

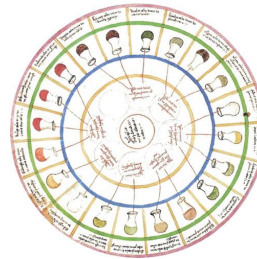
ANALYTICKÁ CHEMIE V POINT-OF-CARE (POC) DIAGNOSTICE



Doc. RNDr. Petr Kubáň, Ph.D.
CEITEC Masarykova Univerzita
Skupina Bioanalytická Instrumentace
petr.kuban@ceitec.muni.cz

TROCHA HISTORIE

URINE WHEEL – POC diagnostika v 15 století

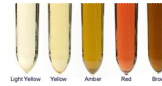


1506 by Ulrich Pinder

Epiphania Medicorum

Testování moči - uroskopie

Sladká - diabetes
Hn davá - Okoutenka
ervené zbarvení, p na - ledviny
Krev - rakovina mo ového ústrojí

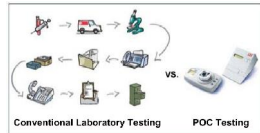


Point-of-care (POC) diagnostika

Diagnostické technologie, které umožňují analýzu vzorků pacientů mimo klinickou laboratoř (doma, v terénu, ve vozzech RZS)

Obvykle malé, jednoduché přístroje/zařízení které jsou schopné provést analýzu důležitých biomarkerů v klinických vzorcích (krev, sliny, moč)

Snižují dobu analýzy a nutnost transportu vzorku



1874 Anstie alkohol je obsažen i v dechu

1897 Nebelthau jedinci, kte i trpi cukrovkou mají v dechu aceton

1927 Bogen první alko tester
McNalley Breathalyzer

1936 Patent Harger



TROCHA HISTORIE

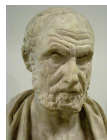
ANALÝZA DECHU

Hippokrates (460 BC - c. 370 BC)

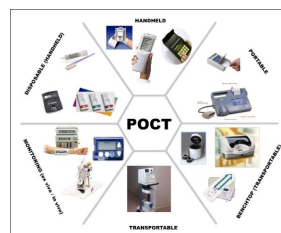
fetor oris and *fetor hepaticus* in his treatise on breath aroma and disease

Hippocrates, *The Corpus: The Hippocratic Writings*, Kaplan Publishing, New York, 2008.

The Hippocratic Corpus (Latin: *Corpus Hippocraticum*) is a collection of around seventy early medical works from Alexandrian Greece. It is written in Ionic Greek



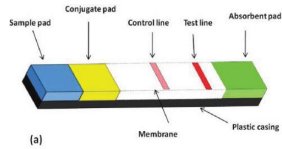
PŘÍKLADY POC ZAŘÍZENÍ



Na jedno použití
Ruční
Přenosné
Laboratorní (přenosné)

LATERAL FLOW ASSAYS (LFA)

série navzájem se překrývajících membrán
materiál obvykle celulóza, nitrocelulóza, cellulose acetate, skleněná vlákna atd.



PŘÍPRAVA LFA

Production of
Lateral Flow test in a basic
equipped lab.

LATERAL FLOW ASSAYS (LFA)

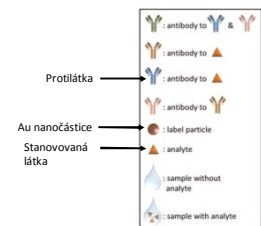
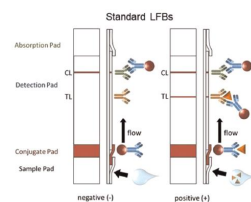
SAMPLE PAD

- nadávkování vzorku
- případná separace plasmy (odstranění červených krvinek, atd.)
- uniformní tok vzorku

CONJUGATE PAD

- obsahuje protilátky specifické pro analyzovanou látku
- protilátky jsou navázané na částice, které lze detekovat
- modrá barva – latexové částice (velikost nm)
- červená barva – Au nanočástice

STANDARDNÍ PŘÍPRAVA LFA



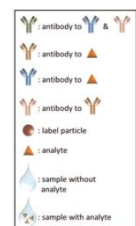
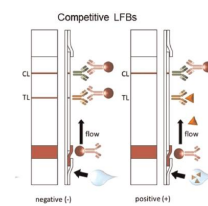
MEMBRÁNA

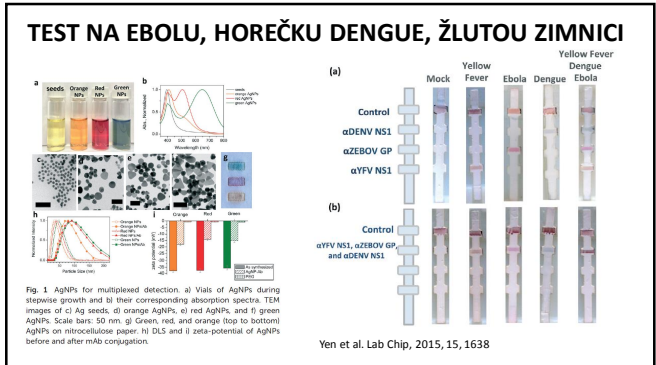
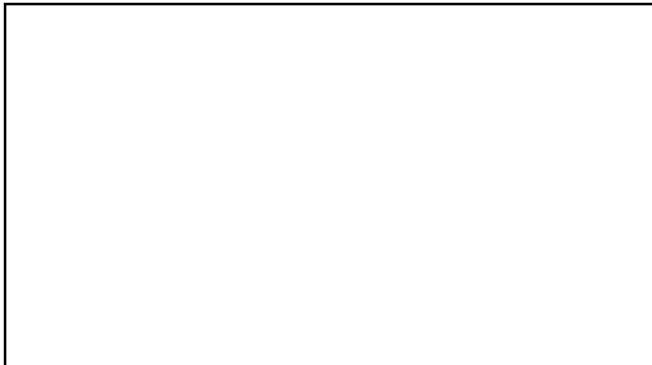
- celá řada materiálů, obvykle hydrofilní nitrocelulóza
- na membránu se nanesou dvě zóny, jedna testovací a jedna kontrolní
- testovací zóna obsahuje imobilizované antigeny, které zachytí analyt s navázanou barevnou částicí
- kontrolní zóna slouží ke kontrole funkčnosti celého LFA

ABSORBENT PAD

- obvykle celulóza
- udržuje konstantní tok reagentů a vzorku
- sběr odpadu

KOMPETITIVNÍ LFA





TEST NA AIDS (2012)

<http://www.omegadiagnostics.com/products/by-area/hiv/>

VISITECT HIV 1/2

VISITECT® HIV 1/2 is a qualitative test for the detection of antibodies to HIV 1/2 virus in human serum, plasma and whole blood specimens. The test is easy-to-use, offers high sensitivity and specificity and produces accurate results within 15 minutes.

CRP test

C-reaktivní protein (CRP) je bílkovinou akutního zánětu, a tedy vysoce citlivý parametr zánětu.

je součástí reakce akutní fáze imunitního obranného systému

jeho hladina v krvi se zvyšuje u všech druhů bakteriálních zánětlivých procesů, a to již za 6-12 hodin od začátku zánětu

vyšetření CRP je považováno za nejčastěji ordinované vyšetření ve vyspělých zemích západního světa, a to od úrovně praktického lékaře až po vysoce specializovanou pracoviště.

CRP pentamer v krevní plasmě

TEST NA AIDS (2012)

VISITECT® CD4 je test na HIV na jedno použití.

Je semi-kvantitativní, rychlý a stanovuje CD4 v kapce krve.

CD4 + T-buňky jsou přesný marker pro stanovení progresu onemocnění.

Test je snadno ovladatelný a poskytuje odpověď na otázku zda "léčit" nebo "ne" do 40 minut.

Omega Diagnostics Group has announced the launch of a ground-breaking new point-of-care disposable test for the detection of HIV.

VISITECT CD4 detects CD4 T-cell levels and was developed by the Burnet Institute in Melbourne, Australia.

An easy-to-use semi-quantitative lateral flow test, it uses a finger-prick blood sample to produce a visual result in 40 minutes, enabling patients to receive life-saving antiretroviral treatment before leaving the clinic.

Video player showing a CRP test advertisement. The video displays a box of CRP test kits and a person using the test. The video player interface includes a progress bar at 0:50 / 1:00 and social media icons.

GLUKOMETRY

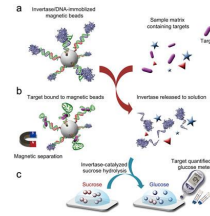
přístroje určené k domácímu měření [glykémie](#), tzv. self-monitoring (sebekontrola) glykémie.

Podle výše glykémie a na základě předchozích zkušeností lze odhadnout množství inzulínu, které je nutno aplikovat.

Záměrem self-monitoringu je, pomocí systematického měření glykémie, docílit glykemické křivky nediabetiků.

Glukometry také zpravidla umí vypočítat týdenní a měsíční průměr z naměřených hodnot glykémie.

PŘÍKLAD VYUŽITÍ GLUKOMETRU PRO JINