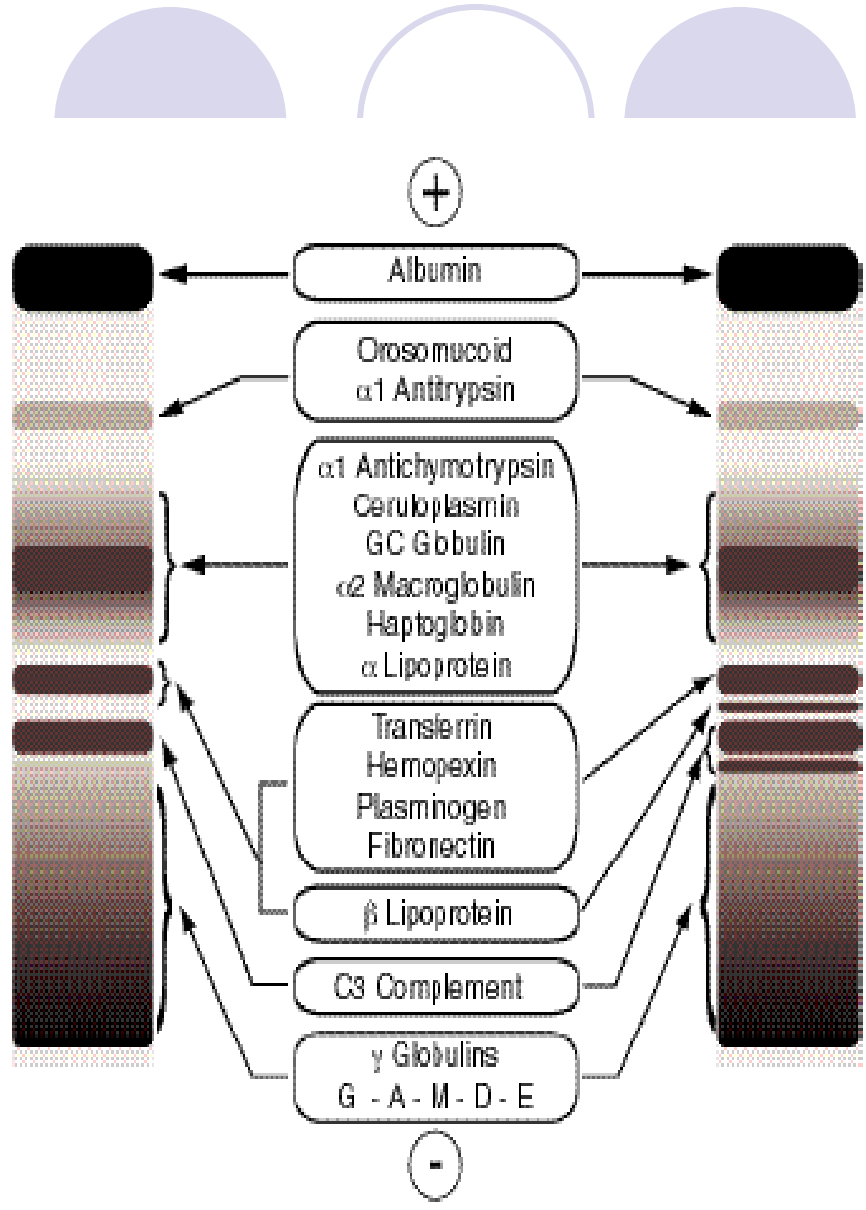
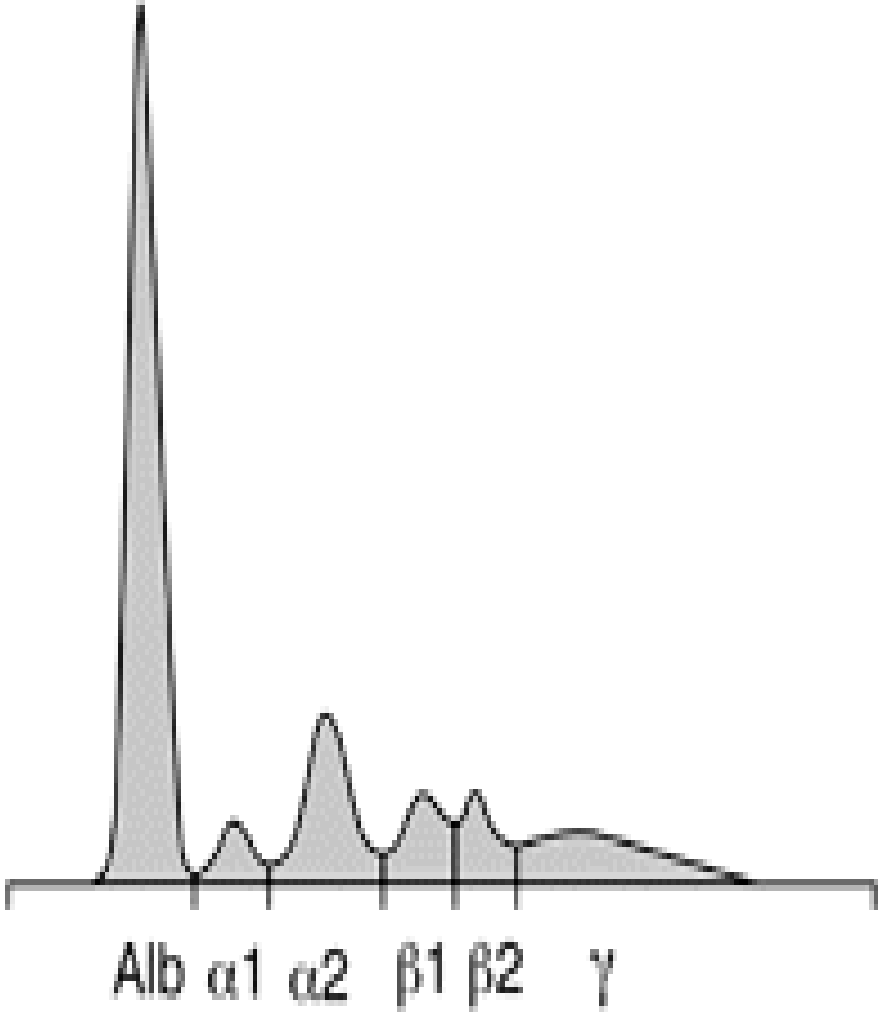
# Elektroforéza bílkovin v agarózovém gelu

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)

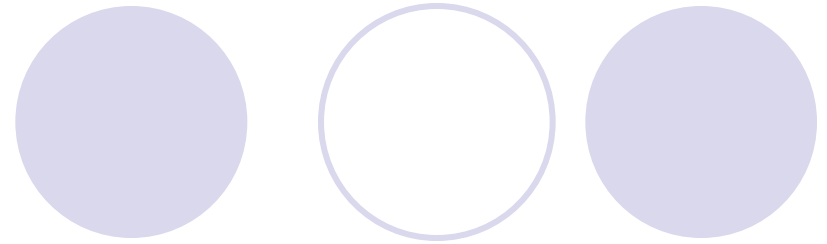
ELFO typ	Elektroforetická frakce					
	Albumin	Globuliny				
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$
1. Typ akutního zánětu	↓	↑↑	↑↑	N	(↑)	N
2. Typ chronického zánětu	↓	↑	↑	N	N	↑↑*)
3. Typ chronické hepatopatie	↓	↓	↓	↓	↓	↑
4. Typ nefrotického syndromu	↓↓	N	↑↑	↑↑	↑↑	↓
5. Typ malnutrice	↓↓↓	(↑) N	(↑) N	(↓)	N	N
6. Typ monoklonální gamapatie	↓	Kdekoli úzký proužek monoklonálního imunoglobulinu; $\gamma$ -frakce může zcela vymizet				

# 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



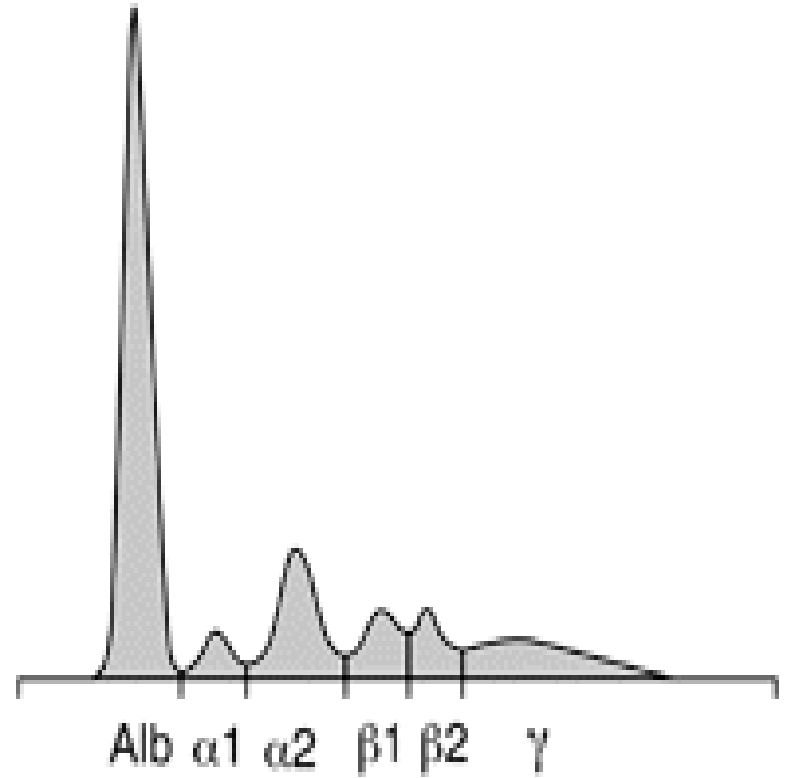
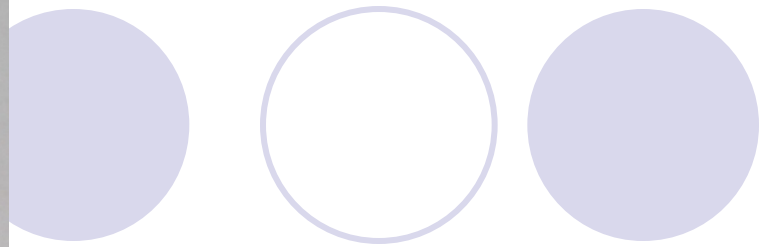
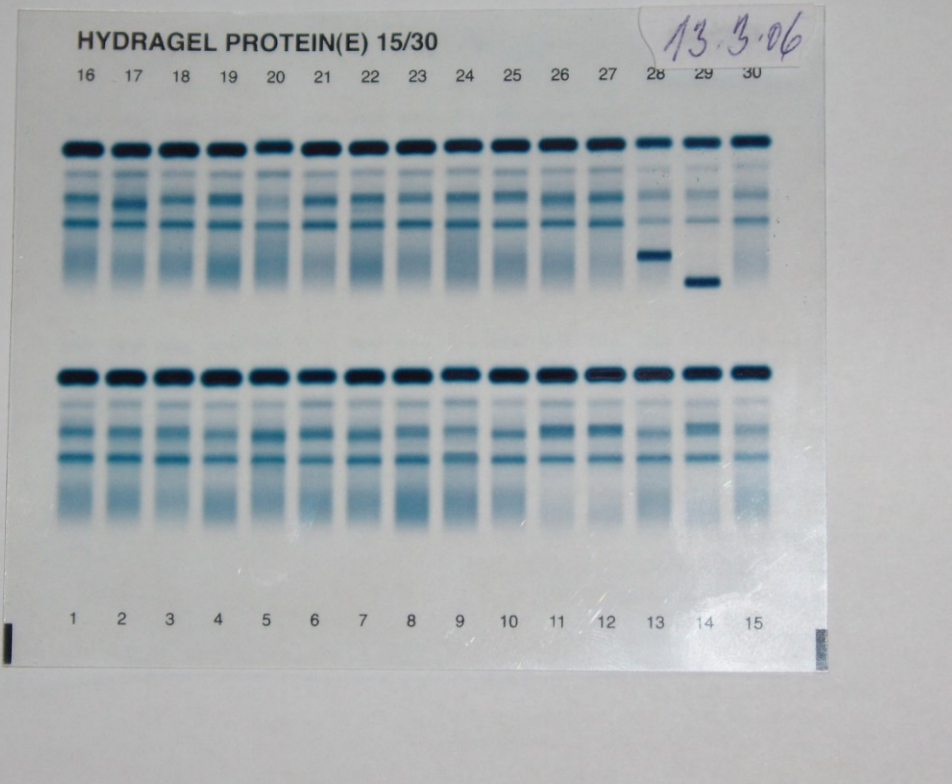
- Bisalbuminémie (zdvojení frakce albuminu), analbuminémie (chybí frakce albuminu), deficit a1-antitrypsinu (chybí a1-frakce), atransferinémie (pokles b1-globulinů), hypogamaglobulinémie (dědičný či získaný defekt syntézy imunoglobulinů); hemolytické sérum (projevy: posun a2-globulinů ke katodě, zvýšení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

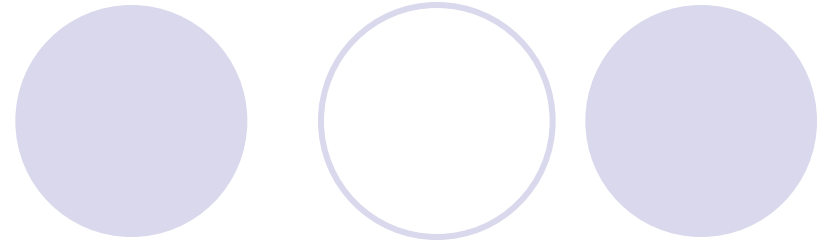
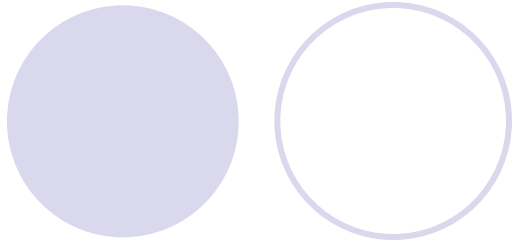
- ELFO bílkovin s následnou denzitometrií má klíčový význam pro diagnózu MG
- MG: jsou definovány jako skupina onemocnění, které jsou charakterizovány proliferací jednoho klonu plazmatických buněk produkujících homogenní imunoglobulin. Toto onemocnění má maligní nebo potenciálně maligní charakter

# 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  $\beta_1$ , IgM – migruje v anodické zóne gama, IgA – migruje v mezizóně  $\beta_1$  a  $\beta_2$ - globulinů.

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



# Vertikální fotometrie

# Vertikální fotometrie



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

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

# 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.

# ELISA techniky podle typu reakce antigen – protilátka

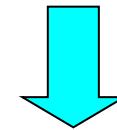
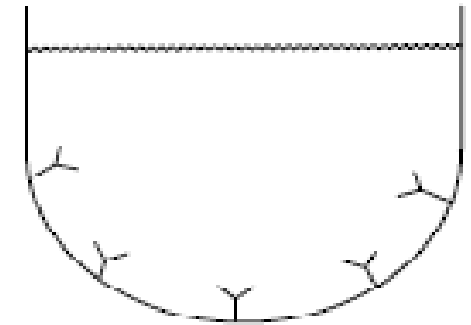
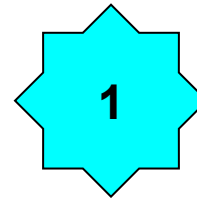


- *Kompetitivní heterogenní imunoanalýza*
- *Nekompetitivní heterogenní imunoanalýza (sendvičová)*

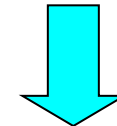
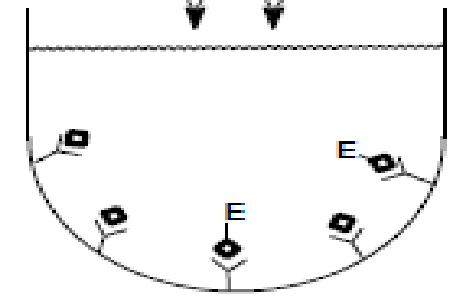
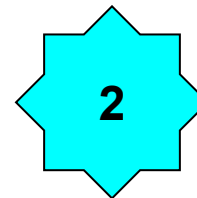
# ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

1. **protilátka** je pevně vázána na stěnu jamky mikrotitrační destičky

2. přidání stanovovaného vzorku a značeného antigenu



neznačený antigen      značený antigen

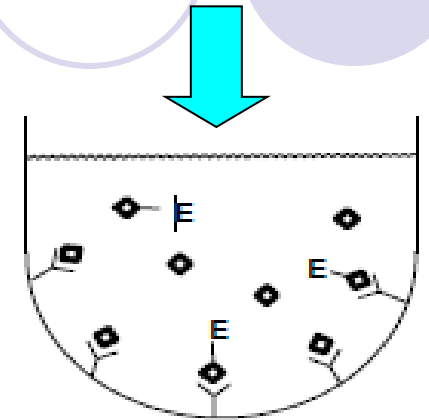


# ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

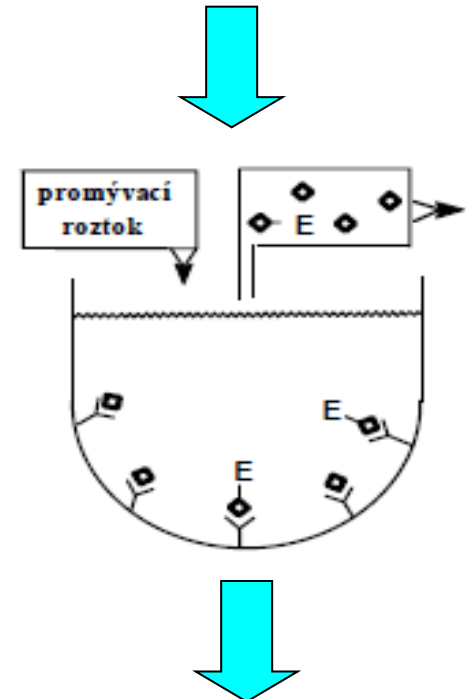
**3. inkubace:** kdy o vazebné místo na protilátce soutěží značený antigen a nezačený antigen (analyt) ze vzorku

**4. promývání:** přebytek nenavázaného antigenu (značeného i nezačeného – tzv. volná frakce), který nezreagoval, se vymyje pomocí promývacího roztoku

3



4

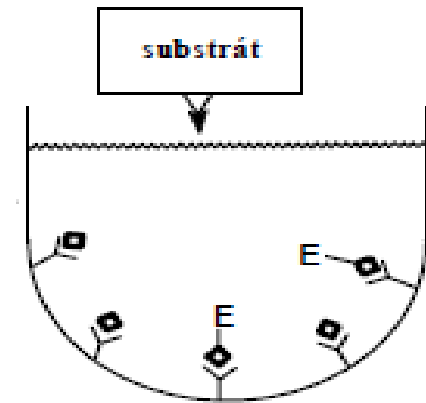




# ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

## 6. přidání substrátu

6



## 7. **Měření** intenzity barevného zbarvení vytvořeného barevného produktu

7

**Spektrofotometrická detekce barevného produktu**



## ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

**Platí zde nepřímá úměra:** čím vyšší koncentrace analytu (neznačeného antigenu), tím nižší intenzita zbarvení (tím méně navázaného značeného antigenu).

Kompetitivní ELISA metodu lze použít **i ke stanovení protilátek:**

- na povrchu jamky mikrotitrační destičky je ukotven antigen a v tomto případě soutěží neznačené protilátky z analyzovaného vzorku se značenými protilátkami (z reagensie, o známé koncentraci) o vazbu na antigen
- opět zde platí nepřímá úměra

# ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

**1. první protilátka** je navázána v nadbytku na stěně jamky mikrotitrační destičky

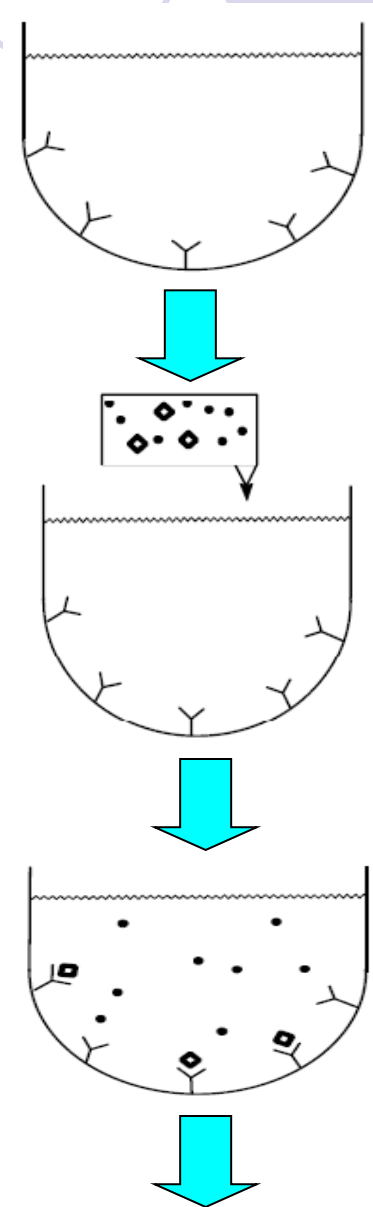
**2. přidání vzorku** (antigenu)

**3. první inkubace:** vytvoření imunokomplexu (antigen – 1. protilátka)

1

2

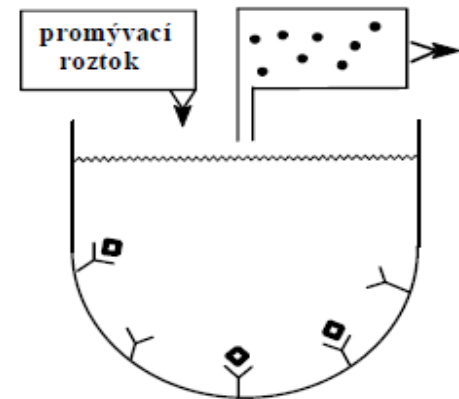
3



# ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

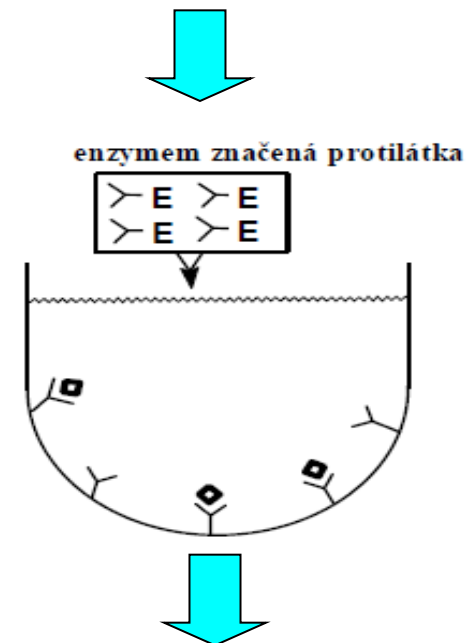
**4. promývání:** z reakční směsi promytím odstraní nenavázaná frakce

4



**5. přidá se druhá protilátka:** značená enzymem (tzv. konjugát), která je namířena proti druhé antigenní determinantě na stejném antigenu

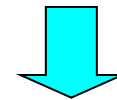
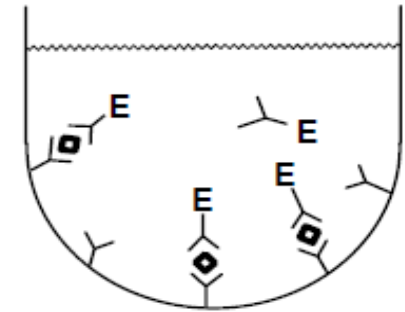
5



# ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

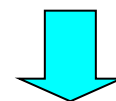
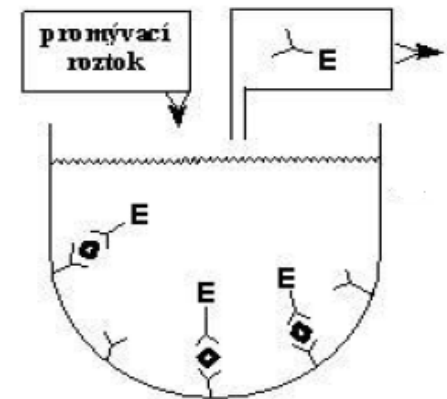
**6. druhá inkubace:** je vytvořen „sendvičový“ komplex

6



**7. druhé promytí:** dojde k separaci nadbytečného nenavázaného konjugátu

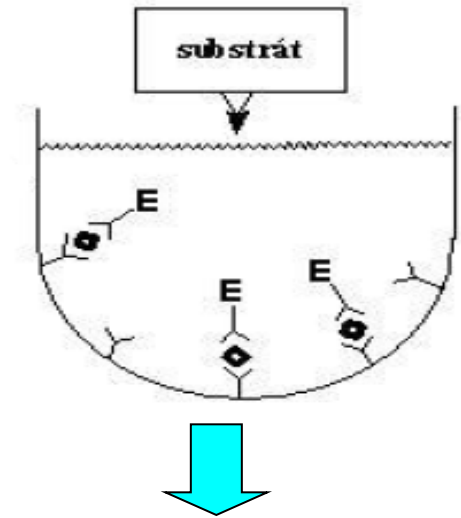
7



# ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

8. přidání substrátu

8



9. měření: změření intenzity zbarvení vytvořeného barevného produktu

9

Spektrofotometrická detekce barevného produktu

# ***ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce***

- nejvíce používaná ELISA metoda
- **platí zde přímá úměra:** čím vyšší koncentrace analytu, tím vyšší intenzita zbarvení.

# Využití ELISA metod



ELISA metody lze použít pro stanovení nízkomolekulárních látek, jako jsou :

- proteiny,
- karbohydráty,
- nukleové kyseliny,
- lipidy aj.

Stanovení se provádí různých typech biologického materiálu..



# Využití ELISA metod



## Nejčastěji jsou analyzovány vzorky:

- séra, plazmy,
- moče,
- mozkomíšního moku,
- tkáně nebo lyzáty buněk.

ELISA metody mají široké uplatnění ve zdravotnických laboratořích hlavně v imunologii a mikrobiologii (méně v biochemii nebo hematologii), kde se používají pro stanovení např. infekčních agens nebo protilátek.

# Využití ELISA metod



## Výhody:

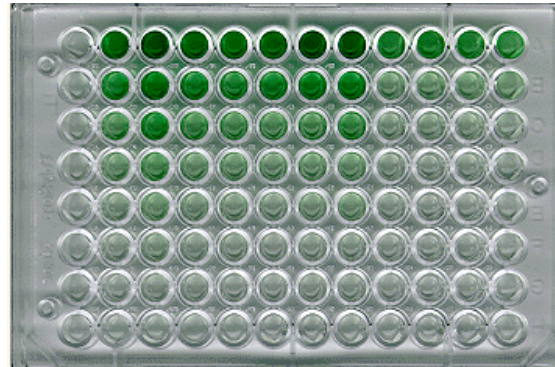
- jsou citlivé a specifické
- mají nízké pořizovací náklady na technickou instrumentaci.

## Nevýhody:

- analýza vzorků pouze v sériích,
- časová náročnost (doba jedné inkubace je více než 30 min., obvykle 1-2 hod. )
- manuální pipetování
- Vzorky nelze ředit během analyzované série.

# ELISA - Technická instrumentace

Provádí se ve speciálních nádobkách uspořádaných do tzv. **mikrotitračních destiček**.



Každá destička obsahuje 96 jamek uspořádaných ve 12 řadách po 8 jamkách.

# ELISA - Technická instrumentace

Mikrotitrační destičky vyžadují **při promývání:**

- použití speciálních osmikanálových pipet
- automatických ELISA promývaček.

Pokud to metoda vyžaduje, lze **během inkubace** mikrotitrační destičku umístit **do třepačky s možností nastavení intenzity třepání a inkubační teploty.**

# ELISA - Technická instrumentace

Pro měření výsledného produktu detekční reakce se používají **speciální vertikální spektrofotometry - ELISA readry mikrotitračních destiček**: je uspořádán tak, že světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru.



## ELISA reader (vertikální spektrofotometr)

**Princip:** světelný paprsek ze zdroje prochází přes zvolený interferenční filtr (podle požadované vlnové délky) 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 vycházejícího ze zdroje (obrázek č.8).
- Ve zlomku vteřiny se změří celá řada jamek (8), mikrotitrační destička se posune a může se měřit řada následující.





v.č. 1940

 DYNATECH  
MR5000





# ELISA reader (vertikální spektrofotometr)

## Součásti vertikálního fotometru:

- **zdroj záření:** nejčastěji používá halogenová žárovka nebo xenonová výbojka.
- **Interferenční filtry:** jsou umístěny v posuvném držáku filtrů, obvykle se používá 6 filtrů (pro  $\lambda$  400-800 nm).
- **Optický systém:** se skládá 9 optických kabelů (světlovodiče), štěrbin a zrcadel pro vedení světelného paprsku ze zdroje do optického prostředí (jamka mikrotitrační destičky).
- **Detektor:** používají se fotodiody.

Rychlost měření je 5s (celá mikrotitrační destička - 96 jamek).

# Vertikální fotometrie

- Vztah mezi změřeným signálem (absorpcí) a koncentrací se určuje **kalibrací**. Obvykle se změří absorbance **6-ti standardních roztoků** o známé vzrůstající koncentraci a blank (slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky) při určité vlnové délce.

# Vertikální fotometrie



- Při ELISA metodě se vyžaduje měření všech vzorků v duplikátech.
- Poté software přístroje sestrojí kalibrační křivku (naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y, hodnoty koncentrace na ose x), ze které odečte hodnoty koncentrací neznámých vzorků
- Při vertikální fotometrii závisí dosažené výsledky měření pouze na přesnosti pipetování kalibrátorů, kontrolních materiálů a vzorků.

# ELISA automatická linka

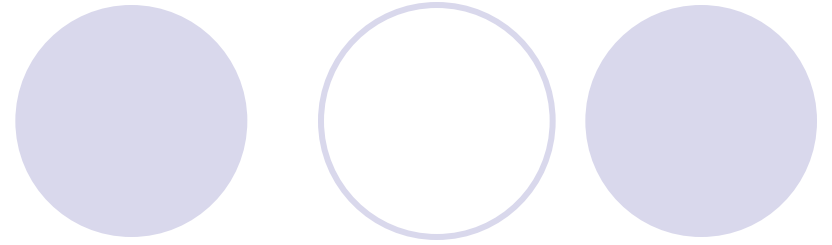
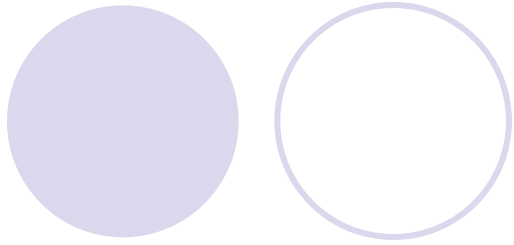


- Automatická linka provádí:
- automatické pipetování vzorků, reagensů, kalibrátorů a kontrol pomocí pipetovacího systému (2, 4, 8 jehel).
- Má zabudovanou čtečku čárového kódu, což umožňuje pozitivní identifikaci patientských vzorků.
- Linka má obvykle 3-4 místa pro umístění mikrotitračních destiček.
- Dále sestává z inkubátoru (místo pro inkubaci vzorků),
- promývačky a readeru mikrotitračních destiček.
- Transport destiček mezi jednotlivými částmi provádí pomocí robotického ramene. S
- systém provádí automatické ředění vzorků a je opatřen softwarem pro automatické vyhodnocení měření.

# ELISA automatická linka

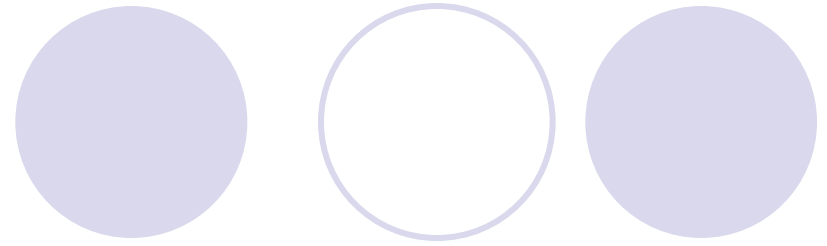


- Velkou výhodou automatické linky je použití čárových kódů, a tím zabránění záměny mezi vzorky. Dále je to přesnost pipetování vzorků a reagensí, vysoká kapacita přístroje.
- Nevýhodou je vyšší spotřeba používaných reagensí.



