

bioanalytika II

analytické metody v klinické praxi

Jan Havliš, Ph.D.
MU PŘF



doporučená literatura

Analytické metody v klinické chemii

V. Chromý, J. Fišer, MU PŘF, Brno, 2000

Bioanalytika – Analytická chemie v laboratorní medicíně

V. Chromý, J. Fišer, MU PŘF, Brno, 2002



Creative Commons: Uveďte autora-Neužívejte dílo komerčně-Zachovejte licenci 3.0 Česko License

sylabus přednášky



laboratorní medicína

- : vzorky – charakter, zpracování
- : instrumentace, integrace a miniaturizace
- : kontrola a řízení jakosti
- : výběr analytické metody
- : optimalizace postupu
- : analytická souprava
- : vyjadřování analytického výsledku

základní metody a principy

- : barevnost a její analytické využití, indikátorové reakce
- : stanovení proteinů a enzymatická analýza
- : imunoanalýza
- : analýza nukleových kyselin
- : lékařská mikrobiologie

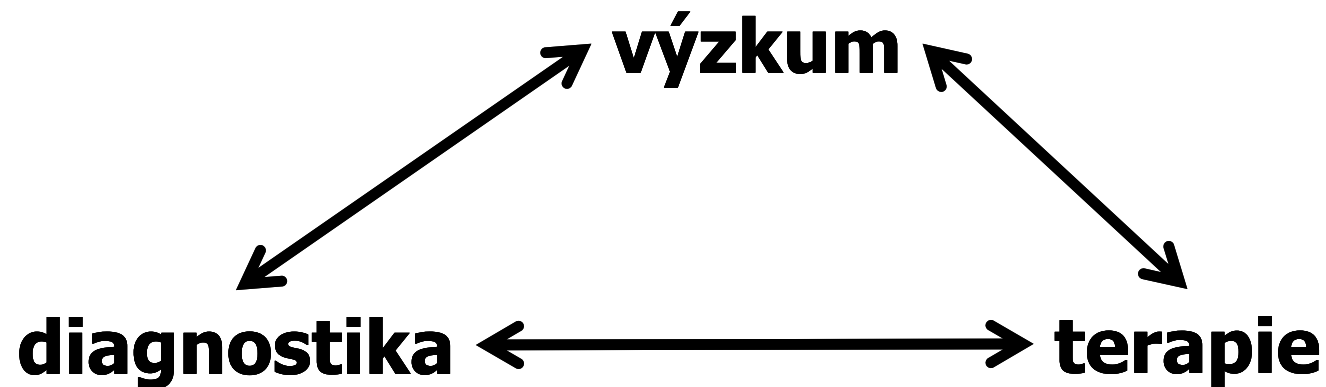
stanovení vybraných analytů

- : případová studie: stanovení ALP
- : albumin, barbiturany, draslík, etanol...

laboratorní medicína

- : analýza složek tělních tekutin s diagnostickým významem
- : stanovování analytů a metabolitů nebo jejich skupin,
včetně monitorování hladiny některých léků
- : zastřešuje obory zabývající se laboratorní diagnostikou:
klin. chemie, klin. biochemie, hematologie, lék. mikrobiologie, imunologie...

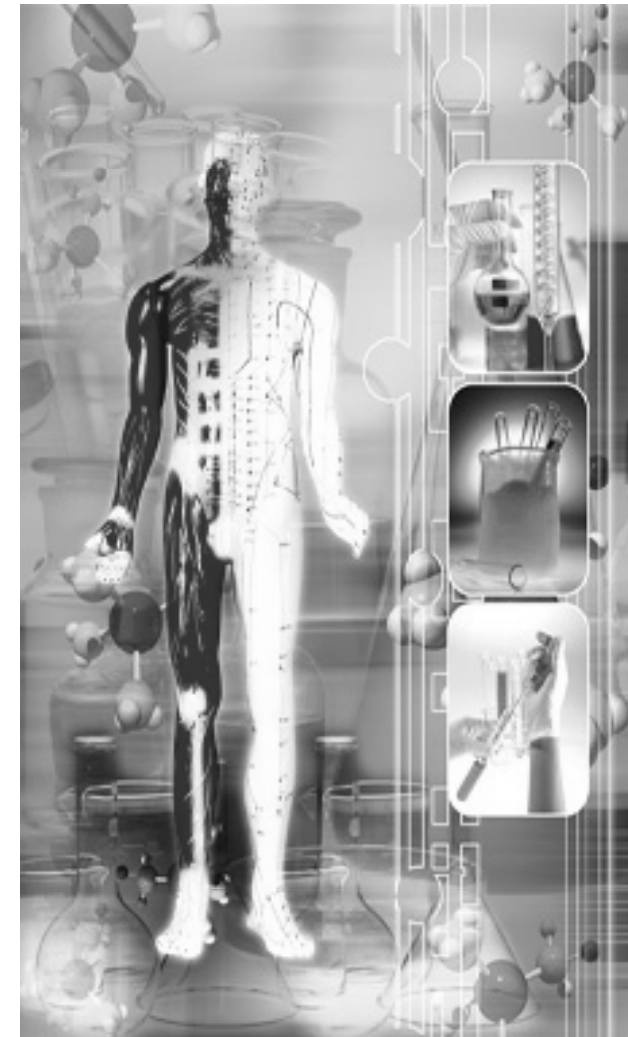
u nás tradovány jako samostatné klinické disciplíny



definice IFCC

(international federation of clinical chemistry)

„Klinická chemie je aplikací chemických, molekulárních a buněčných principů a technologií s účelem porozumět lidskému zdraví a nemoci a umožnit jeho hodnocení. Jádrem oboru je poskytování výsledků měření a pozorování se vztahem k příčině nemoci a udržení zdraví. Na rozhraní laboratoře a kliniky následuje přeměna těchto dat na specifické a obecné informace se vztahem k pacientovi a nemoci. Úkolem oboru je prohlubování znalostí o zdraví a nemoci prostřednictvím základního a aplikovaného výzkumu.“



laboratorní medicína : v EU 5 – 10 analýz na hlavu za rok

- : největší světový producent (bio)analytických dat
- : a zasahuje do většiny analytických oborů

laboratoře

- : nemocniční
- : soukromé
- : tzv. konsolidované (spojené) laboratoře
- : diagnostická centra



obrovský rozsah analytické činnosti

- : nesrovnatelný s jinými vědními nebo průmyslovými obory

vzorek **v laboratorní medicíně**

biologický

- : invazivní (krev, mozkomíšní mok, tkáně, šťáva žaludeční a duodenální)
- : neinvazivní (sliny, moč, stolice, sputum, dech)

krev

krev = suspenze b. částic v kapalině (plazma)

buněčné částice : krvinky (erytrocyty a leukocyty)
: krevní destičky (trombocyty)

srážení krve (opuštění kr. řečiště) – přeměna rozp. fibrinogenu na nerozp. fibrin

krev *srážení* > tuhý krevní koláč + krevní sérum

krevní sérum – podobné složení jako plazma, bez srážlivých látek

plazma a sérum

směs anorganických a organických látek ve vodě

nativní plazma – oddělením od krvinek z krve v nádobce s nepolárním povrchem (plast) bez protisrážlivého prostředku

: nejvíce blíží tomu, co je přítomno v cirkulující krvi

plazma – z krve v nádobce s protisrážlivými prostředky

sérum – oddělením od sraženiny z krve v nádobce s polárním povrchem a bez antikoagulancií

: příprava plazmy je *rychlejší*

: získá se asi o 20 % více plazmy než séra

: plazma snižuje riziko nežádoucí hemolýzy (v séru až 10x vyšší)

: v séru po odstředění nežádoucí dodatečná koagulace

: sérum je svým způsobem artefakt

: v plazmě nelze provádět elfu bílkovin \Rightarrow fibrinogen překrývá řadu γ -globulinů

: protisrážlivé prostředky vnášejí do plazmy ionty, které pak nelze stanovovat

: řadu analytů maskují a inhibují i některé enzymy plazmy

moč

světle žlutá tekutina produkovaná ledvinami a vylučovaná z organismu prostřednictvím močových, močového měchýře a močové trubice

obsahuje: močovinu, chloridy, ionty sodíku, draslíku, fosforečnany, sírany, kreatinin a kyselinu močovou

mozkomíšní mok

(likvor, cerebrospinální tekutina)

čirá, řídká tekutina, která cirkuluje mezi mozgovými komorami, centrálním kanálem v páteři a prostupem mezi mozkem a míchou a jejich ochrannými membránami (meningami)

obsahuje: elektrolyty a podobné organické látky (podobné jako krevní plazma, ale jiné koncentrace)

např. glukózu, bílkoviny, laktát, pyruvát, cholesterol, enzymy, soli a určité typy lymfocytů

co ovlivňuje koncentrace analytů v biologických vzorcích

- a) dané
- vlivy
- b) proměnné

vlivy dané

rasa a pohlaví

např. různé referenční hodnoty analytů: kreatinkinázy, α -amylázy a granulocytů

: vyšší u mužů než u žen

:: ženy mají většinou nižší a užší referenční intervaly u celé řady analytů

: narůstají vzestupně od bělochů přes žlutou rasu k černochům

věk

např. různé referenční hodnoty analytů u novorozenců, dětí, dospívajících, dospělých a starých lidí

biorytmy – chronobiologické vlivy

lineární : mění se průběžně s věkem

cyklické : denní (cirkadiánní)
: měsíční (lunární)
: roční období (sezónní)

biorytmy **způsobují změny** *koncentrací analytů*

cyklické biorytmy – kolísají koncentrace ze dne na den i v průběhu dne

významná **změna biorytmů** v *těhotenství*

vlivy proměnné

dieta

: stravy, hladovění (\Rightarrow malnutrice; podvýživa)

Δ koncentrací tuků, cukrů, bílkovin \Rightarrow Δ hladiny sérového amoniaku a močoviny

tělesná námaha

krátkodobá a intenzivní námaha

: spotřeba ATP, ↓ hladiny glukózy a laktátu

dlouhodobá námaha

: ↑ koncentrace iontů sodíku, draslíku, vápníku, fosforu, ALP, albumin, močovina, bilirubin, AST, pyruvátkináza, CK

míra změny je *individuální a závisí na okolnostech*

vliv nadmořské výšky (*zátěž organismu*)

: ↑ koncentrace C-reaktivní proteinu, β_2 -globulinu, kyseliny močové, hemoglobinu a hematokritu

adaptace na **vysoké nadmořské výšky** je *pomalá a trvá týdny*

adaptace po **přechodu zpět** je jen *několikadenní*

běžné drogy

kofein

: ↑ koncentrace glukózy, neesterifikovaných mastných kyselin a katecholaminů

nikotin (cigareta)

: akutní i chronické změny

např. ↑ koncentrace sérových mastných kyselin, glukóza, fibrinogenu, cholesterolu, volného glycerolu, aldosteronu a kortisolu, některých hormonů a tumorové markery a těžké kovy (Cd, Cu, Pb)

alkohol

: ovlivňuje intenzita a délce konzumace

okamžité vlivy: ↓ koncentrace sérové glukózy, metabolická acidóza
(etanol⇒acetaldehyd⇒acetát)

dlouhodobé vlivy: ↑ aktivity enzymů GMT, GLD, AST a ALT
(intoxikační vliv na játra)

chronický alkoholizmus: ↑ koncentrace triacylglycerolů, cholesterolu a některých hormonů

jiné běžné vlivy

biologické tekutiny – komplex anorganických a organických molekul, navíc jsou tvořeny nepravými roztoky bílkovin a emulzí tukových kapének

látky mohou být vázány na bílkoviny ⇒ jejich obsah se v živém organizmu dynamicky mění; změny souvisí s jejich individuální stabilitou nebo rozkladnými procesy (metabolismus a bakterie)

biologické vzorky – **potenciálně infekční materiál** ⇒ bezpečnostní předpisy

počet analytů ve vzorku – stovky + jejich deriváty s proměnným obsahem a proměnnou foto- a termostabilitou = **biologická matrice**

vliv odběru a následného transportu – tzv. *preanalytická fáze*

nutnost **rychlého transportu** a **uchovávání v chladu** nebo **konzervace**

vlivy medikace

vzorky nemocných – **lékové interference**

*zkreslují **výsledek** nebo *úplně znemožňují* provedení analýz*

údaje o **interferencích** – zjišťovány **empiricky**

: vlivy **jednotlivých léků** (běžné)

: vlivy **lékových kombinací** (vesměs neznámé)

: **odběr krve nalačno, ale i po vysazení léků na dobu 24 – 72 h**

: **většinou jen znalost léků pacienta**

analytická interference léčiv – je sledována IFCC, zjištěné analytické interference v databance

standardní (normovaný) operační postup (**SOP**) – analýza směsného séra dárců nebo nemocných obohaceného známým množstvím příslušného léčiva

: výsledek analýzy je statisticky hodnocen

preanalytická fáze

odběr, transport a uchovávání vzorků

postupy a operace se vzorkem analyzovaného materiálu do zahájení analýzy

odběr a transport biologického materiálu

analyty mají omezenou časovou stálost

: jsou metabolizovány, jsou termolabilní nebo fotolabilní

stabilita – doba skladování, kdy se za přesně definovaných podmínek nemění počáteční obsah analytu ve vzorku; jeho koncentrace nebo aktivita

vyjadřuje se jako čas, během něhož se počáteční obsah analytu s 95% pravděpodobností nezmění o více než 1.5-násobek referenčního intervalu

vlivy stavu pacienta

tělesná poloha – u vysokomolekulárních látek jsou nižší při odběru vleže a zvyšují se až o 15 % při odběru vstoje

fyzická námaha – Δ koncentrace látek podílejících se na energetickém metabolismu, dochází k zahušťování makromolekulárních látek, zvyšuje se aktivita enzymů AST a CK, kreatininu, snižuje se hladina thyroxinu

krev

- : odebírá se *vsedě* a alespoň po *30 min klidu*
- : *stažení paže* elastickým obinadlem a po *dezinfekci* místa vpichu
- : obinadlo se *rychle uvolní* – odbírá se *volně proudící krev*
- : před vpichem se *nesmí* pacient staženou paží *dlouho cvičit*

rychlé neuvolnění obinadla a příliš intenzivní cvičení paží \Rightarrow

významné ovlivnění hladiny některých sérových analytů:

\uparrow koncentrace Na^+ a Ca^{2+} , hemoglobinu, cholesterolu, ALP, bílkovin, bilirubinu a některých enzymy; \downarrow se koncentrace glukózy, kreatininu, fosforečnanu...

venózní (žilní) krev

odběr ráno nalačno

poslední lehkou potravu kolem 18:00, a druhý den ráno v malém množství jen vodu nebo neslazený čaj

vysazení léků na dobu alespoň 24 – 72 hodin

- : většina analýz (kromě hematologických) je prováděna ze **séra**
- : po odběru srážlivé krve a před oddělením séra od krevní sraženiny odstředěním je nezbytné vyčkat nejméně 30 minut, což je doba nezbytně nutná pro koagulační proces
- : s prostředky zrychlující proces krevní koagulace, stačí obvykle jen 10 minut

kapilární krev

vpichem lancetou do prstu, do ušního lalůčku nebo patičky (děti)

- : šetrné
- : skápnutí nebo odsátí (mikropipetou nebo kapilárou) 1 – 3 kapek krve
- : okamžitá analýza (stanovení glukózy na diagnostickém proužku)
- : transport v plastové mikrozkuhavce s protisrážlivým a anti-glykolytickým prostředkem

protisrážlivé prostředky (antikoagulancia)

látky schopné komplexovat ve vzorku ionty endogenního vápníku a tak zabránit procesu srážení krve – *koagulaci*

: sodné nebo draselné soli kyseliny citronové, šťavelové nebo EDTA

: heparin, akcelerátor antithrombin III (inhibitor krevní koagulace)

: hirudin (antikoagulans pijavek lékařských)

v hematologických analýzách a testech je nutné naopak nesrážlivou krev rekalifikovat a tím obnovit srážlivost krve přidáním přebytku vápenaté soli k vysycení antikoagulancia

odběrové nádoby

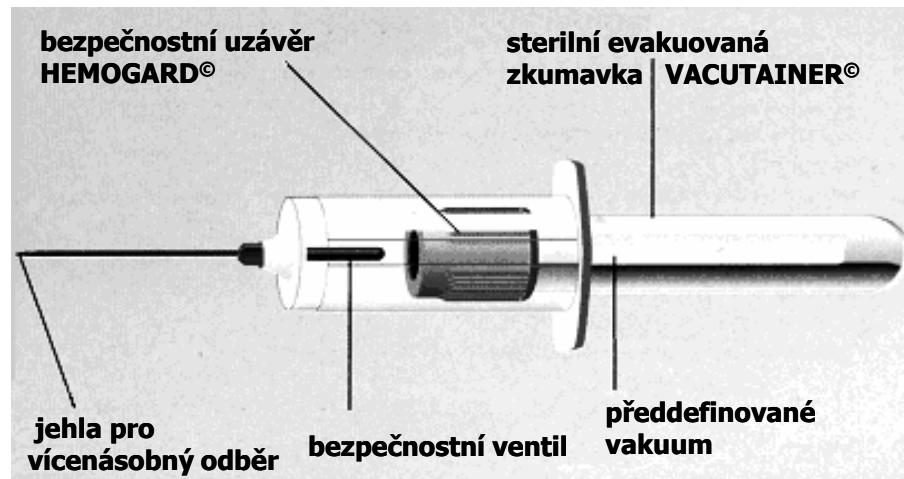
otevřený systém – otevřená zkumavka

uzavřený systém – evakuovaná nádoba či zkumavka s pryžovou zátkou, nebo speciální injekční stříkačka sloužících k odběru a současně i jako centrifugační zkumavka

obsahují – antikoagulancia nebo látky urychlující srážení krve (želatina, aprotinin, polystyrenové kuličky *apod.*)

stanovení glukózy – speciální nádoby s prostředky potlačujícími glykolýzu v kombinaci s antikoagulačními prostředky

protisrážlivé prostředky jsou většinou *solí* a vnášejí vždy do biologického vzorku některé ionty, nelze tyto ionty v takto ošetřeném biologickém materiálu stanovovat



speciální **separační gel** – oddělí po centrifugaci sérum nebo plazmu od krevní sraženiny nebo krvinek; není nutné rychlé oddělení séra/plazmy od zbytku krve

nádobky na odběr krve jsou barevně odlišeny pro snadnější manipulaci; zakotveno v příslušné normě ISO



červená – čistá; zlatá – gel pro centrifugaci
 šedá – glukózové (NaF, K₂(ox)), zelená – heparin
 fialová – EDTA, modrá – citrát...

jednorázové p. (*disposables*) – třída pomůcek, mezi než patří i uzavřené nádoby a další plastové jednorázové pomůcky pro odběr, transport, odstředění, dávkování a uchovávání dalších tělních tekutin ve sterilním provedení

dále jsou to: nastavce automatických pipet, nádoby a zkumavky na moč, plastové destičky ELISA, na určení krevních skupin *atp.*

hemolýza

rozpad erytrocytů ⇒ mění kvalitu odebrané krve

: zpracování odebrané krve na sérum či plazmu optimálně *do 30 minut, nejpozději ale do 1 hodiny* po odběru

projev – ↑ koncentrace draslíku a chloridů, ↑ aktivita enzymu ALT, ↓ glukóza

vzhled – normální sérum i plazma – nažloutlé a průhledné

: hemolýza ⇒ *červené* (uvolnění hemoglobinu)

: *mléčný zákal* – emulgované tukové kapénky – **chylózní (lipemické) sérum**

hemolytické a chylózní sérum nebo plazma jsou *pro většinu analýz nevhodné*

glykolýza

obsah glukózy v krvi **rapidně klesá** po odběru – *krvinky stále žijí*

sérum/plazmu je nutné uchovávat při teplotě kolem +4 °C

účinné, ale *komplikuje transport*

teplota 15 – 25 °C ⇒ obsah glukózy za den na **~30 %**, za 2 dny jen **6 %**

teplota +4 °C ⇒ obsah glukózy za den na **~80 %**, za 2 dny **32 %**

biochemická povaha glykolýzy – *katabolizmus glukózy*

: **aerobní glykolýzu** – konečným produktem **CO₂** a **voda**

: **anaerobní glykolýzu** – konečným produktem **laktát**

: **pentózový cyklus** – přímá oxidace glukózy; hexóza ⇒ pentóza

potlačení glykolýzy

: potlačení funkce významných enzymů daných katabolických drah

glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza – dehydrogenace glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bis(fosfo)glycerát

: **inhibována** *kyselinou monojódoctovou* (cca 0.5 mg/ml vzorku krve)

enoláza – převod 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát
metaloprotein – Mg^{2+} v aktivním centru

: **inhibována** *fluoridy v kombinaci s endogenními fosforečnany* (cca 2 mg/ml KF nebo NaF; krev lze uchovávat až 24 hodin při pokojové teplotě)

hexokináza – fosforylace glukózy

: **inhibována** *mannózou v přebytku* (kompetitivní substrát, 15 mmol mannózy, stabilita krve na 12 h při pokojové teplotě)

kontraindikace: nelze použít hexokinázovou metodu pro stanovení glukózy

: **inhibována** též *fluoridy v kombinaci s protisrážlivým přípravkem* (EDTA; na 1 ml krve 1.6 mg Na_2EDTA a 2 mg KF)

kontraindikace: EDTA, KF interferují nebo inhibují stanovení některých analytů (např. metaloproteiny)

moč

jednorázový sběr (první ranní moč) nebo *sbíraná moč* (12 nebo 24 hodin)
: *katetrizace* (cévkování)

hygienu odběru – bakteriální **kontaminace**

jednorázový sběr moči

: základní analýza a vyhodnocuje se močový sediment
: analýza nejpozději do 2 hodin po odběru

sbíraná moč

: stanovení některých iontů, močoviny, glukózy, mikroalbuminurie, kreatininu a kreatininové clearance
: stanovení některých hormonů (17-ketosteroidů, 5-hydroxyindoloctové kys. a kys. vanilmandlové) – konzervace zředěnou HCl
: kvantitativní analýza 24 h moč (dU) – vztažení obsahu analytu na jeho denní vylučování močí; objemová eliminace

konzervační prostředky

- : 5 ml 10 % thymolu ve 2-propanolu/l moči – pro většinu analýz
- : azid sodný, 10 mmol/l moči – glukóza, močovina, kys. močová, Na, Ca, oxaláty, citráty
- : 25 ml roztoku HCl 6 mol/l na dU – kys. 5-hydroxyindolooctová, Ca, Mg, P, katecholaminy
- : uhličitan sodný, 2g/l moči – porfyriny, urobilinogen
- : kyselina benzoová, 10 mg na dU – glukóza
- : úprava pH moči nad 8 – kyselina močová

mozkomíšní mok

lumbální punkce

stanovení bílkovin, glukózy, chloridů aj.

krom neurologických vyšetření, se využívají rutinní analytické metody

duodenální šťáva

sondáž dvanáctníku

analýzy trávicích enzymů (trypsin), kyselin, žlučových kyselin a barviv

rychle se měnící vzorek, který musí být proto speciálně odebírán do nádob vychlazených ledem a okamžitě analyzován

další biologické vzorky

stolice, sputum, hnis, sliny, pot, sperma, výtěry a stěry sliznic a vzorky orgánů a tkání

sputum, pot – vesměs nejsou předmětem práce běžné laboratoře klinické chemie, obvyklé v mikrobiologii, histochemii *aj.*

stolice – tzv. okultní (skryté) krvácení (krev ve stolici)

sliny – analýza drog (alkohol *atp.*) a některých steroidů

úprava vzorku

: odstředění celé krve, deproteinace, mineralizace, zkoncentrování

odstřed'ování

oddělení **sedimentu** od *supernatantu*

podmínky – relativní centrifugační síla (RCS), čas a teplota

RCS – kolikrát je odstředivé zrychlení u dna centrifugační nádoby větší než gravitační zrychlení (g)

intenzivní centrifugace vede k *nežádoucí hemolýze* krve

odstranění bílkovin

deproteinace – nutné pro stanovení některých analytů

analyt

: *v supernatantu* – některé ionty nebo substráty

: *v sedimentu* – organický fosfor, celková bílkovina v silně lipemických sérech, bílkovinný dusík Kjeldahlovou metodou *apod.*

deproteinační techniky

fyzikální – centrifugace, ultracentrifugace, adsorpce a denaturace teplem

časově náročné, určeno pro speciální případy

chemické – srážení protilátkami (imunoprecipitace), dehydratací nebo solemi

rychlé

dehydratace

užívaná

frakcionace bílkovin nebo v některých speciálních analytických případech

silně závislé na pH – bílkoviny mají jak kladné, tak i záporné náboje
: v kyselém prostředí – kationty, v alkalickém prostředí – anionty
: izoelektrický bod (pI) – specifické pH kde je bílkovina elektroneutrální
:: v izoelektrickém bodě jsou bílkoviny labilní a snadno se srážejí

dehydratace: **pomocí rozpouštědel** nebo **vysolením**

kompetice proteinu se srážedlem o vodu

⇒ odejme-li se proteinu určité množství vody ⇒ protein se sráží

: metanol, etanol, aceton

: pracuje se v oblasti pI

dehydratace bílkovin je většinou vratný proces

srážení solemi

obvyklé

srážení bílkovin ve formě nerozpustných solí

srážedla:

: **aniontová** (trichloroctan, chloristan, pikran, wolframan, molybdenan, sulfosalicylan, metafosforečnan)

: **kationtová** (zinek, rtuť, kadmium, uran, thorium, železo, měď a olovo)

mineralizace

speciální případy

mineralizace suchou cestou

pro stanovení C, H a N elementární analýzou nebo stanovení kovů v biologické/organické matrici atomovou absorpční spektrofotometrií

mineralizace mokrou cestou

pro stanovení organicky vázaného fosforu, stanovení celkového bílkovinného dusíku Kjeldahlovou metodou

kjeldahlizace v klinické chemii – směs obsahující konc. kyselinu sírovou se solemi, např. s K_2SO_4 s $CuSO_4$, $HgSO_4$ a SeO_2

zakoncentrování

zakoncentrování stopových, jinak nestanovitelných množství analytů (bílkoviny)

metody

dialýza, ultrafiltrace nebo separace na koloně

: nejsou předmětem práce běžné laboratoře

instrumentace

analýzátory; organizace, integrace a miniaturizace analýz

historie

významná změna za posledních 40 let

manuální provoz ⇒ **automatické analyzátory**

odběr – krev injekční jehlou do otevřené skleněné zkumavky

: ta je buď neuzavřená, nebo v lepším případě uzavřená korkovou či gumovou zátkou

v laboratoři – sraženou krev promíchat skleněnou tyčinkou, odstředit a sérum nad sraženinou odsát Pasteurovou pipetou, přenést do další zkumavky pro analýzu

: vzorky a připravená činidla odměřit do reakčních zkumavek, a nechat proběhnout příslušnou chemickou reakci, přelít zreagovanou směs do kyvety fotometru, změřit absorbanci a provést výpočet obsahu analytu

: stanovení jednoho analytu – od 50 do 500 μ l séra a dalších 1.5 – 2 ml činidel

srovnání: kolem r. 1930 byl objem reakční směsi pro stanovení alkalické fosfatázy přes anorganický fosforečnan *několik mililitrů* a inkubace trvala *kolem 48 hodin*

analyzátory – kapalná činidla

průtokové (50. léta) ⇒ **centrifugační** ⇒ **pásové** (70. léta) ⇒ **revolverové**

: **vícekanálová analýza** – paralelní analýzy

: **vícekomponentová analýza** – více analýz z jednoho vzorku

skleněné kapiláry, vzorky oddělené vzduchovými
bublinami nebo inertní kapalinou

: **vícekanálová analýza**

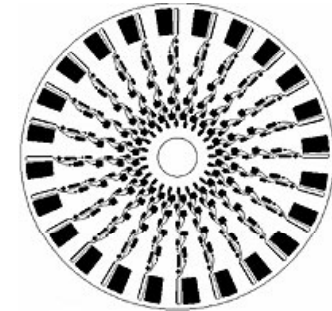
vysoká správnost a shodnost analýz

průtokové a.



centrifugační a.

rotor s prohlubněmi paprskovitě od středu



dvě reakční místa **oddělená** zvýšenou **přepážkou**

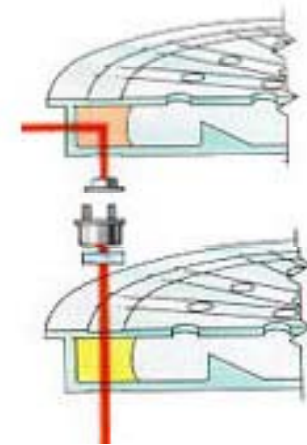
vnější prohlubeň – fotometrcká kyveta, kolmo na rotor průhledné okénko

: odstřed'ováním dávkování vzorku i činidla; slití vzorku s činidlem
:: přelití se do měřícího prostoru

rotor – 28 pozic pro vzorky, standardy a kontroly, omyvatelný

: analýzy po metodách (*batch analyses*)

nevýhoda: neselektivní; nemožnost analýzy s přímým přístupem
(*random access analysis*)



pásové a.

kopírování reakcí ve zkumavce

: nekonečné pohyblivé pásy osazené řadami zkumavek ve vodní lázni

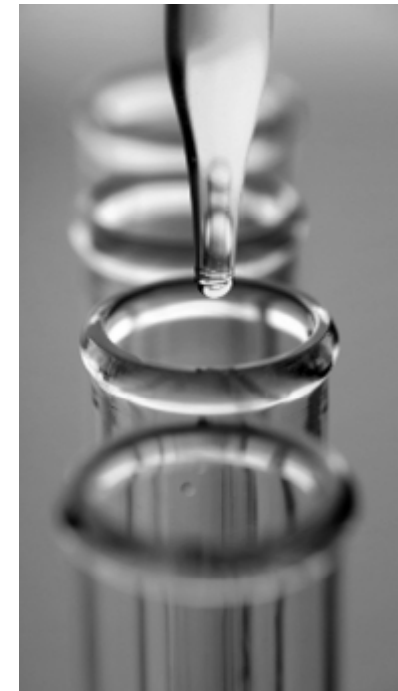
: lineární pohyblivý dávkovač pipetuje sérum a fixní dávkovače jednotlivá činidla

: po proběhnutí reakce byl obsah zkumavek nasát do měřících kyvet

: zkumavkami byly umyty, vysušeny a znovu použity k analýze

:: doslova zástupy pochodujících zkumavek

nevýhoda: spotřeba vzorků i činidel



revolverové a.

kruh stojanů na vzorky, činidla a reakční kyvety se **soustavou dávkovačů**

: řízeno **procesorem**

: měření absorbance 340 – 600 nm vyměnitelnými filtry (5 – 8)

malé, střední nebo velké

: dosahované průměrné hodinové výkony (analýz/h)

:: výkon se pohybuje od stovky za hodinu až nad tisíc v hodině

paleta metod, bez přeprogramování: 15 – 50

speciální analyzátory – vybrané skupiny analytů dle lékařských požadavků

: nebezpečná léčiva (*drug monitoring*), analýza moči, stanovení hormonů, stanovení onkomarkerů, koagulační hematologické přístroje (počítače krevních částic *aj.*)

neodkladná (akutní) vyšetření – speciální malé analyzátory



analyzátory – suchá chemie

suchá chemie – činidla v suchém stavu

destičky či **proužky (stripy)** – nosiče reagensů

principy měření signálu:

kolorimetrie, měření odrazu, potenciometrie a imunochemické reakce

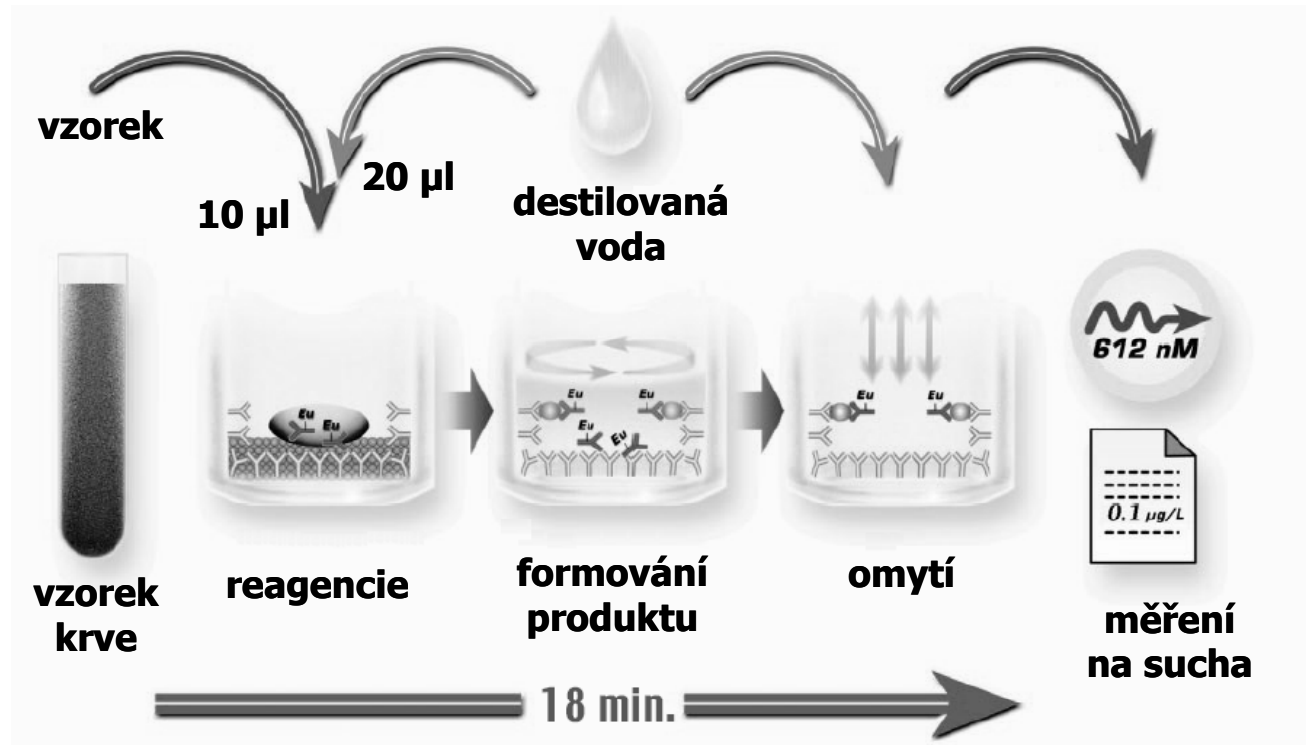
až 50 různých druhů analýz

analyzátor s destičkami: obsahuje zásobníky destiček, stojánek pro více vzorků a dávkovač

vzorek do okénka na jednu stranu destičky; vsákne se do reakční zóny ⇒ příslušná chemická reakce; odezva se měří v měřícím okénku na druhé straně destičky

analyzátory s diagnostickými proužky: měří se odraz zbarvení reakční plošky

umožňují buď jednotlivé analýzy nebo analýzu souboru více analytů



suchá chemie – nemožnost rychlého transportu vzorku nebo výsledků; malý objem analytu

: snadné pro obsluhu, ale nevhodné pro kvalitní screening; orientační stanovení

ostatní analyzátoři

AAS (atomová absorpční spektrometrie), **FAS** (fluorescenční absorpční spektrometrie), **centrifugy**, **CZE a PAGE bílkovin a lipoproteinů**, **skenery**, **pH-metry**, **osmometry**, **coulometry**, **fluorimetry**, **analyzátoři NA**, **chromatografy**, **hmotnostních spektrometry...**



přeměna **laboratorní diagnostiky** na **laboratorní medicínu**

⇒ **pokroky v instrumentaci!**

laboratorní medicína ⇐ patologie a laboratorní praxe na začátku 19. století (C. Bernard, R. Virchow, J. Hopkins a další)

do 30. let využívána k dodatečnému potvrzení diagnózy – **laboratorní diagnostika**

rozvoj po r. 1950 – prudkým růstem počtu laboratorních vyšetření nástupem nových diagnostických metod, zejména s **imunodiagnostikou** (kolem r. 1960), zrychlených **automatizací** a **komputerizací** analýz (po r. 1970); a **molekulární biologii** (po r. 1990)

1970 – 1990 : meziroční ↑ počtu analýz o *cca* 12 %, náklady na laboratorní diagnostiku dosáhly již asi 10 % z celkových nákladů na zdravotnictví

racionalizace

efektivita práce – slučování samostatných sekcí (hematologie, klinické biochemie, imunologie, částečně mikrobiologie) ⇒
⇒ **konsolidované laboratoře**; rychleji a levněji komplexní servis

kontrola u lůžka (*bed-side monitoring*)

rychlá analýza u lůžka pacienta personálem kliniky

akutní analýzy na místě – tzv. **point-of-care testing** (POCT)

klinická chemie akutních stavů

sledování tzv. vnitřního prostředí pacienta: pH krve, pO₂, pCO₂, ionty sodíku, draslíku, chloridy a hemoglobin nebo hematokrit

sebekontrola pacientů (*home diagnostics*)

analýzu nebo vyšetření si pacient provádí **doma sám**

kontrola aktuálního stavu, dávkování léku, nebo signál k návštěvě lékaře

miniaturizace a automatizace – robotizovaných celků,
do tzv. diagnostických center

centralizace

konsolidované laboratoře

současně analýzy biochemické, hematologické, imunochemické, detekce některých cílových sekvencí NA + mikrobiologické analýzy

soustředí analýzy z původně izolovaných laboratoří klinické biochemie, hematologie, mikrobiologie, imunochemie *aj.* do celku, který je schopen poskytnout na jednom místě hlavní laboratorní vyšetření biologických vzorků rychleji a levněji, napříč tradičním oborovým dělením



diagnostická centra

: **komplexní palety analýz**

: **vysoký stupeň automatizace**

:: umístění vzorků s čárovými kódy pacientů na vozík pohybující se na dráze kolem několika vzájemně kompatibilních analyzátorů, zcela automatické odměřování vzorků, provádění analýz a vydání nálezu

: modulárním propojení kompatibilních analyzátorů

: řízený celek

: analýzy prakticky bez zásahu lidské ruky

vzorky pacientů v jednorázových odběrových nádobek s **čárovým kódem**, ten zahrnuje **požadované analýzy + identifikačních znaků**

rozdělení vzorku do zkumavek dle požadovaných analýz

: vzorek se automaticky pohybuje mezi analyzátory

: kumulace nálezů a databáze pacientů



organizace diagnostických center

: centrální laboratoř (*core laboratory*)

:: *cca* 75 % objemu činností

:: analytická chemie, hematologie, toxikologie, imunologie, analýzy moči

: mikrobiologie

:: *cca* 20 % objemu činností

:: kultivace vzorků krve a moči, sérologie

: transfúzní služby

:: *cca* 5 % objemu činností

:: určování krevních skupin a předtransfúzní křížové testy/zkoušky

malé, specializované laboratoře **akutní analýzy, analýzy pro poradny** (diabetologii, urologii, toxikologii *apod.*), kde je vhodné nebo nutné provést některé základní **analýzy na místě a co nejrychleji**

dlouhodobý trend

: Δ rozměrů analytického místa na **mikro-** až **nanometrové**

: Δ objemu vzorku a činidel na **submikrolitry**

:: mikročipy mají analytická místa o rozměru *cca* 10 až 100 μm

:: velikost lidského erytrocytu je 7 μm

termíny z mikroelektroniky

čip (*chip*, pův. tenký plátek polovodiče): **soubor analytických míst na matici** (mikrojamek či mikroteček obsahujících všechny potřebné reagensie); + další funkční elementy: kanálky, mikropumpy, čidla *apod.*

pole (*array*, pův. uspořádání v řádcích a sloupcích; soustava uspořádaných elementů): způsob uspořádání souboru nebo množiny analytických míst a funkcí na matici

mikroanalytická jednotka – celý analytický systém, tedy kompletní mikroanalyzátor, včetně dávkovačů, ventilů a detektorů měřeného signálu

technologie mikroanalytických přípravků

⇒ zachycení určitých cílových skupin obsažených ve vzorku vhodným čidlem (sondou)

čidlo – afinitní systém (protilátka, enzym, bílkovina, NA nebo kompletním biologickým systémem)

detekce – optické metody, elektrochemicky nebo měřeními reagujícími na hmotnost (např. akustickými vlnami)

základní dělení mikroanalytických přípravků

- : mikroreakční destičky o vysoké hustotě reakčních míst
- : reakční místa na povrchu plochy
- : mikročipy a nanočipy
- : senzory a biosenzory (biočipy)

mikroreakční destičky o vysoké hustotě reakčních míst

původní mikrotitrační destička ELISA: čirý polystyren, 8x12 (96) jamek na 9x12 cm, objem jamky je *cca* 0.2 ml

dnešní mikroreakční destičky: od 192 do 20000 mikrojamek o objemu 125 μ l do 50 nl

praxe: čipové přípravky s *cca* 100 analytických míst; kompromis mezi miniaturizací a její cenou

mikrodávkače (na bázi techniky *ink-jet* odměřující mikro- až nanolitry)
mikrodetektory (spojení mikroskopu s fotometrem či fluorimetrem) měří signál (např. absorbanci) v mikrojamce destičky shora dolů; jamka je současně reakční cela i měřící kyveta

měření: metoda „smíchej a měř“

mikroreakční destičky – polymerní materiál; odlitím nebo vrtáním jamek laserem, laserovou ablací *apod.*

mikroreakční destičky – mikročip i mikroarray

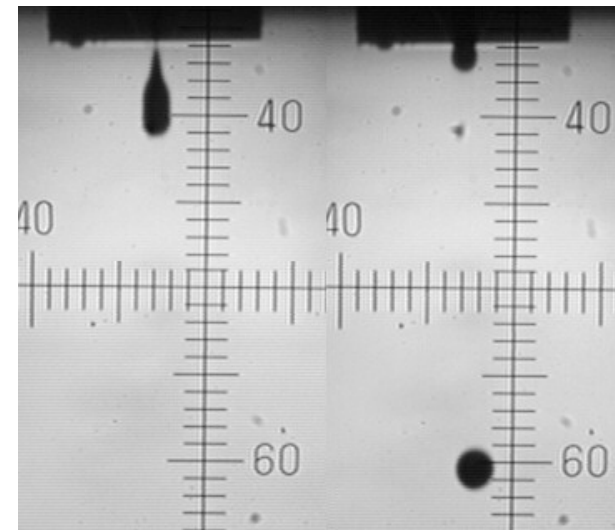
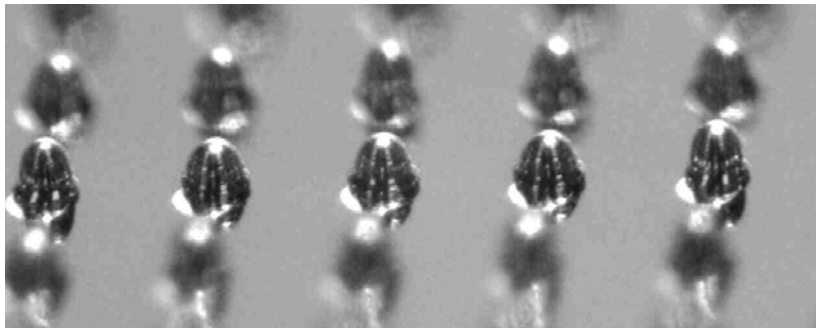
reakční místa na povrchu plochy

reakční systém – přímo na podložce, *cca* 1 až 2 cm² (ne v mikrojamce)

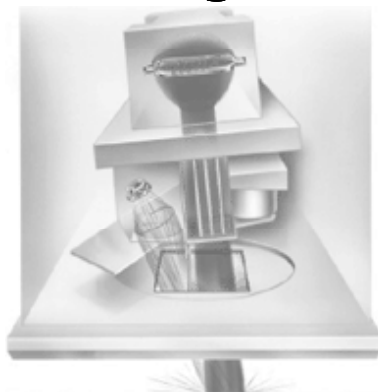
: stovky mikroteček o velikosti 10 – 100 μm

materiál podložky: sklo, křemík, plasty (teflon, polymetylmetakrylát, polykarbonát, polypropylen, polyakrylamid *apod.*)

nanášení vzorku: technika *ink-jet* nebo tiskem (fotolitografie)



měření analytického signálu: většinou odrazem

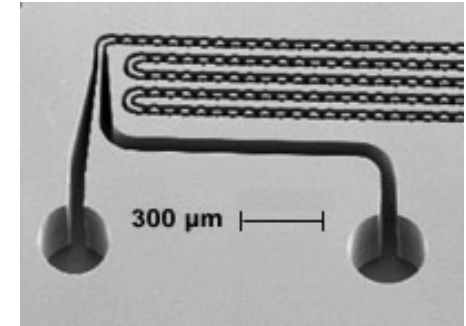


mikročipy

mikročipy a nanočipy

matrice/nosič – cca 1.5x1.5 cm; tloušťka několik milimetrů

materiály: sklo, křemík, hydrofobní plasty



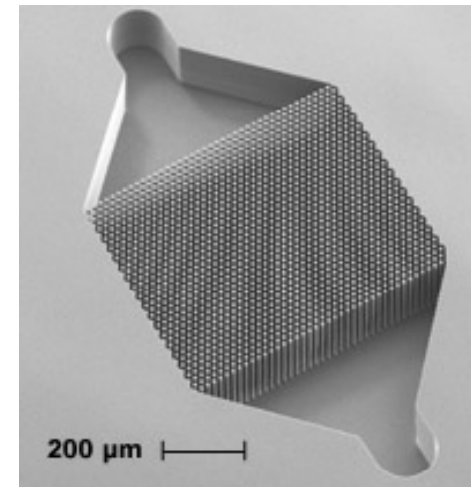
reakční místa: jamky nebo mikrotečky; propojeny nanokanátky s ventily, kanálky jsou naplněny gelem

: možnost osazení elektrodami ⇒ elektrické napětí mezi jamku/vzorek a senzor

průtok vzorku sledován **čidly s laserovou diodou** (excitace **fluorescence**; detekce fotonásobičem; značení reaktantů/vzorků fluorofory)

analýza: DNA, RNA, léčiv *apod.*

tekutiny se pohybují na principu **elektrokineze**



: elektroosmóza; využívá el. pole k pohybu vodivých vodných roztoků
: elektroforézou; dělení molekul v el. poli podle jejich náboje

externí mikropumpy – jiná možnost pohybu tekutin

: velikostí čipy mnohonásobně přesahují; nesnadné spojení s μ -čipem

centrifugační analyzátory – řešení problému externí pumpy

původně pro analýzy v beztížném stavu

mikročip pro centrifugační analýzu – **LabCD**

materiál: třívrstvý disk, vícenásobné stanovení jednoho typu analytu (*cca* 96 stejných mikrokyvet)

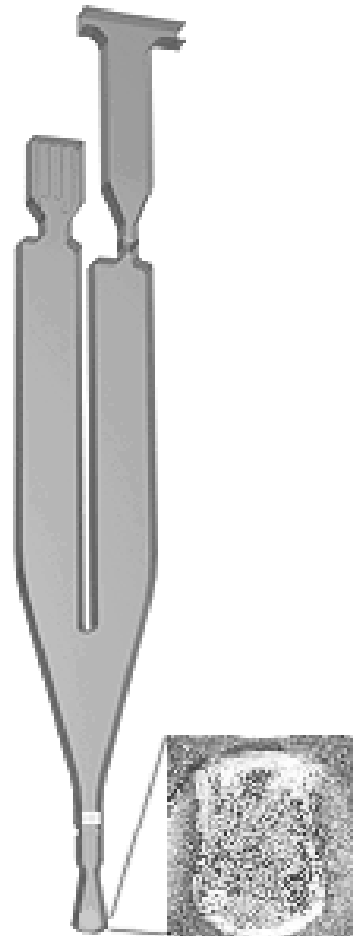
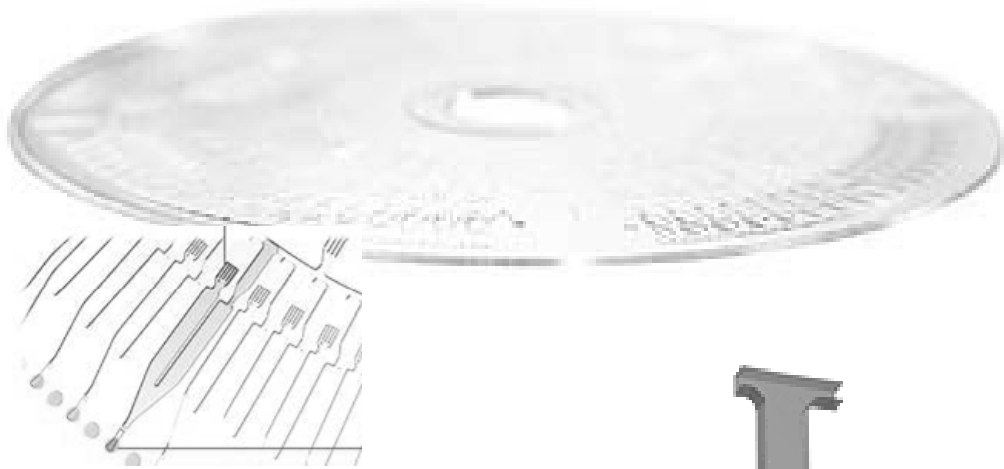
obsah: řídicí software, zahřívací elementy a mikrokanálky, reakční jamky, ventily a mikrokyvety

pohyb kapaliny – kapilární síly, centrifugační odstředivé síly

mísení, zředování, promývání; zahřívání, filtrování, lyzování, separace buněk, fotometrická nebo fluorimetrická detekce

modifikace – systém tzv. **povrchově řízeného toku uvnitř mikrokanálek** (tzv. *surface-directed liquid flow inside microchannels*) – mikrofluidní systém \Rightarrow rychlý laminární tok, molekulární difúze

kanálky zhotovené **fotolitografií**



funkce LabCD

- 1. nanesení vzorku**
- 2. odstředění
prekoncentrace na koloně**
- 3. promytí kolony**
- 4. eluce z kolony**
- 5. vzorek v detektoru**

nanočipy

další miniaturizaci mikročipů ⇒ **nanometry**

kopírují často funkci přírodních molekul (např. kolagen – kabel, DNA – paměťová jednotka, bílkovinná membrána – pumpa)

ultramikroanalýzy (nanoanalýzy) – léčiva, biologicky aktivní látky, imunoanalýza, mitochondriálních DNA *apod.*

omezení – limity citlivosti analýz a náklady (prudce zvyšují)

komplikace – odpařování mikroobjemů vzorku i činidel na mikročipu

vzorek: objem 1 μl , analyt 2 fmol/l = 6020 molekul analytu

redukce objemu na 1 nl ⇒ jen **6** molekul analytu!!

: většinou pod detekčním limitem analytické metody na mikročipu

: postupy prekoncentrace: **flow-through** *apod.*

využití mikroelektrod na křemíku

např. **odpor** tenké **kovové vrstvy** (Au, < 30 nm) se **zvyšuje** s přítomností jiných **atomů a molekul na povrchu** filmu Au

: elektrony dopadající na kovový film (~ zrcadlo) jsou odráženy

: v místě adsorpce jiných atomů a molekul se elektrony neodrážejí, ale jsou rozptylovány

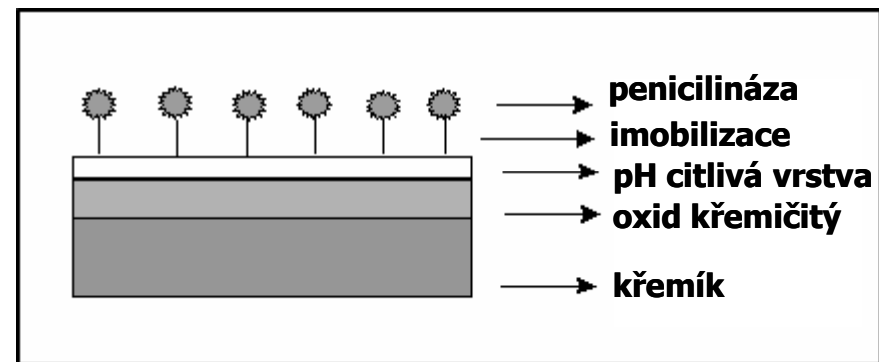
⇒ změna odporu filmu Au (↑); odpor = $f(\text{koncentrace})$

využití: např. stanovení stop těžkých kovů v roztocích (iontů Cd, Pb, Ni, Tl, Zn, jejich organické komplexy), limit detekce *ppb* (parts per billion)

průtokové cely – kvalita pitné vody, korozní procesy, ale i v organizmu

čipový senzor pro penicilin

křemík s pH-citlivou strukturou (Si_3N_4)



měří se vysoce citlivou pH-vrstvou **54**

biosenzory (biočipy)

biologický systém (enzym, receptor, orgán) s **analytickým čipem**

využití: medicína, biotechnologie, kontrola a monitorování potravin a životního prostředí

princip: propojení biomolekul s křemíkem

technologie **EIS** (*capacitive electrolyte insulator semiconductor*)

BioFET (*biologically sensitive field-effect transistors*)

modelový analytický systém

biosystém + analyt \Rightarrow produkt + elektrony/protony(H^+)

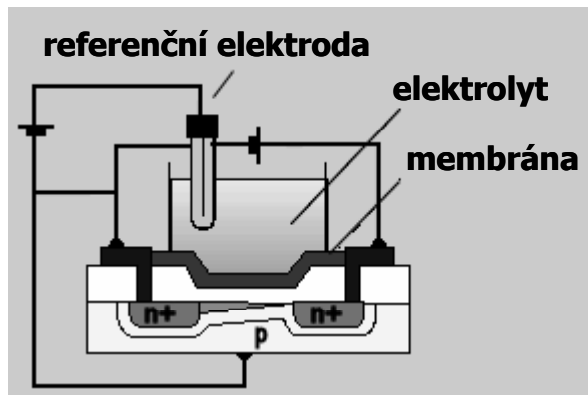
případně

biosystém1 + analyt \Rightarrow produkt1

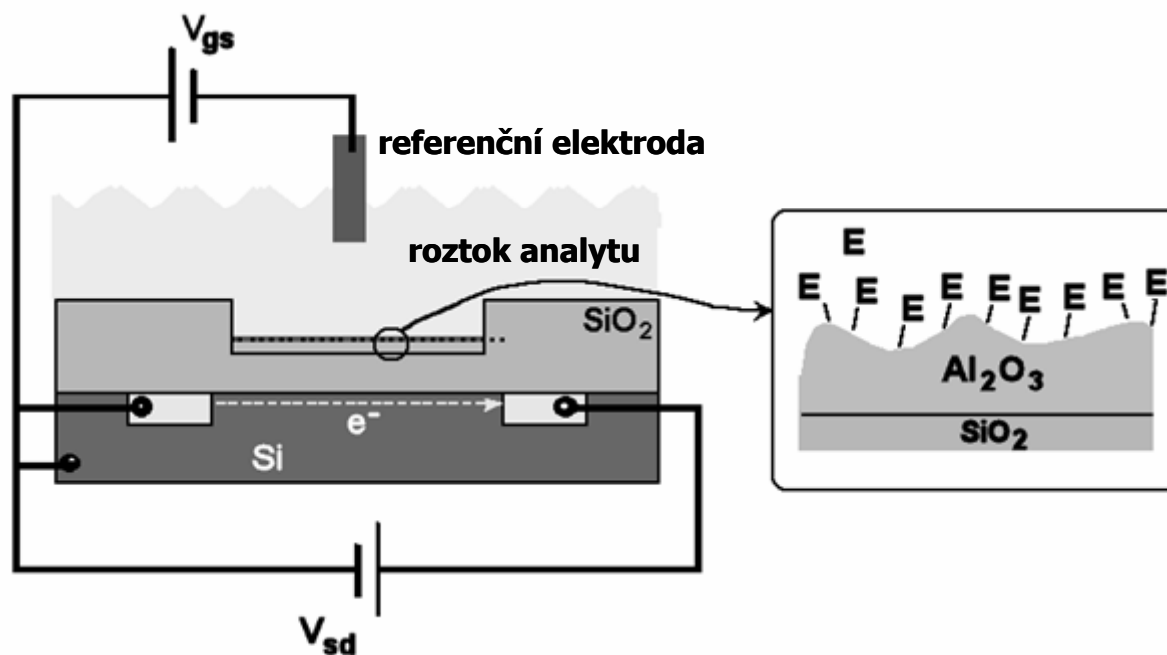
biosystém2 + produkt1 \Rightarrow produkt2 + elektrony/protony(H^+)

analýza metabolitů, osobní ID (pot) *apod.*





ISFET
ionově selektivní tranzistor řízený polem
ion-selective field-effect transistor

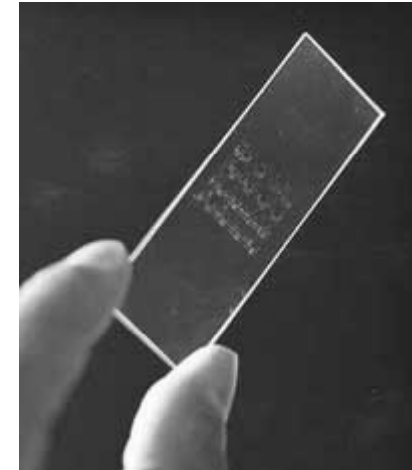


ENFET
enzymový tranzistor řízený polem
enzyme-controlled field-effect transistor

DNA-čipy

určování **cílových sekvencí nukleových kyselin**

detekce patogenů, prenatální diagnostika,
forenzní diagnostika, testy POCT



princip: na čipu **sonda s sekvencí DNA** (Watson-Crickovo párování)
komplementární k cílové sekvenci NA

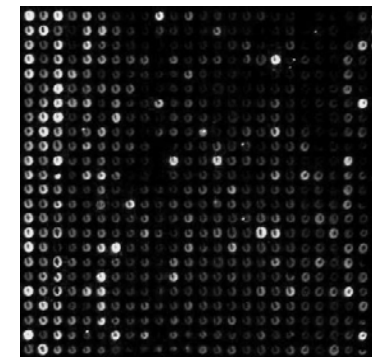
pouze komplementární sekvence interagují!

vzorek	TAACGCGATTGTGTGAC
sonda	ATTGCGCTAAGTCACTG

sonda je značena např. **luminoforem** ⇒ **indukce laserem + fluorimetr**

zachyceno
nedokonale zachyceno
nezachyceno

červené
žluté
zelené



miniaturizace imunoesejí (kompetitivní, nekompetitivní)

imunoanalýza na nasákové podložce

: metoda suché chemie

materiál: filtrační papír, tkané rouno

: ukotvené reakčními komponenty; difuzibilní sekundární značená protilátka

vzorek difunduje nasákovým materiálem **do reakčních zón**

: 1 až 5 minut ⇒ **barevné pruhy** indikující výsledek testu

detekce: vizuálně nebo jednoúčelovým reflektometrem

analytické systémy – **binární jednoúčelové testy** – ano/ne

analytické kazety (patrony)

materiál: plastová patrona s činidly v suchém nebo v kapalném stavu

vzorek se v systému kanálek smísí s činidly

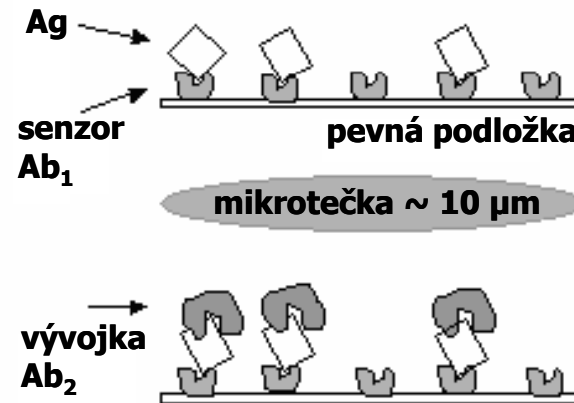
detekce: v místě optické kyvety se odečte analytický signál

: analýza léčiv, drog, nebo pro akutní analýzy

mikročipy pro stanovení jednoho druhu analytu

na mikročipu – pole stejných analytických míst – mikroteček

mikrotečka – imobilizovaná primární protilátka (Ab_1), v přebytku



přidá se vzorek/antigen (Ag) \Rightarrow **kotvený imunokomplex** [Ab_1^b -Ag]

promytí; přidá se značená sekundární protilátka (Ab_2^*) \Rightarrow

\Rightarrow **sendvičový imunokomplex** [Ab_1^b -Ag]- Ab_2^*

detekce: spektrofotometricky

primární protilátka – protilátka senzorová

sekundární protilátka – protilátka vyvolávací

multifunkční mikročip – mikrotečky obsazeny různými druhy protilátek
 \Rightarrow **současné** stanovení několika **různých analytů**

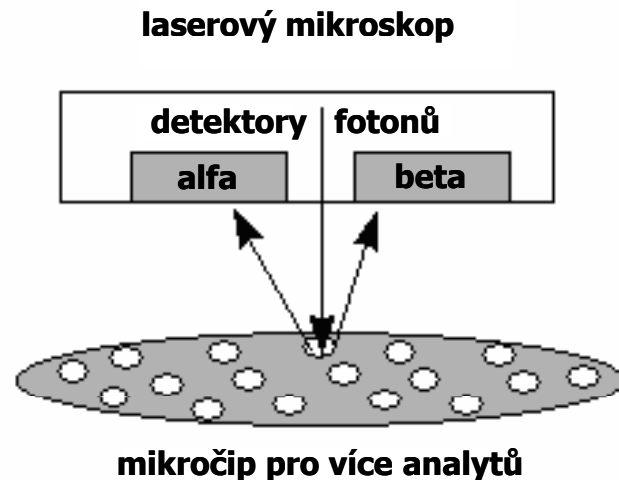
mikročipy pro současné stanovení několika analytů

analytická místa (mikrotečky) – různé primární protilátky (Ab_1)

např. proti antigenu Ag_a primární protilátkou Ab_{1a} , proti antigenu Ag_b primární protilátkou Ab_{1b} *atd.*

promytí; přidá se směs monoklonálních sekundárních značených protilátek proti stanovovaným antigenům ($*Ab_{2a}$, $*Ab_{2b}$, *atd.*)

detekce:



multianalytové imunomikročipy – POCT (*cca* 8 až 10 analytů), onkomarkery, alergeny, hormony pro endokrinologii, screening vybraných analytů dárců krve v transfusních stanicích *apod.*

jakost v klinické analýze její kontrola a řízení

„fatální“ význam klinické medicíny
aplikace norem ISO řady 9000

jakost

charakteristické a žádoucí vlastnosti nebo rysy výrobku či služby

jakost je nepřímo úměrná variabilitě výrobku nebo služby

: variabilita – odchylka od návrhu/záměru

prověření všech etap celého stanovení analytu

: od odběru vzorku až po výpočet; výcvik analytika, příprava činidel, mytí nádobí, nakládání s odpadem *atd.*

výsledkem je návrh na jejich správné **provádění** a vytvořit **podmínky** pro provoz s minimálními odchylkami od předepsaného postupu, včetně **kontrolního mechanismu**

definice dle ČSN ISO 8402

jakost (quality)

celkový souhrn vlastností a znaků výrobku (např. analytické soupravy) nebo služby (např. provádění analýz), které zaručují schopnost uspokojovat předem stanovené nebo předpokládané potřeby

koncepce jakosti (quality policy)

celkové záměry a směry působení organizace v oblasti jakosti formulované vrcholovým vedením (např. vedoucím laboratoře)

řízení jakosti (quality management)

součást funkce celkového řízení, která určuje a realizuje koncepci jakosti

systém jakosti (quality system)

organizační struktura, zodpovědnosti, postupy, procesy a zdroje potřebné na realizaci řízení jakosti; požadavkem je, aby veškeré postupy byly jasné, řádně dokumentované a dodržované; systém jakosti je pravidelně kontrolován a doplňován; všichni pracovníci se aktivně zúčastňují zavádění a provozování systému jakosti

příručka jakosti

řízení jakosti v laboratoři – **příručka jakosti**

: je v každé certifikované či akreditované laboratoři

komplexní dokument zahrnující všechny aspekty **činnosti laboratoře**, od činnosti **vrcholového managementu** až po **úklid laboratoří**

„domácí norma“ – převod obecných norem ISO 9000 resp. EN 45000 správné laboratorní praxe (GLP), bezpečnostních předpisů, zákonů a nařízení *aj.* na konkrétní podmínky laboratoře

celková koncepce jakosti

- 1) laboratoř a její povinnosti** – jméno laboratoře, adresa, fax, e-mail, tel. čísla, jméno zodpovědného vedoucího
- 2) pracovní doba laboratoře** – způsob a doby příjmu vzorků
- 3) seznam zajišťovaných služeb** – (včetně analytů)
- 4) komunikace mezi laboratořmi a uživateli** – popis žádanek, popis nálezo­vého formuláře, pravidla pro předávání výsledků telefonicky, způsob, pro opravy či doplnění předaných analytických nálezů, dobu potřebnou k provedení analýz, včetně způsobu kontroly jejího dodržování
- 5) odběry vzorků (doba)** – instrukce pro pacienta, doprava vzorků, úprava až po přípravu zkušební­ho vzorku a skladování včetně expirační doby; zajištění jednoznačné identifikace pacienta; způsoby vyřazení nevyhovujících vzorků; směrnice pro předávání dílčích vzorků do různých sekcí laboratoře
- 6) provádění analýz** – psané návody pro užívané analytické postupy; dohledatelnost každého stanovení od žádanky až po laboratorní nález; kalibrace včetně návaznosti na metrologicky vyšší etalony
- 7) interpretace výsledků** – údaje o možnostech konzultace pracovníků laboratoře, určené kontaktní osoby

- 8) účast na klinických poradách, setkání s externími lékaři**
- 9) výchova pracovníků laboratoře, kliniků, sester a studentů**
- 10) informování o změnách v provozu, o akreditaci či certifikaci**
- 11) účast na vývoji a výzkumu** – koncepci účasti laboratoře na výzkumu a vývoji; systém kontroly a jména příslušných odpovědných pracovníků
- 12) způsoby zajištění povinné mlčenlivosti**
- 13) počty pracovníků v jednotlivých kategoriích**
- 14) údaje o vybavení laboratoře** – názvy přístrojů, výrobci, rok nákupu, cena, údaje o záruce, umístění přístrojů, údaje o servisních prohlídkách, o opravách, provozní deník přístroje a jeho uložení; o kalibraci
- 15) bezpečnostní pravidla laboratoře a nemocnice** – uložení příslušných směrnic; záznamy o nehodách a úrazech

jakost není stav, ale dynamický, vylepšující se proces

kalibrační, kontrolní a referenční materiály

chybná analýza ⇒ **špatné rozhodnutí** ⇒ **poškození zdraví nebo smrt**
měřící proces – k měřenému signálu přiřadit jeho odpovídající koncentrace pomocí kalibračních materiálů (standardů)

kontrolně-regulační proces – validace výsledku analýzy a zahrnutí do řízení jakosti; sledování analýzy v delším časovém intervalu
: vyžaduje vhodné kontrolní a referenční materiály

50. – 70. léta XX. století

analýzy **manuální** (fotometricky, titračně apod.) nebo poloautomatické (nalévací/odsávací kyvety)

- : objem vzorku 20 – 500 μl , objem činidel 1 – 5 ml
- : **vodné roztoky** připravené z čistého analytu

dnes

automatické analyzátory

- : objem vzorku v mikrolitrech, objem činidla v desítkách mikrolitrů
- : *viskozita* ⇒ *potíže*; kalibrační roztoky bez biologické matrice nesplňují
- :: požadavek shody s analyzovaným vzorkem
- :: místo vodných roztoků **kalibrátory s bílkovinnou maticí**
- : **certifikované referenční materiály**

vodné kalibrační roztoky a standardy

IFCC – všude, kde je to možné – kalibrace pomocí vodných roztoků standardů

stabilizování a ochrana (oxidace, bakteriální kontaminace *apod.*)

užití: atestace enzymů, ověřování výtěžnosti analytické metody, kontrola vlnových délek fotometrů *apod.*

příprava: vážením; vysoce čisté chemikálie, redestilovaná voda

uchování: skleněné ampule nebo dobře těsnících lahviček
: pod inertní atmosférou N₂ nebo CO₂

pomocné látky: albumin, polysacharidy, cukry, glycerol (stabilizace enzymů), cystein, dithiothreitol, kyselina askorbová (ochrana před oxidací), komplexany, (např. EDTA, maskování těžkých kovů katalyzujících oxidaci), různé pufrы a produkty enzymové hydrolýzy substrátů (zvýšení stability enzymů) a konzervační přísady (benzoan sodný, azid sodný *apod.*)

nesmějí obsahovat jako příměs/nečistotu uvažovaný standard
(jen stopové a definované množství)

kontrolní séra a moče

k operativnímu řízení jakosti (k tzv. vnitřní kontrole kvality)

kapalná – zmrazená (– 80 °C)

- : původně séra zvířecí: koňská (*equine*), hovězí (*bovine*), prasečí (*porcine*)
- : nahrazována séry lidského původu

lyofilizovaná – stabilnější

- : připravována v nejméně dvou koncentracích pokrývajících jak referenční interval analytů, tak i patologické hodnoty

séra s atestem – určení správnosti v delším časovém intervalu

séra bez atestu – určení shodnosti (reprodukovatelnosti)

parametry: pH 7 až 8, rozdíl obsahu ve stejné šarži < 0.1 %, volný glycerol < 0.2 %, mají být sterilní, zbytková vlhkost < 1 %, stabilita v chladu 3 roky, rozdíl obsahu labilních složek < 4 %, zákal po rekonstituci a zředění vodou 1:9 měřený kyvetě 1 cm jako absorbance při 700 nm pod 0.05 a při 340 nm pod 0.2

sérové kalibrátory

podobné složení a chování jako analyzovaný vzorek

příprava: jako kontrolní séra; koncentrace analytů se upravuje přidáním

lyofilizáty – stabilita

komutabilita s určenými metodami

příprava a atestace: jako u kontrolních sér

obsah jednotlivých **analytů** stanoven definitivními či **referenčními metodami** certifikovanými referenčními materiály

přípravky pro **normální** a **patologické** hodnoty analytů

multikalibrační přípravky

certifikované referenční materiály (CRM)

- : kalibrace definitivních a referenčních metod
- : testování/porovnávání rutinních metod (**komutabilita**)

RM – materiál nebo látka, hodnoty vlastností stanovenými pro kalibraci přístrojového vybavení, vyhodnocení metody měření nebo pro stanovení hodnot materiálů

CRM je RM doložený certifikátem

- : certifikovaná metoda je doprovázena nejistotou při dané konfidenční úrovni

koncentrace a matrice analytu v CRM **stejná** jako analyzovaném **vzorku**

vhodnost RM pro daný účel se **prověřuje** (ISO Guide 35)

šarže CRM musí být **homogenní**

- : rozdíly mezi reprezentativním měřením vzorku musí být vždy menší než celková nejistota všech měření

CRM musí mít uvedenu svou **expirační lhůtu**

CRM – opatřen atestem

koordinace **evropskou komisí při evropské unii**, např. **institutem pro referenční materiály a měření** v Belgii (IRMM)

validace a správná laboratorní praxe

potvrzení měření (zkoušením) a opatření **objektivního průkazu**, že byly **splněny** jednotlivé **požadavky** pro **určený účel**

validovaná analytická metoda – poskytuje medicínsky správné výsledky a využitím analytického výsledku při léčení pacienta nedojde k jeho újmě

ověření velikosti **celkové chyby** – součtu chyb náhodných a systematických

správná laboratorní praxe (*good laboratory praxis, GLP*)

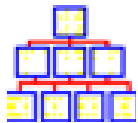
: mezinárodně dohodnutý systém zabezpečení a kontroly jakosti

: zahrnuje organizaci zkoušek, studií a podmínek, za nichž jsou neklinické studie plánovány, prováděny, monitorovány, zaznamenávány, archivovány

operativní řízení jakosti

také **vnitřní kontrola kvality (VKK)**

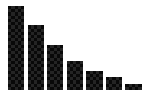
nástroje VKK tzv. „**báječná sedma**“:



tabulka lodyha-list (*stem-and-leaf display*) – kontrolní data rozepsaná tak, aby bylo možné rychle posoudit globální rozdělení dat



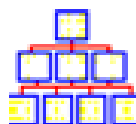
list závad (*check list*) – kalendář s uvedenými příčinami závad; řádky tvoří kalendář, do kterého se zapisuje, kdy a kolikrát se daná závada objevila



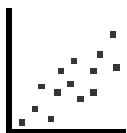
Paretův graf (*Pareto chart*) – histogram se sloupci vyjadřujícími četnost jednotlivých typů závad v klesajícím pořadí




diagram příčina-následek (*cause and effect diagram*) – grafický rozbor chyb a jejich zdrojů



proudový diagram (*flow chart, defect concentration diagram*) – grafické zobrazení zařízení či procesu s vyznačením citlivých bodů



korelační diagram (*scatter diagram*) – korelační graf k odhadu vzájemných závislostí analyzovaného problému

regulační diagram (*control chart*) 

regulační diagram

: 1931 W.A. Shewhart

: 1950 S. Levey a E.R. Jennings – klinická biochemie

jednoduchá grafická interpretace Gaussova rozdělení

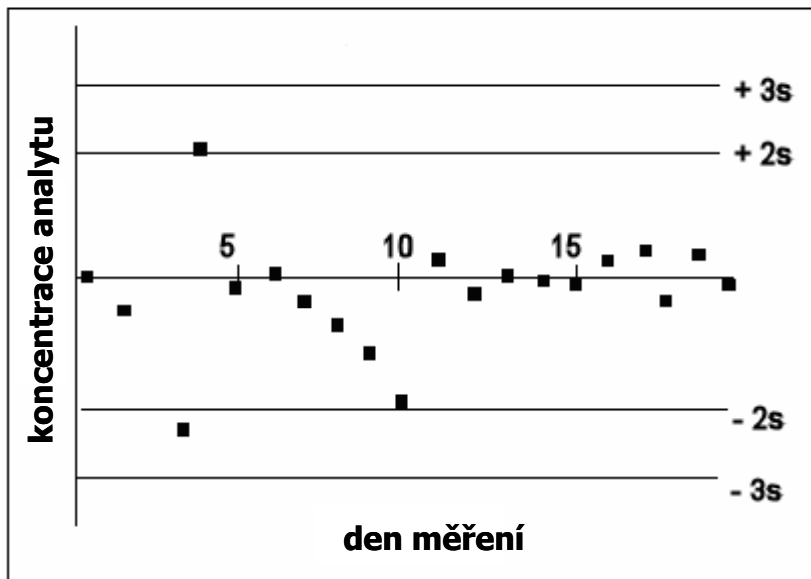
množina normálně rozdělených dat \Rightarrow

v intervalu směrodatných odchylek

od $-s$ do $+s$ leží **68.3 %** údajů

od $-2s$ do $+2s$ leží **95.5 %** údajů (*varovná mez*)

od $-3s$ do $+3s$ leží **99.7 %** údajů (*regulační mez*)



osa x – čas

osa y – měřený signál

: uvedený podíl údajů musí ležet v odpovídajících pásech na grafu

: polovina těchto údajů musí být střídavě nad a polovina pod osou **x**

kumulace jen na jednu stranu intervalu \Rightarrow **systematická chyba** v analytickém procesu

: mimo varovnou mez > **1x měsíčně**

: mimo regulační meze > **1x za 18 měsíců**

:: mimo varovné meze častěji

\Rightarrow závady v analytickém procesu nebo proces je úplně mimo kontrolu

odchyly: Δ směrodatné odchyly (s) ; Δ vychýlení (B)

účinnost regulačního diagramu

průměrné délky série (PDS)

: \emptyset počet bodů, kdy právě vynášený bod indikuje metodu mimo kontrolu

$$PDS = 1/p,$$

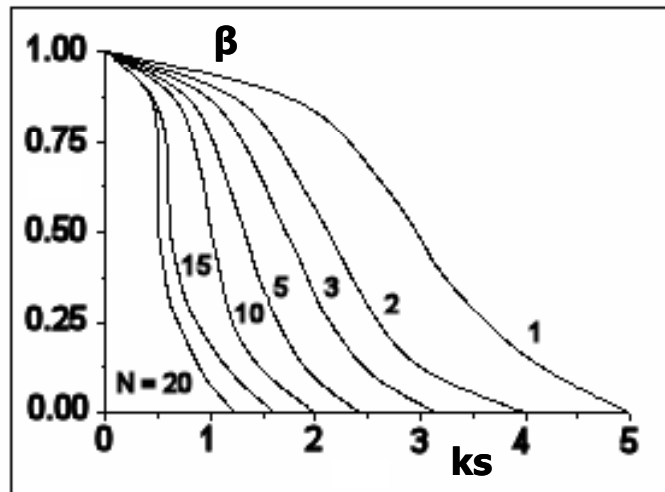
kde p je pravděpodobnost, že libovolný bod překročí kontrolní meze

operativní charakteristické křivky

: závislost chyby β , tj. pravděpodobnosti nezjistit posun

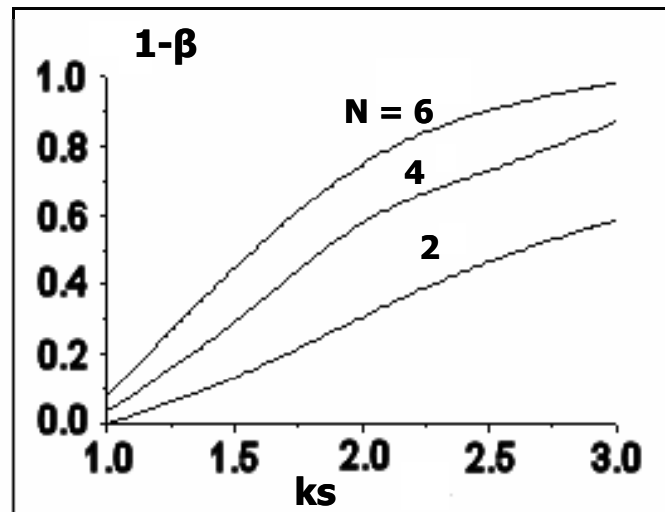
$$\beta = \Phi(L - k\sqrt{N}) - \Phi(-L - k\sqrt{N}),$$

kde Φ je Gaussova funkce, L je násobek s dle zvolené meze, k je faktor respektující změnu x v násobcích s , N je počet vzorků



silofunkce

na rozdíl od operativní charakteristické křivky
osa y – $(1-\beta)$, tedy pravděpodobnost zamítnutí



mezilaboratorní posuzování jakosti

(EQA, external quality assurance)

součást obecného řízení jakosti každé laboratoře (cca 1x za 2 měsíce)

: validace metod

: sledování laboratoře a porovnání její přesnosti vůči ostatním laboratořím nebo obecně platným požadavkům

posuzuje se

: vychýlení ve vztahu k současně dosahované úrovni (*state-of-the-art*), resp. vůči údajům získaným referenčními či definitivními metodami

: dosahovaná úroveň všech zúčastněných laboratoří, a to jak podle inter-, tak i podle intralaboratorního rozptýlení nalezených údajů

: vztah mezi nalezenými údaji a způsobem kalibrace, analytickým postupem, užitými komerčními analytickými soupravami a použitým přístrojovým parkem

: dosahovaná současnou úroveň v závislosti na koncentraci analytu v kontrolních materiálech

mezinárodní harmonizovaný protokol pro ověřování způsobilosti (chemických) analytických laboratoří

international harmonised protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories

: od roku 1992

: IUPAC, ISO a AOAC (*association of official analytical chemists*)

materiál IFCC: základy mezilaboratorního posuzování jakosti

přesná a protokolární organizace testu

statistické vyhodnocení testu

z-skóre

$$z = (x - X_a) / s,$$

kde s je cílová směrodatná odchylka, x je naměřená veličina, X_a dohodnutá (skutečná) hodnota veličiny a z má tvar směrodatné normální veličiny

interpretace z-skóre

$|z| \leq 1$ lze hovořit o **dobrém skóre**

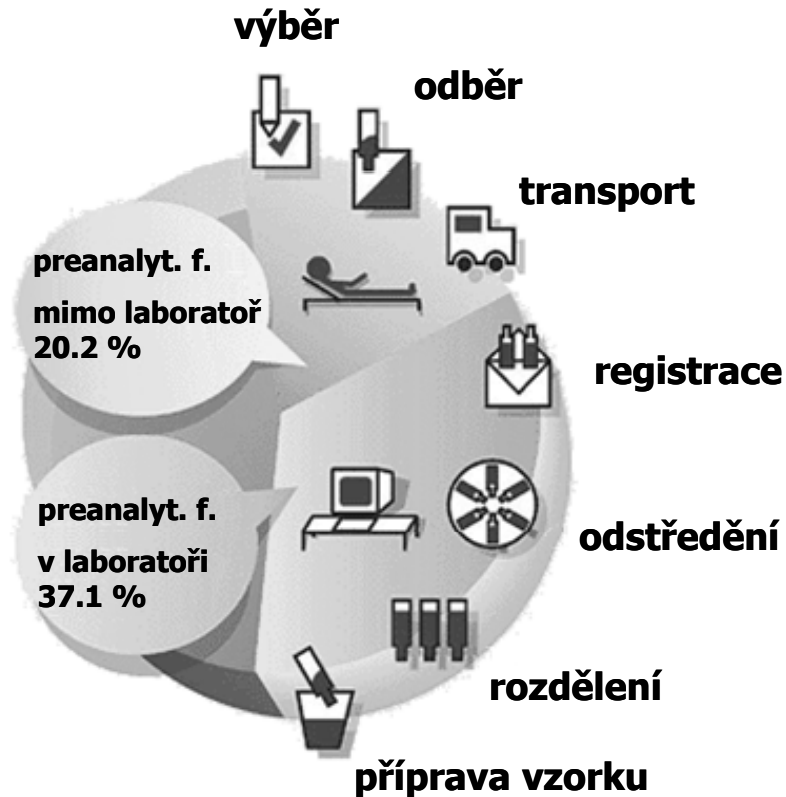
$|z| \leq 2$ o skóre dostačujícím

$2 \leq |z| \leq 3$ o skóre problematickém

skóre $|z| \geq 3$ skóre nedostačující

význam hodnocení laboratoře

úspěch laboratoře v externím hodnocení kvality její **výkony** jsou v **tolerančních limitech** akceptovaných příslušnou **(mezi)národní společností klinické chemie** pro dané období



: preanalytická fáze

: analytická fáze

: postanalytická fáze

řízen a kontrolován – pouze *vlastní analytický postup*

opomíjení *preanalytické fáze* (odběr, transport a uchovávání vzorku)

chyby **preanalytické fáze** – až 50 % **X analytický proces** má asi 25 %
zbytek připadá na tzv. **postanalytickou fázi**

jednu hrubá chyba na *cca 1600 analýz*

příprava vzorku (55 % jde na vrub jeho hemolýzy), nedostatečný objem vzorku (21 %), záměna vzorků (12 %) a koagulovaný vzorek (5 %)

hrubá chyba ohrožuje život ⇒ zpřísnění kontroly **preanalytické fáze**

Kill as few patients as possible & 56 other essays on how to be the world's best doctor,
Arlan Cohn, 2004

postanalytická fáze

- : uskladnění vzorků i výsledků
- : přeměna analytických výsledků na podložené informace (smysl lab. medicíny)
- : komunikace s praktikem, zpětná vazba
- : metaanalýza výsledků

analytické metody

výběr a optimalizace

IV.

výběr metod/postupů je **poznamenan vývojem** oboru analytické chemie

: **kvalitativní**

: **kvantitativní**

původně: metody chemické

: počet stanovovaných analytů byl malý, nepřesáhl několik desítek

od 70. let: metody biochemické/enzymatické/molekulárně biologické

: spektrofotometrie

: průmyslová výroba enzymů, analyzátory

zájmem klinické laboratoře je analytický postup

: náročnější požadavky – analytické i klinické požadavky

vlastní nepřesnosti výsledku testu: včetně preanalytických chyb, systematické vlivy, náhodné chyby a omyly

biologické vlivy: intra- a interindividuální variabilitu, chyby způsobené nestandardním odběrem vzorků

nejistoty: schopnost testu skýtat správné závěry (diagnóza, prognóza, nebo terapeutická rozhodnutí)

historie stanovení glukózy:

- 1) **oxidoredukční vlastnosti** v alkalickém prostředí, oxidace kyselinou pikrovou, ferrikyanidem nebo redukcí Cu^{1+} ; pracné, málo citlivé, nespecifické
- 2) ***o*-toluidinem přes Schiffovu bázi**; citlivé a specifické; *o*-toluidin – kancerogen, činidlo obsahuje ledovou kyselinou octovou
- 3) stanovení **enzymovými postupy** (GOD)

charakteristické znaky analytické metody

definovaná a popsaná analytická metoda

: charakteristické znaky, normované v mezinárodních normách ISO i v odvozených nebo převzatých národních normách

specifické klinické požadavky

přesnost metody ve vztahu k biologické variabilitě

rozsah kalibrační funkce – minimální rozsah kalibrační funkce v rozsahu referenčních hodnot analytu

analytická metoda – v principu funkce daného analytu v organismu

ekologické a toxikologické požadavky

analýza potenciálně **infekčního** biologického materiálu

neužívat k analýze jedy, kancerogeny, žíraviny a hořlaviny

nevyhnutelnost: stanovení kreatininu kyselinou pikrovou, celkové bílkoviny biuretovou reakcí s NaOH, stanovení hemoglobinu přes hemiglobinkyanid *aj.*

vlastní znaky analytické metody

znak analytické metody (*analytical performance characteristic*)

: vlastnost z množiny vlastností, které jsou nutné pro ověření přesnosti měřicího postupu a jeho vhodnosti pro daný účel a které může být přiřazena experimentálně určitelná hodnota

definováno **IFCC** a **IUPAC**

Česká společnost chemická (ČSCH) – jiná nomenklatura analytických znaků

správnost (*accuracy, trueness, ČCHS pravdivost*)

: těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z velké řady výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou

přijatá referenční hodnota (*dohodnutá referenční hodnota*)

: hodnota, která slouží jako schválená referenční hodnota, odvoditelná jako

a) teoretická

b) odsouhlasená (certifikovaná), založená na experimentálních pracích

c) přiřazená (certifikovaná), založená na experimentální spolupráci

d) není-li ani a), b), c); očekávaná hodnota měřitelné veličiny, tj. střední hodnota specifikovaného základního souboru měření

strannost čili **vychýlení** (*bias, odchylka*)

rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou

stanovení: pomocí CRM nebo RM

výtěžnost (*recovery*)

relativně vyjádřený rozdíl mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu a vzorku bez přídavku, vztažený na přidané množství

shodnost, preciznost (*precision, přesnost*)

těsnost shody mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za předem specifikovaných podmínek

opakovatelnost (*repeatability*)

shodnost stanovená za podmínek opakovatelnosti (stejná laboratoř, stejná metoda, stejné zkušební zařízení, stejný operátor, během krátkého časového intervalu)

reprodukovatelnost (*reproducibility*)

shodnost stanovení za podmínek reprodukovatelnosti (stejná metoda, různá laboratoř, různý operátor, různé zkušební zařízení, různá doba)

přesná specifikace – slouží jako základ při konstrukci regulačních diagramů

nejistota měření (*uncertainty of measurement*)

parametr přidružený k výsledku měření, charakterizující rozptyl hodnot, které by mohly být důvodně přisuzovány k měřené veličině

zahrnuje mnoho složek

nejistota typu A – charakterizace směrodatnou odchylkou určenou ze statistického rozložení výsledků

nejistota typu B – charakterizace směrodatnými odchylkami z předpokládaných rozložení na základě zkušenosti

nejistota jako směrodatná odchylka – **směrodatná nejistota $u_{(x)}$**

výsledná nejistota metody – **kombinovaná směrodatná nejistota $u_{c(x)}$**

nejistota – interval kolem výsledku měření (rozšířená nejistota **U**)

$$\mathbf{U} = \mathbf{k} * \mathbf{u}_c, \text{ kde } \mathbf{k} \text{ je koeficient rozšíření}$$

normálně rozdělené hodnoty a $\mathbf{k} = 2 \Rightarrow$

\Rightarrow výsledek v uvedeném intervalu s pravděpodobností 95 %

kalibrace

soubor úkonů, za specifikovaných podmínek se stanoví vztah mezi hodnotami měřených veličin a odpovídajícími kalibračními hodnotami (etalony)

$$\text{kalibrační funkce } S = f(c)$$

analytická citlivost – první derivace této funkce podle koncentrace

$$dS/dc = df(c)/dc$$

vypočet kalibrační funkce z kalibračních údajů **regresní analýzou**

přednost – *lineární závislosti* (stanovení mezí spolehlivosti, jednodušší výpočty)

mez detekce (*limit of detection, L_D , LOD*) – souvisí s mezemi spolehlivosti

$$\alpha = \beta = 0.05$$

β – pravděpodobnost falešně negativního výsledku

α – pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku

dolní mez stanovitelnosti (*limit of quantification, LOQ*)

nejnižší výsledek měření, pro který může být udána nejistota stanovení;

IUPAC: pro LOQ nejistota (variační koeficient) = 10 %

pracovní interval (*measuring interval*)

uzavřený interval hodnot, které lze určit daným měřícím postupem; je omezený dolní a horní mezí stanovitelnosti. U fotometrických metod se vybere lineární oblast kalibrační křivky nebo lineární část grafu závislosti $T = f(\log c)$

linearita kalibračního vztahu (*linearity*)

rozsah koncentrací, ve kterém je analytický signál lineární funkcí koncentrace

kalibrace (lineární funkce):

- : 10 koncentrací v pracovním intervalu, 3 – 4 měření jedné koncentrace
- : test na homoskedascitu (rovnost jejich směrodatných odchylek)
- : konstrukce regresní přímky
 - :: normální regrese (homoskedascita)
 - :: vážená regrese (heteroskedascita)
- : test na linearitu
- : výpočet mezí spolehlivosti (toleranční interval)

analytická specifita, specifita (*analytical specificity*)

schopnost měřicího postupu stanovovat pouze tu měřenou veličinu, která má být stanovena

vyjádření – jako nespecifita, tj. jako efekt libovolné složky vzorku odlišné od analytu způsobující změnu indikace měřicího přístroje a tím zavádějící systematickou chybu

interference

systematická chyba měření způsobená analytickým interferentem

analytický interferent – složka vzorku, která je současně složkou ovlivňující veličiny, která však sama není zdrojem signálu měřicího systému, ale která způsobuje přírůstek nebo pokles indikované hodnoty

robustnost metody (*robustness, ruggedness*)

schopnost metody skýtat přijatelné výsledky měření i v případě malých odchylek v měřícím postupu nebo ve složení vzorku

srovnání s jinými metodami (*comparison with other methods*)

např. rutinně laboratoří používaná metoda a její porovnání s metodou referenční (IFCC), či s metodou definitivní, pokud je k dispozici

rozmývání vzorku (*carry-over*)

není znakem metody, ale jedná se o zjištění, zda nedochází k rozmývání po sobě jdoucích vzorku (vzájemné ovlivnění měření signálu nízkého vzorku po vysokém a naopak)

problém nalévacích a průtokových kyvet

provedení:

15 analýz, 5x s vodou (absorbance A_1 až A_5)

5x se vzorkem (absorbance A_6 až A_{10})

nakonec 5x s vodou (absorbance A_{11} až A_{15})

$A_6 - A_5 = A_{10} - A_5 = A_{10} - A_{11}$ a $A_{15} - A_5 = \mathbf{0}$, nedochází k rozmývání

rozmývání – numericky v % jako podíl rozmývání $100 * (A_{10} - A_6)/(A_{10} - A_5)$

kritéria výběru analytické metody

analýza v laboratorní medicíně

: smysl pouze k vyhodnocení zdravotního stavu pacienta

dva hlavní aspekty

klinická užitečnost – jaká je požadovaná jakost z lékařského hlediska

jakost analytického stanovení – nesprávnosti a neshodnosti, interference a specifita metody

výběr metody podle analytických znaků

dle současného stavu (*state-of-the-art*)

volí se postupy podle právě žádoucích klinických potřeb při užití analytických metod

dle požadavků expertů či expertních skupin (*panel experts*)

: empirická zjištění expertů ve specializovaných lékařských odvětvích
: kompromisy přihlížející spíše k současně dosaženému stavu než k reálným potřebám

dle výsledků řízení jakosti

: s rostoucí jakostí analytických metod klesají náklady a pracnost kontroly

výběr podle požadavků kliniků

zkušenosti lékaře konfrontované se **současnou úrovní postupů**

není možné navrhnout **univerzální požadavky** na jakost postupů

nevýhoda – liší se v řadě případů a není možné stanovit společná hodnotící kritéria

výběr založený na biologické variabilitě

nejpřiměřenější klinickým i analytickým požadavkům

: intra- i interindividuální variabilita analytů je skoro konstantní (i ve stáří)

: je možný geografický i časový přenos

výběr podle klinické významnosti

ke změnám koncentrace nebo i složení některých analytů může dojít při jakékoli změně zdravotního stavu; pro praktické využití je účelné užívat jen některé indikace změny – **potřeba definovat *užitečnou* indikaci změny**

testy s binárními výsledky

výsledky testů: pozitivní/negativní (ano/ne)

diagnostická významnost (kontingenční tabulka 2x2)

: řádky – výsledky nalezené u skupiny *nemocných* a u skupiny *ne-nemocných*

pacient	pozitivní test	negativní test	suma
<i>nemocný</i>	správně (sp)	falešně (fn)	$N*sp + N*fn$
<i>ne-nemocný</i>	falešně (fp)	správně (sn)	$N*fp + N*sn$
<i>suma</i>	$N*sp + N*fp$	$N*fn + N*sn$	$N*(sp + fn + fp + sn)$

senzitivita (*citlivost*)

: pravděpodobnost, že u nemocného bude nalezen pozitivní výsledek testu

$$\mathbf{sens} = N*sp / (N*sp + N*fn)$$

směrodatná odchylka $s_{sens} = \sqrt{[(sens * (1 - sens) / N]}$

specifita

: pravděpodobnost, se kterou se u **ne**-nemocných získá negativní výsledek

$$\mathbf{spec} = N*sn / (N*fn + N*fp)$$

směrodatná odchylka $s_{spec} = \sqrt{[(spec * (1 - spec) / N]}$

nesenzitivita (*necitlivost*)

: pravděpodobnost očekávání falešně negativního výsledku u nemocného

: nesenzitivita je doplňkový pojem k citlivosti

$$(1 - sens) = \mathbf{nesens} = N*fn / (N*fn + N*sp)$$

nespecifita

: pravděpodobnost očekávání falešně pozitivního výsledku u zdravého

$$(1 - spec) = \mathbf{nespec} = N*fp / (N*fp + N*sn)$$

predikce (předpověď)

- : pravděpodobnost nemoci, je-li test pozitivní (nebo test ne-nemoci negativní)
- : popsáno dvěma podmíněnými pravděpodobnostmi

$$\mathbf{predpos} = N*sp / (N*sp + N*fn)$$

$$\mathbf{predneg} = N*sn / (N*sn + N*fn)$$

	T	¬T	Σ
D	94	6	100
¬D	5	95	100
Σ	99	101	200

$$\mathbf{sens} = 94/100 = \mathbf{0.94}$$

$$\mathbf{spec} = 95/100 = \mathbf{0.95}$$

$$\mathbf{nesens} = 6/100 = \mathbf{0.06}$$

$$\mathbf{nespec} = 5/100 = \mathbf{0.05}$$

$$\mathbf{predpos} = 94/(94 + 5) = \mathbf{0.95}$$

$$\mathbf{predneg} = 95/(95 + 6) = \mathbf{0.94}$$

význam prevalence

: pravděpodobnost nemoci v definované populaci v určitém okamžiku

prevalence – podíl nemocných z počtu testovaných

$$100 D + 100 \neg D \Rightarrow 200 \text{ testů} \Rightarrow \text{preval} = 0.5$$

citlivost a *specifita* se **nemění**, mění-li se počet vyšetřovaných, **mění** se *predikce*

**vždy srovnávat
jen souměřitelné
testovací skupiny**

	T	¬T	Σ
D	470	30	500
¬D	475	9025	9500
Σ	945	9055	10000

predikce infaktu

$$D = 500, \neg D = 9500 \Rightarrow \text{preval} = 0.05$$

populace X kardiaci

$$\text{sens} = 470/500 = \mathbf{0.94}$$

$$\text{spec} = 9025/9500 = \mathbf{0.95}$$

$$\text{predpos} = 470/945 = \mathbf{0.497}$$

$$\text{predneg} = 9025/9055 = \mathbf{0.997}$$

incidence

: výskytu nemoci za určitý časový interval (např. rok)

např. cukrovka

: prevalence v USA – 2.00 %, tj. *cca* 4 miliony občanů nemocných diabetem

: incidence v USA – 1.99 %, tj. každý rok nových 398 000 případů

vydatnost

: poměr počtu všech správných výsledků k jejich celkovému počtu

$$\mathbf{vydatnost} = (N*sp + N*sn) / (N*sp + N*sn + N*fp + N*fn)$$

věrohodnost a poměr věrohodností

věrohodnost (likelihood)

: *pravděpodobnost je mírou pro nastoupení jevu při dané hypotéze*

: *věrohodnost je mírou pro nastoupení jevu při různých hypotézách*

poměr věrohodností LQ (*likelihood quotient, likelihood ratio*)

$$LQ = \text{sens} / (1 - \text{spec})$$

místo *prevalence* a *prediktivní* hodnoty: **naděje** (*chance, W*)

post – *naději po provedení testu*

ante – *naději před provedením testu*

$$W_{\text{post}} = LQ * W_{\text{ante}}$$

vztah mezi pravděpodobnostmi a nadějemi

$$W = P / (1 - P); P = W / (1 + W)$$

$$W_{\text{ante}} = P / (1 - P) = 0.05 / (1 - 0.05) = 0.0526$$

$$LQ = \text{sens} / (1 - \text{spec}) = 0.94 / (1 - 0.95) = 18.8$$

$$W_{\text{post}} = LQ * W_{\text{ante}} = 0.0526 * 18.8 = 0.98888$$

$$W_{\text{post}} / (1 + W_{\text{post}}) = 0.98888 / (1 + 0.98888) = 0.497$$

definitivní metody

založené na *izotopovém zředování* (ID) a *hmotnostní spektrometrii* (ID-MS), popř. na kombinaci *ID s plynovou chromatografií* (ID-GC)

: nejsou většinou aplikovatelné do denní praxe – *složitě a pracně*

: slouží hlavně při **atestaci kalibrátorů a kontrolních přípravků**

referenční metody

základní, důkladně prostudovaný a definovaný měřicí postup, jehož analytické znaky (nepřesnost a strannost) dovolují jeho užití k posuzování správnosti jiných měřících postupů a k charakterizaci referenčních materiálů

doporučené metody

(dle IFCC) s popsanými logickými sledy operací, které jsou součástí postupu měření tak, jak byly definovány a doporučeny příslušnou pracovní skupinou

rutinní metody

metody, které nepatří do některé z výše uvedených skupin

: musí být **komutabilní** s metodou referenční

komutabilní metoda – poskytuje na reprezentativním souboru nativních sér stejné výsledky jako metoda referenční

optimalizace analytické metody

optimální podmínky analýzy

: složení reakční směsi (druh, koncentrace složek, pH a teplota reakční směsi *apod.*)

: jednotlivé kroky a pořadí přidávání činidel

hledání optimálních reakčních podmínek – zkoumání většího počtu parametrů, zjišťuje se jejich vliv

existuje *většinou* jen **jedna určitá optimální kombinace**

metoda postupného měnění parametrů (*single variable approach, SVA*)

: *relaxační metoda*

zkoumá odděleně reakční parametry; vyžaduje větší počet nezávislých měření; zkoumá odděleně i ty, které spolu mnohdy těsně souvisí (může vést k nesprávnému závěru)

multivariační metody (*multivariable approach, MVA*)

zkoumá parametry komplexně; mění se současně několik parametrů; metodicky správnější

: vyžaduje **plán pokusů** (*experimental design, ED*)

plány pokusů

způsob rozvržení experimentů tak, aby z co nejmenšího počtu bodů byla získána maximální informace a tedy co nejlepší popis průběhu funkce o více proměnných

faktorový plán

plně faktorový plán (*full factorial experimental design*, FED)

: obsahuje všechny možné kombinace vybraných faktorů

parametry: počet faktorů a počet úrovní každého faktoru

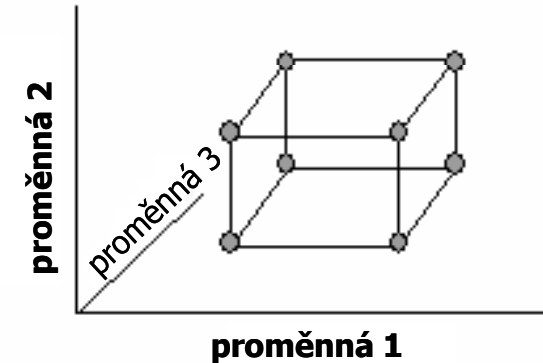
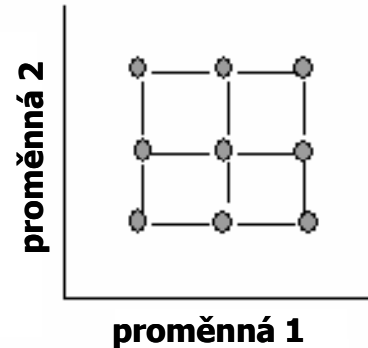
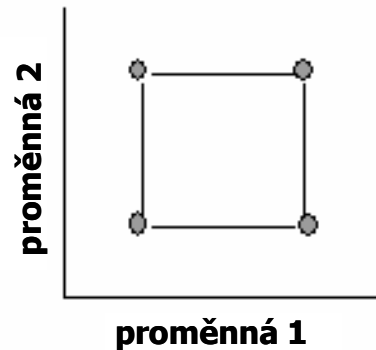
počet faktorů (f) odpovídá počtu vstupních proměnných (počtu složek)

počet úrovní (L) je počet hodnot každé vstupní proměnné (*např.* počet měřených koncentrací)

počet bodů faktorového plánu (celkový počet experimentů *n*)

$$n = L^f$$

tříhladinový dvoufaktorový plán ($L = 3$); 3^2 experimentů



dvouhladinový dvoufaktorový plán
($L = 2$) *nejjednodušší*; 2^2 experimentů

dvouhladinový třífaktorový plán
($L = 2$) 2^3 experimentů

redukovaný faktorový plán (*fractional factorial experimental design*, FrED)

snižuje počet experimentů oproti FED (ten je někdy zbytečně komplexní/pracný)

: stále popisuje vliv každého parametru a kontroluje možné interakce

: vhodný v případech drahých a časově náročných experimentů

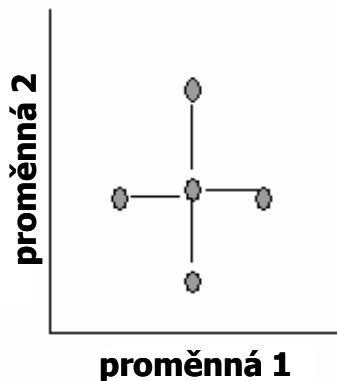
hvězdicový plán

- : další varianta plánu pokusů
- : může být FrED variantou faktorového plánu
- : tříhladinový dvoufaktorový faktorový plán \Rightarrow dvoufaktorový hvězdicový plán

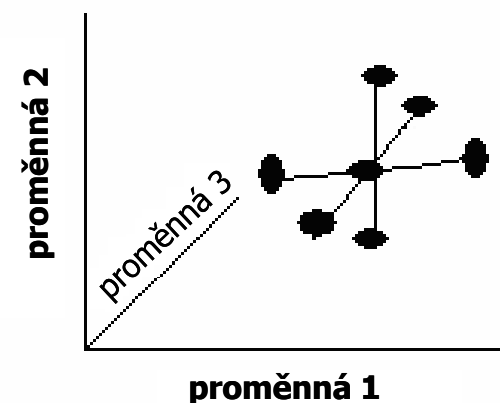
obsahuje (**$2xf+1$**) experimentů, kde **f** je počet rozměrů (složek)

rozmístění bodů hvězdicového plánu je dáno polohou centrálního bodu

ostatní body jsou *rozmístěny symetricky kolem středu*



dvoufaktorový hvězdicový plán
 $2xf+1$ experimentů



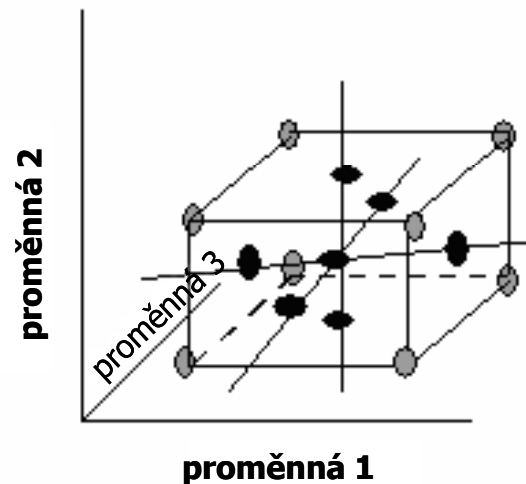
třífaktorový hvězdicový plán
 $2xf+1$ experimentů

centrálně a necentrálně kompoziční plány

kombinace faktorového a hvězdicového plánu pokusů – *komplexní hyperplocha*

centrálně kompoziční plán – středy obou plánů shodné

necentrálně kompoziční plán – středy shodné nejsou



pětihladinový třífaktorový centrálně kompoziční plán
 $2^f + 2xf + 1$ pokusů

aproximativní metody a algoritmy

optimalizace – snaha „odhalit“ numericky funkci závislosti výstupu na optimalizovaných parametrech – ***aproximace***

black box : algoritmy nepopisují fyzikálně chemické vlastnosti, ale „jen“ numericky zaznamenávají vztahy mezi proměnnými

parciální metodou nejmenších čtverců (*partial least squares, PLS*)

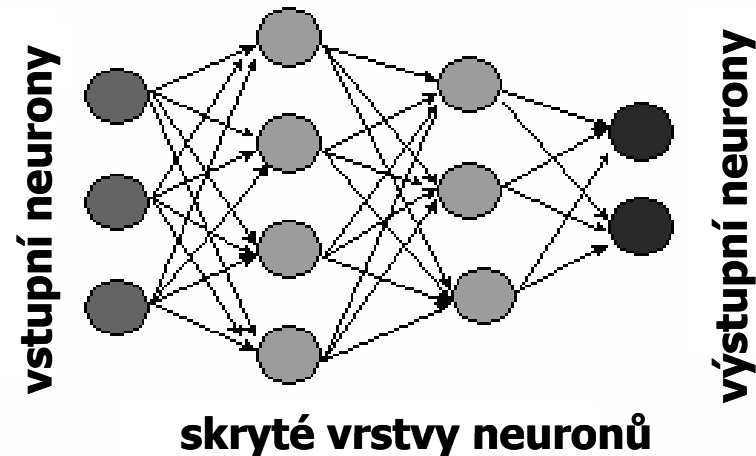
parciální metoda nejmenších čtverců – MVA, hodnoty pro všechny komponenty analyzované směsi počítány současně

kanonická korelace (*canonical correlation, CC*)

umělé nervové (neuronové) sítě (*artificial neural networks, ANN*)

nápodoba biologického systému vzájemně propojených neuronů

- : procesory – **neurony**
- : způsob spojení – **topologie sítě**



neurony jsou sdružovány do **vrstev**

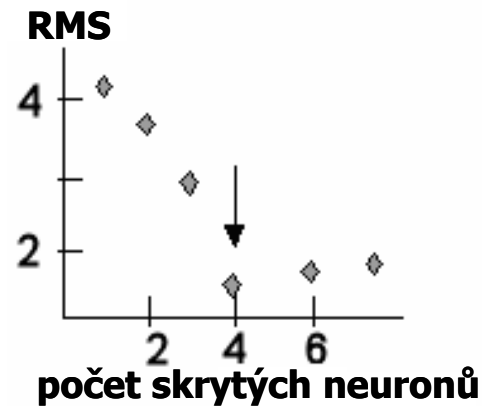
výstupy n -té vrstvy jsou přivedeny do každého neuronu ve **vrstvě $n + 1$**

první, **vstupní vrstva** – přijímá hodnoty pro zpracování

poslední, **výstupní vrstva** – hodnoty odezvami celého ANN na změny podmínek vstupních parametrů

počty neuronů ve vstupní a výstupní vrstvě jsou dány počtem vstupních a výstupních proměnných

vnitřní, **skryté vrstvy** – počet závisí na složitosti aproximované funkce



spojení mezi neurony

reprezentováno racionálním číslem – *váhou spojení* (w)

učení se předpovědi výstupních hodnot s minimální odchylkou hodnot předpovězených ANN *od hodnot experimentálních* – opakovaným nastavováním číselných vstupů transformační funkce a sledování výstupů na funkční (reálnou) hodnotu

odchylka – úplná suma čtverců (*total sum of squares, TSS*)

součet čtverců rozdílů předpovězených a vstupních hodnot

$$TSS = \sum_{i=1}^n (z_i - OUT_i)^2$$

z_i – hodnota výstupní proměnné z pro danou trojici (x, y, z) , OUT_i (*output*) – její předpovězená hodnota, n – počet prvků trénovací sady

každý neuron (kromě vstupních) sčítá hodnoty z předchozí vrstvy a násobí je vahou spojení w :

$$NET_j = \sum_i (INP_i * w_i) + BIAS_i$$

INP_i – hodnota vstupu (*input*), w_i – hodnota příslušné váhy a $BIAS_i$ – hodnota prahu (*bias*), která je tzv. prahovým parametrem a je nezbytná pro správné nastavení hodnoty neuronu NET_j a pro celý výkon sítě

NET_j – neuron j v neuronové síti

OUT_i – transformace součtu NET_j (*output*)

$$OUT_i = 1 / (1 + e^{-NET_j})$$

sada trénovací/učící – n sad parametrů určených plánem pokusů

testovací – nejméně 3 sady parametrů uvnitř hranic daných plánem

verifikační – nejméně 3 sady parametrů v hranicích daných plánem
(i hranice sami)

analytické soupravy v laboratorní medicíně

analytické sety/kity

před r. 1960 – analytická činidla připravována v klinických laboratořích

dnes – analytické přípravky ve formě mikročipů určené pro speciální analytické přístroje již nelze v běžné laboratoři vyrábět vůbec

požadavky na analytickou soupravu

připravena k okamžitému použití (*ready-for-use*)

jednostupňová metoda – jeden pracovní roztok

dvoustupňová metoda – dva pracovní roztoky; enzymová stanovení

stabilní alespoň 12, ale nejlépe až **24 měsíců**

: jednotlivé činidlo po otevření při 2 – 8 °C stabilní týden

metoda s rychlou analýzou – signál, nejčastěji absorbance, do 5 minut, kinetické měření v intervalu nejvýše desítek sekund

metoda bez úprav vzorku – deproteinace, mineralizace, zkoncentrování obsahu analytu *apod.*

příprava analytické soupravy

výrobní postup – *technologický reglement*

: popis všech výrobních, kontrolních a dalších operací formou standardního operačního postupu

výroba analytických souprav je organizována podobně jako výroba léčiv

kapalná činidla

příprava: vážením (včetně vody; přesnější)

nádoby: skleněné nebo plastové, objem od 10 do 200 ml

stabilní – nelouhovatelno, nepodtékající, neprostupné pro plyny (oxidace, únik ochranného inertního plynu)

: nízkotlaký PE, PP, PET (polypropylentereftalát) *aj.*

plnění: průplach nádoby inertním plynem, dávkování čerpadlem, bakteriální filtry (mikrofiltrace), štítkování (čárový kód)

pevná činidla

příprava: navážka pevné směsi do obalu, pevná směs se tabletuje a tablety se zatavují (blistry)

: mlýnky, míchací a homogenizační zařízení, tabletovací stroje, granulátory;
za snížené vlhkosti vzduchu (< 20 %)

choulostivá činidla (enzymy, bílkoviny) – lyofilizáty

: lyofilizace (*freeze drying*, mrazová sublimace) – odstranění vody sublimací v hlubokém vakuu ze zmrazeného vodného roztoku produktu; voda kondenzuje v chladiči, který má proti produktu podstatně nižší teplotu (vyšší tepelný spád)

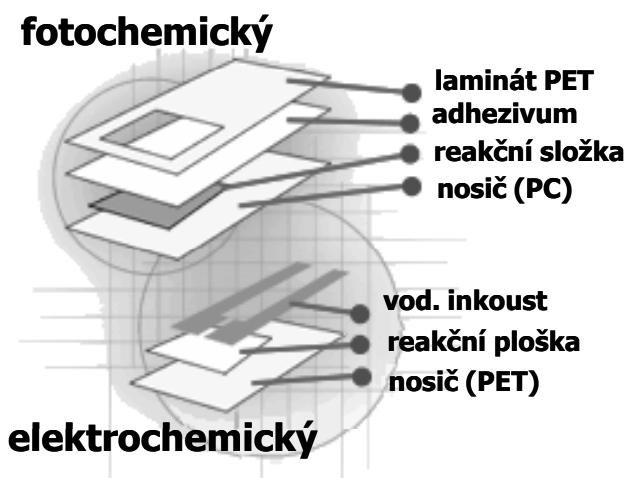
lyofilizační houba – látky umožňující snadnější proces (bílkoviny, deriváty rozpustné celulózy *apod.*)

kompletace soupravy

: poloautomaticky, na pásu

vnější obal – finální etiketa

skladování: pokojová teplota nebo v chlazených boxech



soupravy pro suchou chemii

diagnostický proužek

reakční zóna – na plastovém proužku

impregnace: koncentrované, kapalně analytické činidlo nasáté do nasákavého materiálu; fixace **navážením sítěky z plastu**

nasákavá podložka – **definované vlastnosti** (gramáž, tj. hmotnost v g/m² a nasákavost pro kapaliny) ⇒ nasákne téměř stejné množství roztoku činidla

uskladnění: vysoušedlo (silikagel/molekulové síto)

obsah analytické soupravy

název soupravy

: analyt; princip jeho stanovení

: skladovací podmínky, doba expirace, počet analýz

: údaje o jedech, hořlavínách a žíravínách

pracovní návod

: princip soupravy (i chemickými rovnicemi), odkazy (lit. a patent.), složení činidel, složení reakční/inkubační směsi, postup jejich přípravy, uchovávání a stabilita

: referenční hodnoty analytu, schéma pracovního postupu, doporučené kalibrační a kontrolní materiály, poznámky o vzorku a k bezpečnosti práce **111**

obsah analytu ve vzorku

analytické výsledky způsob jejich vyjadřování

původně: hmotnost, popř. aktivita na objem (v biologické tekutině)
g a mg/dl, jinak též gramprocenta (g%) a miligramprocenta (mg%)

1977: soustava **SI**

hmotnost (g, mg) \Rightarrow **látkové množství** (mol)

koncentrace – mol/l (analyt s přesně definovanou molekulovou hmotností)

enzymy: koncentrace katalytické aktivity místo koncentrace enzymu

katalytická aktivita **1 katal** – množství enzymu, které rozloží **1 mol** enzymového substrátu **za 1 s** za definovaných reakčních podmínek

koncentrace katalytické aktivity – katalytická aktivita vztažená na objem

obsah katalytické aktivity – katalytická aktivita vztažená na hmotnost

mezinárodní jednotka **U** (international unit, IU) – množství enzymu, které rozloží za **1 min 1 μ mol** enzymového substrátu za daných podmínek

$$1 \text{ U} = 1 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min} = 16.67 \text{ nmol}/\text{s} = 16.67 \text{ nkat}$$

hmotnostní koncentrace enzymů/proteinů (*mass concentration*)

: stanovení v imunodiagnostice a u enzymu CK

:: koncentraci vyjadřujeme jako **mg** či **µg proteinu/l**

počet elementů v biologických tekutinách (buněk, částic, různých útvarů)

:: početní koncentrace, tj. **počet částic v litru**

močový sediment – **arbitrární početní koncentrace** (arbitrární jednotka)

: zjednodušení při vyjadřování počtu částic (elementů) na definovaný (dohodnutý) objem

po odstředění vzorku moče se zjistí počty jednotlivých elementů v zorném poli mikroskopu v odečítací komůrce s definovaným objemem (Bürkerova komůrka)

jiné užití: analýzy některých testů v moči (např. průkaz bílkoviny), v mozkomíšním moku, ve stolici (obsah železa) *apod.*

IFCC a IUPAC: systém zkratk pro vyjadřování analytického nálezu pro tyto typy vzorků nad rámec SI

interpretace výsledku analýzy

analyt – součást vzorku, kterou stanovujeme (*kreatinin v séru a v moči*)
: stanovení s určitou přesností v závislosti na obsahu, stabilitě, metodě stanovení *apod.*

analytická metoda/postup – metoda stanovení analytu (*Jaffého reakce s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí*)

výsledek analýzy – hodnota ve vztahu k diagnóze (*kreatininová clearance*)

test na určitou funkci – testovaný stav ve vztahu k diagnóze (*glomerulární filtrace*)

index – diagnostické poměry obsahu analytů

analytická variabilita – preanalytická i analytická fáze

biologická variabilita (BV) populace – komplexní charakterizace rozptylu výsledků biochemických vyšetření; suma intra- a interindividuálních variabilit

vyjádření: variační koeficient v procentech (*CV*)

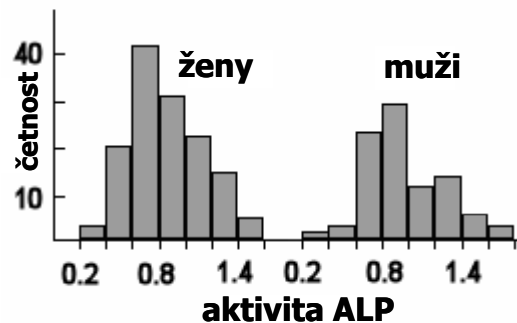
stanovení: analytické postupy, které mají $CV < \text{cca } 1/3$ intervalu BV

dohodnuté odchylky od *cílové hodnoty analytu* (*target value, TV*) – místo **BV**
cílová hodnota : průměrná hodnota všech výsledků souboru po jejich záznamu
: průměr stanovený definitivní nebo referenční metodou, v
případech, že definitivní ani referenční metoda zatím nejsou stanoveny, může
být užita srovnávací metoda

souvislost mezi analytickým nálezem a stavem pacienta

zdravý (normální) nebo má **analyt vybočující** (patologické) hodnoty

pro běžné analyty zpracovány tzv. **referenční hodnoty** (dříve normální či fyziologické hodnoty)



: referenční hodnoty **referenčního jedince** – donora
: **referenční skupiny**
: **referenční populace**

získávání: *analýzou vzorků* osob, které se hodnotí jako *zdravé*
referenční (fyziologický) interval – hodnoty laboratorního testu, *mezi nimiž*
leží většina hodnot získaná měřením referenční populace

analytické soubory

funkční soubory jednotlivých **analytických metod**

klinicko-biochemické požadavky lékařů

: jaterní soubor, soubor pro tukový metabolismus, soubor pro poruchy glukózové tolerance *aj.*)

jiné důvody – organizační, bezpečnostní, ekonomické

akutní (statimová) analýza

stanovení jednoho nebo skupiny hlavních analytů co nejdříve a non-stop

glukóza (diabetes), kreatinin nebo močovina (ledviny), bilirubin a aminotransferáza ALT (jaterní testy), kreatinkináza a troponin (srdce), α -amyláza či lipáza (slinivka), acidobazická rovnováha krve, základní toxikologické vyšetření a základní vyšetření moči

základní biochemické vyšetření

základní (screeningové) vyšetření analytů charakterizujících činnost hlavních tělesných orgánů a funkcí

celkovou bílkovinu, bilirubin, kreatinin, močovinu, glukózu, cholesterol, kyselinu močovou, ALP, aminotransferázy ALT a AST, popř. GMT nebo CK

základní hematologické vyšetření

stanovení krevního obrazu

hemoglobin, erytrocyty, hematokrit, leukocyty, trombocyty, retikulocyty, osmotickou rezistenci erytrocytů, bazofilní tečkování erytrocytů *apod.*

organizační dělení analýz do souborů

imunochemická vyšetření

imunoelektroforéza

sérové bílkoviny, α 1-fetoprotein, imunoglobuliny A, G, M, prealbumin, α 1-antitrypsin, α 2-makroglobulin, transferin, ceruloplasmin, CRP, prostatický specifický antigen *aj.*

radioimunoanalytická vyšetření

thyroxin, trijodtyronin, thyreotropin, luteinizační hormon, folikuly stimulujícího hormonu, prolaktin, choriogonadotropin, estradiol, progesteron *aj.*

vyšetření mozkomíšního moku

chemické stanovení analytů + různé speciální testy

základní vyšetření moči

pH, dusitany, bílkovina, glukóza, bilirubin, urobilinogen, ketolátky, osmolalita, erytrocyty a hemoglobin, leukocyty, vyšetření močového sedimentu

doplňkové analýzy

morfologická analýza močového sedimentu (epitelie, válce granulované, voskové, epitelové, erytrocytární, leukocytové, žlučové, pseudoválce, spermie a mikroby (kvasinky, bakterie, trichomonady, plísně)

drug monitoring

kontrola hladiny těch léčiv, která jsou ve větších dávkách toxická a hrozí jejich předávkování, nebo protože mají lidé na některá léčiva individuální toleranci

speciální analyzátory

nejčastěji monitorovanými léčivy – digoxin, fenytoin, fenobarbital, kyselina valproová, diazepam, theofylin, gentamicin, tobramicin, methotrexat, cyklosporin *a dal.*

drogy (drugs of abuse)

instrumentální metody (HPLC, GC, MS, CZE *apod.*)

alkohol, amfetamin, barbiturany, benzodiazepiny, cannabinoidy, kokain, methadon, opiáty, antidepressiva, anabolické steroidy *aj.*

vybrané instrumentální analytické metody v laboratorní medicíně

spektrometrické metody

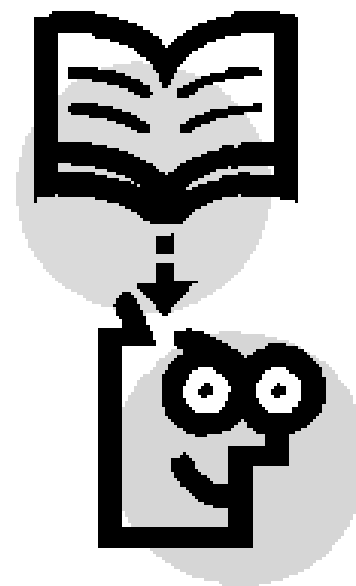
- : UV-Vis, fluorimetrie
- : AAS, AES
- : hmotnostní spektrometrie

elektrochemické

- : coulometrie, potenciometrie

separační metody

- : chromatografie (kapalinová, plynová)
- : elektroforéza (gelová, kapilární)



princip

separace dle různých rozdělovacích konstant analytů v systému dvou fází (pevná-kapalná)

rozdělovací poměr D

$$D = C_S / C_M$$

C_S – koncentrace analytu na stacionární fázi, C_M – koncentrace ve fázi mobilní

retenční čas t_R

: čas, za který analyt projde kolonou

mrtvý (nulový) čas t_M

: čas, za který projde kolonou samotná mobilní fáze, nebo neinteragující látky (jejich $t_R = t_M$)

sorpce – analyt z mobilní fáze se zachytí na fázi stacionární

desorpce – obrácený proces

chromatografie – dynamická rovnováha sorpce a desorpce analytu

čtyři hlavní sorpční mechanismy: adsorpce, rozdělení (obdoba extrakce), iontovou výměnu na iontoměničích a sterické vylučování (stacionární fáze s kontrolovanou porozitou, dělení látek dle jejich velikosti a molekulové hmotnosti)

adsorpce – povrchový efekt působený elektrostatickými interakcemi (vodíkové můstky, vazba dipól-dipól a vazba dipól-indukovaný dipól)

analyty soutěží s mobilní fází o **limitovaný** počet **vazebných míst** na povrchu adsorbentu

chromatografické dělení látky – symetrický neboli gaussovský koncentrační profil ve směru pohybu mobilní fáze, tzv. zóny čili píky

kvalita chromatografického dělení

: účinnost kolony

počet teoretických pater N $N = 5.54 * (t_R / W)^2$

W – šířka píku v polovině jeho výšky

výškový ekvivalent teoretického patra H $H = L / N$

L – délka kolony

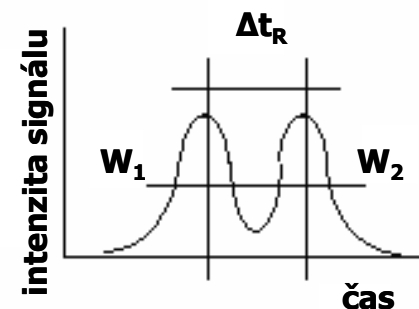
vysoké $H \Rightarrow$ účinné dělení multikomponentních směsí látek

rozlišení R_S

: oddělení dvou sousedních píků

$$R_S = 2 * \Delta t_R / (W_1 + W_2)$$

$R_S \geq 1.5$ uspokojující, $R_S = 1.5$ je tzv. dělení na základní linii



stacionární fáze (SF)

chemicky modifikované silikagely nebo různé kopolymery

silikagel Si-OH – polární a slabě kyselý

: modifikace alkylchlorsilany s délkou alifatického uhlíkového řetězce 1 až 18;
hydrolyticky stálé siloxany s typickými vazbami **Si-O-Si-C**

: nejužívanější fáze – **oktadecylsiloxany (ODS čili C18)**; tzv. **reverzní fáze**

mobilní fáze (MF)

dle polarity: *n*-hexan, cyklohexan, metylbenzen, chlorované uhlovodíky, tetrahydrofuran, aceton, acetonitril, *iso*-propanol, etanol, metanol, voda...

jednotlivě nebo jejich mísitelné směsi

MF teče pod tlakem až 40 MPa, rychlostí toku asi 0.05 – 2.00 ml/min

reverzní HPLC – směs metanolu nebo acetonitrilu s vodou nebo s roztokem pufru

velmi důležité **pH vodné složky** – ionizované formy látek menší afinitu k C18

kolony pro HPLC

konvenční – nerezová ocel, délka 3 do 25 cm, vnitřní průměr 3 – 5 mm

mikrokolony – délka 5 – 50 cm, vnitřní průměr 0.5 – 2 mm

kapilární HPLC

detekce signálu

: v MF po eluci z kolony

fotometry UV-Vis (PDA/DAD), fluorimetry, refraktometry, elektrochemické detektory, nově hmotnostní spektrometrie

citlivost HPLC detektorů

: refraktometrické a vodivostní detektory $5 \cdot 10^{-7} \text{ g/cm}^3$

: fotometrické detektory 10^{-10} g/cm^3

: fluorimetrické a ampérometrické detektory do 10^{-12} g/cm^3

aplikace HPLC v laboratorní diagnostice

syndrom fragilního chromozómu X

příčina vrozené *mentální retardace* (2. nejčastější po Downově chorobě)

projevy: obličejová dysmorfie, velké uši, velká tvář s výraznou bradou a čelistí

poruchy chování: stereotyp, špatná komunikace, hyperaktivita a špatná prostorová orientace

*defektní gen **FMR 1** na chromozómu X (*fragile X mental retardation gene 1*)*

mutace: zmnožení trinukleotidových repeticí (**SNP**, *single nucleotide polymorphism*)

: Fra X – zmnožení repetice CGG a následná **metylace cytosinu**

: metylace cytosinu v sekvenci CGG ⇒ potlačení exprese genu ⇒ projevy Fra X

podle obsahu **deoxycytidinmonofosfátu** (dCMP) a jeho **metylovaného derivátu** (mdCMP) a podle **počtu repeticí CGG** může mít **gen FMR 1 tři stadia:**

stav FRM 1	dCMP [%]	mdCMP [%]	počet CGG
normální	70 – 100	0 – 30	6 – 53
premutační	50 – 70	30 – 50	< 200
mutační	10 – 50	50 – 90	> 200

stanovení poměru obsahu dCMP/mdCMP

diagnostika Fra X syndromu

buňka \Rightarrow DNA *endonukleáza Msp I* \rightarrow

nukleotidtrifosfáty *exonukleáza III* \rightarrow

nukleotidmonofosfáty

$(\text{mdCMP} / \text{dCMP})_1$ vs. $(\text{mdCMP} / \text{dCMP})_2$

$\% \text{mdCMP} = \text{mdCMP} / (\text{mdCMP} + \text{dCMP})$

kontrolní poměry

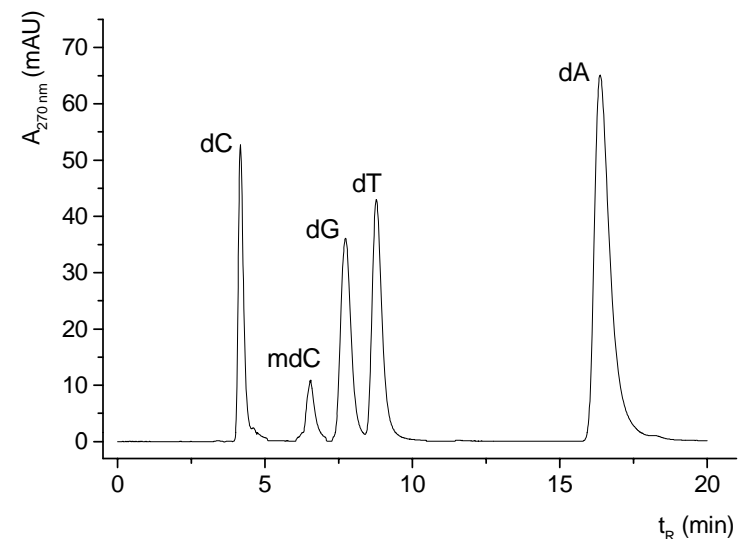
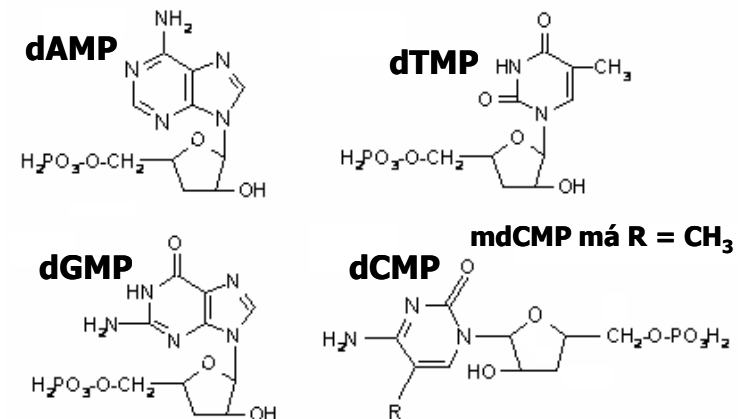
$(\text{mdCMP} + \text{dCMP}) / \text{dGMP} = 1$

$\text{dAMP} / \text{dTMP} = 1$

zlepšení citlivosti o řád

UV-Vis \Rightarrow fluorescenční detekce

derivace dansylchloridem



kapilární elektroforéza (CE)

princip

separace dle různých elektroforetických mobilit analytů v potenciálovém gradientu elektrického poli

d – vzdálenost, kterou analyt uputuje po zavedení potenciálu **E** mezi dvěma elektrodami vzdálenými od sebe **S** za čas **t**

$$d = \mu * t * (E / S)$$

μ – elektroforetická mobilita (je funkcí náboje, molekulové hmotnosti a tvaru molekuly; frikční síly – zpomalují migraci ve viskózním elektrolytu)

separace $\Delta d = (\mu_1 - \mu_2) * t * (E / S)$

nejužívanější metodiky

CZE – kapilární zónová elektroforéza (*capillary zone electrophoresis*)

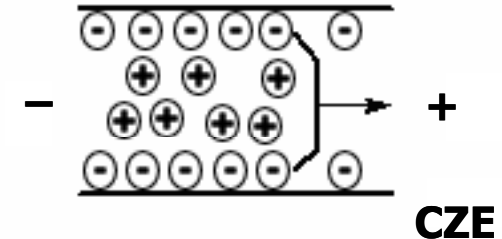
PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza (*polyacrylamide gel electroph.*)

CZE – kapilární zónová elektroforéza

: křemenná kapilára o malém průměru (50 – 75 μm)

: záporně nabitý povrch (*silanové skupiny*)

: vložené napětí ~ 10 – 60 kV



elektroosmotický tok (*electroosmotic flow, EOF*)

: základní jev v CE

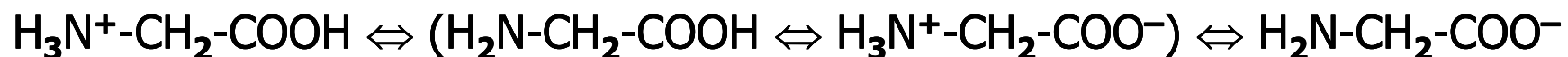
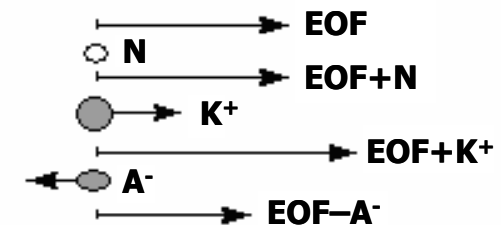
silanolové skupiny (pK_a asi 6.2) \Rightarrow kompenzace kationtů pufru \Rightarrow **Sternova elektrická dvojvrstva**

potenciálový gradient \Rightarrow hydratované kationty v pohybu \Rightarrow posun celého elektrolytu (**EOF**) \Rightarrow unáší ke katodě všechny přítomné látky (neutrální i ionty)

rychlost EOF – \uparrow se \uparrow pH pufru a napětím; \downarrow s viskositou

základní elektrolyt (vodivé medium) – pufr
(*background electrolyte, BE*)

: zásadní vliv na konstantní mobilitu dělených látek



separace neutrálních látek – přidání povrchově aktivních látek do BE

vytváření micel \Rightarrow uzavření neutrálních látek \Rightarrow nabité micely jsou separovány

separace na základě jejich **rozdílné rozpustnosti v micelách** nebo na základě **rozdílů v distribučních koeficientech** analytů mezi **vodnou a micelární fází**

detekce signálu

: **UV-Vis** – citlivost 10^{-13} až 10^{-16} mol (10^{-5} až 10^{-8} mol/l)

: **ampérometrická** detekce – 10^{-11} mol/l

: **laserem indukovaná fluorescence (LIF)** – 10^{-14} až 10^{-16} mol/l
:: derivatizace fluoroforem

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza

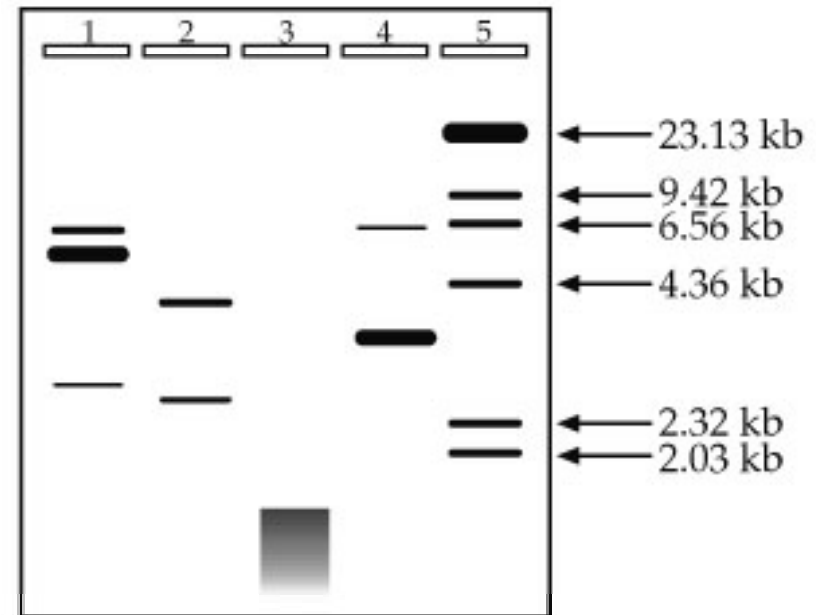
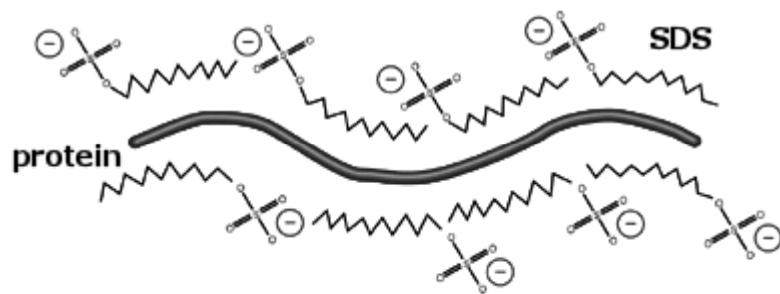
migrace v polymerní matrici
(agar, škrob, agaróza, polyakrylamid)

: separace makromolekul

provedení : izokratická, gradientová

: denaturující (SDS; *Lämmli*)

: nedenaturující



detekce:

barvení, denzitometrie

proteiny

Coomassie modř, stříbro, SYPRO rubínová, Cu^{2+} , Zn^{2+}
NA

SYBR zeleň, ethidium bromid, akridinová oranž

aplikace CZE v laboratorní diagnostice

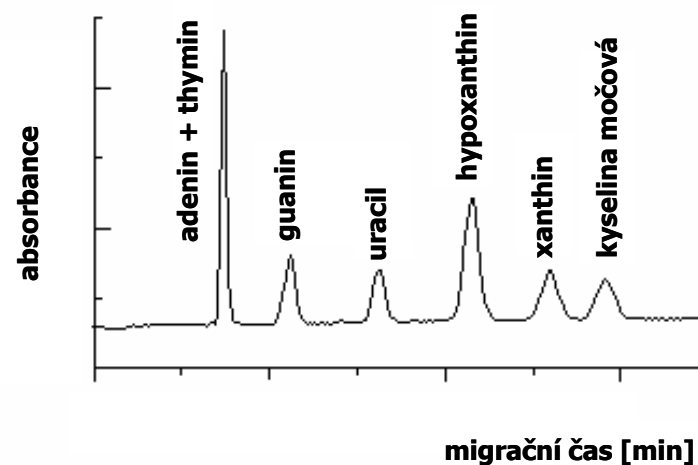
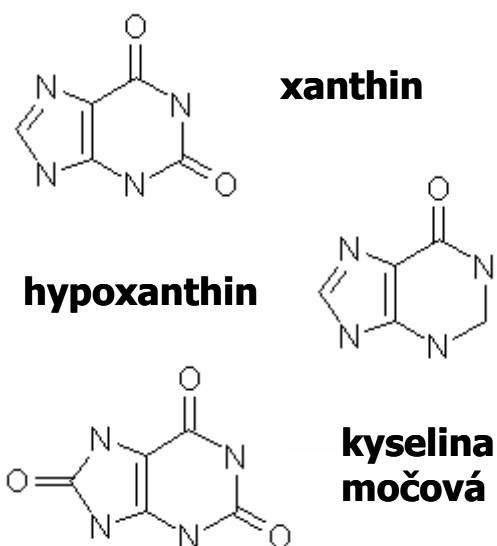
metabolické poruchy

: porušené metabolické dráhy (blokování, nepřítomnost enzymu /geneticky/)
:: *přítomnost produktů neúplného metabolismu v moči a krvi*

stanovení obsahu purinů a pyrimidinů

diagnostika xanthinurie a deficitu enzymu hypoxanthinfosforibosyltransferázy

BE – borátový pufr 30 mmol/l o pH 10.2; hydrodynamické dávkování 10 s,
separační napětí 15 kV, teplota 25 °C, UV-detekce při 260 nm



hmotností spektrometrie (MS)

: fyzikální metoda; určení molekulové nebo atomové hmotnosti analytu

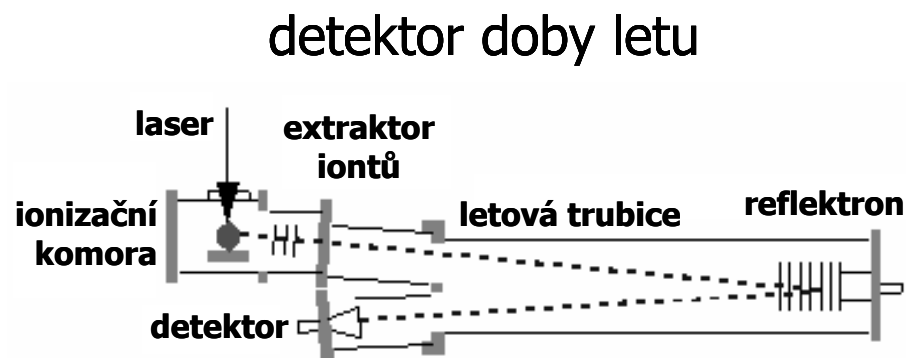
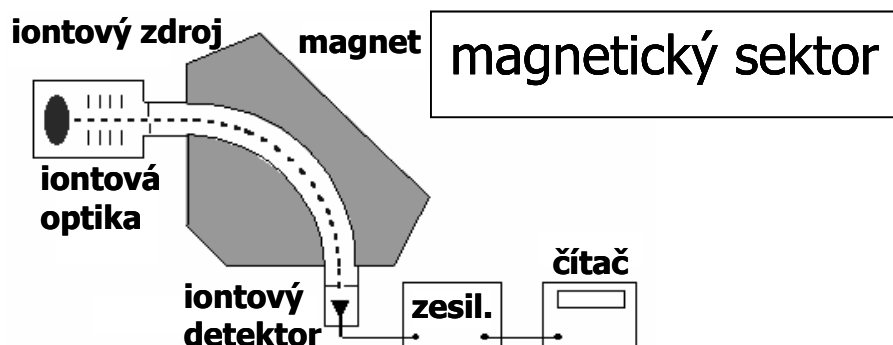
princip

molekuly analytu se **ionizují v plynné fázi**; pak jsou **rozděleny** buď v prostoru nebo v čase podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z)

ionizace \Rightarrow **hmotnostní analýza** \Rightarrow **detekce iontů**

ionizace – polem nebo vysokoenergetickými částicemi (elektron, foton, atom)
měkká vs. tvrdá ionizace

hmotnostní analýza



detekce iontů – systém dynod

tandemová MS

sériové spřažení *několika hmotnostních analyzátorů*
+ *sekundární ionizace* – **kolizní cela**

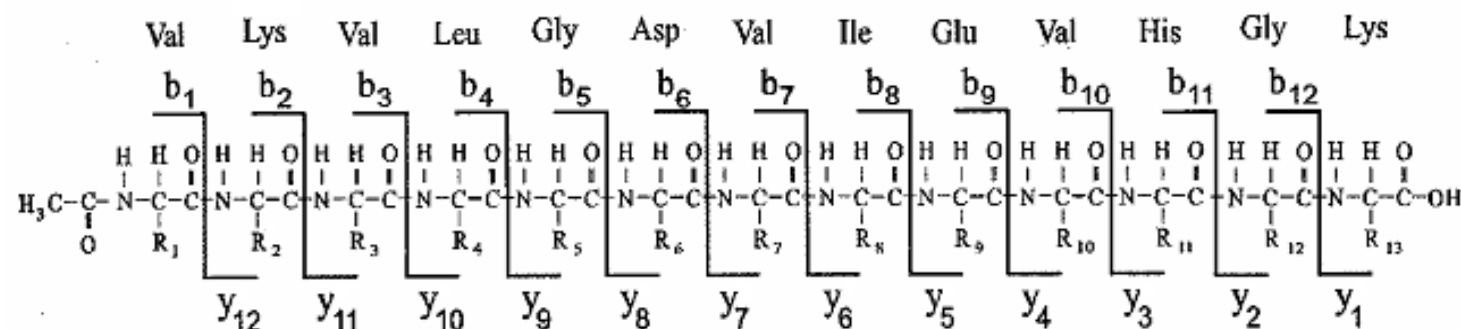
: **první analyzátor rozdělí ionty dle m/z**

: **selekce iontu o určitém m/z**

: **sekundární ionizace-fragmentace**

: **rozdělení fragmentů v druhém analyzátoru**

: **detekce iontů fragmentů**



analýza proteinů a nukleových kyselin

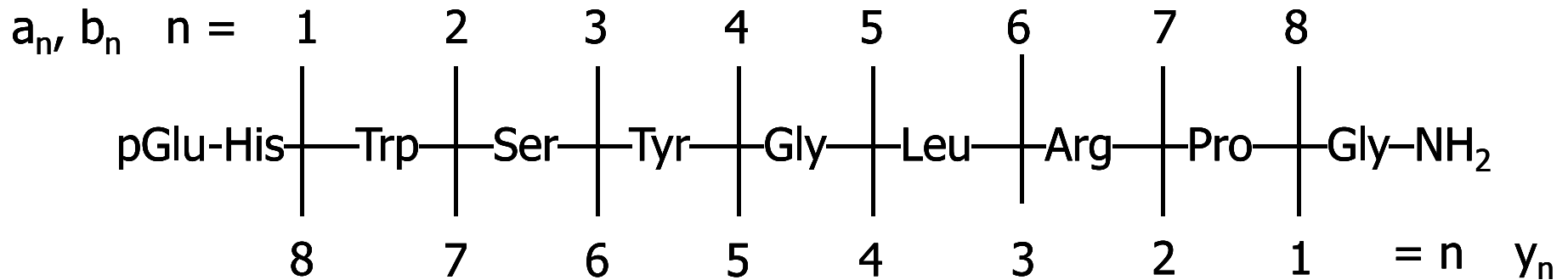
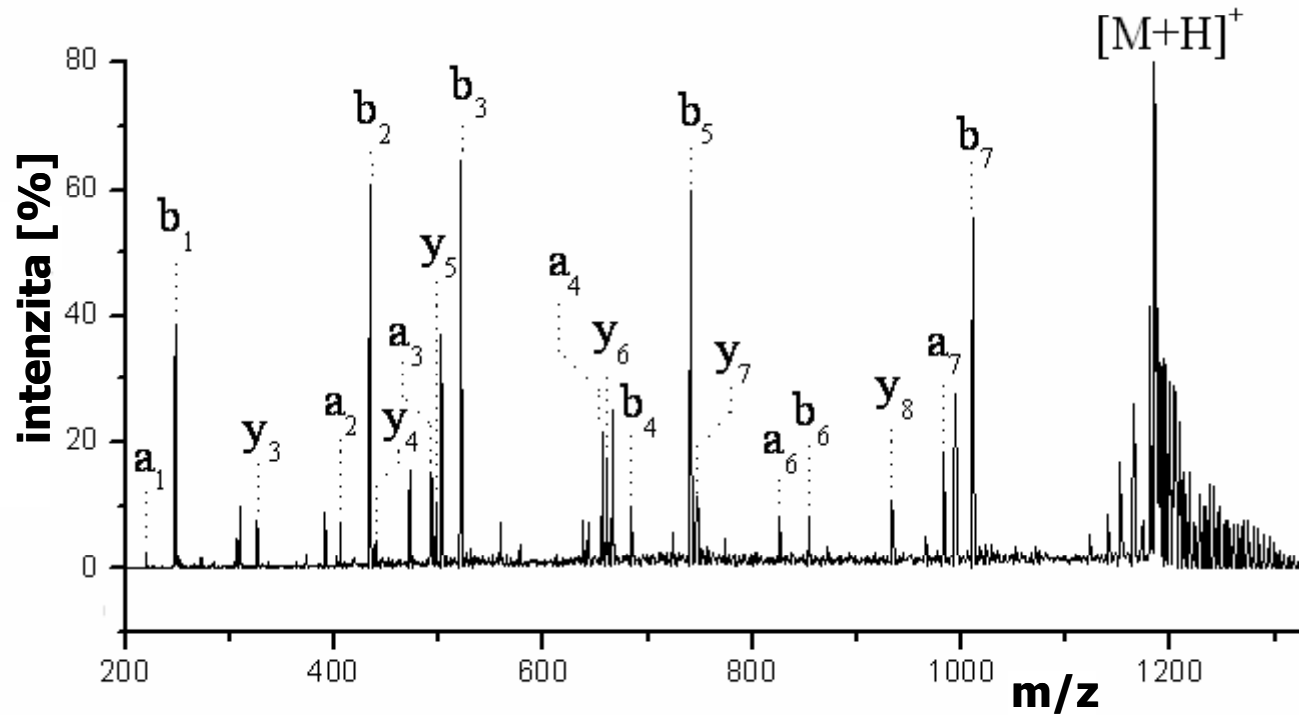
MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight*)

aplikace MS v laboratorní diagnostice

MALDI PSD TOF

rozpad za zdrojem
(*post-source decay*)

identifikace hormonu tandemovou MS



lidský hormon uvolňující luteinizační hormon (LHRH)

imunochemická analýza v praxi klinické imunodiagnostiky

imunitní systém (IS) – informační soustava

: zodpovídá za udržení identity a integrity jedince a jeho individuality

složky: lymfocyty, fagocyty, komplement, interferony a protilátky (Ab)

lokalizace: v krevním a lymfatickém oběhu

funkce: tolerují vlastní struktury, cizí označují a odstraňují

: rozpoznání vlastního od cizího

: likvidace cizího: mikroorganismy, cizí buňky, tkáně, cizorodé bílkoviny a antigenně působící látky

interakce antigen + protilátka

: analytické využití imunitního systému – afinitní (specifická) interakce

:: nekovalentní

:: reverzibilní

:: variabilní

antigen (*antibody generator*) (**Ag**)

: obsahuje **determinanty** (epitopy) ⇒ vyvolávají imunitní reakci (imunogen)

:: **makromolekula** (> 8 kDa)

:: makromolekulární nosič + **hapten**

bakteriální toxiny, lipopolysacharidy, aglutininy, revmatoidní faktor, endotoxiny, alergeny

protilátka (*antibody*) (**Ab**)

: rozeznávají **determinanty** ⇒ odpověď imunitního systému na Ag

: specifická Ab reaguje s určitým Ag – **označí jej**

: váží se na determinanty **vazebným místem** (paratopem)

:: **imunizace** – vystavení IS novému Ag ⇒ výroba nových Ab

monoklonální, polyklonální Ab – rovnocennost epitopů

křížové reakce Ab – interakce jednoho paratopu s podobnými epitopy

imunoglobuliny

IgA (15 – 20%) – na povrchu sliznic z exokrinních žláz

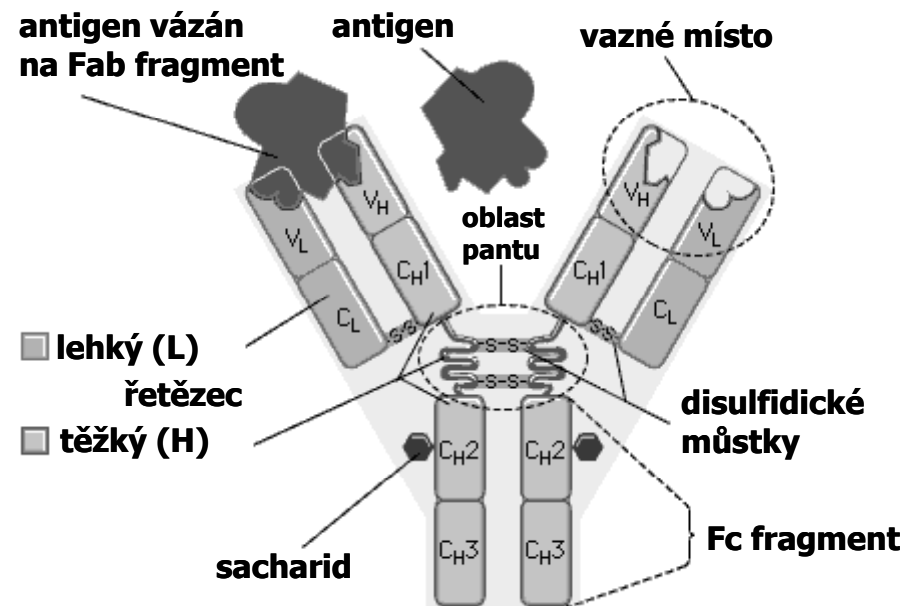
IgD – aktivace B-buněk

IgE – u alergií; dvojvazný: alergen-IgE-glykoprotein

IgG (75%)

IgM (3 – 10%) – intravaskulární prostor

protilátka – detail struktury



sledování interakce

- : přímé – precipitace, rozptyl světla
- : nepřímé – aglutinace, vazba komplementu
- : značením – imunostanovení
 - :: homogenní
 - :: heterogenní
 - ::: přímé, kompetitivní
 - ::: nepřímé, sendvičové

detekce

- u přímých a nepřímých imunoanalýz*
- : vizuální
- : optická (nefelometrie, turbidimetrie)
- : hmotnostně-spektrometrická

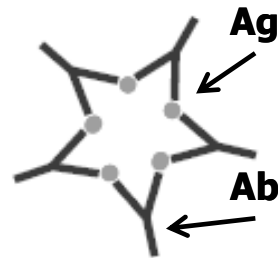
- u imunoanalýz se značením*
- : spektrofotometrická, fluorimetrická
- : radiometrická
- : elektrochemická

prostředí

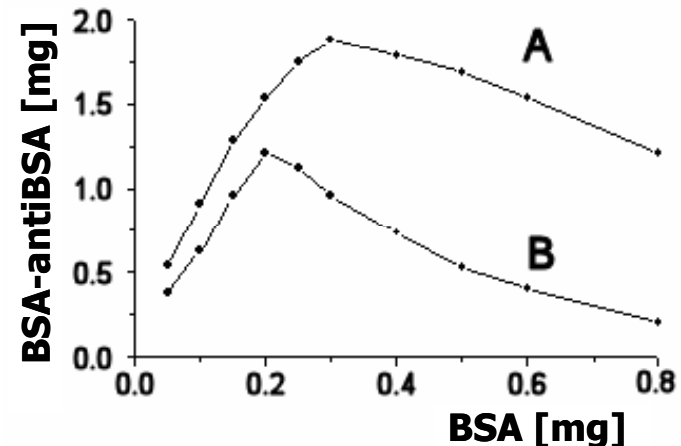
- : roztoky
- : gel (imunodifúze)
- : imobilizace a jejich kombinace
 - :: tkáně

přímá imunoanalýza – precipitační reakce

bivalentní Ab (precipitin), **makromolekulární Ag** (precipitinogen), 1:1
precipitát – viditelná sraženina vzniklá přímo z molekul



disagregační látky – brání precipitaci

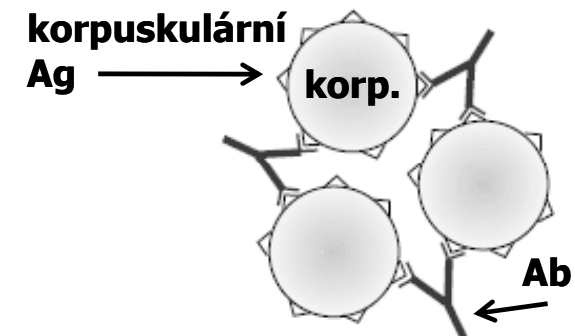


precipitační křivka

nepřímá imunoanalýza – aglutinační reakce

polyvalentní Ab (aglutinin),
korpuskulární Ag (aglutinogen)

aglutinát – viditelná sraženina
vzniklá z makroskopických částic

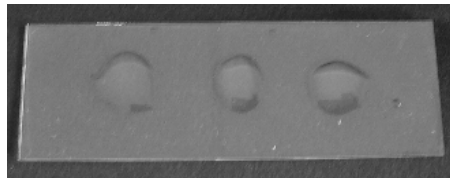


korpuskulace Ag: imobilizace na korpuskuli (makroskopickou částici)
: hemaglutinace, cytaglutinace, latex; systém komplementu

kvalitativní metody

prstencová p. – prstenec precipitátu na rozhraní fází s Ag a s Ab

sklíčková p. – „kapkovací“ imunitní reakce



Oudinova metoda – dvě vrstvy gelu, s Ab nebo s Ag

Oakley-Fulthorпова metoda – dva gely, s Ab nebo s Ag; více [AbAg]

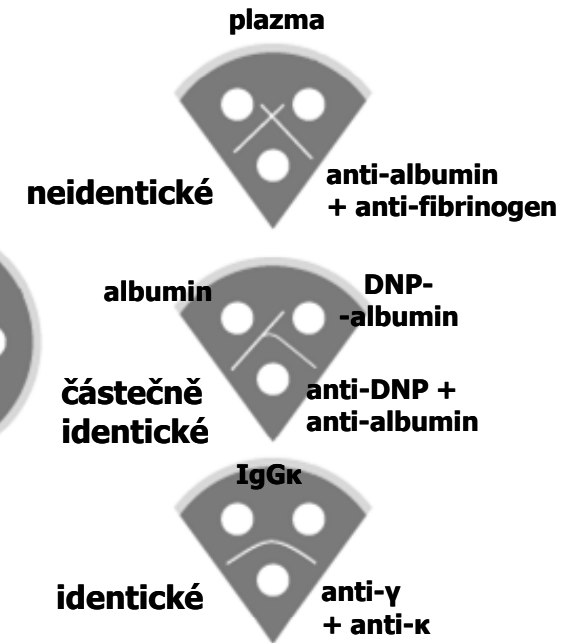
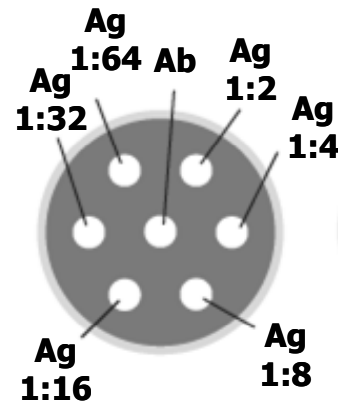
Ouchterlonyho metoda

: dvojitá radiální imunodifúze

:: koncentrický systém jamek

Ab vprostřed

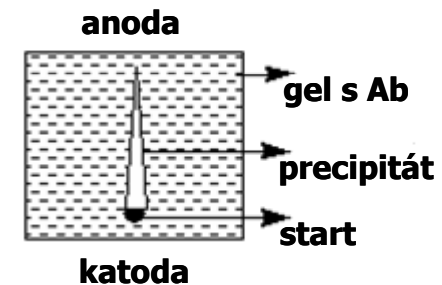
Ag okolo



metoda dle Williamse a Grabara

: imunoelektroforéza

:: startovací jamky s Ag, podélná jamka s volně difundujícím Ab



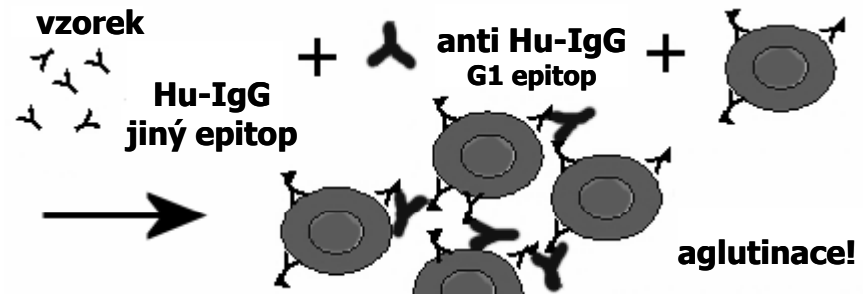
protisměrná imunoelektroforéza

: na opačných koncích Ab a Ag, precipitační proužky

hemaglutinačně inhibiční test (HIT)



pozitivní – krev sedimentuje
 přítomnost **Ab** ⇒ **žádná** aglutinace



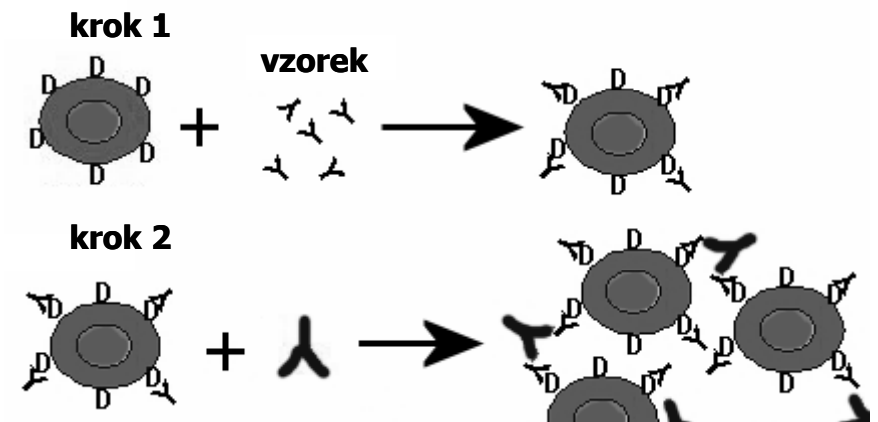
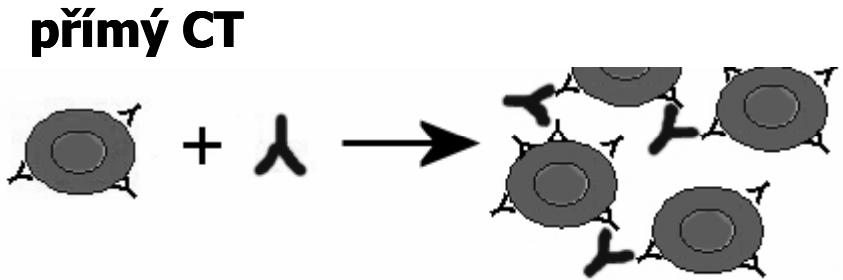
negativní – aglutinované erythrocyty
 nepřítomnost **Ab** ⇒ **aglutinace**

Coombsův test (CT)

: odhalení protilátek proti červeným krvinkám

- :: stanovení Ag_1 pomocí nekompletního Ab^i
- :: primární komplex: Ag_1Ab^i
- :: sekundární komplex: $Ag_1Ab^iAg_2$

nepřímý CT



kvantitativní metody

vážková p. – vážení p., nefelometrie, turbidimetrie

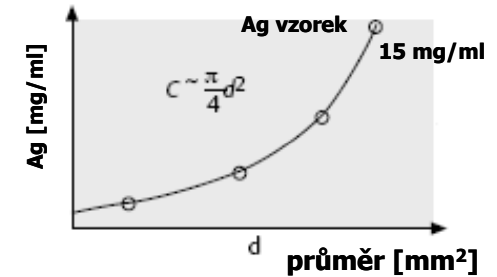
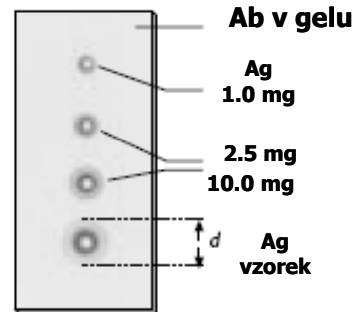
metoda Manciniové

: radiální imunodifúze

:: gel obsahuje Ab

:: řada jamek

::: standardy (kalibrace) + vzorek



kalibrační závislost

metoda dle Laurela

: raketová, spojitá, křížová IELFO; elektroimmunodifúze

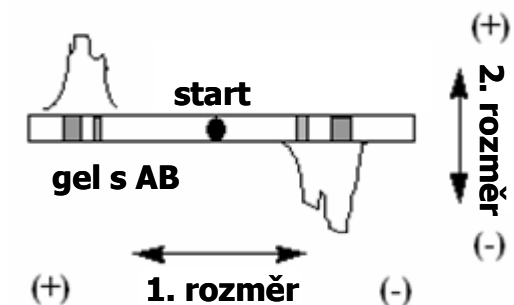
:: gel obsahuje Ab, startovací jamky s Ag; tvar plamene – semikvantita

metoda dle Clarka a Freemana – 2D IELFO

:: 1.D dělí Ag, 2.D interakce s Ab v gelu v úhlu 90°

tandemová IELFO

:: obdoba 2D IELFO se standardními množstvími Ag



imunoanalýza se značenými reaktanty

imunostanovení, imunoesej (*immunoassay*); **neutralizace séra**

univalentní Ab, rozpustný Ag

: vhodné Ab – **monoklonální**

: vhodná značka (Ab, Ag) – fluorofor, chromofor, radioaktivní izotop, enzym

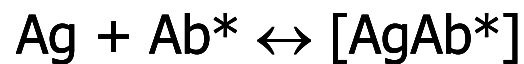
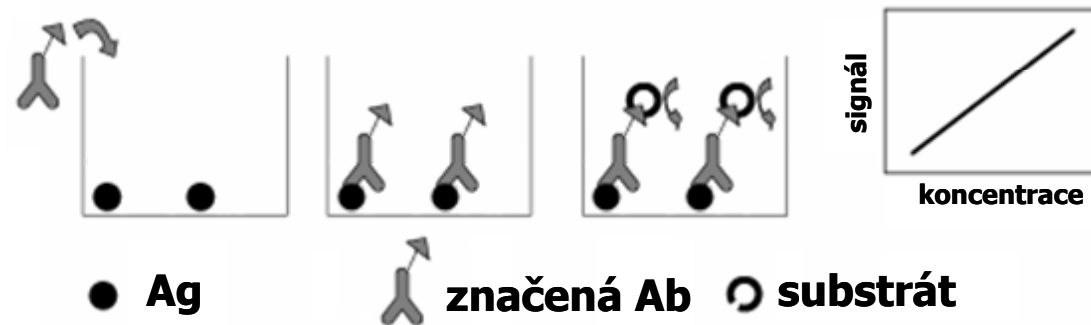
: separační systém – imobilizace

: detekce

: standard či kontrolní stanovení

jednoduchá imunoanalýza

- : imobilizace Ag**
- : známé množství Ab**
- : vazba Ab na Ag**
- : určení obsahu Ag**
 - :: přímo – značená Ab₁
 - :: nepřímo – značenou Ab₂ proti Ab₁



výhody: nízká spotřeba Ab

nevýhody: imobilizace vzorku, značená Ab,
nízká specifita, nízká selektivita (jen u přímé)

kompetitivní imunoanalýza

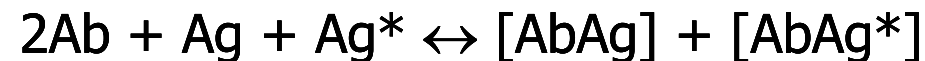
stanovení s omezeným množstvím reagentu

: omezený počet vazných míst na Ab

: neznámé množství Ag

: soutěž o vazná místa se známým množstvím značeného Ag

:: určení poměru značeného Ag a to buď volného nebo vázaného ⇒
neznámého Ag



výhody: nízká spotřeba Ab

nevýhody: nízká specifita, nízká selektivita

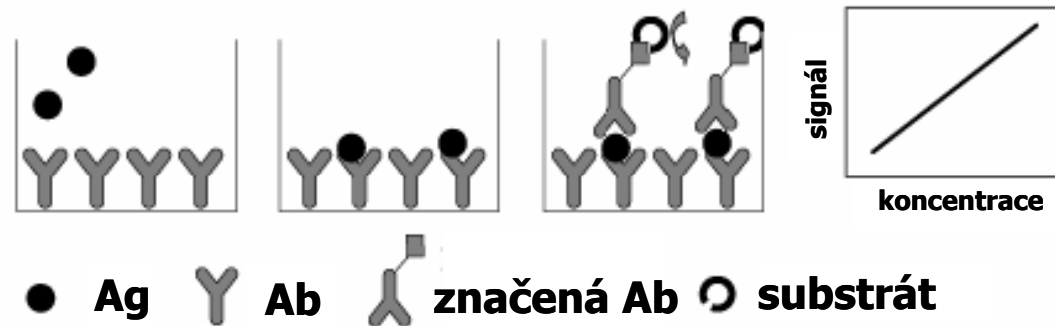
sendvičová imunoanalýza, imunometrie

stanovení s nadbytkem reagentu

: dvě a více Ab zaručují specifitu imunoanalýzy

: teoretický limit detekce je jedna molekula analytu

:: nevázaná značená Ab může být použita ke kvantifikaci analytu



výhody: zvýšená citlivost, zvýšená specifita

nevýhody: značené Ab, plýtvání Ab

FIA – fluorescenční imunostanovení *fluorescent immunoassay*

značení Ab či Ag fluroforem

provedení

homogenní

: Δ fluorescenčních vlastností značené Ab/Ag po vzniku [AbAg]

heterogenní

: fluorescence značené Ab/Ag po vymytí nevázaného

používané fluorofory:

fluorescein, izothiokyanát fluoresceinu (FITC), rhodamin, ombelliferon, 8-anilino-1-naftalenesulfonát (ANS), cheláty lanthanoidů (Eu, Tb, Sm)

výhody

- : specifita
- : citlivost
- : rozměr sondy

nevýhody

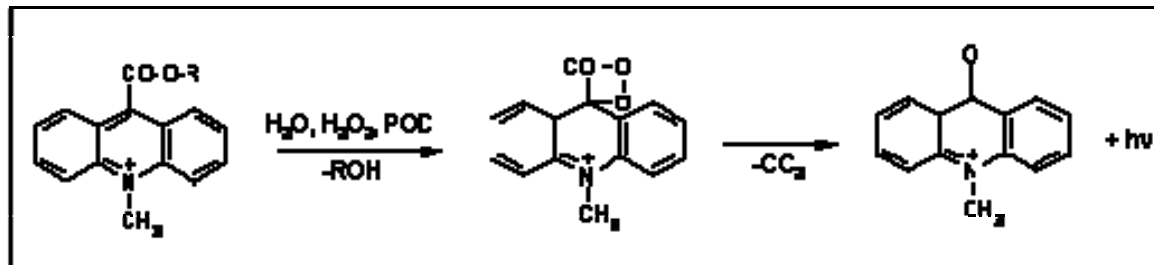
- : pozadí (zhášení)
- : instrumentálně náročné
- : omezený výběr různých značek

LIA – luminiscenční imunostanovení

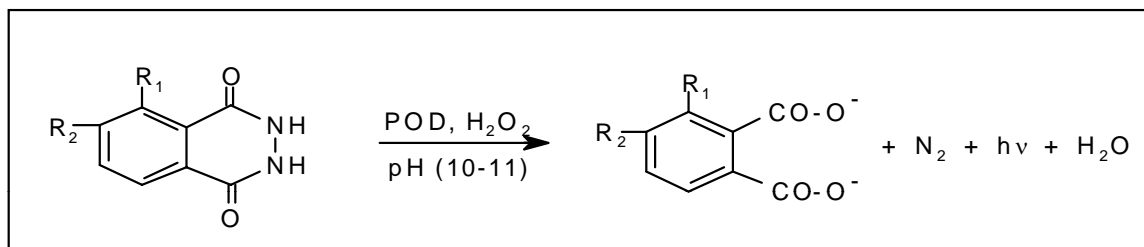
luminescence immunoassay

chemoluminescence

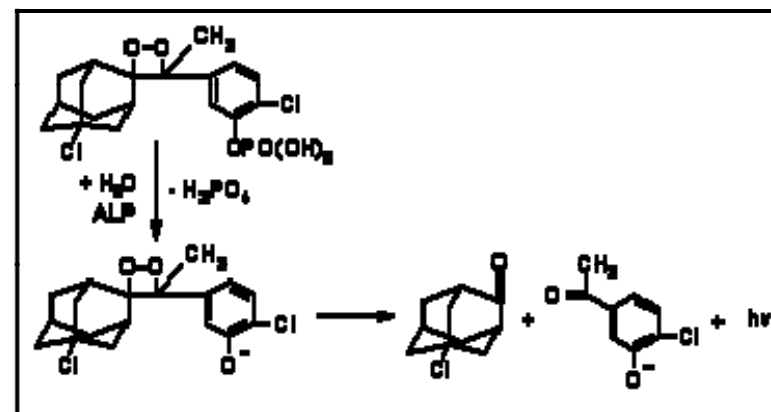
estery akridinia – **nepotřebují katalýzu**



luminol, izoluminol – **potřebuje peroxid vodíku; peroxidáza**

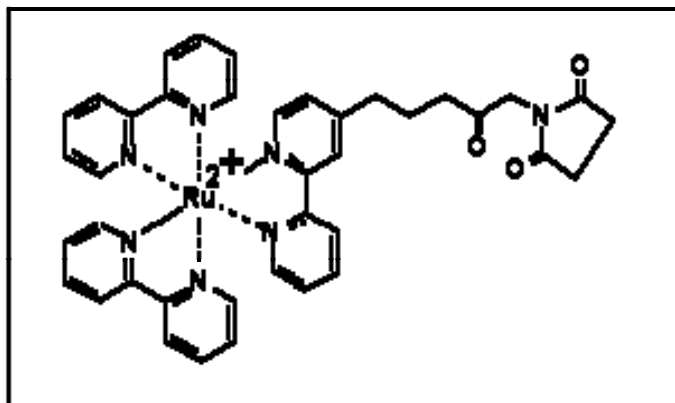


enzymaticky indukovaná luminiscence
 složka: 1,2-dioxetan



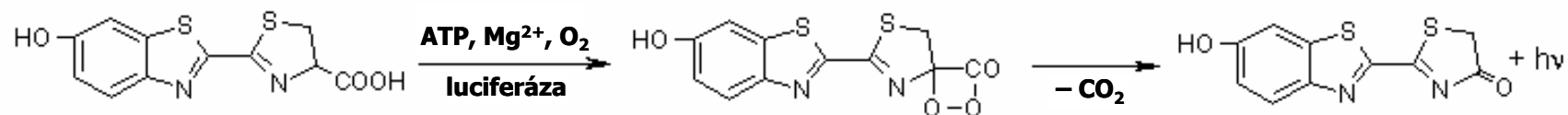
elektrochemoluminiscence

NHS ester $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$



kotvení na magnetickém nosiči
oxidace značky na Pt či Au eldě při 2 V
+ TPA (tripropylamin) v pufru – *regenerace*

bioluminiscence; luciferin/luciferáza



výhody

- : poměr S/N
- : citlivost
- : rozměr sondy

nevýhody

- : instrumetální náročnost

RIA – radioizotopové imunostanovení *radioisotopic immunoassay*

značení Ab či Ag radioizotopem (nestabilním / radioktivním izotopem)

provedení

: heterogenní, kompetitivní

používané izotopy:

^{125}I – proteinové Ag; 60 dní; ^{14}C – hapteny; ^3H – steroidní hormony
další izotopy – ^{14}C , ^{75}Se , ^{57}Co

detekce: dle typu záření – α a β (*scintilátor*) či γ (*kryystalový počítač*)

výhody

: pružnost

: citlivost

: rozměr sondy

nevýhody

: toxicita

: skladovatelnost

: likvidace odpadu

EIA – enzymové imunostanovení
enzyme immunoassay

značení Ab či Ag enzymem

provedení

homogenní

: kompetitivní **Ab + Ag-E + Ag → [Ab*Ag-E] + Ag-E + Ag**

heterogenní

- : kompetitivní
- : přímá/nepřímá
- : sendvičová

používané enzymy:

alk. fosfatáza, peroxidáza, lysozym, galaktosidáza, glukózooxidáza, glukózodehydrogenáza, malátdehydrogenáza

výhody

- : různorodost
- : víceúčelovost
- : zesílení signálu

nevýhody

- : nestabilita
- : rozměr značky
- : heterogenní

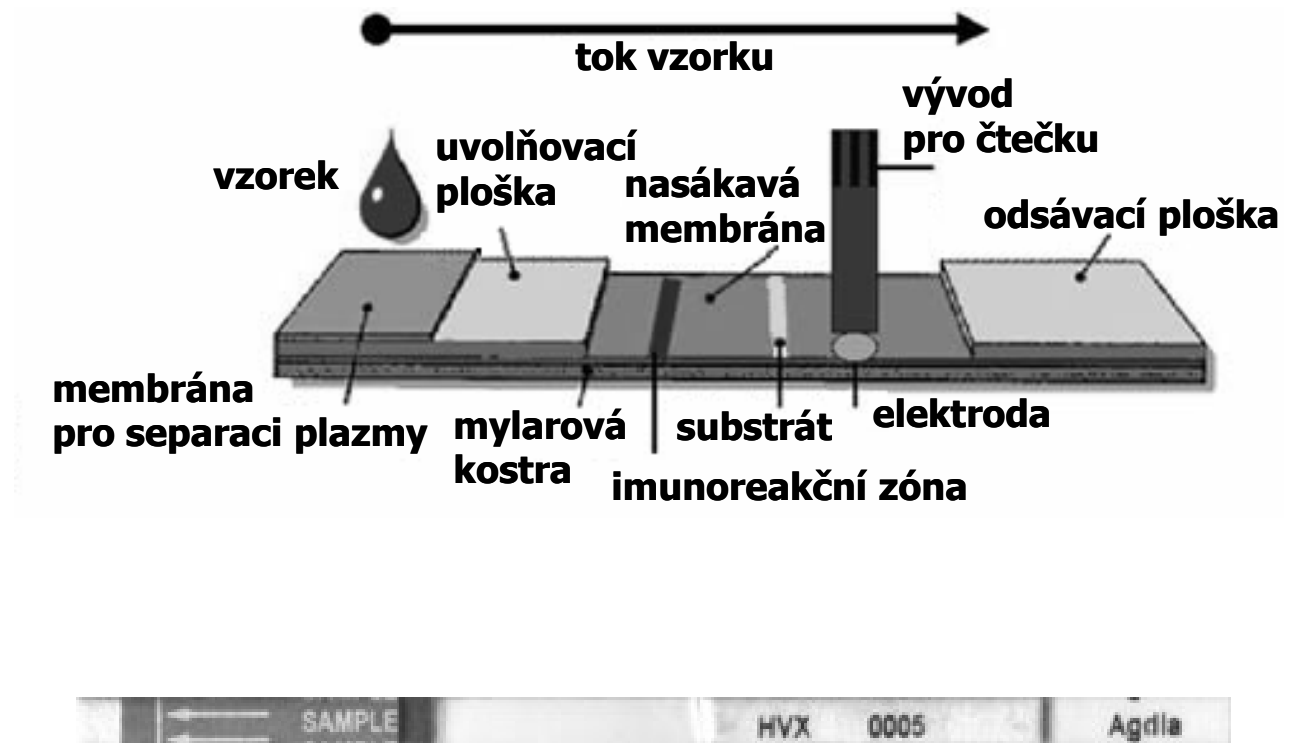
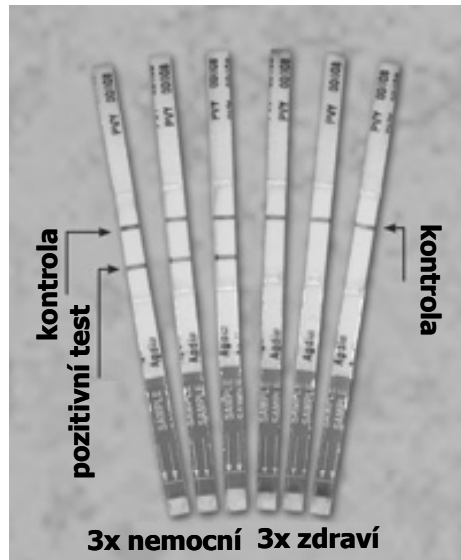
imunoanalyzátořy

- : plně automatizované imunoanalýzy
- : většinou na bázi heterogenního sendvičového imunostanovení (EIA, FIA)
 - :: každý výrobce má vlastní modifikaci postupu (patenty)
- : relativně nízká cena (masová produkce Ab)



imunoproužky

- : specializované jednoúčelové immunoanalýzy na jedno použití
- : většinou na bázi heterogenního sendvičového imunostanovení (EIA)
- : relativně nízká cena (masová produkce Ab)



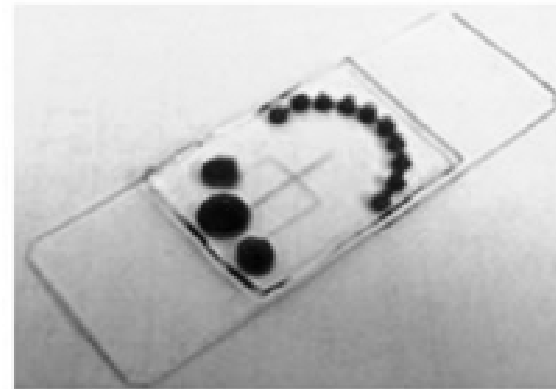
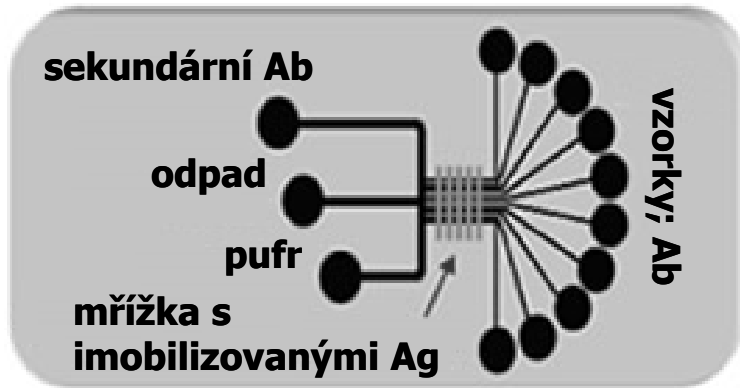
měřiče pro akutní analýzy na místě (POCT) na bázi imunoanalýzy

- : specializované jedno- i víceúčelové miniimunoanalýzátory
- : většinou na bázi heterogenního sendvičového imunostanovení (EIA)
- : vycházejí z použití imunoproužků



imunočipy

- : další miniaturizace
- : klasické výhody čipové technologie

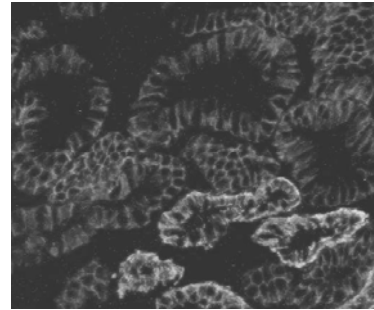


- : OptoLabCard+Skinpatch
- :: lab-on-foil

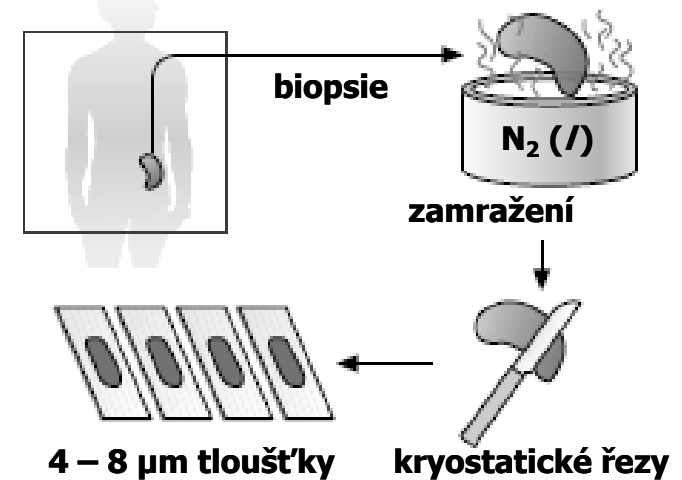
⇒ **The SmartBioPhone™**

imunohistochemie

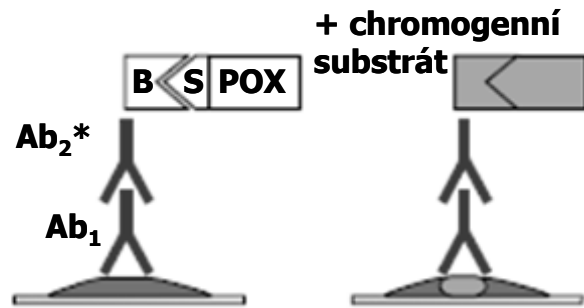
imunocytochemie



aplikace imunologických metod při studiu tkání a izolovaných buněk
: detekce nádorů a patologických změn

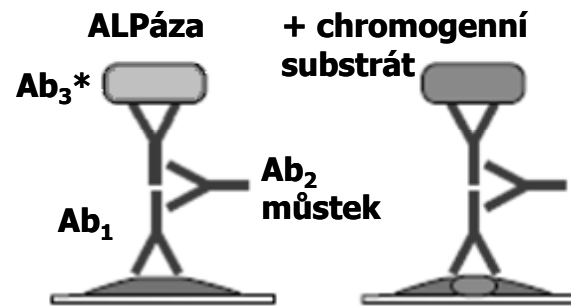


nejčastěji značení fluroforem, kovem a enzymem
: přímá, nepřímá, nepřímá třístupňová (Ab-„můstek“) – zesilování signálu

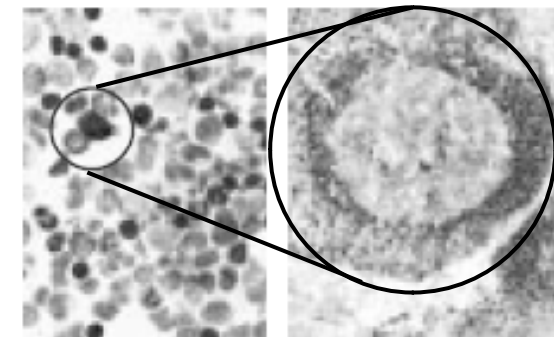


metoda BSPOX

B – biotin, S – streptavidin, POX – peroxidáza

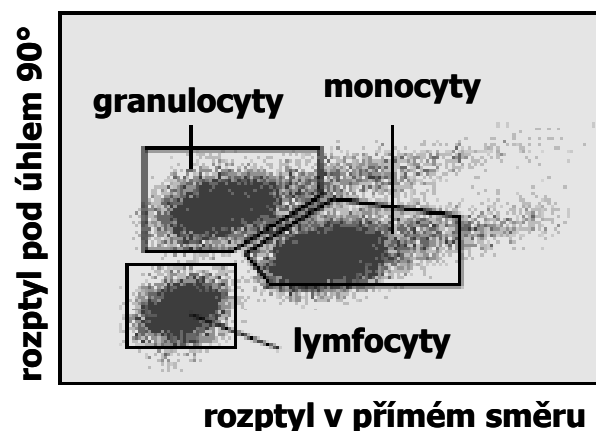
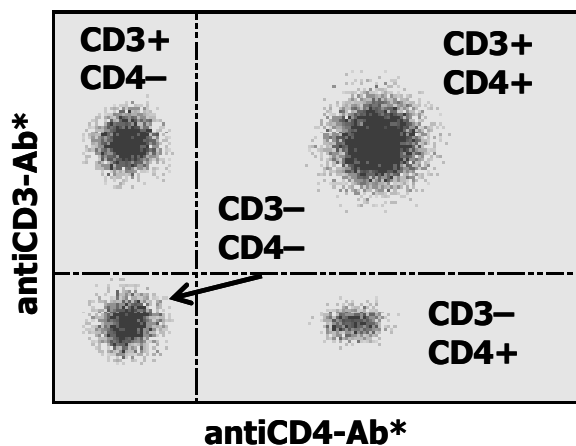
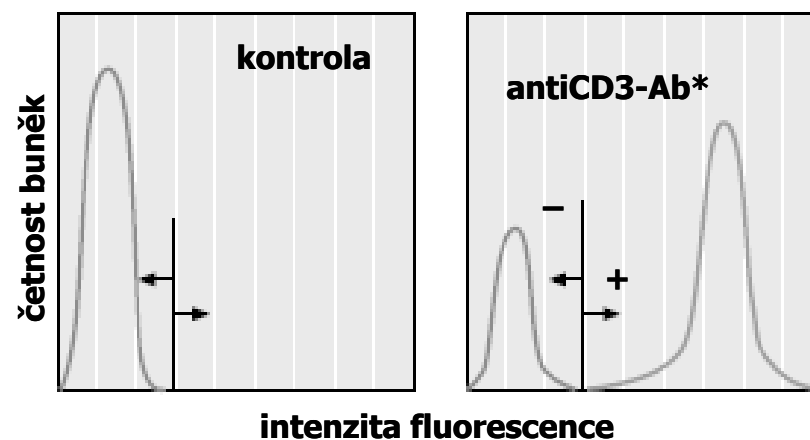
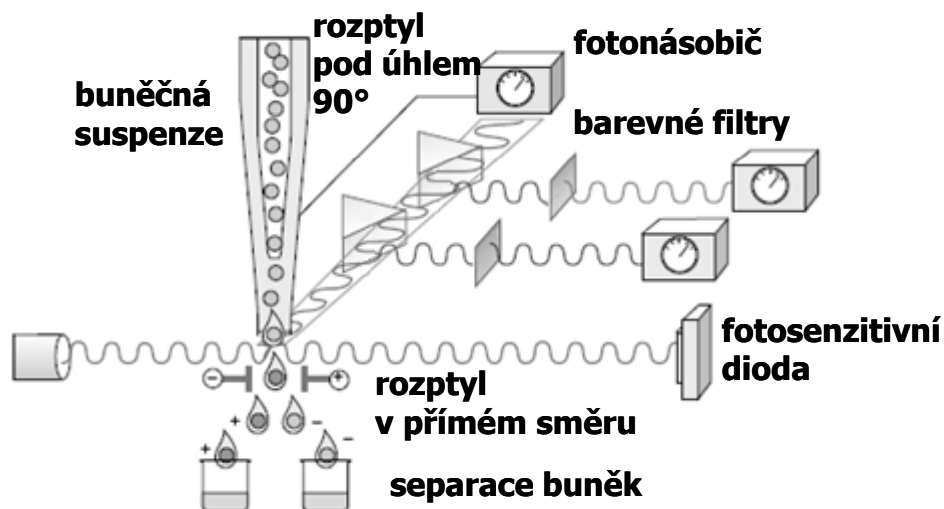


metoda APAAP



aplikace imunologických metod při studiu buněk IS
: detekce patogenních změn v IS

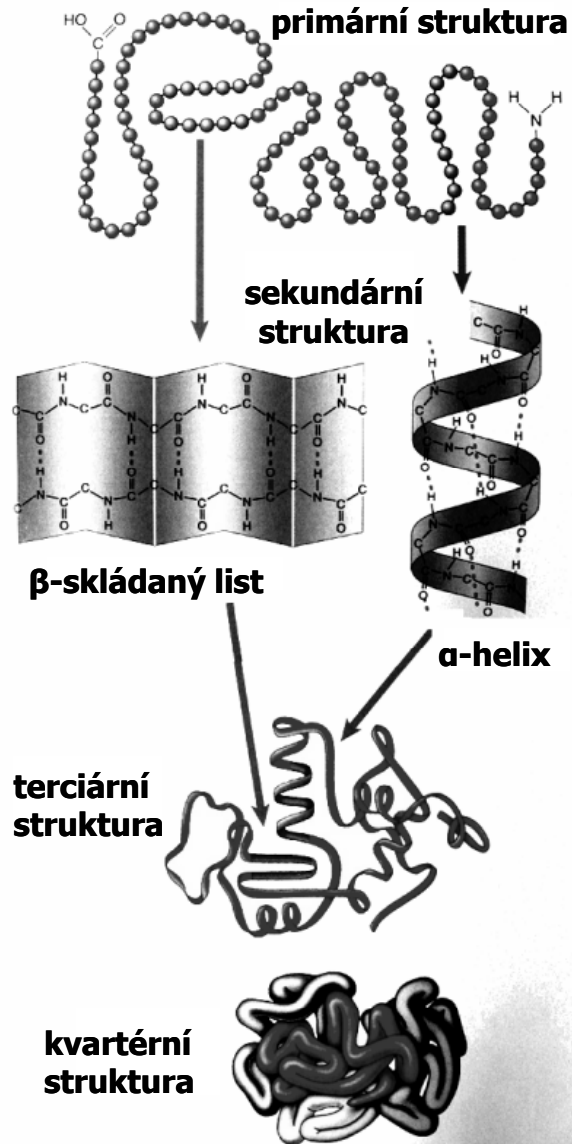
nejčastěji značení Ab s fluroforem
: průtoková cytometrie



analýza proteinů v klinické biochemii

VII.

struktura proteinů



primární struktura – pořadí aminokyselin
(sekvence)

sekundární struktura – samovolný vznik

terciární struktura – 3D (indukované chaperoniny)

kvarterní struktura – suprakomplexy

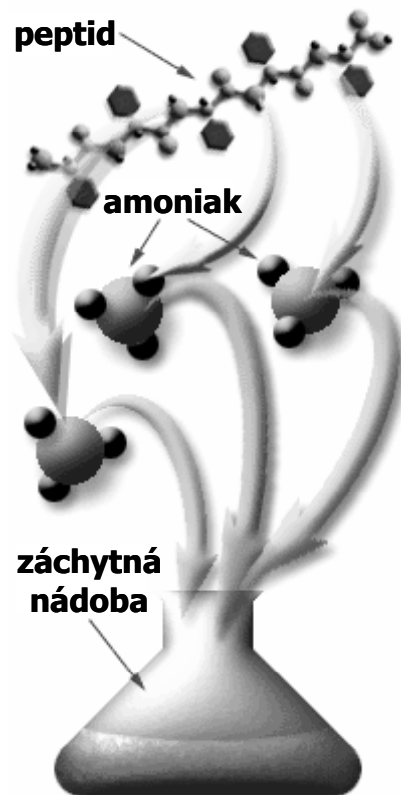
specifická – stanovení určitého proteinu

nespecifická – stanovení celkové bílkoviny *nebo* jednoho proteinu

nespecifická stanovení

Kjeldahlova metoda [chjeldálova]

polypeptid \Rightarrow **amoniak**, obsah p. se definuje dle organického dusíku



vzorek se mineralizuje koncentrovanou kyselinou sírovou v přítomnosti katalyzátoru; aminový dusík \Rightarrow **amonné ionty**

amonné ionty se převedou na amoniak zahřátím a destilací se zachytí ve sběrné nádobě, kde se opět přemění na amonné ionty

amonné ionty se stanoví **neutralizační titrací**

spektrofotometrické stanovení (SPEFO)

205; 260 a 280 nm

peptidová vazba; aromatické struktury

absorbanci ovlivňují

: sekundární, terciární i kvartérní struktury

: faktory jako pH, iontová síla *atp.*

(ne)známý vzorek

: kalibrace na BSA \Rightarrow extinkční koeficient při 205 anebo 280 nm

neznámý vzorek s možnou kontaminací DNA

: měření při 260 a 280 nm

: koncentrace (mg/ml) = $(1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$

neinvazivní (nespotřebovává vzorek)

: nepřesné, snadné falešně pozitivní výsledky – kontaminace

SPEFO – biuretová metoda

: invazivní, zdlouhavé, velká spotřeba vzorku

biuretové činidlo:

25 g vínanu sodno-draselného

0.75 g síranu měďnatého 5H₂O

1.25 g jodidu draselného

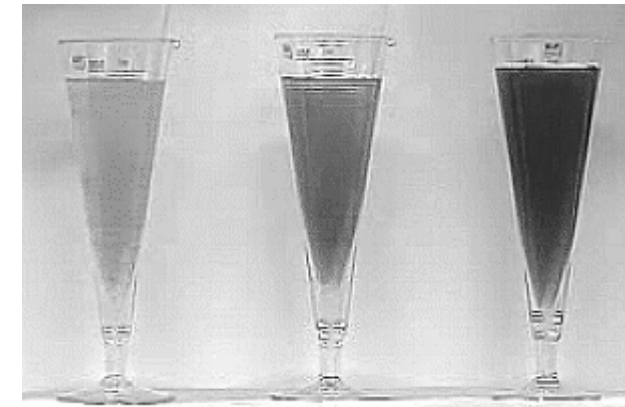
:: vše v 100 ml 0.2 M NaOH

: vzorek 1 – 10 mg/ml proteinu

: kalibrace na BSA

: přidáme biuretové činidlo, rozmícháme a necháme stát 20 min

: absorbanci měříme při 550 nm



biuretové
činidlo

glycin

bílek

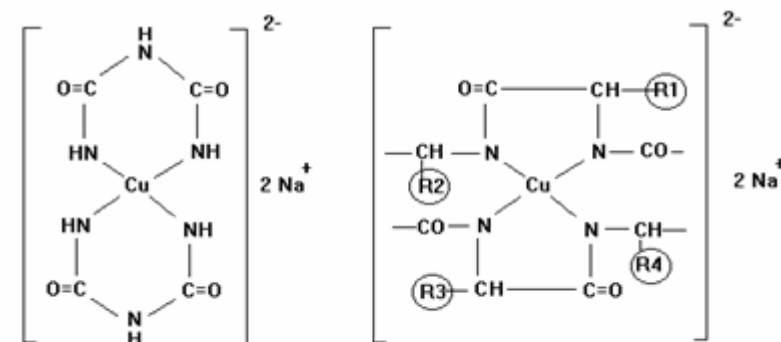
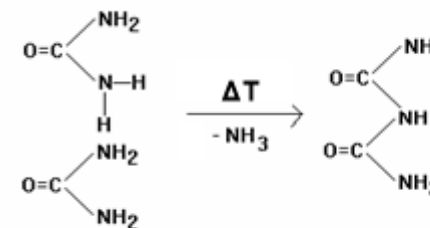
vínan – rozpustnost iontů mědi v alk. #

jodid – katalýza redukce $\text{Cu}^{2+} \Rightarrow \text{Cu}^{1+}$???

chylózní sérum – falešně pozitivní výsledky

reagují i tyto skupiny

$-\text{CONH}_2$, $-\text{C}(\text{NH})(\text{NH}_2)-$ a $-\text{CSNH}_2$



SPEFO – Lowryho metoda

: variace na biuretovou metodu

v alkalickém prostředí s měďnatými ionty

: po přidání **Folin-Ciocalteu reagentu** se tento váže na protein, je zvolna redukován na heteropolymolybdenanovou modř pomocí Cu^{2+} -katalyzované oxidace aromatických kyselin; barva se mění ze **žluté** na **modrou**

: 100 μl vzorku + 1.0 ml Lowryho reagentu (alkalické prostředí CuSO_4)

: inkubace 30 min při 25 °C

: + 100 ml Folin-Ciocalteuova reagentu

: inkubace 30 min při 25 °C

: měříme při 595 nm

Folin-Ciocalteu

750 ml vody; 100 g Na_2WO_4 ; 25 g

Na_2MoO_4 ; 50 ml 85% kys. fosforečné; 100 ml

konc. HCl; 150 g Li_2SO_4 + pár kapek Br_2

více rozdílů mezi proteiny, mnohdy nestačí jen kalibrace na BSA

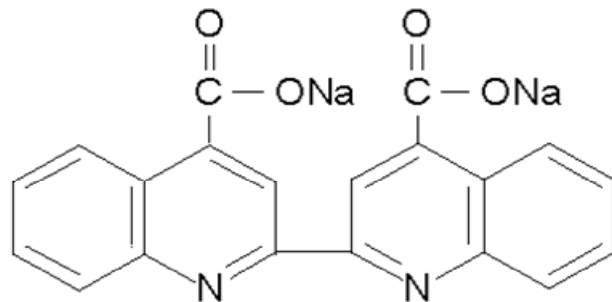
interferenty:

barbital, CAPS, CsCl_2 , citronan, cystein, dietanolamin, dithiothreitol, EDTA, EGTA, HEPES, merkaptoetanol, Nonidet P-40, fenol, polyvinylpyrrolidon, deoxycholan sodný, salicylan sodný, thimerosol, Tricin, TRIS a Triton X-100

SPEFO – modifikovaná/Smith-Lowryho metoda

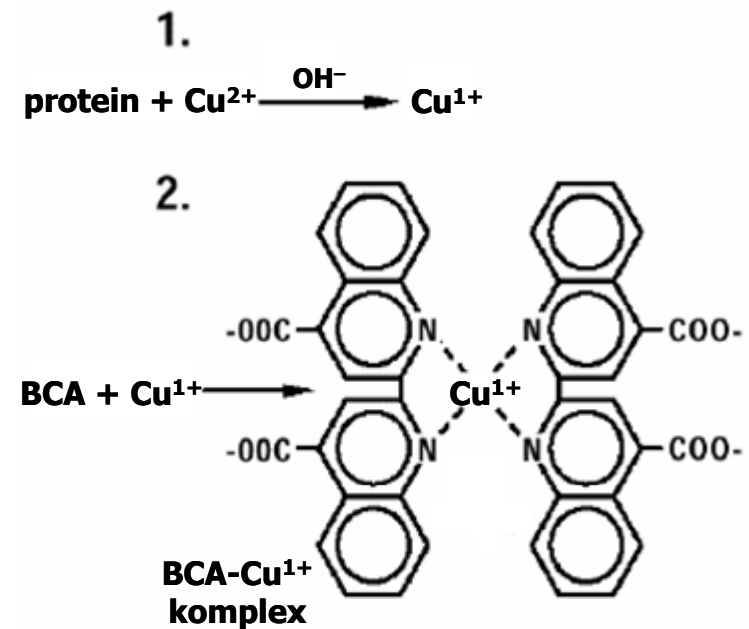
- : provedení podobné jako u Lowryho metody
- : absorbance při 562 nm
- : citlivost nezvýšena, ale snížen vliv kontaminantů

velmi citlivá metoda na přesné pipetování



kyselina bicinchoninová – BCA

mechanismus



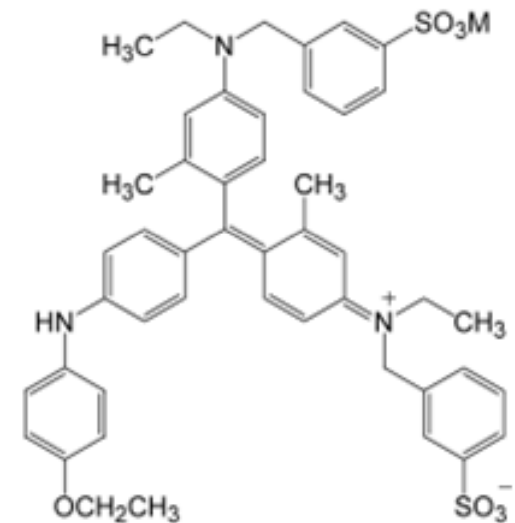
SPEFO – metoda Bradfordové

Δ absorbance Coomassie Brilliant Blue G-250 po vazbě na protein

- : kalibrace na BSA (1 mg/ml)
- : absorbance při 595 nm bez inkubace

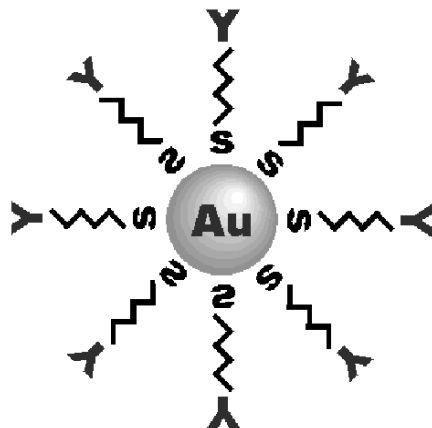
není citlivé na interferenty, vyjma vysokých konc. tenzidů

významný rozdíl abs. hodnot protein od proteinu
⇒ **vhodná kalibrace!**

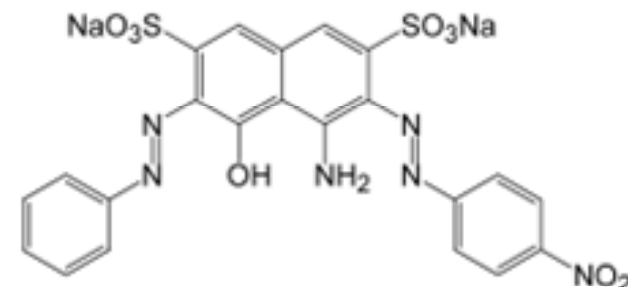


jiné modifikace SPEFO metody

koloidní zlato



Amidočernň



A

imunoanalýza

A. bez separace

B. se separací

hmotnostní spektrometrie

peptidové otisky prstů (peptide mass fingerprinting; PMF)

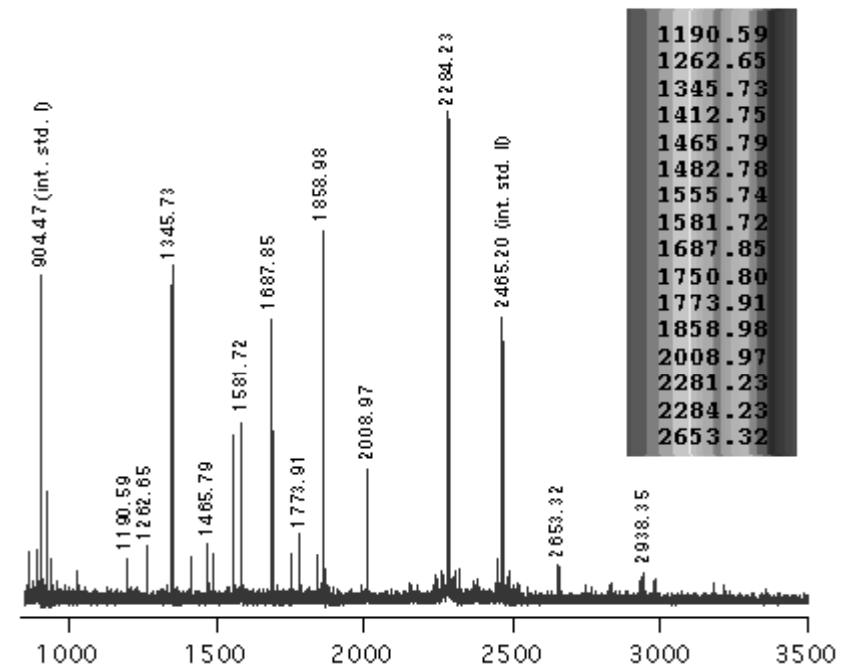
MFLKAVVLT	ALVAVAGARA	EVSADQVATV	MWDYFSQLSN	NAKEAVEHLQ	KSELTOQLNA	LFQDKLGEVN	TYAGDLQKKL
VPFATELHER	LAKDSEKLKE	EIGKELEELR	ARLLPHANEV	SQKIGDNLRE	LQORLEPYAD	QLRTQVNTQA	EQLRRQLTPY
AQRMERVLRE	NADSLQASLR	PHADELKAKI	DQNVEELKGR	LTPYADEFKV	KIDQTVEELR	RSLAPYAQDT	QEKLNHQLEG
LTFQMKKNAE	ELKARISASA	EELRQLAPL	AEDVRGNLKG	NTEGLQKSLA	ELGGHLDQQV	EEFRRRVEPY	GENFNKALVQ
QMEQLRQKLG	PHAGDVEGHL	SFLEKDLRDK	VNSFFSTFKK	KESQDKTSL	PELEQQQEQQ	QEQQQEQVQM	LAPLES

: enzymatické štěpení
proteáza; chemická činidla

: specifické štěpení
(jen u určitých aminokyselin) – trypsin

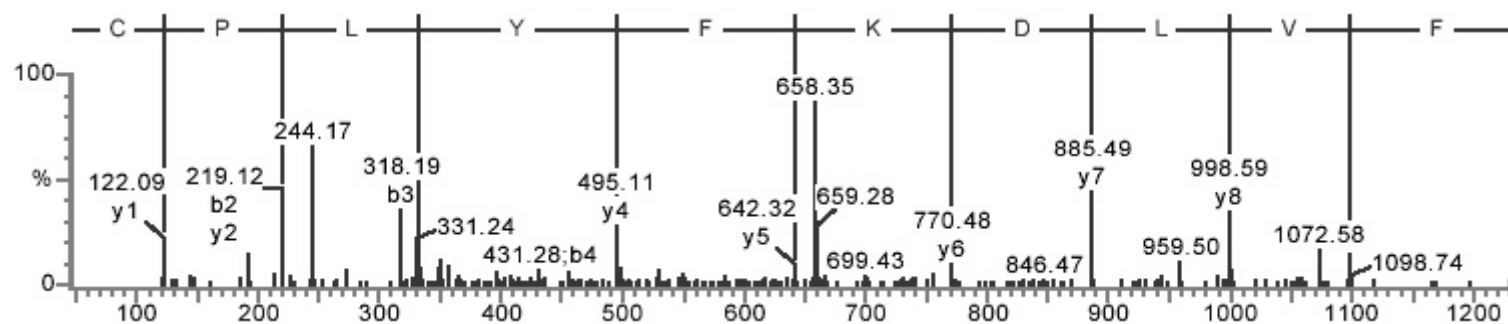
: *in silico* štěpení – modelové štěpení

: srovnání štěpení *in silico* a ve vzorku
statistické vyhodnocení shody
(MOWSE skóre)



sekvenace proteinu

- : enzymatické štěpení – proteázou**
- : specifické štěpení (jen u určitých aminokyselin) – trypsin**
- : další štěpení v analyzátoru hmot. spektrometru (polem, kolizí)**
- : specifická fragmentace peptidické vazby**



Edmanova sekvenace

separace fenylthiohydantoinových derivátů

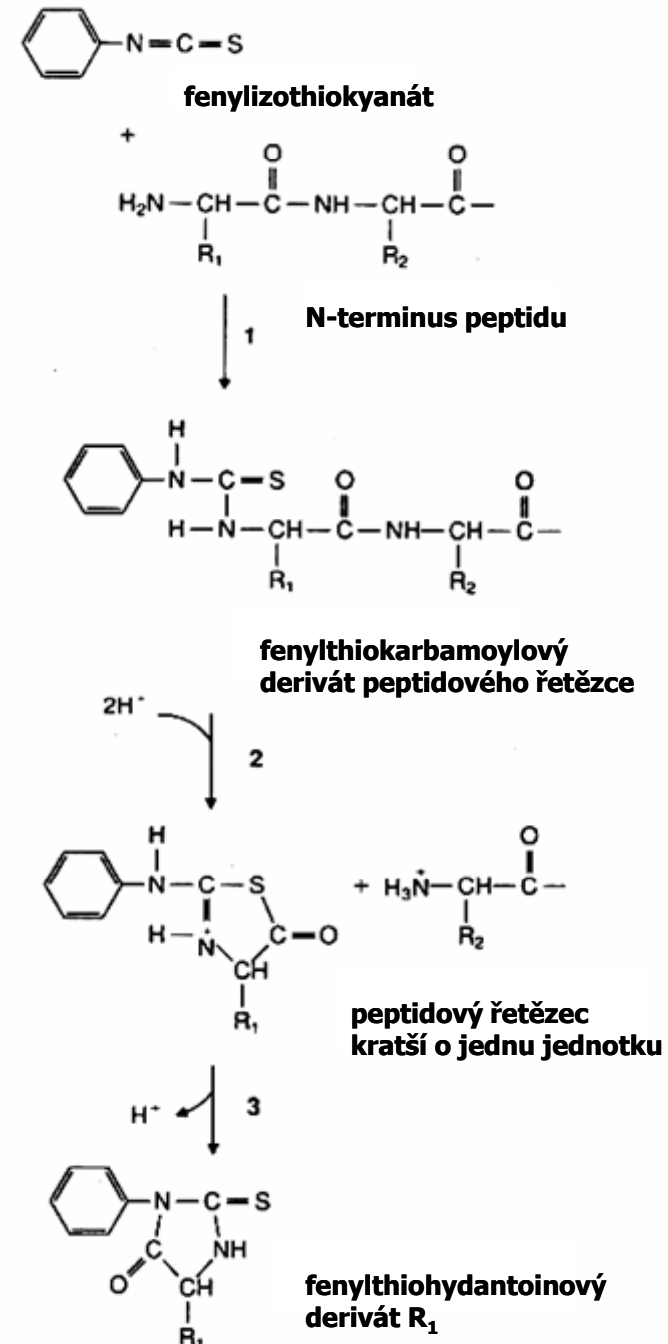
- : iontově párová HPLC
- : RP-HPLC
- : CZE

jiné metody identifikace – bod tání

srovnání Edman vs MS

výhody MS – malá spotřeba vzorku
předseparace na PAGE

výhody ES – automatizovatelné
rutinní metoda



B

gelová elektroforéza (PAGE – polyakrylamidová gelová elfa)

: separace v gelu + vhodné barvení

denaturující PAGE – SDS normalizuje náboj, dělení jen podle M_w

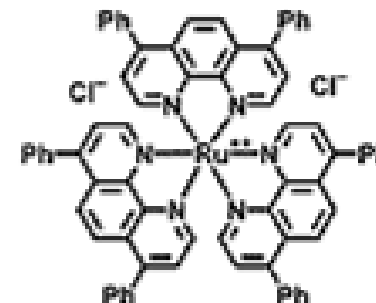
:: **denzitometrie**

druhy barviv

: *barvení stříbrem* – nekvantitativní

: *modř Coomassie Brilliant* – semikvantitativní

: *SYPRO rubínová* – kvantitativní



hmotnostní spektrometrie

: pomocí izotopově značeného vnitřního standardu

kapilární elektroforéza

HPLC

: *UV detekce* – nevhodná

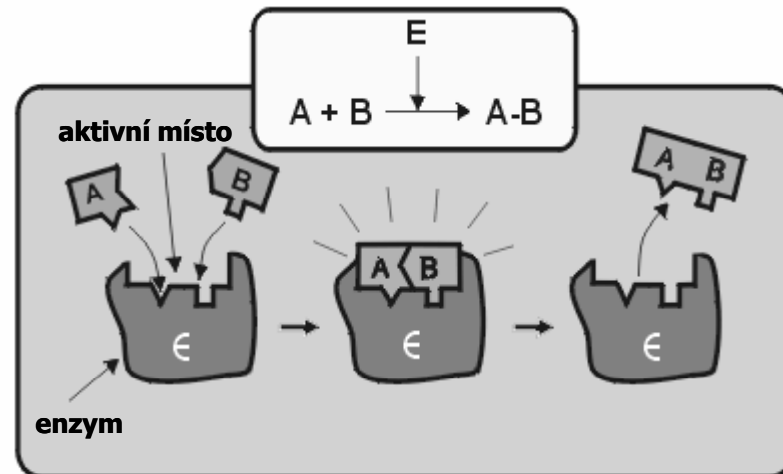
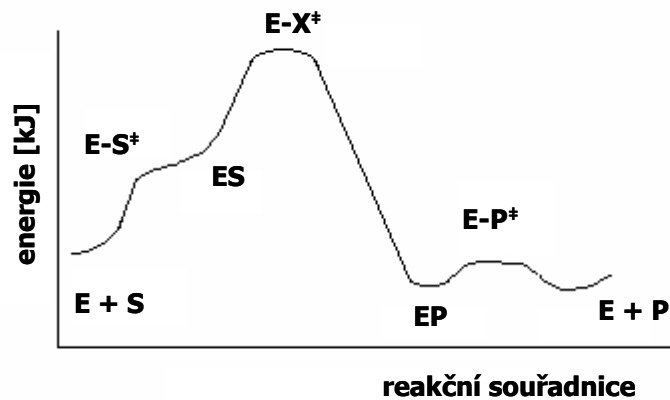
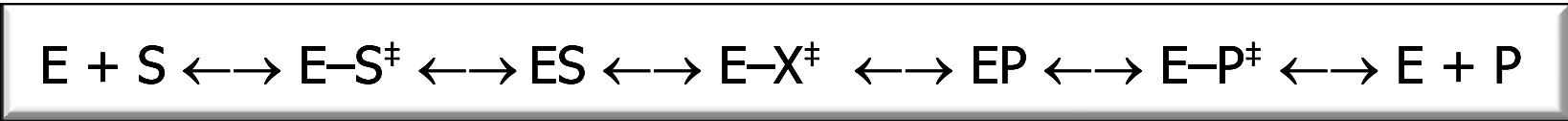
: *fluorescenční detekce* – předkolonová derivatizace
danzylchlorid, *o*-ftaldialdehyd

enzymová analýza

enzym ~ biokatalyzátor

holoenzym = koenzym (kofaktor) + apoenzym

formy jednoho enzymu – **izoenzymy**



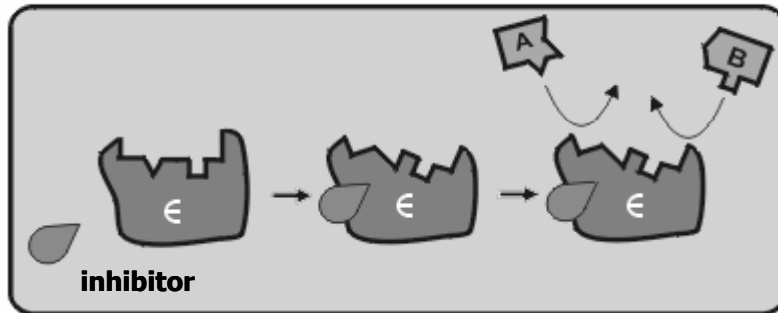
substrát (S) se váže do **aktivního centra** \Rightarrow komplex enzym-substrát [ES]

[ES] \Rightarrow P; **enzym regeneruje**

vazba ES – vysoce specifická; závisí na AA složení a kofaktorech

účinnost enzymu – katalytická aktivita; koncentrace katalytické aktivity

inhibice enzymové reakce



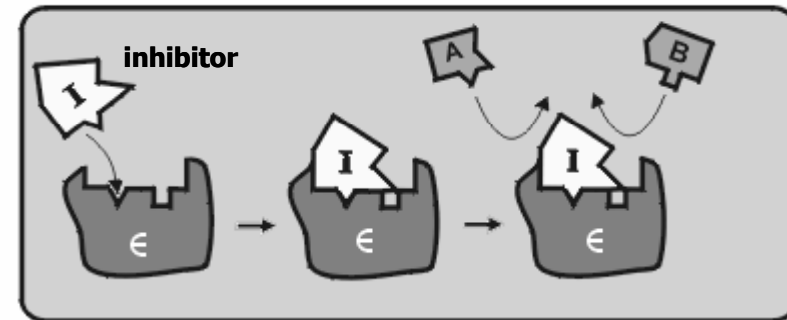
nekompetitivní

inhibitory : specifické a nespecifické
: reverzibilní a ireverzibilní

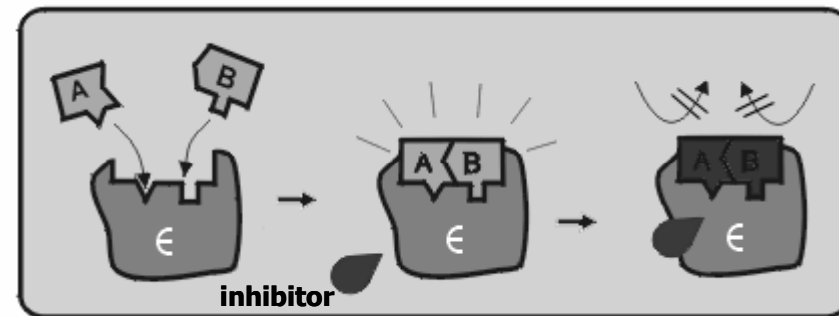
aktivované enzymové reakce

- : kationty: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ...
- : anionty: Cl^-
- : organické látky: metabolické meziprodukty a hormony

allosterické enzymy

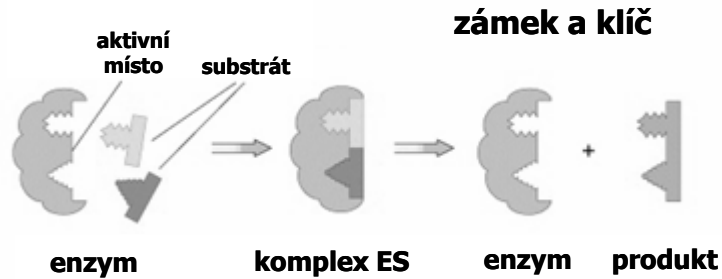


kompetitivní



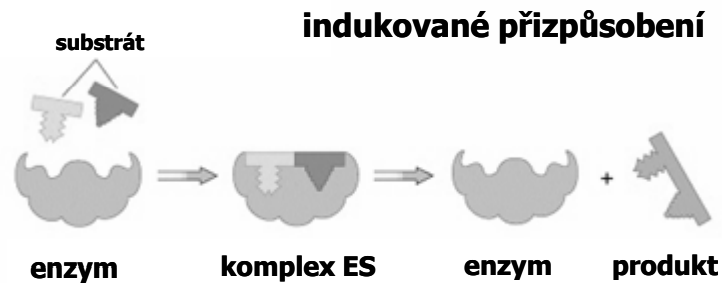
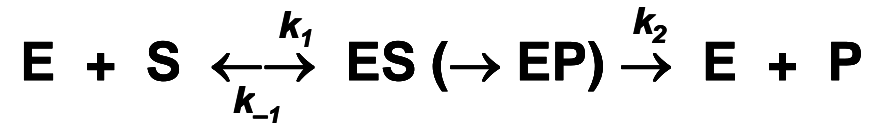
akompetitivní

mechanismus enzymové katalýzy



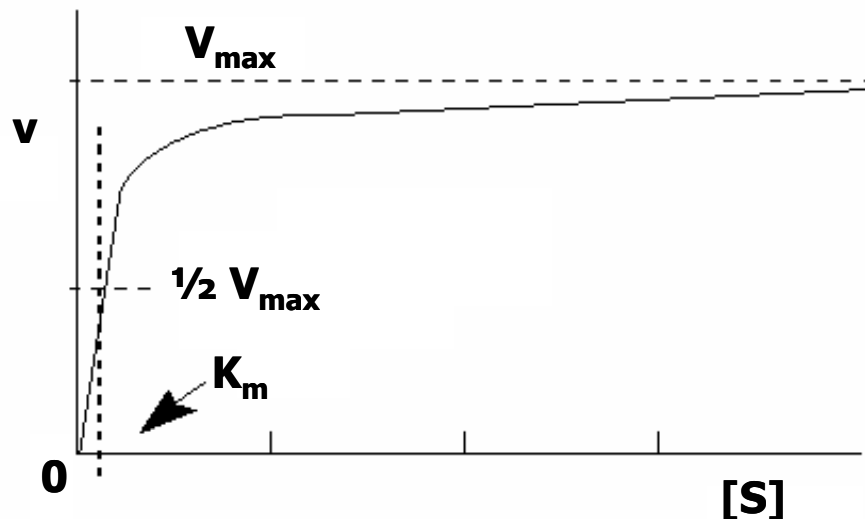
- : obecná acidobazická katalýza
- : nukleofilní a elektrofilní katalýza

kinetika enzymové reakce s jedním S



$$v = -d[S] / dt = k_1 * [E] * [S] - k_{-1} * [ES]$$

$$v = d[P] / dt = k_2 * [ES]$$



$$v = V_{max} * [S] / (K_m + [S])$$

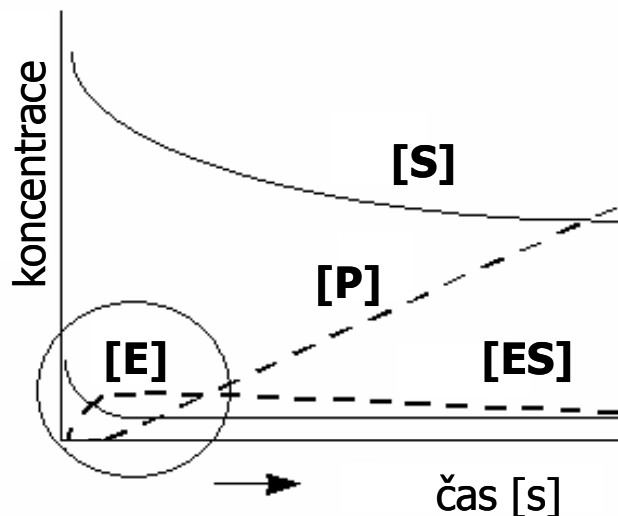
rovnice Michaelise a Mentenové

V_{max} – maximální rychlost

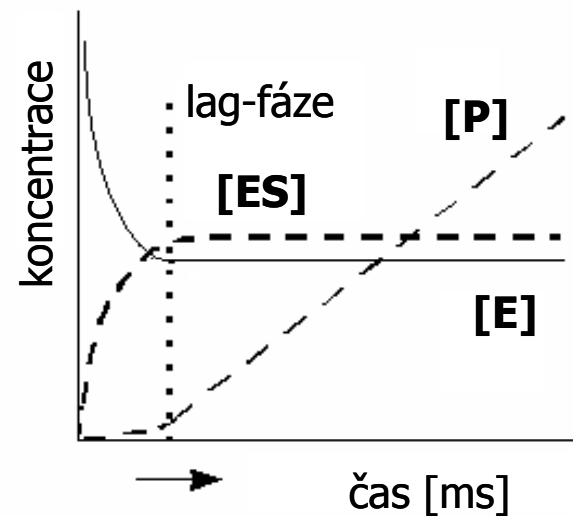
K_m – Michaelisova konstanta;
koncentrace S, kde $v = 1/2 V_{max}$

enzym + substrát \Rightarrow
 \Rightarrow krátká perioda pro vytvoření ES, tzv. **lag-fáze** (indukční perioda)

[E] se enzymu snižuje, koncentrace [ES] narůstá až do ustáleného stavu
(*steady state*, ms) \Rightarrow [ES] = *konst.*, [P] = 0



enzymová kinetika



výřez

teplota

: rozsah teplotních optim: 0 až 150 °C

:: běžný rozsah teplotní stability: 20 až 40 °C

zvýšení teplotní stability

:: kotvení na nosič;

:: biotechnologický / genetický zásah

rychlost enzymatické reakce – **Arrheniův zákon**

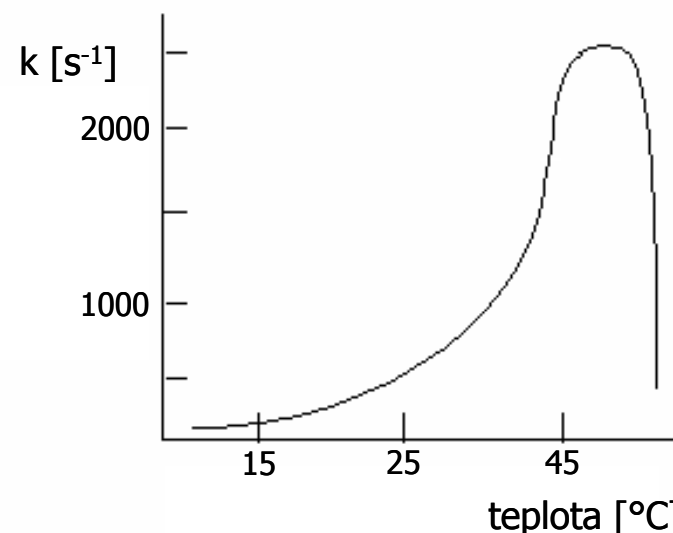
pH

dán počtem a kvalitou (pK) disociovatelných skupin

: pH optimum enzymu se syntetickými substráty *in vitro*

:: je odlišné od pH optima pro enzym *in vivo*

vliv reakčních podmínek



pufr

: často i jiný význam než jen nastavení optimálního pH
:: **synergický efekt** pufru – kumulace efektů

jednoduché pufr
amfolyty

pufr jako druhý enzymový substrát

stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy (ALP)

enzymová aktivita zásadně závisí na typu pufru

: **uhličitan** – ALP jako hydroláza

: **aminoalkohol** – ALP jako fosfáttransferáza

aminoalkoholový pufr je současně druhým enzymovým substrátem

stanovení katalytické koncentrace γ -glutamyltransferázy (GMT)

akceptorem glutamylové skupiny aminokyselina jsouc druhým enz. substrátem

:: bez aminokyseliny – GMT jen jako hydroláza

:: optimálním druhým substrátem je **glycylglycin**

:: současně jako pufr + synergický vliv na GMT; $pK_a \sim$ opt. pH pro GMT

pufr jako specifický moderátor při stanovení enzymu

enzymové turbidimetrické stanovení fibrinogenu s proteolytickým enzymem batroxobinem

- :: rychlost reakce se specificky zvyšuje za přítomnosti glycyglycinu v průměru až o 80 %
- :: enzymová reakce má $\text{pH}_{\text{opt}} = 8$, $\sim \text{p}K_{\text{a}}$ glycyglycinu \Rightarrow současně pufr i aktivátor, synergický efekt

pufr jako nespecifický moderátor reakce

enzymové stanovení glukózy se provádí s glukózaoxidázou (GOD), peroxidázou a oxidační kopulací

- :: **TRIS**: reakce probíhá pomalu a jen zvolna se ustaluje rovnovážný stav
- :: **fosforečnanový pufr**: reakční rychlost se dramaticky zvyšuje a rovnováha se ustaluje rychle

pufr jako stabilizátor enzymové aktivity

stanovení močoviny ureázou

:: v aktivním centru skupinu $-SH \Rightarrow$ pufrů kombinující EDTA (kyselá složka pufru) s různými zásadami; EDTA chrání enzym před inaktivací stopami těžkých kovů

pufr jako zdroj potíží při enzymové analýze

stanovení pomocí ALP

:: dietanolamin a aminometylpropanol: odstrašujícími příklady pufru
::: látky medovité konzistence, nedají se krystalovat a je obtížné je vyčistit
::: obsahují nečistoty interferující při stanovení ALP, která je metaloproteinem; komplexují zinečnaté kationty v aktivním centru ALP

moderátor

aktivátory nebo inhibitory

inhibitor jako analyt: z míry inhibice je možné stanovit koncentraci analytu

substrát

praktické důvody \Rightarrow **syntetické substráty**
strukturní definovanost, průmyslová výroba

: substrát s **autoindikační** vlastností

4-nitrofenylfosforečnan $\xrightarrow{\text{ALP}}$ 4-nitrofenol

: substrát \Rightarrow produkt, jenž je substrátem **indikátorové reakce**

1-naftylfosforečnan $\xrightarrow{\text{ACP}}$ **1-naftyl** + *4-aminoantipyrin* \Rightarrow chinonmonoimin

enzymy jako analyty

stanovení K_m a V_{max}

linearizovaná rovnice Michaelise-Mentenové podle Lineweavera a Burka

$$1/v = 1/V_{max} + K_m / ([S]V_{max})$$

alkalická fosfatáza (ALP)

absorbance 400 nm $\Delta A/\text{min}$

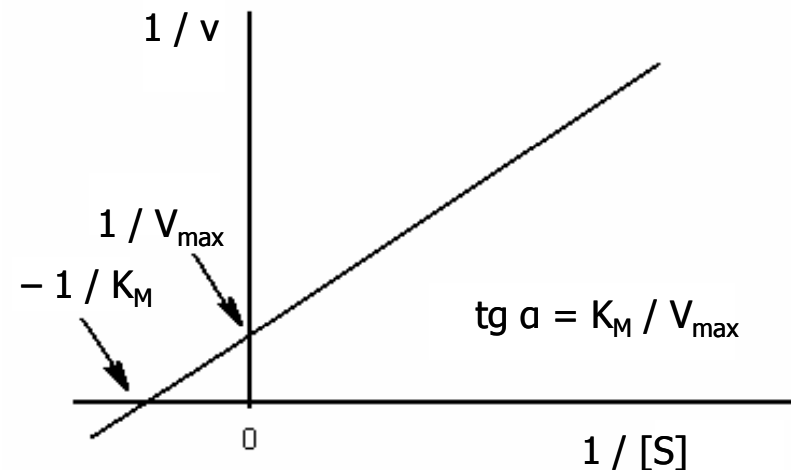
inkubační směs

- : ALP + substrát 4-nitrofenylfosforečnan
- : alkalické prostředí
- : pufr N-metyl-D-glukamin, pH 10.1 při 37 °C

inkubační směs vždy stejné množství enzymu a pufru, startuje se substrátem, jehož koncentrace se plynule zvyšuje

: ΔA se měří mezi 30 až 120 s po startu

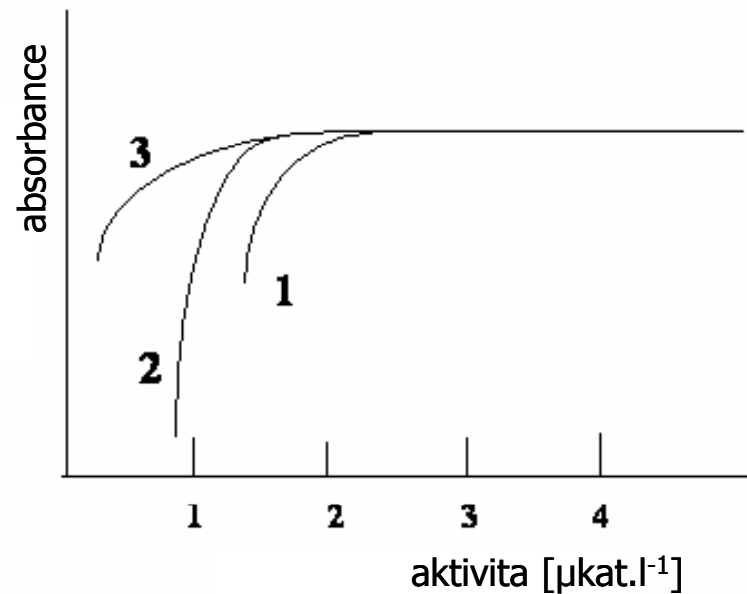
odhad K_m a V_{max} lze provést z grafu linearizované rovnice



enzymy jako analytická činidla

enzym

: rychlá, elegantní, vysoce specifická chemická reakce za šetrných podmínek



urikáza

: přeměna kys. močové na allantoin

1 – urikáza z hovězích jater

2 – urikáza z *Aspergillus flavus*

3 – urikáza z *Candida utilis*

způsoby měření enzymů a substrátů včetně kalibrace

koncentrace katalytické aktivity enzymů

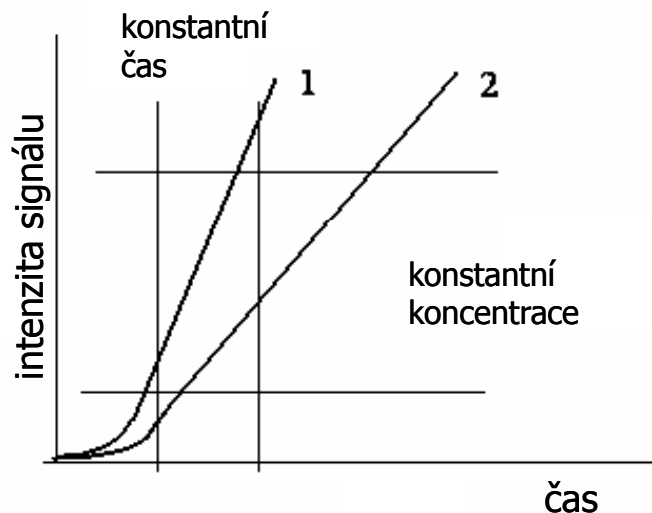
- : analytický postup musí být kinetický
- : reakce podle kinetiky nultého řádu a maximální rychlostí V_{\max}

metodou konstantní koncentrace

- : z času potřebného k dosažení předem zvolené změny koncentrace

metodou konstantního času

- : z velikosti signálu dosaženého za předem zvolený čas



vzorek **1** s vyšší a **2** s nižší aktivitou
svislé přímky

: metoda konstantního času

vodorovné přímky

: metoda konstantní koncentrace

kalibrace

enzym jako analyt – definice koncentrace katalytické aktivity enzymu produkt-em/-y, které vznikají enzymovou transformací příslušného substrátu nebo měřením jeho úbytku

enzym jako analytické činidlo – kalibrace prováděna standardním roztokem použitým místo vzorku

kalibranty

: *certifikované referenční materiály* (CRM)

: *sérové kalibrátory* (lyofilizovaná séra obohacená o příslušné analyty), jejich obsah stanoven definitivními nebo referenčními metodami, pokud jsou k dispozici, nebo pomocí primárních standardů

stručné zásady enzymové analytiky

konstantní teplota inkubační směsi s přesností ± 0.1 °C (37 ± 0.1 °C)

stanovení enzymu: inkubační směs – vzorek (enzym), pufr a další nezbytné látky reakce; se startuje roztokem vytemperovaného substrátu

: objem startéru ne $> 1/20$ až $1/10$ celkového objemu

: substrát musí být v dostatečném přebytku $> cca 20x K_m$

: startovat lze i vzorkem (např. sérem)

stanovení substrátu: jako v bodě 2), startuje se vzorkem

stanovení koncentrace katalytické aktivity enzymu: kalibrace jako definice katalytické koncentrace enzymu produktem, který vzniká transformací substrátu, nebo sérovými kalibrátory a CRM

enzymové stanovení substrátu: kalibrace standardním roztokem substrátu, nebo CRM a sérovými kalibrátory

optimalizace enzymových postupů

reakční směs – více složek navzájem se ovlivňujících, optimalizace tzv. relaxační metodou (SVA)

: shromáždit údaje o enzymu/enzimech včetně K_m (stačí i odhad)

: hledání hlavní parametrů enzymové reakce optimalizačními postupy MVA

metoda – **validace** \Rightarrow splňuje pro daný účel analytické a klinické požadavky

analýza DNA v klinické biochemii



onkologie

vyšetření rakoviny

přítomnost mRNA markerových proteinů: mRNA tyrosináza (melanom), GAPDH (rakovina plic), E-kadherin (trávicí trakt), AIB1 receptor (slinivka břišní), hypermetylace DNA (rakovina prostaty)

prenatální a postnatální diagnostika

vrozené metabolické nebo neurodegenerativní poruchy

galaktosémie, fenylketonurie, Wilsonova choroba, MCAD (porucha metabolismu mastných kyselin), Friedreichova ataxie, syndrom fragilního chromozómu X *atp.*

soudní medicína

zjišťování identity pomocí tzv. genetických otisků prstů

určení příbuznosti; spor o rodičovství (paternita, maternita), identifikace oběti či pachatele

infekční nemoci

průkaz původců chorob

: **vir** (HIV, cytomegalovirus, viry hepatitidy B, C, enterovirus, adenovirus, herpes simplex virus)

: **bakterie** (*Mycobacteria*, zejména *M. tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Bordetella pertussis*, *Borreliae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*)

: **houby a paraziti** (*Candidae*, *Aspergillus*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trichomonas*)

terorizmus – antrax, tularemie, botulizmus *apod.*

sledování post-transplantačních stavů

sledování stavu pacientů po transplantaci

hladiny cytomegaloviru a herpesvirů, DNA-chimérismus

sledování kvality potravin a veterinární lékařství

sledování patogenů

mykobakterie, echinokoky, rotaviry, PRRVS a BVDV viry u chovných zvířat, helikobaktery v mléce, *Escherichia coli* O157 převážně v hovězím mase či enteroviry obecně v potravinách a pitné vodě

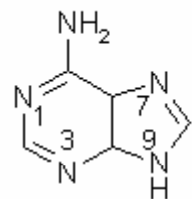
primární struktura – sekvence

: **baze:** puriny – A, G; pyrimidiny – C, T

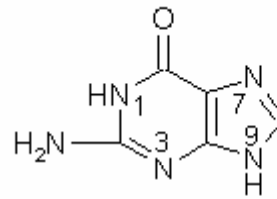
: **nukleosid:** baze + (2'-deoxy)ribóza

: **nukleotid:** nukleosid + 5'-fosforečnan;

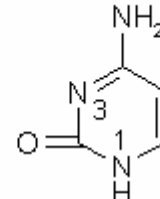
MP – monofosfát, DP – difosfát, TP – trifosfát



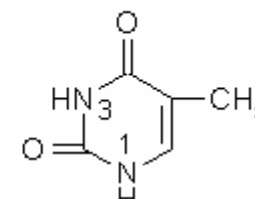
adenin (A)



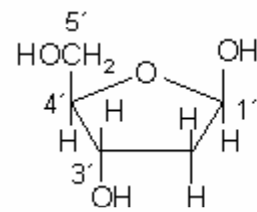
guanin (G)



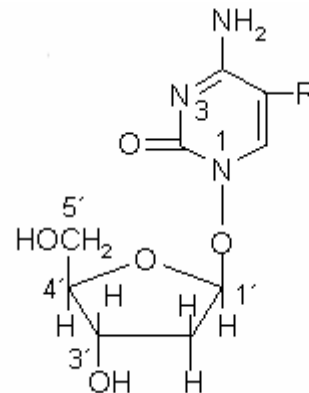
cytosin (A)



thymin (A)

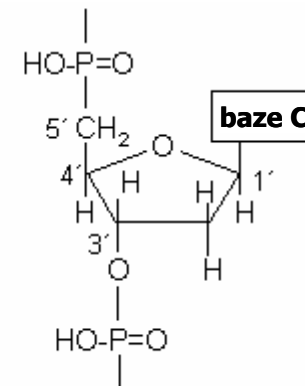


adenin (A)



deoxycytidin (dC), R = H

5-metyldeoxycytidin (mdC): R = CH₃

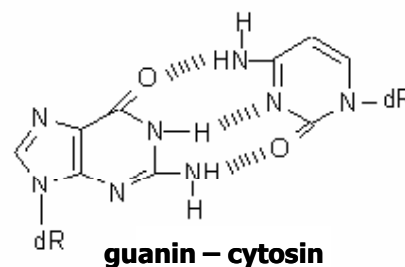
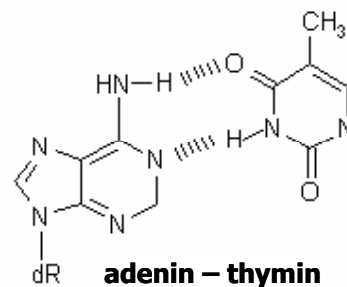
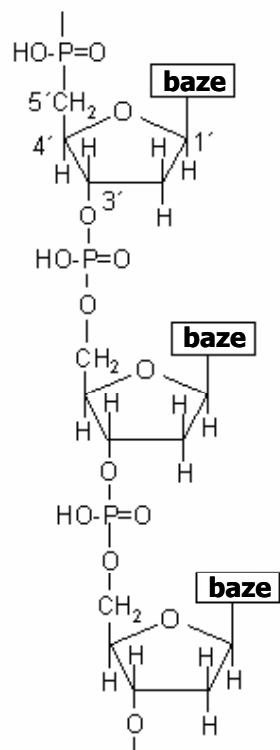


deoxycytidin-3'-5'-difosfát (dCDP)

sekundární struktura – dvoušroubovice DNA

párování bazí (Watson-Crickovo)

G – C
A – T



jiné párování bazí

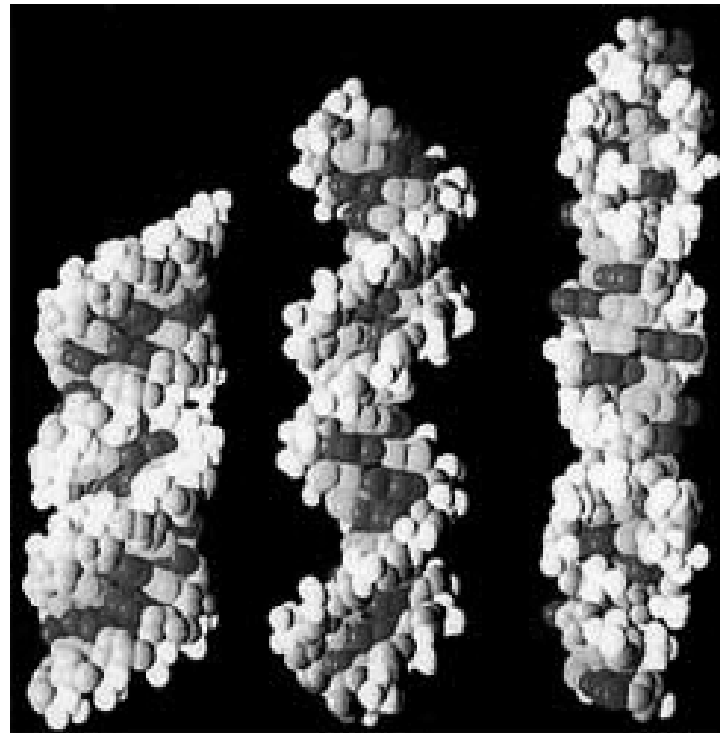
Hoogsteenovo, Wobbleho, obrácené Watson-Crickovo

neshoda (*mismatch*) – nesesnoucí sekvence, „uzel“

G – A
G – T
A – C

ssDNA – jednořetězcová DNA (*single stranded DNA*)
dsDNA – dvouřetězcová DNA (*double stranded DNA*)

dvoušroubovice – formy

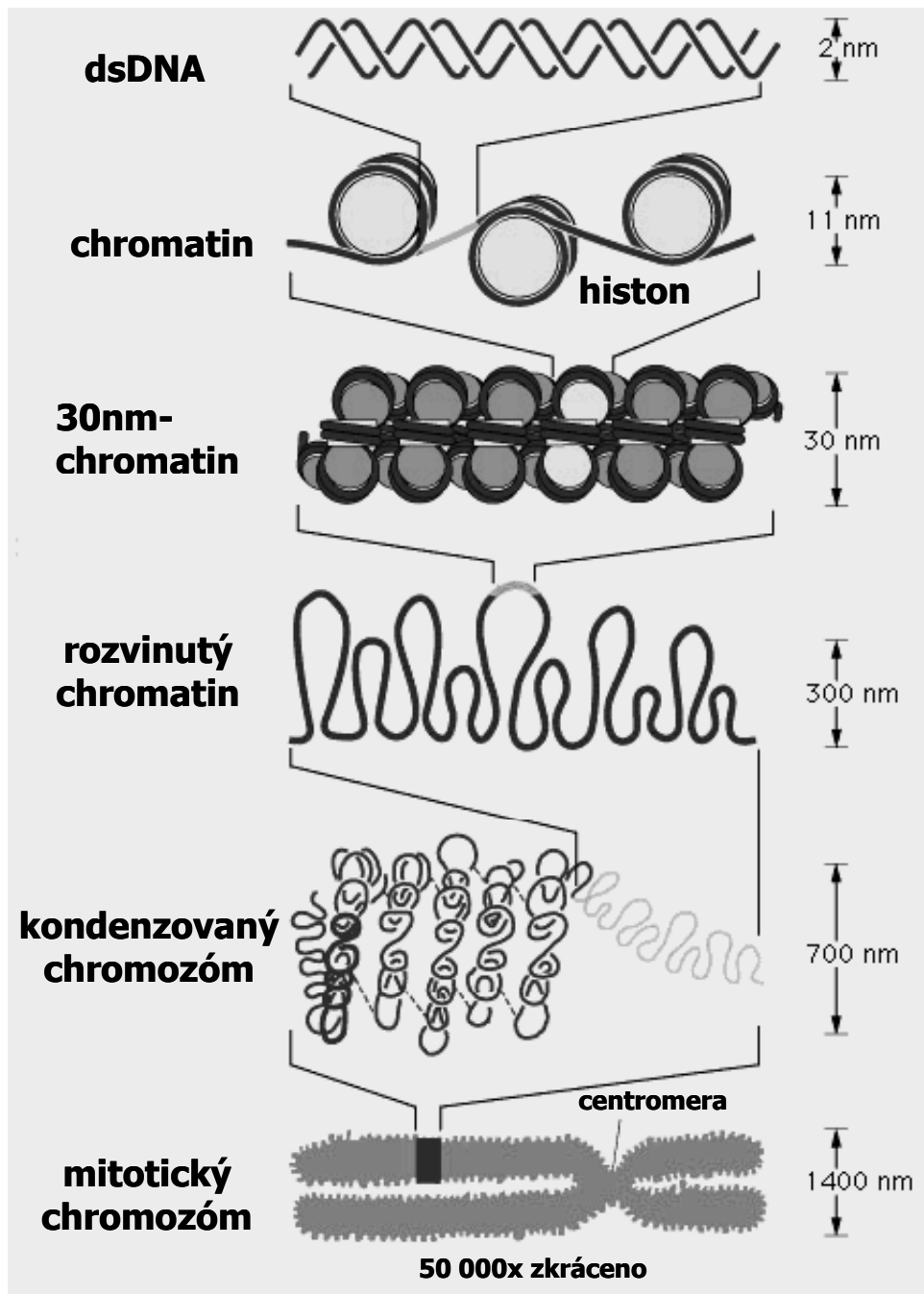


šroubovice

A

B

Z

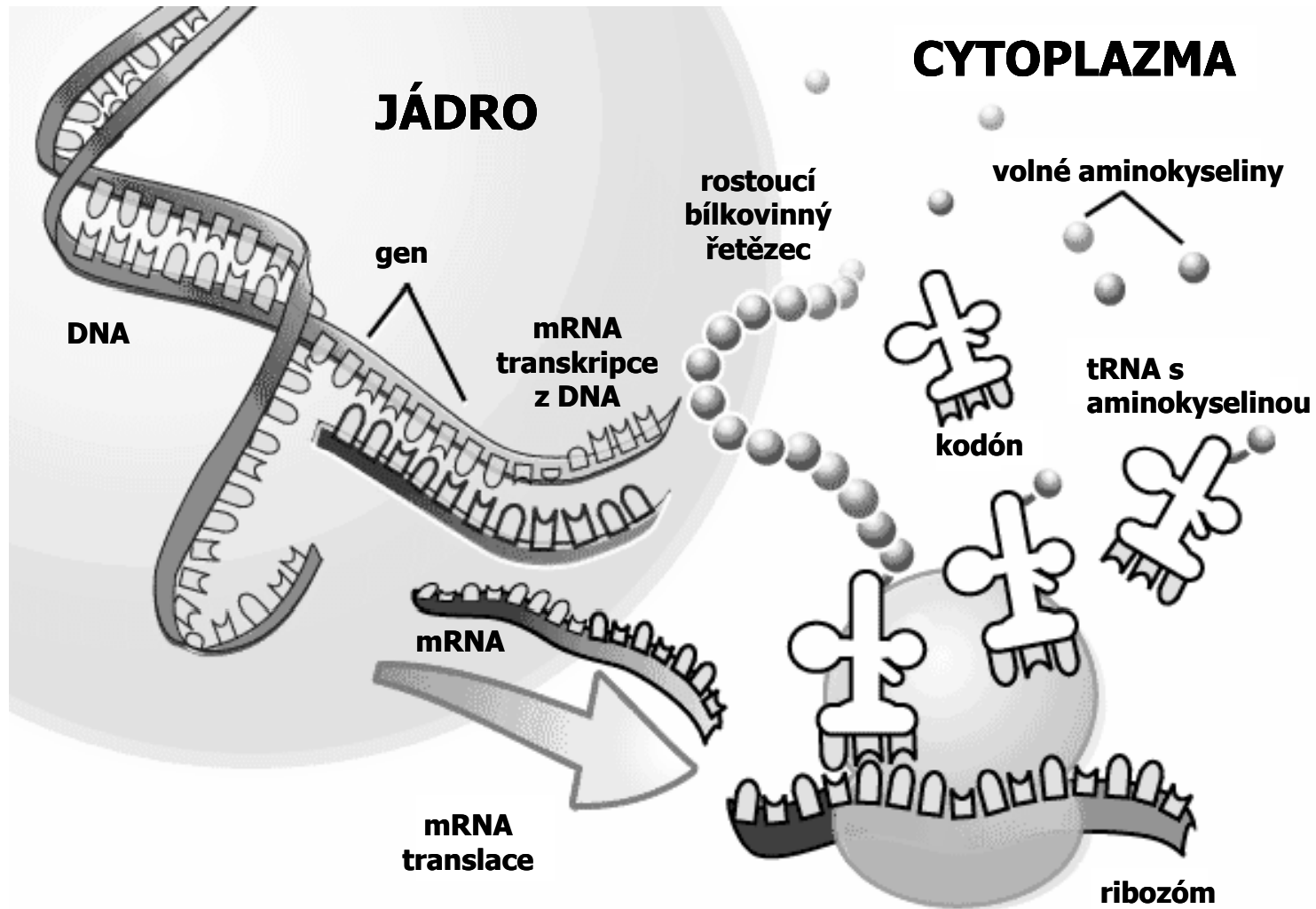


terciární struktura DNA

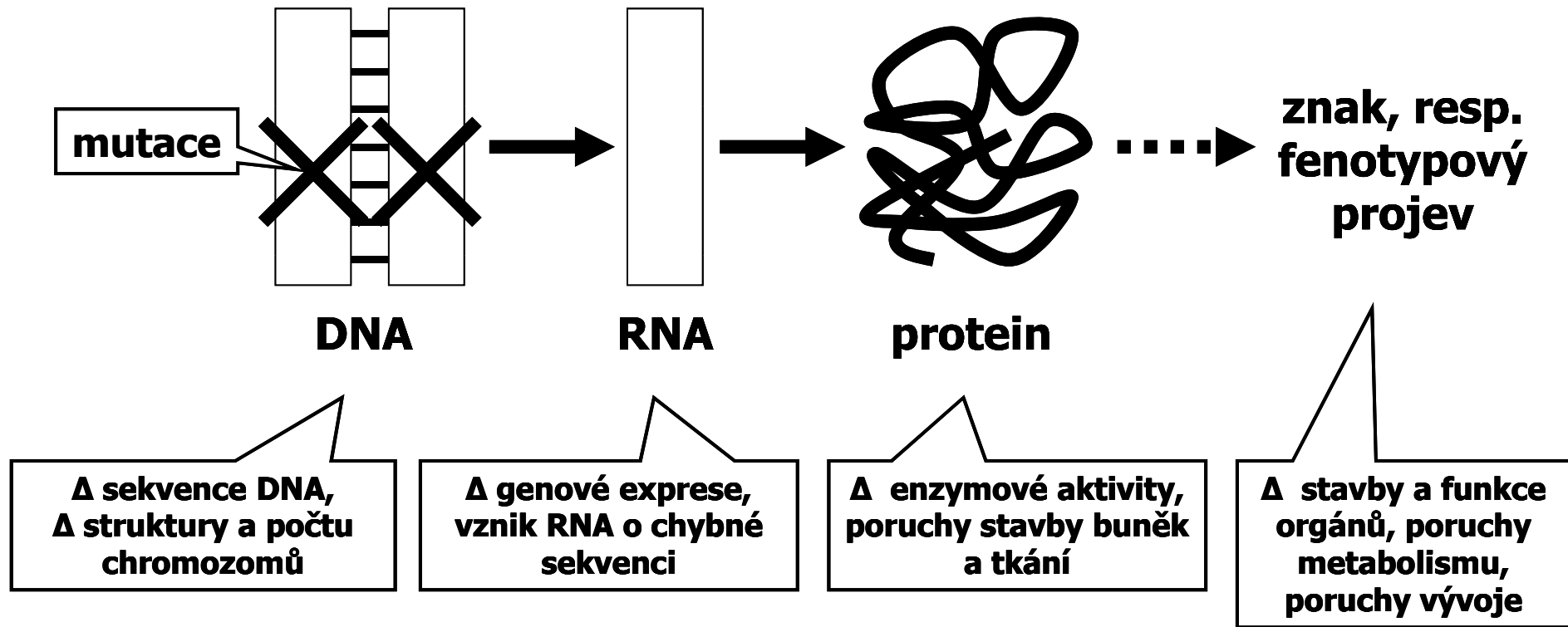
nadšroubovice
 : *topoizomerázy*
 : *histony*

transkripce; DNA \Rightarrow mRNA

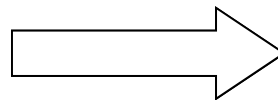
translace; mRNA \Rightarrow protein



diagnostika poruch

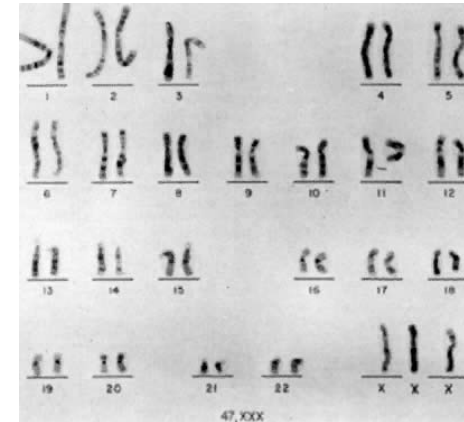


**genealogické
vyšetření**



**molekulárně-
biologické
vyšetření**

analytické postupy



sledování numerické aberace

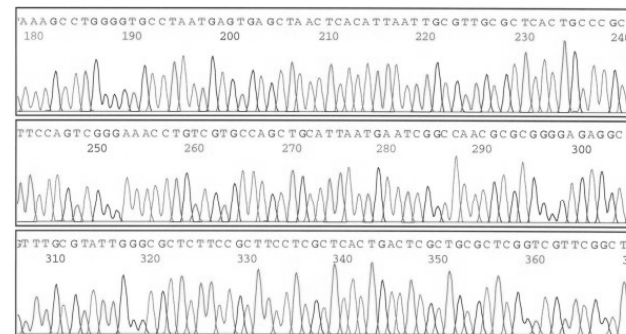
: monozómie (Turnerův syndrom), polyzómie (Downův syndrom)

identifikace známé sekvence

: mutace (fenylketonurie)

identifikace neznámé sekvence

: sekvenace nových patogenů



sledování stavu DNA

: metylace deoxycytidinu (syndrom fragilního chromozómu X)

základní metodické postupy analýzy NA

: zmnožení (PCR)

:: multiplikace výchozí DNA, 25 cyklů $\sim 2^{24} = 17 \times 10^6$ kopií

: štěpení restrikčními enzymy

:: štěpení namnožené DNA (specifické)

: (přenos otisku po gelové elektroforéze)

:: oddělení separovaného úseku DNA

: hybridizace – na přenosové membráně či na čipu

:: reakce s komplementární označenou ssDNA



PCR: 10 – 500 µg lidské DNA
1 – 10 µg bakteriální DNA
0.1 – 1 µg plazmidové DNA

izolace DNA

1) extrakce NA + sorpce na SiO₂ po cytolýze

2) postupná šetrná degradace buněk organickými rozpouštědly

přípravu vzorku a separace DNA

afinitní purifikace – princip hybridizační schopnosti NA

: vzorek + lyzační pufr; + biotinylační pufr; inkubace

: po inkubaci ⇒ mikrozkuška

s povrchem modifikovaným avidinem nebo streptavidinem

adsorpce na silikagelu

: NA v přít. guaninu adsorbují na silikagelu

: eluce pomocí Δ pH a iontové síly

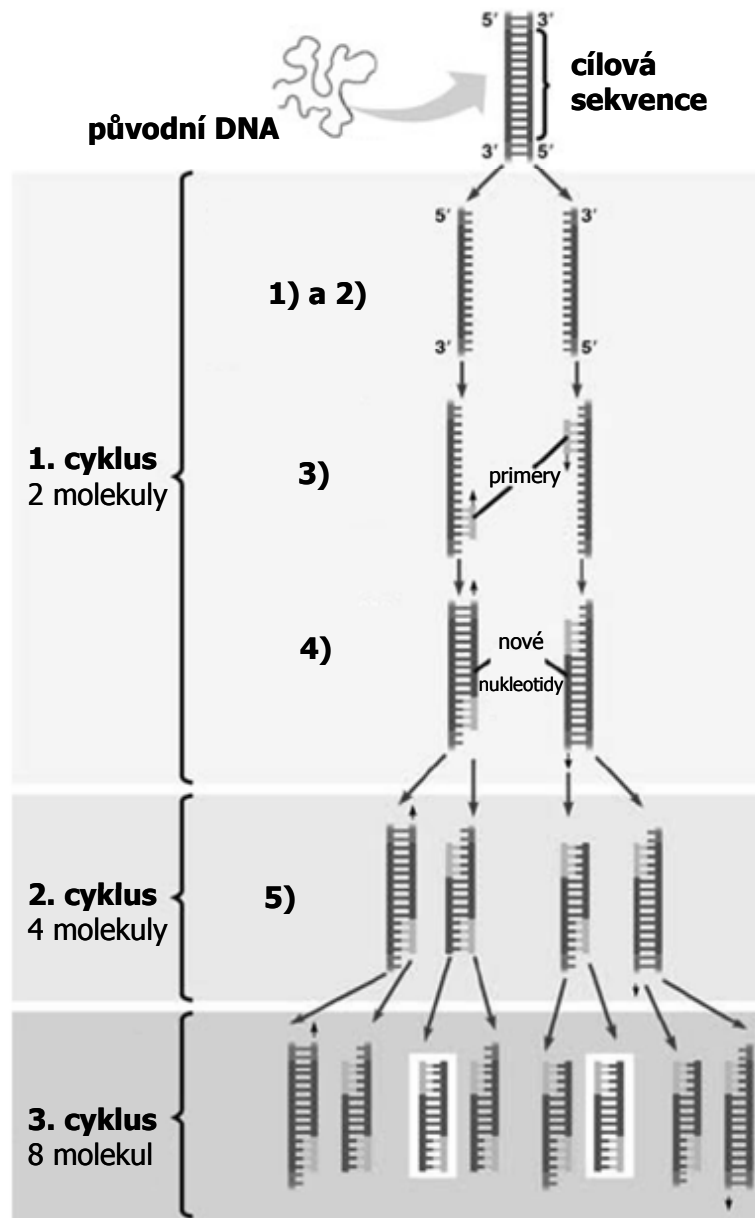
gelová filtrace

: mikrokolonky plněné gelem

: adsorpce na silikagelu a gelová filtrace se mohou urychlit centrifugací

polymerázová řetězová reakce

(polymerase chain reaction, PCR)



1) **iniciace** – zahřívát na 96 °C 5 min
až DNA i primery roztají

2) **tání** – zahřívát na 96 °C po 30 s;
přidat DNA-polymerázu

3) **připojení** – zahřívát na 68 °C po 30 s

4) **prodlužování** – zahřívát na 72 °C po 45 s

5) **opakování** – kroky 2 – 4 opakovat
max. 25x

6) **uchování** – výsledná směs na 7 °C;
chrání DNA před rozkladem

amplifikace NA

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> polymerázová řetězová reakce	(DNA)	1985
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i> reverzně transkripční PCR	(RNA)	1991
TAS	<i>transcription-amplification system</i> transkripčně-amplifikační systém	(RNA, DNA)	1989
3SR	<i>self-sustained sequence replication</i> nepřetržité zmnožování sekvence / 3SR amplifikační reakce	(RNA, DNA)	1990
NASBA	<i>nucleic acid sequence-based amplification</i> amplifikace na základě sekvence bazí	(RNA, DNA)	
TMA	<i>transcription mediated amplification</i> amplifikace zprostředkovaná transkripcí	(RNA, DNA)	1991
SDA	<i>strand displacement amplification</i> amplifikace s vytěsňováním řetězce	(DNA)	1992

amplifikace hybridizační sondy

LAR	<i>ligase amplification reaction</i> ligázová amplifikační reakce		1989
LCR	<i>ligase chain reaction</i> ligázová řetězová reakce		1991
Q-beta	<i>Q-beta replicase amplification</i> Q-beta replikázová amplifikace		1988

restrikční enzymy

EcoRI *Escherichia coli*

5' GAATTC

3' CTTAAG

BamHI *Bacillus amyloliquefaciens*

5' GGATCC

3' CCTAGG

HindIII *Haemophilus influenzae*

5' AAGCTT

3' TTCGAA

MstII *Microcoleus* sp.

5' CCTNAGG

3' GGANTCC

TaqI *Thermus aquaticus*

5' TCGA

3' AGCT

NotI *Nocardia otitidis*

5' GCGGCCGC

3' CGCCGGCG

AluI *Arthrobacter luteus*

5' AGCT

3' TCGA

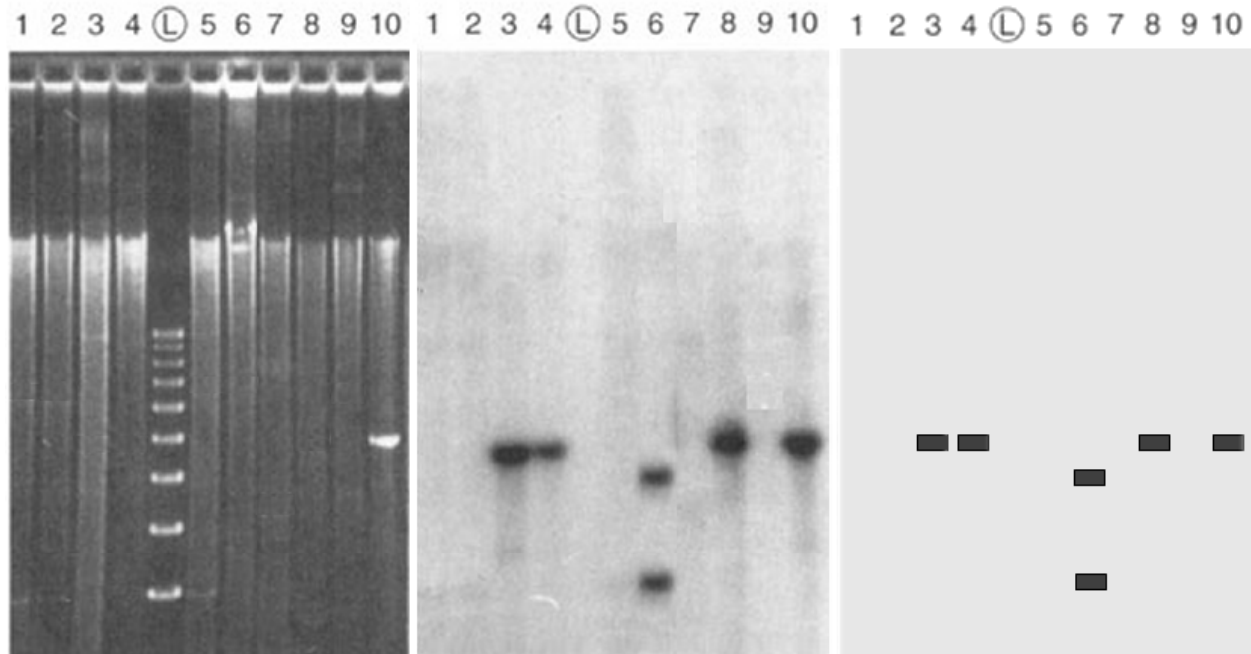
přenos otisku (blotování)

PCR ⇒ štěpení NA restriční endonukleázou ⇒
 ⇒ separace gelovou elfou ⇒ **přenos** ⇒ hybridizace ⇒ vizualizace značky

DNA – přenos podle Southerna, „jižní“ přenos (*Southern blot*)

RNA – přenos podle „Northerna“, „severní“ přenos (*Northern blot*)

hybridoblot



hybridizace

ssDNA fragment (**analyt**) +
 + značený komplementární ssDNA fragment (**sonda**)

: chromofor, fluorofor, radioaktivní izotop (^{32}P)

cytogenetická diagnostika

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

sledování polyzomií, translokací, inverzí, delecí

možnost analýzy interfázních chromozomů

: nevyžaduje kultivaci buněk a přípravu metafázických chromozomů

komplementární párování vyšetřované DNA s fluorescenčně značenou sondou

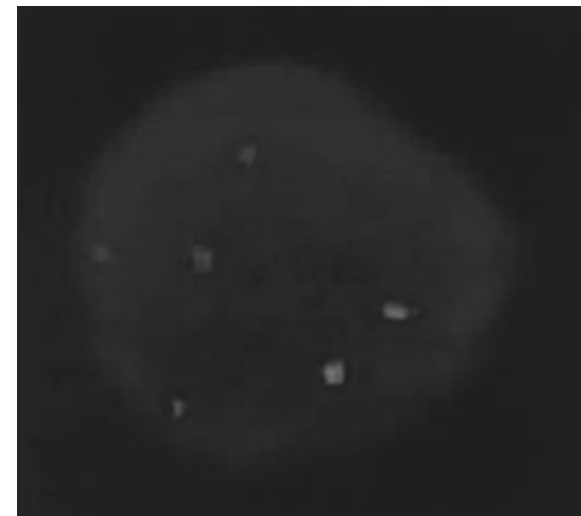
sekvence vyšetřovaného genu

: jednotlivý gen

: celý či část chromozómu

anebo centromerické či telomerické oblasti

detekce – fluorescenční mikroskopie



mFISH – vícebarevná vysokorozlišovací fluorescenční hybridizace *multicolour FISH high resolution banding*

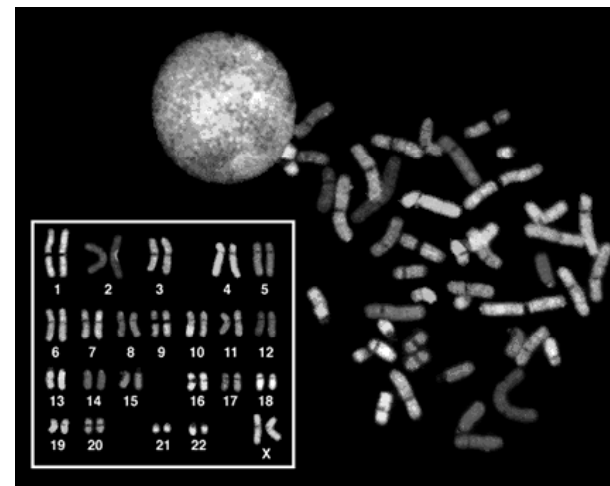
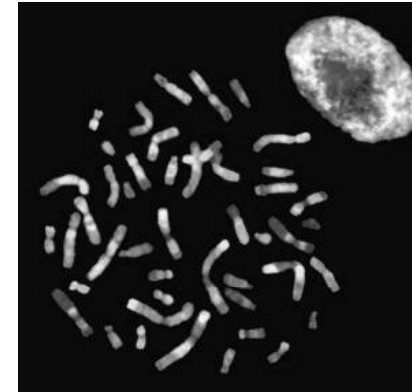
kombinace více fluorochromů a více sond

SKY – spektrální karyotypování *spectral karyotyping*

identifikace početních i strukturálních chromozomálních aberací

komplementární párování – 55 fluorescenčně značených sond

počítačové zobrazení a analýza



CGH – komparativní genomová hybridizace

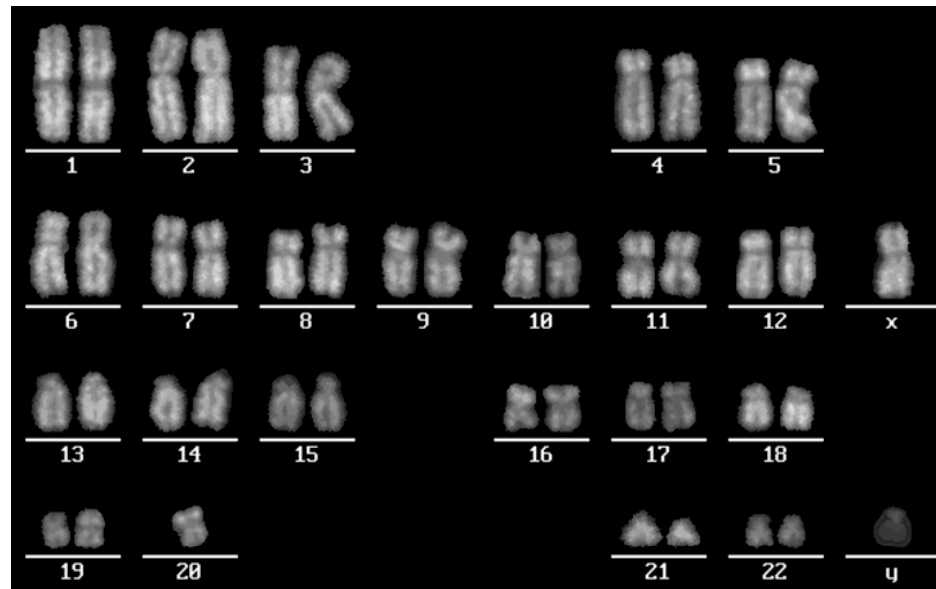
comparative genomic hybridization

vizualizace chromozomových poruch

současná hybridizace dvou vzorků DNA značených odlišnými fluorochromy

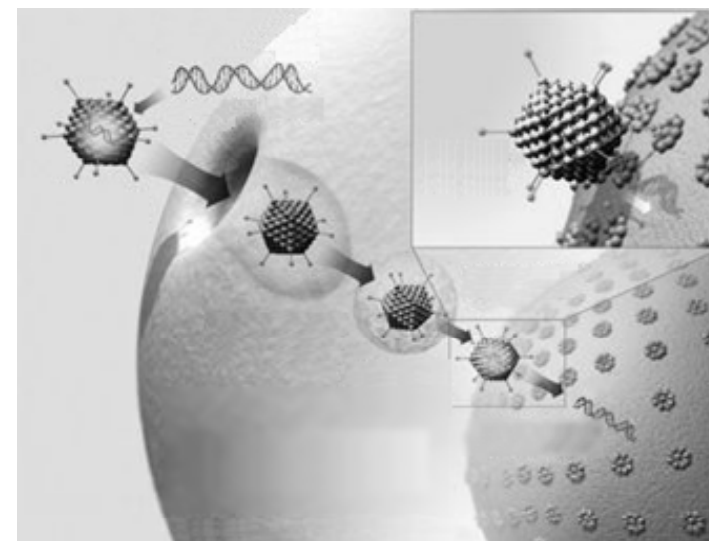
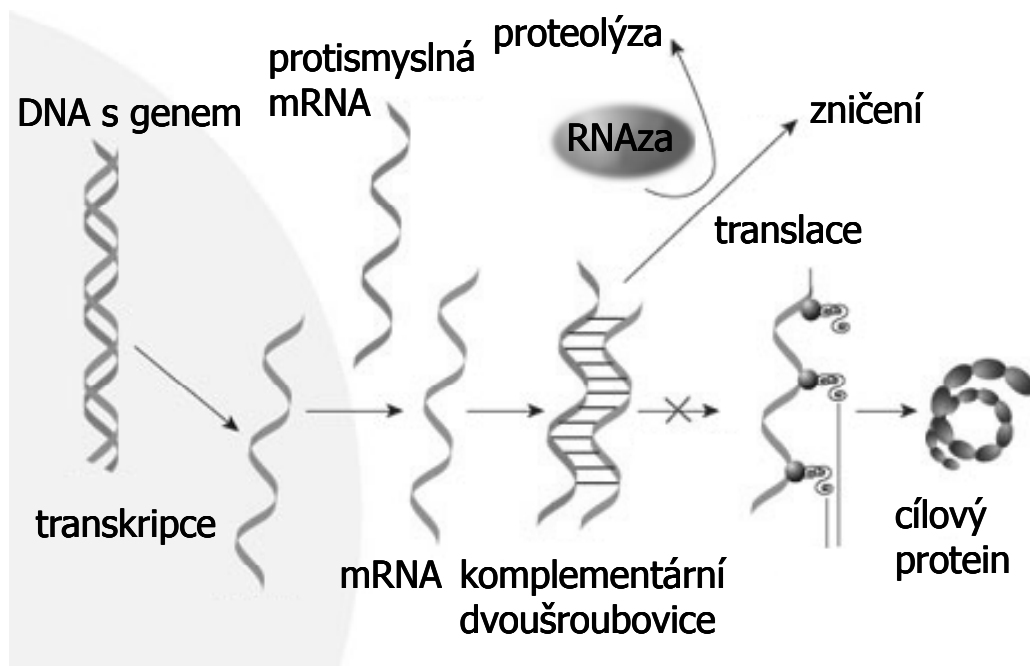
: DNA pacienta (nádorová), značena zeleně

: kontrolní DNA (DNA zdravého jedince), značena červeně



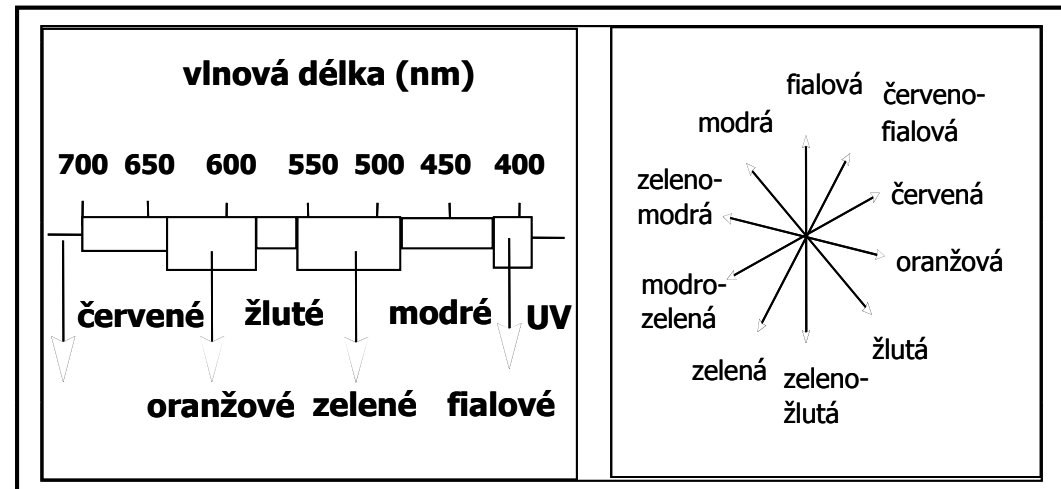
genová terapie

- : přenos genetického materiálu s léčebným účinkem (AVV; adenovirový vektor)
- : cílené vyřazení aberantního proteinu (rakovina; proti /*antisense*/ terapie)
- : obnova exprese mutovaného genu (dědičné choroby)
- : problém obranných mechanismů buňky k cizorodé DNA (transplantace)
- : problém selektivní terapie defektních buněk



barevnost fyzikální jev

indikace \Rightarrow zrak \Rightarrow barva



sluneční světlo – bílé, bezbarvé

rozkládá se hranolem \Leftarrow **index lomu je funkcí vlnové délky**

: více se odklání od kolmice paprsky fialové, méně žluté

lidské oko vnímá jako barevné paprsky s vlnovou délkou mezi **400** až **760** nm

absorbuje-li předmět **žlutou**, odráží modrou \Rightarrow jeví se **modrý a naopak**

tzv. **doplňkové barvy**

popis absorpce

Bouguer-Lambert-Beerův zákon

$$I = I_0 * 10^{-\epsilon * c * d}$$

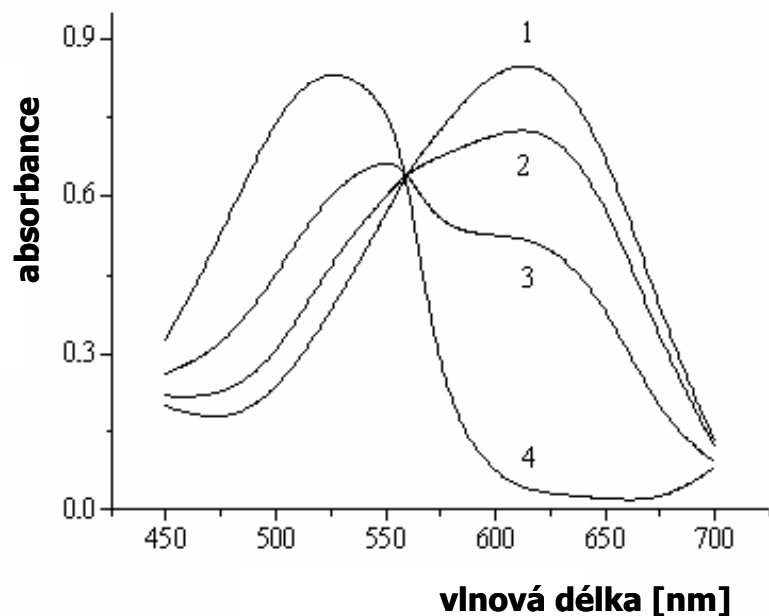
koncentrace c [mol/l], molární absorpance ϵ , síla absorpční vrstvy d [cm]

transparence vrstvy: I / I_0

absorbance A [l/mol.cm]: $A = \log I_0 / I = \epsilon * c * d$

$\epsilon = A / c * d \Rightarrow$ úměrné **počtu molekul** absorbující látky

spektrofotometrická absorpční křivka (*absorpční spektrum*) $A = f(\lambda)$



absorpční spektrum:
 magon s ionty Mg^{2+}

- 1 – magon
- 2 – magon + $2 \cdot 10^{-6} Mg^{2+}$
- 3 – magon + $1 \cdot 10^{-5} Mg^{2+}$
- 4 – magon + $8 \cdot 10^{-4} Mg^{2+}$

posuny polohy absorpčního maxima:

- bathochromní** : k vyšším vlnovým délkám
- hypsochromní** : k nižším vlnovým délkám
- hyperchromní** : zvýšení absorbance
- hypochromní** : snížení absorbance

je-li změna spektra plynulá \Rightarrow existence **izosbestického bodu**
 : *všechny barevné složky téže molekuly* v něm mají *stejnou absorbanci*

teorie barevnosti absorpce záření molekulami

molekula = X atomů ($X > 2$)

absorpce světla – valenční vazebné elektrony
: rychlost jejich kmitů je tím větší, čím je vazba pevnější

molekuly absorbují: světlo s kmitočtem \approx kmitočtu vazebných elektronů

celková vnitřní energie molekuly **E**: $E = E_{\text{rot}} + E_{\text{vibr}} + E_{\text{elektr}}$

elektrony σ – velká energie přechodu na vyšší energetickou hladinu \Rightarrow
 \Rightarrow neúčastní se absorpce světla ve Vis

elektrony π – menší energie přechodu na vyšší energetickou úroveň \Rightarrow
 \Rightarrow mohou absorbovat již ve Vis

vlastní příčina barevnosti:

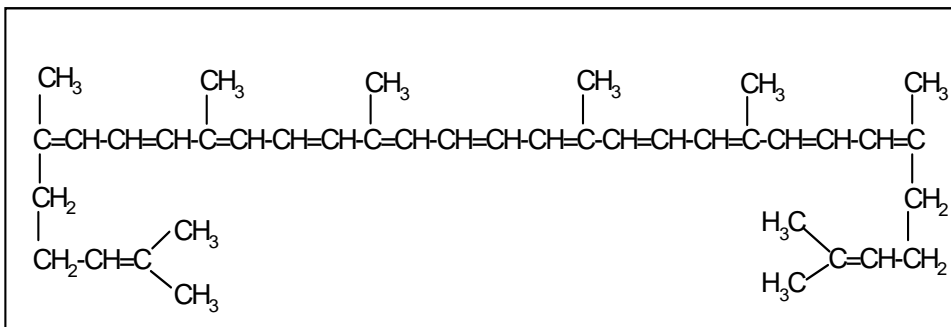
absorpce energie záření přechodem elektronů π mezi hladinami s různými **E**

struktury způsobující barevnost

řetězce konjugovaných dvojných vazeb

excitační energie

etan	$\text{CH}_3\text{--CH}_3$	cca 180 kJ/mol	$\lambda = 155 \text{ nm}$
etyn	$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	cca 150 kJ/mol	$\lambda = 190 \text{ nm}$
butadien	$\text{CH}_2=\text{CH--CH}=\text{CH}_2$		$\lambda = 210 \text{ nm}$
lykopen (11 konjugovaných dvojných vazeb)			$\lambda = 506 \text{ nm}$



: *substituenty* :: nukleofilní, elektrofilní
 :: nabité

dodatečný efekt

: *oxidace / redukce*
 : *planarita* struktury
 : *komplexace* s ionty kovů
 : *detergenty*, molekulární sloučeniny

substituenty – nukleofilní, elektrofilní

substituenty – nabité

ovlivňují rozložení elektronů

nukleofilní:

: aminoskupina (volný elektronový pár)

: hydroxylová skupina (dva volné elektronové páry)

benzen $\lambda_{\max} = 255 \text{ nm}$ > fenol $\lambda_{\max} = 275 \text{ nm}$ > anilin $\lambda_{\max} = 282 \text{ nm}$

elektrofilní:

: nitroskupina, karbonylová skupina a iminová skupina

nitrobenzen $\lambda_{\max} = 268 \text{ nm}$, acetofenon $\lambda_{\max} = 279 \text{ nm}$

:: kombinace skupiny nukleofilní a elektrofilní: bathochromní posun

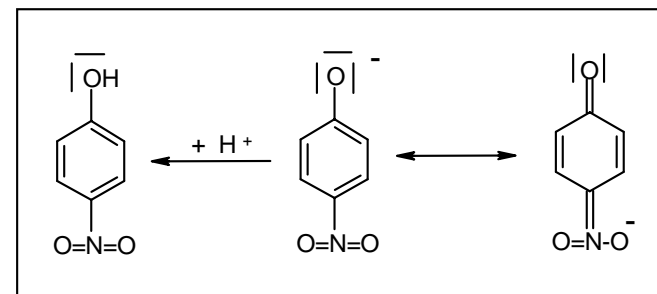
ionizace umocňuje efekt přítomnosti substituentu

nitrofenol $pK_a = 7.16$

: kyselé prostředí **bezbarvý** $\lambda_{\max} = 315 \text{ nm}$ (vlevo)

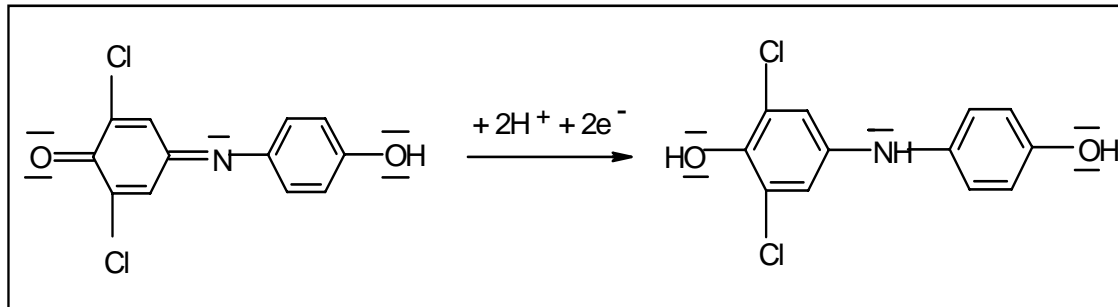
: alkalické prostředí **žlutý** (uprostřed)

: chinoidní struktura (vpravo) $\lambda_{\max} = 404 \text{ nm}$



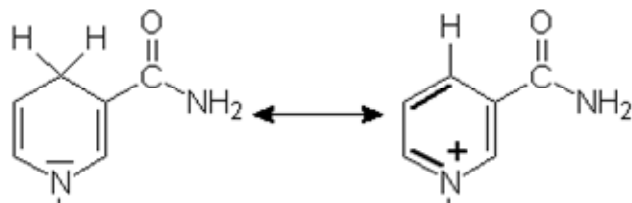
oxidace / redukce

oxidace zvyšuje množství konjugovaných dvojných vazeb



2,6-dichlorofenolindofenol – modrý
redukce – leukobáze (bezbarvá)

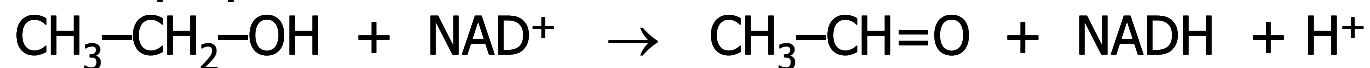
redukce zcela výjimečně zlepšuje absorpci



NADH

NAD⁺

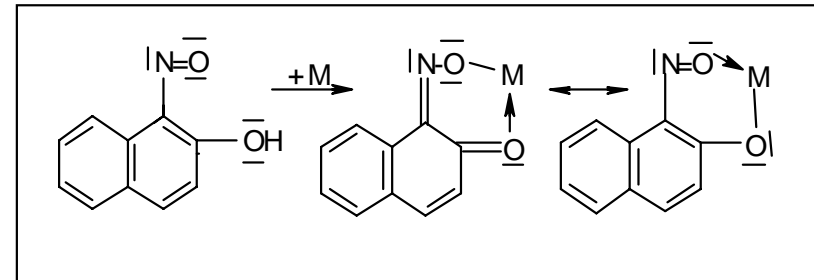
koenzymy odvozené od nikotinamidu



kovové cheláty

vznik komplexu [ML] a vznik koordinační vazby na úkor volného elektronového páru zapojeného do systému konjugovaných dvojných vazeb je provázen zvýšením barevnosti

1-nitroso-2-naftol : žlutooranžový
: ionty Fe, Ni nebo Cr
:: zelené a hnědé komplexy



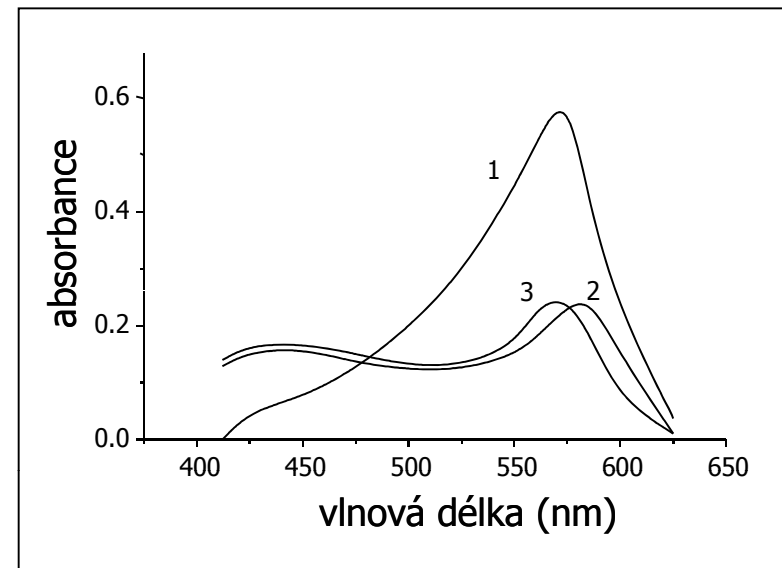
detergenty

alkalická xylenolová oranž $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l

1 – XO, pH 10.5

2 – XO a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l CPB pH 10.5

3 – XO, pH 6.4



molekulové sloučeniny

: aromáty, heterocyklické báze a arom. sloučeniny s nukleofilními substituenty

: aromatické uhlovodíky s elektrofilními substituenty

chinhydron

využití barevnosti v klinické diagnostice

acidobazické indikátory

stanovení pH

: **alkalimetrická titrace** ⇒

stanovení celkové bílkoviny Kjeldahlovou metodou (NH_3)

: **orientační stanovení pH** ⇒

semikvantitativní stanovení pH moči – **směsné indikátory** (plynulý přechod)

stanovení analytů

: **semikvantitativní stanovení sérového albuminu** – tzv. proteinová chyba

: **semikvantitativní stanovení močoviny** – ureázová reakce, produkce NH_3

: **indikace mikrobiální kontaminace** – přeměna cukrů na organické kyseliny

redoxní indikátory

stanovení redukujících/oxidujících látek

- : **stanovení kyseliny askorbové (vitamin C)**
- : **oxidační kopulace** – stanovení glukózy, kyseliny močové, cholesterolu
- : **stanovení ELISA s POD** (křenová peroxidáza)
- : **stanovení enzymů AST, ALT** (fosfatázy)
pomocí druhotné enzymatické redoxní reakce

organočinnidla a metalochromní indikátory

stanovení iontů kovů – Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}

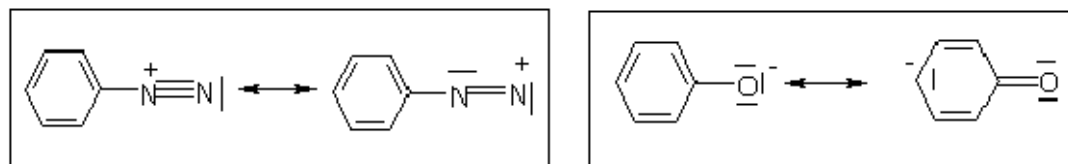
- chloridy** – titrace $Hg(NO_3)_2$; Hg^{2+} + difenylkarbazon – modrofialové zbarvení
- vápník** – arsenaze III, *o*-kresolftalein komplexon
- hořčík** – magon, calmagit
- měď** – bathocuproin
- železo** – bathofenantrolin, ferrozín

čínidla kopulační

stanovení reagujících látek

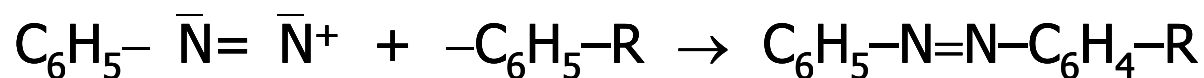
azokopulace

: azobarviva – vodivé propojení konjugovaného řetězce dvojných vazeb původních molekul azoskupinou \Rightarrow rovinná struktura nové molekuly



: aryldiazoniový kationt jako elektrofilní činidlo

: aktivace *p*-polohy fenolu při disociaci hydroxylového vodíku



reakce bilirubinu s diazosulfanilovou kyselinou

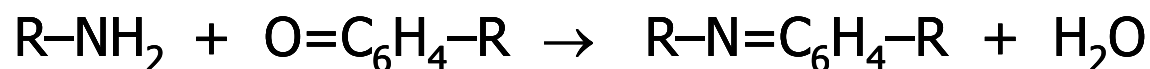
oxidační kopulace

: molekula se dvěma aromatickými kruhy konjugovanými přes iminoskupinu

: nová molekula má **chinoidní** strukturu

: další substituenty zvyšující její polarizaci \Rightarrow **vysoce barevná**

využití vznikající peroxid vodíku



–R odpovídá =O, –NH₂

nechromogenní produkty se **převádějí na barevné**

1-naftylfosforečnan $\xrightarrow{\text{ACP}}$ 1-naftyl + *kopulační čin.* \Rightarrow barevný produkt

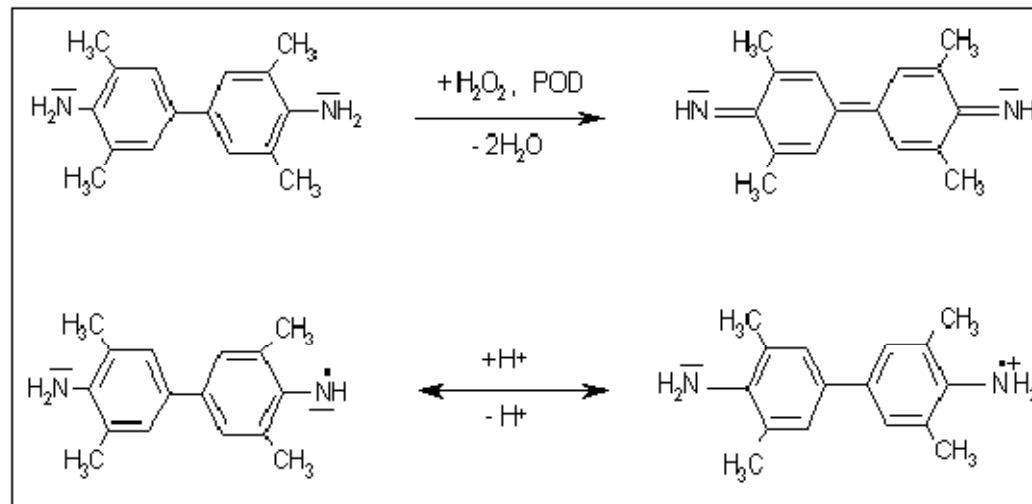
kyselá fosfatáza

činnidla redoxní

stanovení reagujících látek

oxidace \Rightarrow

změna redukované **leukoformy** na **barevnou**



3,3',5,5'-tetrametylbenzidín a oxidace na modř
: oxidační mezistupeň – semichinon

chromogenní substráty pro enzymové reakce

samy barevné, nebo enzymovou transformací vzniká barevný produkt

alk. fosfatáza

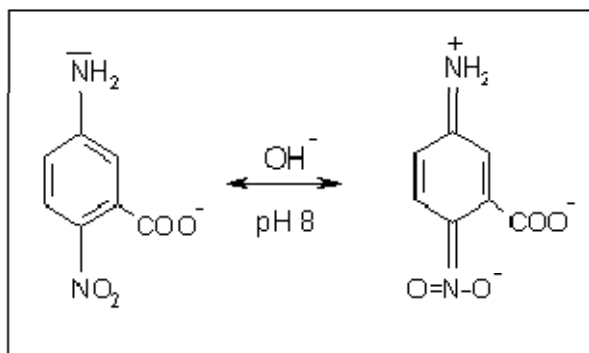
4-nitrofenylfosforečnan **ALP** > 4-nitrofenol

312 nm

404 nm

glutamát transferáza

L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid **GMT** > kys. 5-amino-2-nitrobenzoová



značení biomolekul

: *afinitní* – slabé interakce
 : *kovalentní*

: **peptidy/proteiny**
 : **NA**

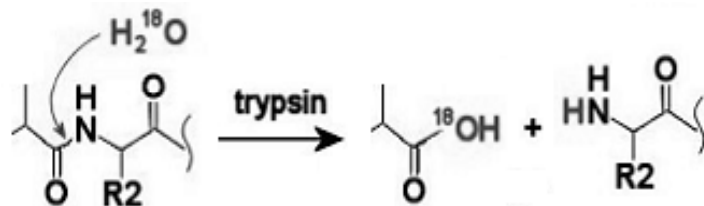
typy značek

afinitní : chromofory, fluorofory

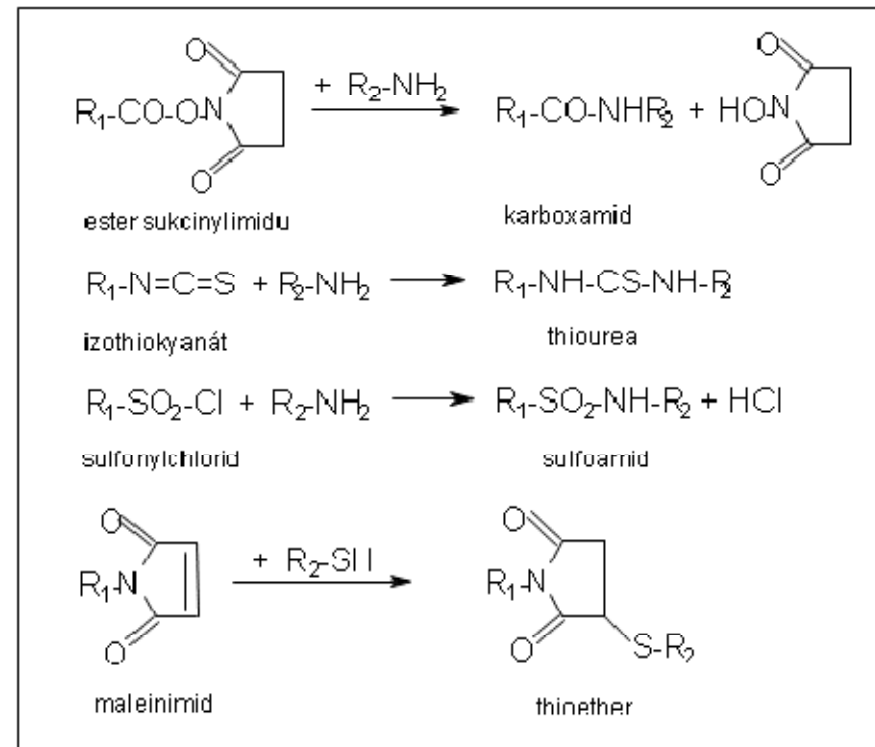
kovalentní : izotopické (radioaktivní, těžké)
 : chromofory, fluorofory, luminofory
 : enzymy

modifikace

: chemická
 : enzymatická



R₁ je značka
 R₂ je biomolekula



lékařská mikrobiologie

postupy vyšetření

mikroorganismy – základní složka biosféry

: **patogenní** – zdraví škodlivé

: **oportunně patogenní** – příležitostně škodlivé (*Escherichia coli*)

lékařská mikrobiologie – mikrobiologická analýza

důkaz **etiologického agens** – původce vyšetřované infekce; jeho citlivost na antibiotika a chemoterapeutika

lékařsky důležité mikroorganismy

: bakterie

: mikroskopické houby

: prvoci

: viry

: subvirová agens (priony)

obecný postup mikrobiologické diagnostiky

- : klinické vyšetření pacienta
- : odběr a transport vzorku
- : evidence a stanovení postupu
 1. sled: mikroskopie, důkaz antigenů a DNA/RNA
 2. sled: izolace agens, popř. nepřímý důkaz
 3. sled: identifikace agens
 4. sled: stanovení citlivosti na antibiotika
- : diagnóza a terapie

přímý důkaz: nález mikroorganismu

- : mikroskopicky – tvar, barvení
- : imunologicky – průkaz patogenních antigenů
- : geneticky – sekvenace
- : biochemicky – důkaz specifických metabolitů patogenu

nepřímý důkaz: imunologicky – nález protilátek proti patogenům

mikroskopický důkaz

: rychlý a levný

: méně citlivý – až v koncentraci 10^5 / ml

nativní preparát

: důkaz větších mikroorganismů – některých parazitů a kožních plísní

:: diagnostika syfilitidy (*Treponema pallidum*, treponemata)

: mykologické preparáty – „nativní“ jen v technickém smyslu slova; přibarvují se Parkerovým inkoustem nebo fluorescenčním barvivem

barvený preparát

fixace – narušení a přichycení mikrobiálních buněk na podložní sklo
zahřátí nátěru nad plamenem nebo denaturací chemickými činidly
(šetrné; metanol, bílkovinné antigeny – etanol, viry – aceton)

: **orientační jednoduchá barvení** – methylenová modř

: **barvení diagnostická (diferenciální)** – barvení dle Grama, Ziehla-Neelsena, Giemsy a fluorescenční barvicí postupy

Gramovo barvení

- : přítomnost mikroorganismů (významný počet)
- : velikost, tvar (koky, tyčinky, rovné, zahnuté či větvené)
- : vzájemné uspořádání (dvojice, shluky, řetízky *apod.*)

pozadí preparátu – přítomnost a vzhled buněk makroorganismu (epitelie nebo leukocyty) a dalších struktur (hlenová vlákna *apod.*)

rozdělí mikroby na **modrofialově** vybarvené mikroby **grampozitivní**
růžově až červeně zbarvené mikroby **gramnegativní**

provedení: fixovaný preparát na 20 s do roztoku krystalové violeti; pak 20 s v roztoku jodu, promytí alkoholem (max. 20 s), opláchnutí vodou, ponoření do roztoku safraninu a závěrečný oplach vodou

stavba bakteriální stěny – komplex krystalové violeti s jodem, u bakterií gramnegativních snadno vyplavitelný alkoholem; snadno se dobarví na růžovo safraninem nebo zředěným fuchsinem

diagnostika hnisavých afekcí (meningitida, kapavka, anaerobní infekce, záněty)

barvení dle Ziehla-Neelsena

bakterie nebarvitelné podle Grama (*Mycobacterium tuberculosis*)

provedení: fixovaný preparát se barví za horka v tzv. karbolfuchsinu, odbarvuje se okyseleným alkoholem a dobarvuje např. methylenovou modří; acidorezistentní tyčinky se barví růžově, pozadí preparátu modře

fluorescenční barvení

: citlivější postup důkazu acidorezistentních tyčinek

provedení: teplem fixovaný preparát se barví směsí fluorescenčních barviv auraminu a rhodaminu, diferencuje se tzv. kyselým alkoholem, dobarvuje se fuchsinem; na sametově tmavorudém pozadí preparátu jasně žluté tyčinky

barvení dle Giemsy-Romanowského

: v hematologii k barvení krevních nátěrů; v mikrobiologii k důkazu prvoků (malárie, trypanosomy, leishmanie, trichomonády), špatně se podle Grama barvicích bakterií (ehrlichii, rickettsii *atp.*) a ke znázorňování virových inkluzí

provedení: fixace metanolem a barví se 2 h Giemsovým barvivem (1:10 ředěného vodou). Giemsovo barvivo – azur s eosinem; bakterie se barví tmavomodře, jádra prvoků karmínově, jejich cytoplasma bleděmodře

izolace, kultivace mikroorganismu ⇒ **přímý důkaz**

provedení

: na kultivačních mediích : bakterie, kvasinky, plísně a prvoci

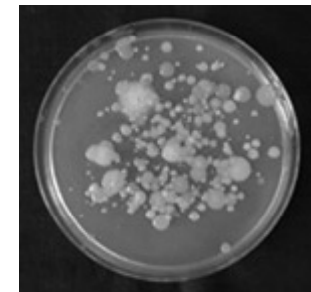
: v buněčných kulturách (*in vitro*, *in vivo*) : prvoci a intracelulární paraziti

kultivační media

základní půda tekutá (bujon)

: masový extrakt

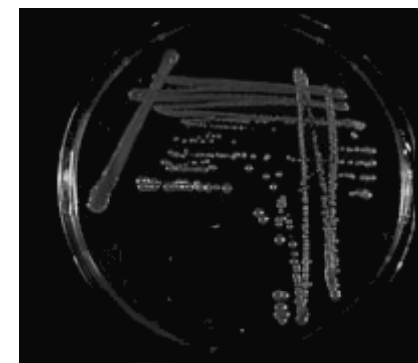
:: očkování kličkou, inkubace v termostatu



základní půda pevná (živný agar)

: rozvažené řasy v bujonu – gel (agaróza, agaropektin)

:: očkování kličkou – **křížový roztěr**, inkubace v termostatu



obohacené půdy

: růstové faktory (vitamíny, AA, nukleotidy)

: krevní agar, půdy vaječné (*M. tuberculosis*)

selektivní půdy

: inhibitory růstu nežádoucích organismů – **selekce**

diagnostické půdy

: růstové faktory, selekční inhibitory, substrát a indikátor

Endova půda (střevní tyčinky), MacConkeyho půda

půdy pro stanovení citlivosti na antibiotika

: růstové faktory, selekční inhibitory, substrát a indikátor

agar Mueller-Hintonové

transportní půdy

: bez živin, vlhké, inhibitory metabolismu

:: 24 h přežití

Amiesovo medium – anorg. soli, thioglykát sodný, aktivní uhlí, 0.4 % agaru

in vitro

: kuřecí embrya – viry, rickettsie, chlamydie

tkáňové kultury, monovrstvy pod živným roztokem (Eaglovo esenciální minimální médium)

in vivo

: morčata, myši

zásada „3 R“

: **refinement** (propracování) – pečlivě připravené pokusy, nejlepší podmínky

: **reduction** (omezení) – na co nejmenším počtu zvířat

: **replacement** (nahrazení) – snaha nahradit pokus jiným postupem, např. tkáňovými kulturami nebo průkazem cílových sekvencí NA

tuberkulózní mykobakterie – morčata; vzácné a neopakovatelné vzorky (likvor, vyňaté mízní uzliny *apod.*)

vivisekce je citlivější než *kultivace* – tularémie nebo psitakóza

virologie – laboratorní myši;

izolace viru **klíšťové encefalitidy**, **coxsakievirů** (zánětu mozkových plen a srdečního svalu)

důkazy **mikrobiálních toxinů** – nejde bez *vivisekce*

buněčné kultury

diagnostické půdy

půdy cukerné – schopnost mikroorganismu štěpit jistý sacharid
produkt \Rightarrow kyselina \downarrow pH media – acidobazický indikátor

adonitol, arabinóza, cellobióza, dulcitol, fruktóza, galaktóza, glukóza, inositol, inulin, laktóza, maltóza, mannitol, mannóza, melesitóza, melibióza, rafinóza, rhamnóza, ribóza, sacharóza, sorbitol, škrob, trehalóza a xylóza

substrátové půdy – schopnost enzymaticky zpracovat substrát

- : deaminace – fenylalanin a tryptofan
- : dekarboxylace – arginin, lysin a ornithin
- : hydrolýza – močovina, hippurát a tributyrin
- : redukce – dusičnany na dusitany

metabolické půdy – využití některých látek

citronan, octan nebo malonan – zdroje uhlíku
: růstové faktory

auxanogram – zjištění, zda kvasinka neroste lépe v okolí tablety s určitým sacharidem

využívané mikrobiální enzymy: N-acetyl- β -D-glukosaminidáza (NAG), C8-esteráza, α -galaktosidáza (α GA), β -galaktosidáza (β GA), β -glukosidáza (β GL), β -glukuronidáza (β GLR), γ -glutamyltransferáza (GGT), leucin-aminopeptidáza (LAP), pyrrolidonylarylamidáza (PYR), ureáza a β -xylosidáza (β XY)

imunodetekce

aglutinace na sklíčku

: antigeny tělové a bičíkové

Salmonella enteridis, citrobaktery, pseudomonády, cholerová vibria, bordetelly, meningokokové

virová identifikace

virus-neutralizační test

: specifická protilátka inhibuje některý biologický účinek viru

citlivost na antibiotika

antibiotika, syntetická antimikrobiální chemoterapeutika

kvalitativní důkaz

diskový difúzní test

princip: kolem disku z filtračního papíru nasyceného antibiotikem citlivý mikrob nevyroste – vytvoří se zóna inhibice o určitém průměru

kmen citlivý vůči danému antibiotiku – zóna stejnou nebo větší než u referenčního kmene

testovaná antibiotika – závisí na druhu mikroba, na charakteru onemocnění a na druhu vzorku, z něhož byl mikrob vypěstován a na místní situaci ve vývoji rezistence mikrobů na antibiotika

kvantitativní stanovení

diluční postupy (zředování antibiotik); minimální inhibiční koncentrace (MIC) daného antibiotika pro vyšetřovaný kmen mikroba

: mikrotitrační destička 8x12 s definovanou koncentrací určitých antibiotik klesající geometrickou řadou

: po naočkování a inkubaci se zjišťuje, zda bujón zůstal čirý (úplná inhibice růstu), nebo zda má zákal či sediment

MIC – nejnižší koncentrace antibiotika schopná růst zastavit; $\mu\text{g/ml}$, mg/l

minimální baktericidní koncentrace – nejnižší koncentrace antibiotika schopná vyšetřovaný kmen usmrtit

: vzestupná koncentrace v sérii

dnes zvláště – **rezistence** mikrobů k antimikrobiálním látkám

rezistence na antibiotikum – změna cílové molekuly, zhoršení průniku do buňky, zrychlení vylučování antibiotika z buňky nebo tvorba enzymu, který antibiotikum inaktivuje

nepřímý důkaz

stopy, které během infekce zanechal **patogen v organizmu**

: mikrobiální antigeny, toxiny, metabolické produkty a typické sekvence NA
naprosté většině jde o **stanovení množství protilátek (Ab)**

sérologický test

imunostanovení

syfilis, mononukleóza, infekce HIV *apod.*

: důkaz signifikantního nárůstu množství Ab; **množství Ab** se nazývá **titr**

případová studie **vývoj metody pro klinickou diagnostiku**

stanovení alkalické fosfatázy

alkalická fosfatáza (ALP) – analyt související s funkcí jater, růstem kostního aparátu, placenty *aj.*

4 hlavní izoenzymy: kostní, jaterní, střevní a placentální

případová studie – typický příklad pro vývoj analytické metody

: vlivy metody, vliv teploty, pufru, modifikátorů, určení optimální koncentrace substrátu, postup zjištění referenčního intervalu

+ výroba soupravy a způsoby stabilizace jednotlivých činidel

základní vlastnosti ALP

E.C.3.1.3.1.

fosfhydroláza monoesterů kyseliny ortofosforečné s alkalickým optimem

: *katalyzuje hydrolýzu* fosforečnanových monoesterů na anorganický fosforečnan a odpovídající alkohol

: může také *hydrolyzovat* všechny typy sloučenin s vazbami typu **P-O-C**, **P-O-P**, **P-S** a **P-N**, s výjimkou sloučenin typu P-C

: v případě fosforečnanových monoesterů může i *přenos fosforečnanové skupiny*

hydrolýza



transfosforylace



účinnost transfosforylace závisí značně na typu a koncentraci akceptoru

ALP : metaloprotein; kofaktor Zn^{2+} (4 atomy)

: Zn^{2+} hraje významnou roli při transfosforylačních reakcích ALP

: Co^{2+} hydrolyzuje, netransfosforyluje

nespecifické inhibitory: EDTA, KCN, cystein, *o*-fenantrolin, kyselina 8-hydroxychinolin-5-sulfonová *aj.*

: odstraněním prvních 2 atomů Zn klesá aktivita enzymu asi o 90%

: zbylé 2 atomy lze odstranit obtížněji, pak ale vzniká zcela neaktivní apoenzym

specifický inhibitor – L-fenylalanin

aktivátory: ionty Co^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+} , zatímco inhibičně působí Be^{2+} a Zn^{2+}



význam ALP

objev: 1907 v rýžových klíčcích

analytické stanovení a **využití** v diagnostice

: 1926 – diagnostika kostních nemocí

: 1930 – obstrukční žloutenka

sérum zdravých obsahuje hlavně **kostní a jaterní izoenzymy**

↑ **aktivita ALP**

: poruchy růstu a u některé kostní nádory (kostní izoenzym)

: nemoci hepatobiliárního systému (cholestáza a nádorové metastázy do jater)

↓ **aktivita ALP**

: hypothyreóza (kretenizmus), skorbut, nemoci z ozáření, těžká anemie a při léčbě imunosupresivy

sezónní variace: vliv UV-záření; v zimě (nižší sluneční svit) ↑ ALP v těhotenství ↑ ALP o 12 až 50 % (placentární izoenzym)

katalytická aktivita: závisí na substrátu a reakčních podmínkách – druhu, pH a koncentraci pufru, teplotě, přítomnosti modifikátorů

historie:

1926 – substrát hexafosforečnan

1929 Kay – substrát β -glycerofosfát, bez pufru; stanovení anorganického fosforu (48 h!!!)

později – glycinový pufr pH 8.8, fosfor pomocí fosfomolybdenové modři (3 h)
– barbitalový pufr pH 10.8

nové substráty: fenylfosfát a 4-nitrofenylfosfát, fenolftaleinmono- a difosfáty, thymolftaleinmonofosfát, 3-O-metylfluoresceinfosfát, naftyl-AS-MX-fosfát, metylumbelliferylfosfát, indoxylfosfát *apod.*

zvýšení citlivosti – fenylfosfátem, stanovení uvolněného fenolu oxidační kopulací se 4-aminoantipyrinem a ferrikyanidem

nově – chromogenní substráty – fenolftaleinfosfát (\Rightarrow fenolftalein)
– thymolftaleinfosfát

substrát

: jednoznačně definovaný, chemicky dostatečně čistý; s produktem hydrolýzy s autoindikačními vlastnostmi

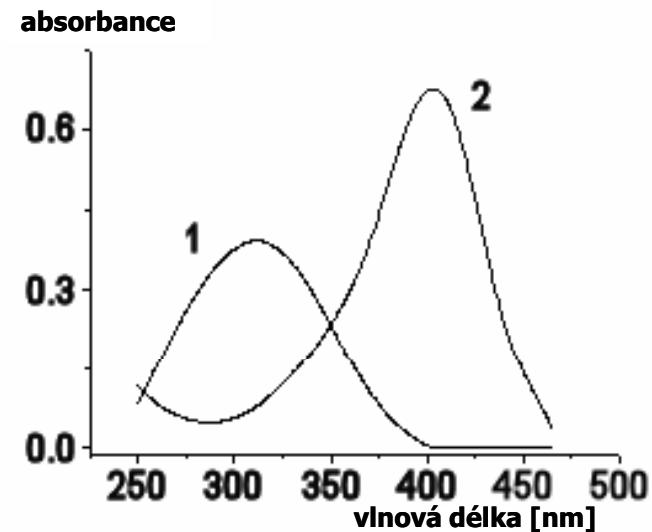
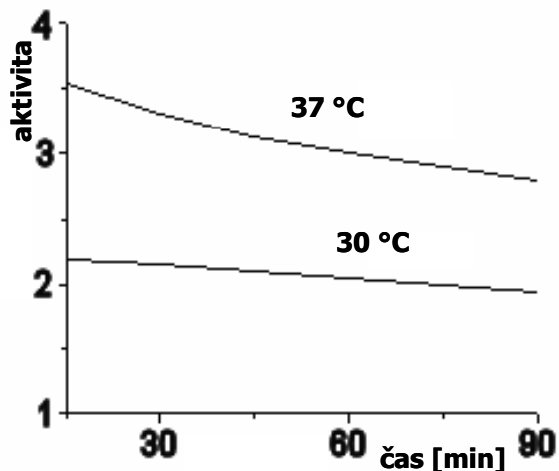
dnes – 4-nitrofenylfosforečnan (**NPP 1**), štěpí se na fosforečnan a 4-nitrofenol (**NP 2**)

NP je acidobazickým indikátorem s disociační konstantou $pK_a = 7.16$

koncentrace **NPP**: 5 – 20 mmol/l

teplota

ALP – při 37 °C rychleji inaktivována



způsoby měření

kdysi: aktivita enzymů kineticky, manuálně a diskontinuálně (dvoubodově)

dnes: rychlý kinetický kontinuální postup

modifikátory ALP

inhibitory: sloučeniny arsenu, fosforečnany, látky schopné vázat ionty zinku silněji než sám enzym

: nespecifické chelatotvorné inhibitory: EDTA a KCN

specifický aktivátor: v pufru MEG ionty sodíku

stanovení ALP v MEG pufru

optimalizace stanovení ALP

- : literární rešerše (vlastnosti, metody stanovení *apod.*)
- : vymezení orientačních podmínek analytického postupu (typ pufru a jeho pH a koncentrace, typ a koncentrace substrátu)
- : optimalizace složení inkubační směsi

výhradně se **substrátem NPP**

pufr

- : MEG – dobré transfosforylační vlastnosti, nízká reaktivita, vysoká čistota a snadná dostupnost
- : DEA i AMP vyřazeny pro obsah inhibujících nečistot

reakční podmínky a pracovní postup

teplota	37 °C	vlnová délka	420 nm
pH (37 °C)	10.1 ± 0.1	délka opt. dráhy	1 cm
MEG pufr	0.35 mmol	teplota	(37.0 ± 0.1) °C
NPP substrát	15 mmol/l	signál	ΔA
chlorid sodný	70 mmol/l	interval měření	30 – 120 s
chlorid hořečnatý	0.5 mmol/l	sérum/inkub. směs (v/v)	1:61 (0.0164)

čistota chemikálií

NPP: < 0.05 % volného 4-nitrofenolu, < 0.25 % volného anorg. PO_4^{3-}
molární absorpance v 10 mmol/l NaOH $\lambda = 311 \text{ nm} - 9\,867 \pm 761 \text{ l/mol.cm}$

MEG: bod tání 129 – 131 °C

NP: molární absorpance v 10 mmol/l NaOH $\lambda = 401 \text{ nm} - 18\,380 \text{ l/mol.cm}$

stálost činidel

puf – nejméně 1 měsíc při teplotě +5 °C (bez bakteriální kontaminace)

substrát – připravit těsně před použitím; v temnu a chladu při teplotě +5 °C stálý nejméně 24 hodin

standardní roztok NP – v temnu a chladu stálý nejméně 1 měsíc

výpočet koncentrace katalytické aktivity

$$\mathbf{fS-ALP [\mu\text{kat/l}] = \Delta A_{420} * F}$$

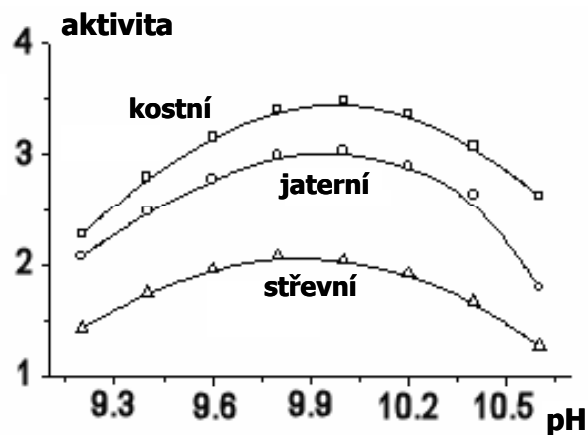
F je faktor, $\Delta A_{420} = (\Delta A_1 - \Delta A_2)$

absorbance kontrolního roztoku (ΔA_2) – kompenzuje absorbanci NP vzniklou spontánním, neenzymovým rozkladem substrátu vlivem alkalického prostředí

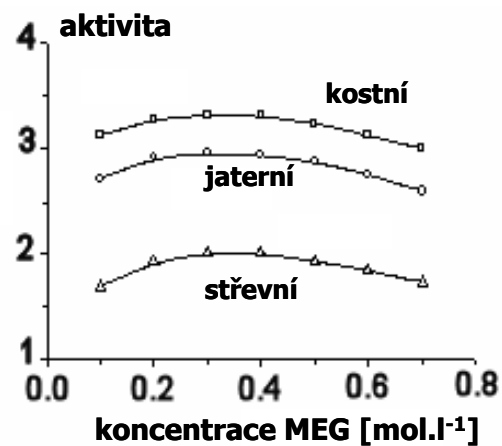
faktor F:

- 1) z kalibračního roztoku bez ALP
- 2) pomocí molární absorbance 4-nitrofenolu

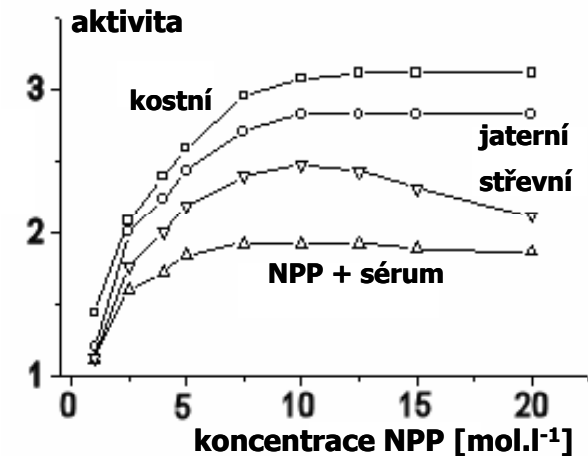
optimální podmínky stanovení ALP



vliv pH



**vliv
koncentrace MEG**



**vliv
koncentrace NPP**

referenční interval

fS-ALP [μkat/l]: muži 0.90 – 2.20, ženy 0.74 – 2.10, děti 1.20 – 6.30
200 dospělých, 112 chlapců a 152 dívek

opakovatelnost a reprodukovatelnost

opakovatelnost: ověřena na 10 externích pracovištích, přesnost v sérii a ze dne na den;

N = 20; σ rel. směrodatné odchylky: 3.5 % manuální analýza; 2.5 % analyzátor

reprodukovatelnost: na 5 pracovištích; 1.4 – 4.2 %

souprava pro stanovení ALP

činidlo 1 (6 lahviček)

- : pevná navážka substrátu obsahuje NPP 1.12 mmol/lahvičku
- : roztok substrátu se připraví rozpuštěním obsahu jedné lahvičky v 5.0 ml destilované vody; v temnu a chladu při +5 °C je roztok stálý asi 1 týden

činidlo 2 (300 ml)

- : MEG pufr v kapalném stavu o koncentraci 0.56 mol/l, který obsahuje pro konzervaci 5-brom-5-nitro-1,3-dioxan 0.3 mg/l a N-metylizothiazolon 1 mg/l

činidlo 3 (2 ml)

- : standardní roztok NP v ampuli pod N₂ obsahující NP 2.4 mmol/l a Na₂EDTA 0.05 g/l

sklad: v temnu a chladu při 2 – 8 °C, stálá 24 měsíců

pracovní postup: vzájemné objemové poměry séra, pufru a substrátu jsou 1:50:5, tedy 0.02 + 1.00 + 0.10 ml

význam pufru v bioanalýze

pufr – reakční prostředí

- : **udržení pH** (optimum)
- : **druhotný substrát** (enzymové reakce)
- : **modifikátory** – inhibitory, aktivátory

1900, Fernbach a Hubert: částečně neutralizovaný roztok kyseliny fosforečné působí jako ochrana proti náhlým změnám kyselosti nebo alkality při studiu enzymu amylázy

výběr pufru

základní charakteristiky: disociační konstanta kyseliny (složka); pK_a
vlivu ředění, iontové síly, pufrací kapacity a vlivu teploty na pH

rozsah pH : $pH = pK_a \pm 1$, přičemž nejefektivnější je pufr při $pH = pK_a$

kompatibilita a synergický vliv pufru

kompatibilita

chemická

- : dobrá rozpustnost ve vodě (nemají ji barbiturany)
- : nekomplexovat ionty kovů (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/^{3+}$ aj.)
- : netvořit nerozpustné sloučeniny (tedy ne uhličitany, fosforečnany, citronany)
- : nereagovat s dalšími složkami systému (bílkoviny, sacharidy + boritany)
- : nenáchylný k bakteriální kontaminaci (tedy ne fosforečnany, citronany aj.)

biochemická

- : ovlivňování aktivity některých enzymů (fosforečnany inhibují fosfatázy, karboxylázy, fosfoglukomutázy aj.)
- : interference v procesech oxidační fosforylace (barbiturany)
- : antisepticita; blokace aktivity většiny enzymů (fenoly)
- : amfolyty (obojetné ionty) oxidovány flavinovými mononukleotidy (BICIN, TRIS)
- : reaktivní a inhibující pufr (TRIS)

synergicita

modifikace – aktivátor (GlyGly; fibrinogen) nebo sekundární substrát (MEG)

hlavní bioanalytické pufry

zkratka	složení	pK_a
MES	2-(N-morfolin)etansulfonová kys.	6.1
BIS-TRIS	2-bis(2-hydroxyetyl)amino-2-(hydroxymetyl)-1,3-propandiol	6.5
BES	N,N-bis(2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonová kys.	7.1
HEPES	N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(2-etansulfonová kys.)	7.5
TRICIN	N-(2-hydroxy)-1,1-bis(hydroxymetyl)etylglycin	8.1
BICIN	N,N-bis(2-hydroxyetyl)glycin	8.3
AMPSO	3-[(1,1-dimetyl-2-hydroxyetyl)amino]-2-hydroxypropansulfonová k.	9.0
CAPSO	3-(cyklohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonová kys.	9.6
CABS	4-(cyklohexylamino)-1-butansulfonová kys.	10.7

analýza vybraných analytů

anorganické, organické analyty a bioanalyty

amoniak

obsah: degradace aminokyselin v játrech; toxický (CNS) \Rightarrow močovina
stanovení: v plazmě; referenční interval 11 – 35 μM

chemické metody

provedení: amoniak alkalizován, vydělen a absorbován do kyselého roztoku (Conwayova technika)

: titrace, konduktometrie, ISE, Nesslerovo činidlo (žluté) nebo Berthelotova reakcí (reakce s fenolem a s alk. chlornanem na modré chinoniminové barvivo)

pracné a neautomatizovatelné

enzymové metody

enzym: glutamátdehydrogenáza (GLD)



: pokles absorbance NADPH při **340** nebo **365 nm**

provedení: TEA 150 mM, pH 8.6 + 2-oxoglutarát 15 mM, ADP 1.5 mM, GLD *min* 800 U/ml a NADPH 0.12 mM

fosfor, fosforečnany

obsah: anorganické a organických fosforečnany; kostní tkáň, nukleové kyseliny, fosfolipidy, koenzymy, ATP *apod*

stanovení: v séru; referenční interval 0.7 – 1.6 mM

chemické metody

anorganické fosforečnany:

: reakce s molybdenem amonným (bezbarvý fosfomolybdenanový komplex)

: s molybdenem a vanadičnanem amonným (žlutý komplex kyseliny molybdátovanadátosfosforečné); hydrolyzuje částečně i organické estery fosforu a tím nahodnocuje stanovení anorganického fosforečnanu

organické fosforečnany: po mineralizaci sražených bílkovin; závisí na pH (silně kyselé prostředí)

provedení: deproteinace séra (silná kyselina), analýza supernatantu: měření při 340 nm; fosfomolybdenová modř (po redukci chlorid cínatý, kys. aminonaftalensulfonová, metyl-p-aminofenolsulfát, síran železnato-amonný, kys. askorbová aj.) při 882 nm; kyselina molybdátovanadátosfosforečná při 420 nm

enzymové metody

nekatalyzují hydrolýzu organických esterů fosforu a tím odpadá deproteinace vzorku

: glykogenfosforyláza, fosfoglukomutáza a glukóza-6-fosfátdehydrogenáza – *NADPH*

: purinnukleosidfosforyláza, xanthinoxidáza (peroxidázy) – *oxidační kopulace*

: sacharózafosforyláza – *NADH*

hořčík

obsah: 21 – 28 g na *cca* 70 kg (60 % kosti, 20 % svaly, 19 % jiné tkáně, asi 1 % extracelulární tekutina); kofaktor asi 300 enzymů
stanovení: v séru/plazmě; referenční interval 0.65 – 1.05 mM

chemické metody

AAS – optimální; volný Mg^{2+} – ISE

: v analyzátorech – fotometrické metody s calmagitem, magonem...

AAS:

provedení: roztok $LaCl_3$ (spektrální pufr, uvolňuje Mg^{2+} z fosforečnanových komplexů a ředí viskózní bílkoviny) má koncentraci 4.3 g/l s 10 ml konc. HCl; vzorek : pufru 1:50 do plamene (acetylén-vzduch), Mg-výbojka při 285.2 nm; kalibrační roztoky obsahují interferenty Na^+ a K^+

reakce s magonem:

provedení: 10 μ l séra s 2 ml pracovního roztoku (20 mM borátového pufru o pH 9.5 a magonu 0.28 mM rozpuštěného ve směsi DMF s etanolem 5+100), výsledné pH *cca* 11; je ovlivněno Ca^{2+} a těžkými kovy – maskování kyanidem + fyziologické koncentrace iontů Ca^{2+} , Na^+ a K^+ ; pokles absorbance modře zbarveného komplexu okolo 500 nm

reakce s calmagitem:

provedení: v částečně nevodném prostředí s 2-metyl-2-amino-1-propanolem; maskování Ca^{2+} EGTA, měří se při 540 nm

hydrogenuhličitany

obsah: krev; určení poruch acidobazické rovnováhy

stanovení: v celé krvi, plazmě i séru jako CO₂ (po okyselení); referenční interval závisí na instrumentaci, obvykle CO₂ v kapilární plazmě asi 22 – 31 mM

fyzikální metody

plynný oxid uhličitý *manometricky*, pracné a nelze automatizovat

chemické metody

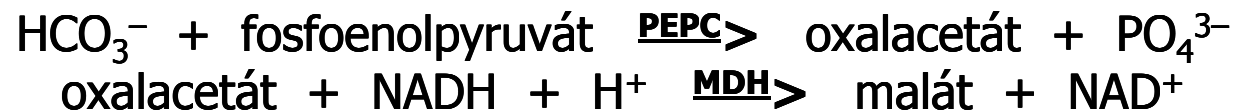
kontinuální měření – difúze CO₂ Si-membránou a sorbce jako HCO₃⁻ v alkalickém pufru, pH 9.2 s fenolftaleinem; pokles zbarvení (okyselení) fotometricky

elektrochemické měření – CO₂ elektroda, parciální tlak rozpuštěného plynu v krvi

enzymové metody

alkalizace – převedení na HCO₃⁻

enzymy: fosfoenolpyruvátkarboxylázou (PEPC), malátdehydrogenáza (MDH):



provedení: alkalický pufr *cca* 70 mM, pH 8 + fosfoenolpyruvát 8 mM, NADH 1.6 mM, mikrobiální PEPC *min* 17 $\mu\text{kat/l}$ a mikrobiální MDH *min* 4 $\mu\text{kat/l}$

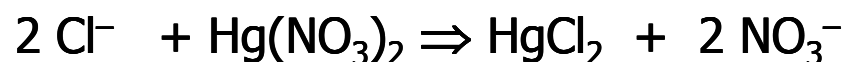
10 μl séra/plazmy (temperovaná kyveta) + 1 ml činidla, inkubace 5 min při 37 °C, absorbance při 340 nm

chloridy

obsah: hlavní extracelulární aniont (67 %)

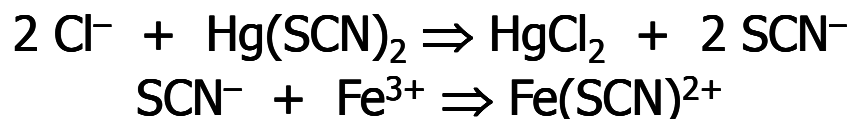
stanovení: v séru i plazmě; referenční interval v séru je 98 – 107 mM

titrace:



provedení: v kyselém prostředí, roztokem dusičnanu rtuťnatého 5 mM, vzorkem je 0.20 ml séra, indikátorem je difenylkarbazon 20 mM v etanolu

spektrofotometrie:



provedení: měří se kolem 500 nm (červený produkt), rozsah 80 – 125 mM, kalibrace není lineární, linearita konstantním množstvím $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ který váže cca 60 mmol Cl^- na 1 L chloridů

coulometrie:



provedení: generování Ag^+ konstantní rychlostí z anody až do ekvivalence. obsah chloridů je proto přímo úměrný měřenému času; kyselé prostředí (lepší vodivost) za přítomnosti želatiny nebo polyvinylalkoholu (reprodukovatelnost)

měď

obsah: metaloenzymy, v plazmě z 95 % na ceruloplasmin

stanovení: v séru; referenční interval ($\mu\text{mol/l}$) 10.1 – 18.4 (muži), 11.3 – 25.2 (ženy)

AAS:

: stačí pouze zředění vzorku

reakce s bathocuproinem:

provedení: deproteinace + redukční činidlo (hydroxylamin nebo pyrosiřičitan v kombinaci s p-(N-metyl)aminofenolem), odstředí se, supernatant se odměří do další zkumavky a přidá se roztok bathocuproinu; v silně kyselém prostředí oranžově zbarvený komplex se měří kolem 480 nm

: značně závisí na čistotě skla; EDTA, promyté vodou s amoniakem

zinek

obsah: metaloenzymy

stanovení: v plazmě, séru, slinách a moči; referenční interval (sérum) 10 – 20 μM

spektrofotometrie s 5-Br-PAPS

provedení: 2-(5-brom-2-pyridylazo)-5-(N-n-propyl-N-3-sulfopropylamino)fenol při pH 8.6 + maskovadla (další endogenní kovy), měří se při 560 nm, málo citlivé

AAS

provedení: vzorek se ředí 5x 5% glycerolem, měří se při 213.8 nm; moč jen ze 24 h sběru, moč je lze do plamene přímo; komplikace vysoký obsah solí v moči

vápník

obsah: kostní tkáň (99 %), extracelulární tekutina, aktivní pouze volný Ca^{2+}
stanovení: v séru, jen volný nebo i vázaný; referenční interval 2.1 – 2.6 mM

reakce s o-kresolftaleinkomplexonem:

provedení: pH 12 v prostředí organické báze (2-amino-2-metyl-1-propanol, 2-ethylaminoetanol); měří se při 580 nm, 8-hydroxychinolin potlačuje interference hořčíku

reakce s arsenazem III:

provedení: imidazolový pufr pH 6, modrý komplex, měří se kolem 650 nm; specifické detergenty potlačují interference bílkovin

AAS:

provedení: podobně jako hořčík, měří se Ca-lampou při 422.7 nm, drahé, vyšší přesnost i správnost

ISE:

: měří se aktivita Ca^{2+} , závisí hlavně na iontové síle (Na^+ a Cl^-) – kalibrátory

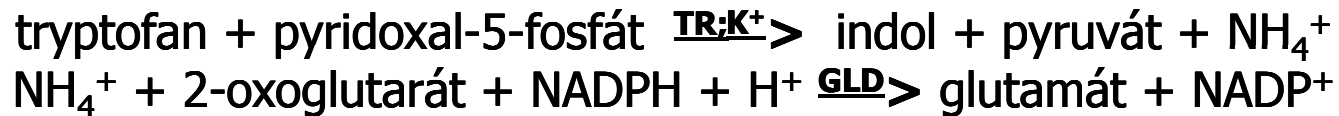
draslík

obsah: K⁺ hlavním intracelulárním kationtem (4.6 mM)

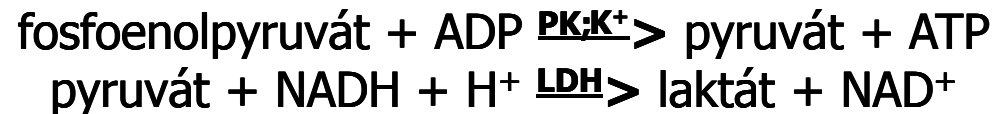
stanovení: ve všech tělních tekutinách, nejčastěji v plazmě a v séru, silně ruší hemolýza; referenční hodnoty v séru jsou 3.8 – 5.2 mM

enzymové metody

enzymy: tryptofanáza (TR), glutamátdehydrogenáza (GLD)



enzymy: pyruvátkináza (PK), laktátdehydrogenáza (LDH)



: snížení koncentrace Na⁺ kryptandem

chemické metody

stanovení AES:

provedení: sérum se ředí spektrálním pufrům (lithiovým nebo cesiovým, stabilizuje efektivní teplotu plamene; aniontové tenzidy Brij 35 nebo Sterox SE pro lepší atomizaci); plamen propan-vzduch; Na, K, Li a Cs s ostrými čarami při 589 nm, 768, 671 a 852 nm

stanovení pomocí ISE:

: elektroda s kapalnou membránou

sodík

obsah: Na⁺ hlavním extracelulárním kationtem (cca 142 mM)

stanovení: ve všech tělních tekutinách, nejčastěji v plazmě a v séru, silně ruší hemolýza;

referenční hodnoty v séru 132 – 142 mM

enzymové metody

enzymy: β-galaktosidáza (βGD)

2-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid $\beta\text{GC:Na}^+ \rightarrow$ galaktóza + 2-nitrofenol

2-nitrofenol (chromofor) se měří kineticky při 420 nm, snížení obsahu Na⁺ na měřitelné hodnoty se používá kryptand, např. Kryptofix 221

chemické metody

AES:

jako draslík

ISE:

elektroda se skleněnou membránou

barbiturany

obsah: léčiva (sedativa)

stanovení: v séru (kontrola medikace), v moči nebo v žaludečním obsahu (otrava)

chemické metody

plynová chromatografie:

provedení: k séru se přidá aprobarbital (vnitřní standard), dvojitá extrakce dietylerem, odvodnění síranem sodným a odpaření dosucha; odparek se rozpustí v etylacetátu; GC separace – kapilární kolona s kotvenou fází (WCOT), plamenový ionizační detektor, nosný plyn Ar nebo He; analýza různých typů barbituranů (tzv. rychle, středně a dlouhodobě působící)

titrační analýza:

provedení: extrakce směsí fosforečnanového pufru pH 7 a chloroformu; k organické fázi se přidá opět pufr a chlorid rtuťnatý, znovu se protřepe a odstředí se; organická fáze se titruje roztokem difenylthiokarbazonu (dithizon), přechod z fialové (komplex $[\text{Hg}^{2+}$ -barbituran]) do oranžové (komplex $[\text{Hg}^{2+}$ -dithizon]); interferují zejména hydantoiny a cyklické imidy kyseliny glutarové

bilirubin a jeho estery

obsah: metabolismus hemu přes biliverdin na bilirubin a konjugáty (estery mono- a diglukuronidy)

stanovení: v séru a v moči; referenční interval pro celkový bilirubin v séru (μM): novorozenci 68 – 138, děti a dospělí 3.4 – 17.1, z toho konjugovaný, tzv. přímý bilirubin 0 – 3.4

chemické metody

stanovení bilirubinu a jeho konjugátů (a části bilirubinu kovalentně navázaného na albumin) je založeno na vzniku azobilirubinu (acidobazický indikátor): červený ve slabě kyselém a neutrálním pH, v silně kyselé a alkalické oblasti je modrý; **konjugáty** (tzv. přímý bilirubin) reagují bez *akceleratorů*; **nekonjugovaný bilirubin** (tzv. volný) nereaguje, jen v přítomnosti *akceleratorů* (alkohol, kofein *aj.*), které uvolňují a solubilizují bilirubin z jeho vazeb na albumin

stanovení **celkového bilirubinu** za přítomnosti *akceleratorů*; při zvýšeném obsahu se stanovuje i tzv. přímý bilirubin bez akceleratorů; při novorozenecké žloutence a ozařování novorozenců UV-světlem, které slouží k rozkladu a odstranění volného, nekonjugovaného bilirubinu, byl pozorován vznik tzv. fotobilirubinů, které mají na rozdíl od popisovaného bilirubinu údajně jinou reakční kinetiku a mohou zkreslovat výsledky jeho stanovení

spektrofotometrie s diazotovanou kyselinou sulfanilovou:

provedení: IFCC metoda stanovení celkového bilirubinu; v kyvetě vzorek + roztok kyseliny sulfanilové v HCl (štěpí bilirubin v místě metylenového můstku) s roztokem akcelerátoru (směs kofeinu, octanu sodného a benzoanu sodného) + se roztok NaNO_2 (diazoniová soli); po asi 10 minutách se změří ve slabě kyselém prostředí absorbance červeně zbarveného azobilirubinu při 430 – 460 nm; stanovení přes modrou formu, přidá se po reakci alkalický roztok pufru (směs NaOH a vlnanu sodno-draselného) a v pH 12 se měří při 580 – 620 nm

stanovení přímého bilirubinu se provádí bez akcelerátoru zastavením diazoreakce kyselinou askorbovou (ukončení rozložením diazočinidla), ta se přidává obvykle za 5 nebo 10 minut; celkový bilirubin se stanovuje s kationaktivním detergentem jako akcelerátorem (cetyltrimetylamonium bromid)

spektrofotometrie po oxidaci:

provedení: oxidace bilirubinu (žlutý) kyselinou vanadičnou na biliverdin (zelený); dvoubodový způsob měření absorbance před a po oxidaci (3 min); lze stanovovat celkový i přímý bilirubin

enzymové metody

enzym: bilirubinoxidáza (BOX)

bilirubin (žlutý) **BOX** > biliverdin (zelený)

provedení: pH 4.5, měří se v pásu 424 – 465 nm kineticky v časovém intervalu asi 5 min; celkový bilirubin se stanovuje při pH 8.5 za přítomnosti akcelerátorů

etanol

obsah: intoxikaci alkoholem

chemické metody

Widmarkova metoda; destilace alkoholu ze vzorku, oxidace dvojchromanem v kyselině sírové na kyselinu octovou, přebytek dvojchromanu je stanovován titračně jodometricky; pro účely soudní je využíváno stanovení plynovou chromatografií

: k průkazu *těžkého alkoholizmu* byl vyvinut test na tzv. karbohydrátovou deficienci transferinu (CDT) na bázi heterogenní imunoanalýzy

enzymové metody

enzym: alkoholdehydrogenáza (ADH)



provedení: deproteinace vzorku kyselinou chloristou, alkohol se stanovuje ze supernatantu v alkalickém pufru pH 8.7 (pyrofosfát, semikarbazid a glycin), absorbance se měří při 37 °C při 340 nm po inkubaci 25 minut

drogy

obsah: zneužívaná léčiva (psychofarmaka) a jejich prekurzory – alkohol, amfetamin, barbiturany, benzodiazepiny, kannabinoidy, kokain, methadon, opiáty, antidepresiva, anabolické steroidy *aj.*

stanovení: řazeno mezi klinickou chemii akutních stavů (POCT)

chemické metody

kompetitivní imunochemie – rychlé statimové orientační stanovení nejobvyklejších drog, screening moči na diagnostického proužku

instrumentální techniky – GC-MS nebo HPLC, slouží většinou pro následnou kvantitativní analýzu po pozitivním screeningovém testu

screeningové imunostanovení

multifunkční (až 9-zónový) proužkový test, nejčastěji: amfetamin, barbituráty, benzodiazepiny, kokain, metamfetamin, morfin, fencyklidin a tricyklická antidepresiva (popř. na jejich metabolity)

provedení: *droga z moči (mAg) soutěží o vazebná místa s (obvykle) myší monoklonální protilátkou proti ní (Ab₁*), fixovanou na povrchu mikročástic, které jsou jen sorbovány (nekotveny) v dolní části proužku; v horní části proužku je kotvena jako další (druhá) protilátka Ab₂ proti myším imunoglobulinům tvořícím Ab₁**

po ponoření multiproužku do vzorku moči obsahující některou z testovaných drog zreaguje na počátku příslušného proužku protilátka a vytvoří *barevný imunokomplex [Ab₁*-mAg]* a vzlíná nahoru

moč bez drogy: komplex nevznikne a barevné mikročástice s fixovanou protilátkou vzlínají nahoru a ve střední části zreaguje **Ab₁*** se zde imobilizovanou drogou/metabolitem a vytvoří tam kotvený *barevný imunokomplex [Ag-Ab₁*]* jako **negativní kontrolu**

moč s drogou: vzlíná se vzorkem vytvořený *barevný imunokomplex [Ab₁*-mAg]* dál a zachytí se až nahoře, kde zreaguje s **Ab₂** a vytvoří silně zbarvený proužek jako **pozitivní test [Ab₂-Ab₁*-mAg]**; protilátka **Ab₁*** je v tomto případě antigenem pro druhou kotvenou protilátku **Ab₂**

citlivost: 10 – 100 ng/ml

užívají se mikročástice z koloidního zlata (Au), výsledné zbarvení negativní kontroly i pozitivního testu červené nebo modré (na povrchu modře zbarvené mikročástice)

glukóza

obsah: reprezentuje metabolismus cukrů

stanovení: v séru, plazmě a v moči (nejčastěji stanovovaný analyt); referenční interval (mM) pro sérum je 3.9 – 6.1, pro plazmu 3.3 – 5.6 a ve sbírané moči za 24 h je do 1.39

chemické metody

reakce s o-aminotoluenem

specifické (už jen galaktóza a manóza), supernatant deproteinovaného vzorku v prostředí ledové kyseliny octové, kdy o-aminotoluen (6 % o-toluidinu v 80 % kyselině octové obsahující 0.5 % kys. šťavelové) kondenzuje s Glu za zvýšené teploty na glykosylamin, stabilizovaný Schiffovou bází, měří se zelený produkt při *cca* 630 nm

: *agresivní chemikálie, nutnost varu a deproteinace vzorku*

enzymové metody

enzymy: hexokináza (HK), glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (G6PD), glukózaoxidáza (GOD), glukózadehydrogenáza (GDH), peroxidáza (POD)

stanovení s GDH



provedení: vzorek se smíchá s pracovním roztokem (fosforečnanový pufr pH 7.6, GDH *cca* 4.5 kU/l a NAD⁺ *cca* 2.2 mM), inkubuje 7 min při 37 °C, měří se nárůst absorbance při 340 nm

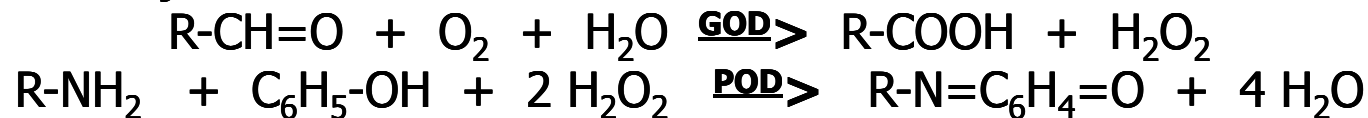
stanovení s HK a G6PD



provedení: vzorek s pracovním roztokem (TRIS 50 mM pH 7.5, ATP 1 mM, NAD⁺ 2 mM, HK cca 3 kU/l a G6PD 2 kU/l) při 37 °C, po 5 min se měří absorbance při 340 nm; HK je pro glukózu nespecifický enzymem, specifita je v následné reakci

stanovení oxidační kopulací s GOD a POD

v praxi nejrozšířenější

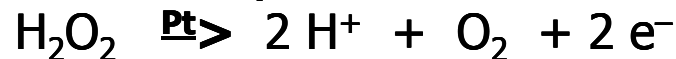


provedení: vzorek s pracovním roztokem (fosforečnan cca 0.15 mM pH 8.0, GOD 10 kU/l, POD 1 kU/l, AAP 1 mM a 3-metylfenol 10 mM) při 37 °C, měří se změna absorbance při 500 nm v intervalu 30 – 90 sekund nebo výsledné zbarvení po 15 min; druhá reakce nespecifická, rušena redukujícími látkami (vitamín C)

speciální analyzátory

osobní glukometry pro sebekontrolu diabetiků

provedení: imobilizovaná GOD a elektrodový systém v suchém stavu, indikace ampérometricky (tzv. Clarkova elektroda):



nebo: $\text{glukóza} + \text{O}_2 + \text{R-Fe(II)} \xrightarrow{\text{POD}} \text{glukonát} + \text{R-Fe(III)}$

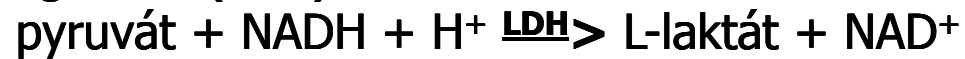
pyruvát

obsah: produkt oxidace laktátu katalyzované enzymem LDH,

stanovení: v krvi obsaženy v malém množství do asi 41 – 67 nM

enzymové metody

enzym: laktátdehydrogenáza (LDH)



kreatinin

obsah: buněčný produkt svalového energetického metabolismu přeměny svalového kreatinu

stanovení: základní vyšetření séra i z moči (funkci ledvin – kreatininová clearance); množství je úměrné velikosti svalové hmoty; referenční interval pro sérový kreatinin je pod 115 μM

chemické metody

Jaffého reakce

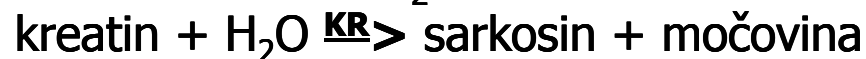
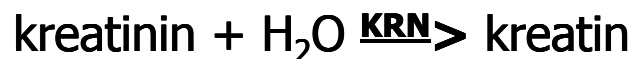
červenooranžový Janovského komplex (adukt kreatininu s pikrátem 1:1); nespecifické, reagují i tzv. nekreatininové chromogeny: bílkoviny, glukóza, kys. askorbová, guanidin, aceton, acetoacetát a pyruvát

provedení: sérum s pracovním roztokem (kys. pikrová 4.4 mM, NaOH 150 mM a Na_2HPO_4 13 mM), měří se absorbance za 10 s a dále přesně po 2 min při 492 nm **266**

enzymové metody

stanovení přes chinoniminová barviva

enzymy: kreatinináza (KRN), kreatináza (KR), sarkosinoxidáza (SOX), peroxidáza (POD)



provedení: vhodné deriváty fenolu – TBHB (2,4,6-tribrom-3-hydroxybenzoová kyselina) a EHSPT (N-etyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin), měří se absorbance při 550 nm

triacylglyceroly (TG)

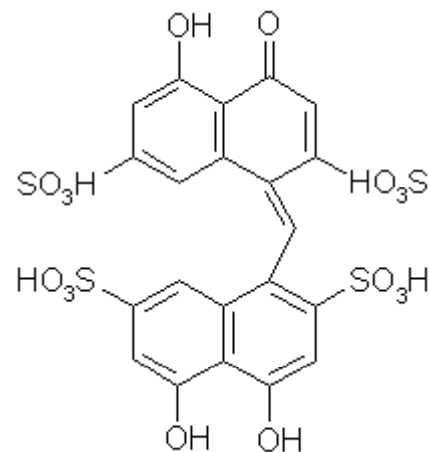
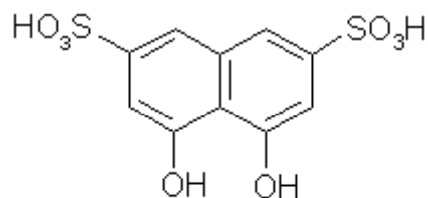
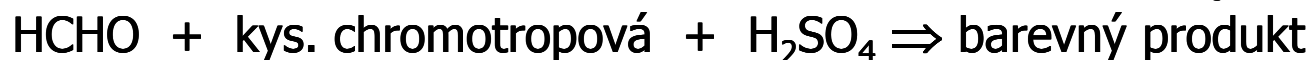
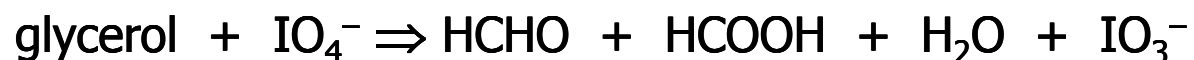
obsah: 95 % všech tuků uložených v tkáních, jsou tvořeny nasycenými mastnými kyselinami od C12 až do C18

stanovení: v séru (nezávislý faktor rizika ischemické choroby srdeční), referenční interval méně než 1.7 mM

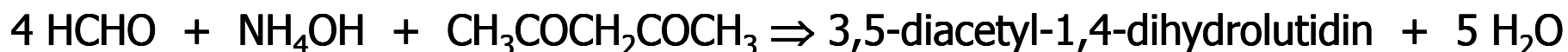
chemické metody

barevný produkt absorbující při 570 nm, nebo byl převeden acetylacetonem a octanem amonným (Hantzchova kondenzace) na žlutý 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin, který byl stanoven fotometricky nebo fluorimetricky

uvedené postupy lze (po extrakci TG) popsat těmito reakčními schématy:



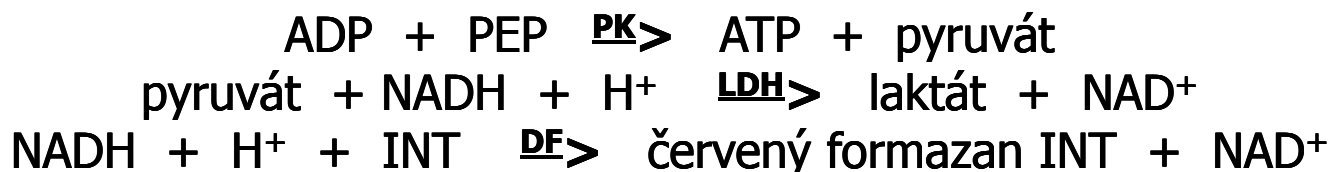
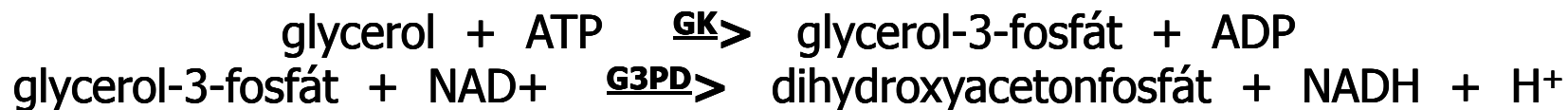
nebo:



enzymové metody

kombinace s chemickou metodou, využívají vznikající glycerol

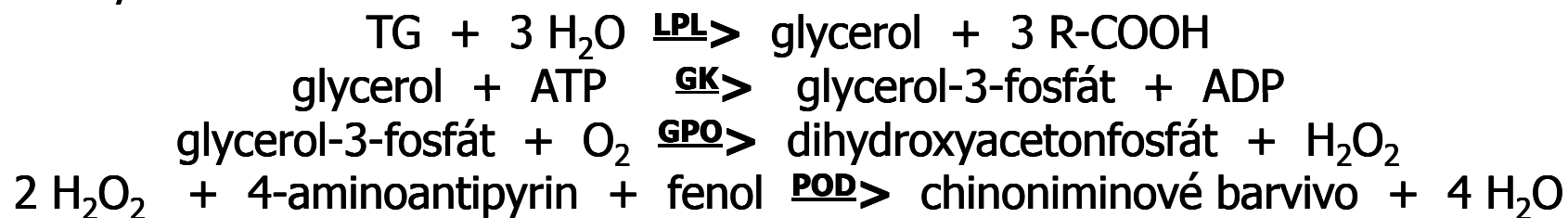
enzymy: glycerolkináza (GK), glycerol-3-fosfátdehydrogenáza (G3PD), pyruvátkináza (PK), laktátdehydrogenáza (LDH), diaforáza (DF), lipoproteinlipáza (LPL), glycerolfosfát oxidáza (GPO), peroxidáza (POD)



INT – jodnitrotetrazoliová violet', *cca* 500 nm

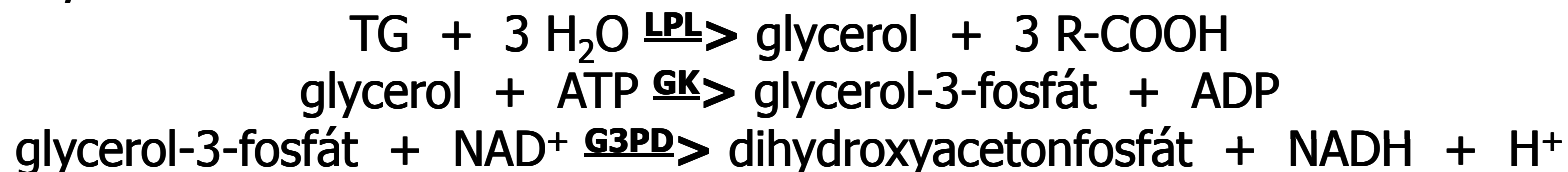
kombinace s chemickými metodami příliš komplikované a nevhodné pro automatizaci

stanovení přes chinoniminová barviva



fenoly: 4-chlorfenol, nebo kyselina 3,5-dihydroxybenzensulfonová (DHBS), nebo N-etyl-N-(3-sulfopropyl)-m-anisidin (ESPAS)

stanovení přes NADH



provedení: probíhá s jedním roztokem, je jednostupňová a je vhodná k automatizaci **269**

revmatoidní faktor

obsah: pentamerické imunoglobuliny IgM se specifitou pro Fc fragment IgG, podobné vlastnosti i u monomerních IgM, IgA a IgG

stanovení: v séru, indikace (až 75 %) všech revmatických onemocnění

latexový fixační test

provedení: separace dle Cohna (extrakce sadou roztoků etanolu za chladu), frakce II se smíchá s latexovými částicemi, na něž je pasivně sorbován γ -globulin, dochází k aglutinaci; citlivost je asi od 2 U/ml

Rose-Waalerův test

hemaglutinační test (ovčí erytrocyty modifikované taninem /zpevňuje buňky/, potažené králičí protilátkou proti ovčím erytrocytům); erytrocyty aglutinují se vzorkem obsahujícím lidský revmatoidní faktor na základě křížové reakce mezi králičím a lidským IgG

C-reaktivní protein (CRP)

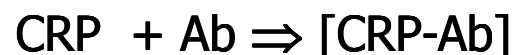
obsah: patří mezi tzv. bílkoviny akutní fáze a mezi rizikové faktory ischemické choroby srdce

stanovení: v séru, jeho koncentrace narůstá *cca* 7 h po zánětu a kulminuje během 1 až 3 dnů, kdy může dosahovat až tisíc mg/l, referenční interval je pod *cca* 1.6 mg/l

CRP lze stanovit různými imunochemickými metodami, nejčastěji jsou to metody s latexovými částicemi

imunoturbidimetrické stanovení

metoda **DuREL** (*dual-radius enhanced latex*) – latexové mikročástice o dvou velikostech s vázanými dvěma typy monoklonální protilátky s různou afinitou k CRP (velké částice s vysokou afinitou); při nízké koncentraci analytu reagují přednostně velké částice, při vyšších koncentracích analytu reagují i menší částice \Rightarrow citlivý, široký a lineární měřicí rozsah



: měří se turbidita při 340 nm

trypsin

obsah: EC 3.4.21.4, serinová proteináza, ve dvanácterníku

stanovení: v plazmě, v duodenální šťávě, ve stolici; test na poruchu exokrinní funkce pankreatu, referenční interval přibližně $150 \pm 77 \mu\text{g/l}$

enzymatické metody

imunochemicky (zejména RIA)

fotometricky s chromogenními substráty



žlutý chromofor 4-nitroanilin; podobný chromogenní substrát benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid

provedení: vzorek se ředí fyziologickým roztokem + pufr TRIS 200 mM pH 8 + substrát 1 mM, při 37 °C po 10 min se změří absorbance při 405 nm

těhotenský test (hCG)

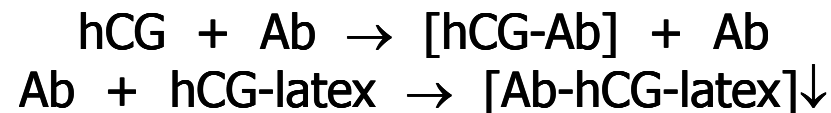
obsah: lidský choriový gonadotropin (hCG), glykoprotein, dimer à 40 kDa; hormon produkováný placentou

stanovení: v mateřské krvi a moči; od 8. dne po oplodnění vajíčka, hladina hCG v moči při těhotenství prudce narůstá, nejvyšší je 8. týden, pozitivní test při obsahu hCG nad 20 – 50 U/l

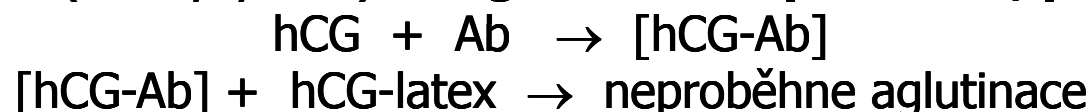
latexový aglutinační test

provedení: na podložním sklíčku; v moči, hCG reaguje s monoklonálním antisérem (Ab, myší), a buď inhibuje následnou aglutinační reakci po přidání latexových částic s fixovaným hCG, nebo ji neinhibuje (reakce proběhne); současně se provádí i tzv. pozitivní kontrola

malý obsah hCG (nestačí vyvázat antisérum) ⇒ **aglutinace proběhne, negativní:**



vysoký obsah hCG (vše vysyceno) ⇒ **aglutinace neproběhne, pozitivní:**



*test diagnostickým proužkem
s koloidním zlatem*

proužek obsahuje v místě nanesení vzorku (dole) sorbovanou, ale *nekotvenou monoklonální protilátku proti hCG na koloidních částicích zlata (**Ab₁-Au**)*, nahoře (ve směru difúze) dvě zóny s kotvenými protilátkami; prvá zóna obsahuje *kotvenou sekundární protilátku proti hCG (**Ab₂^b**)*, druhá zóna obsahuje *kotvenou protilátku proti Ab₁ (**Ab₃^b**)*

vysoký obsah hCG

hCG reaguje s primární protilátkou na komplex, difunduje nahoru a zachytí se na *prvé zóně* s kotvenou **Ab₂** jako *sendvič [**hCG-Ab₁-Au**]-Ab₂^b*; vznikne *červený proužek* (**pozitivní reakce**)

malý obsah hCG

žádný komplex, Ab₁ difunduje nahoru, zachytí se až *na druhé zóně*; tam se objeví *červený pruh* koloidního zlata (**negativní reakce**), slouží jako kontrola, že test je funkční

: místo koloidního zlata např. organické barvivo

proužek s protilátkou značenou enzymem

: podobné jako u koloidního zlata

: *primární hCG protilátkou je značena vhodným enzymem (\mathbf{Ab}_1^*); v místě zakotvené (\mathbf{Ab}_2^b) je v reakční zóně vhodný enzymový substrát a pomocné látky*

vysoký obsah hCG

vznikne *komplex* $[\mathbf{Ab}_1^*-\mathbf{Ag}]$, který difunduje a zachytí se na \mathbf{Ab}_2^b $[\mathbf{Ab}_1^*-\mathbf{Ag}]-\mathbf{Ab}_2^b$; enzym katalyzuje rozklad bezbarvého substrátu a *zóna se zbarví*

malý obsah hCG

žádný komplex, značená primární protilátka je zachycena v *kontrolní zóně třetí protilátkou* (\mathbf{Ab}_3^b) $[\mathbf{Ab}_1^*-\mathbf{Ab}_3^b]$; druhá zóna také obsahuje enzymový substrát – *barevný pruh*

substráty:

: pro enzym POD – TMB (v kyselém prostředí) : modré zbarvení

: pro enzymem ALP – fenolftalein- nebo thymolftaleinfosfátu (alkalické prostředí) :
červené až modré zbarvení

kvantifikace hCG pomocí ELISA

sendvičová technika; druhá Ab je konjugát s POD, substrát ABTS

Mycobacterium tuberculosis

obsah: *Mycobacterium* jsou acidorezistentní tyčinky, patogenní (tuberkulóza) je *M. tuberculosis* a *M. bovis*, atypická mykobakteria, např. *M. Kansasi* a *M. avireni* a původce malomocenství *M. leprae*; infekční je již i méně než 10 bacilů

stanovení: sputum, ranní vzorek, asi 5 – 10 ml po 3 dny za sebou, někdy i likvor, hnis, biopsie, moč; nebarví se dle Grama

kultivační průkaz

provedení: dekontaminace (nespecifická mikroflóra) NaOH 1 M za přítomnosti laurylsulfátu, neutralizace HCl; naočkování na půdu (*vaječná* s obsahem solí, asparaginu, glycerinu, škrobu a malachitové zeleně; nebo *tekutá* obsahující glutamát, L-alanin, kaseinový hydrolyzát, hovězí sérum *aj.*), inkubace při 37 °C, odečítá za 1, 3, 6 a 9 týdnů (vyřadit kontaminované půdy); při pozitivním výsledku se pokračuje určením zachycených kmenů a založí se vyšetření na jejich citlivost (rezistenci) vůči lékům; pro rozlišení *M. tuberculosis* od *M. bovis* se ověřuje schopnost tvorby niacinu, redukce dusičnanů na dusitany, citlivost vůči hydrazidu kyseliny thiofen-2-uhličitě (tzv. TCH-test) a hydrolýza Tween 80; *M. tuberculosis* má, na rozdíl od *M. bovis*, uvedené testy pozitivní

průkaz pomocí PCR

HIV (AIDS)

obsah: tělní tekutiny, virus lidské imunodeficiency, retrovirus

stanovení: v séru, imunochemické postupy (ELISA)