# Reflexní fotometrie

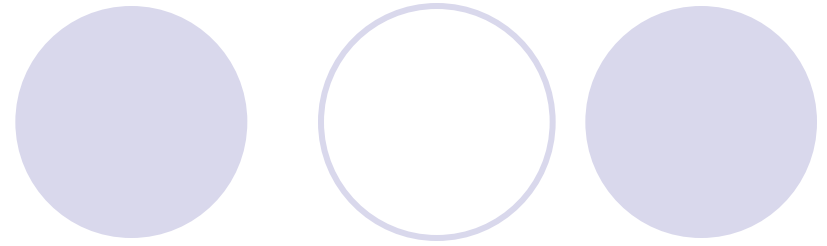
# Reflexní fotometrie



## 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



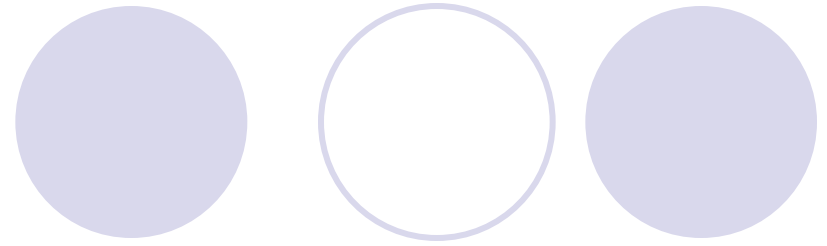
- Přístroj slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi. Pevná fáze slouží jako nosič obsahující činidla aktivovaná vodou obsaženou v naneseném vyšetřovaném biologickém materiálu (krev, moč).
- Měří se intenzita záření odraženého od homogenně zbarvené podložky.(matrice)



# 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

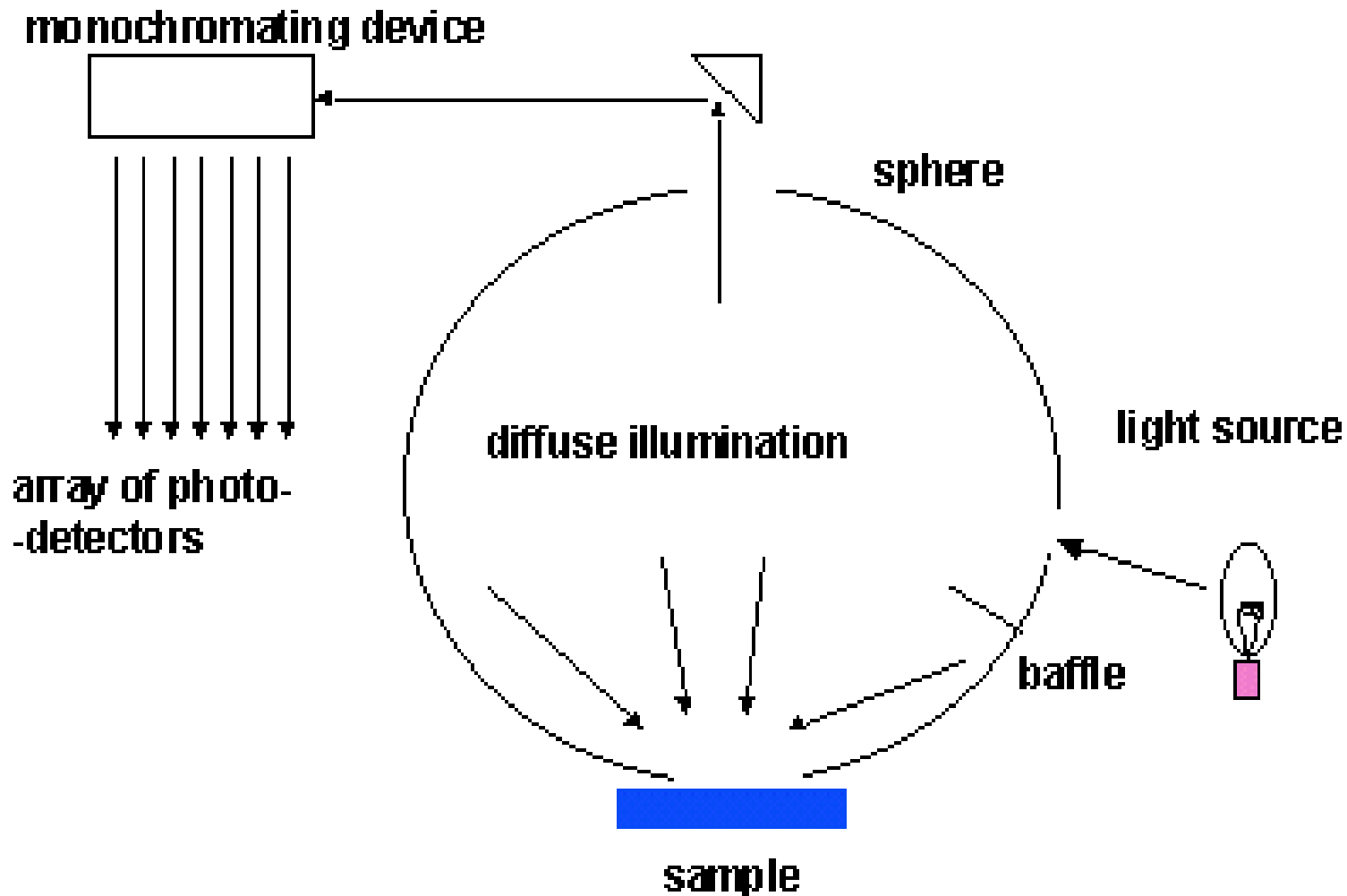
## Ulbrichtova koule (jako zdroj difuzního světla):

- 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**

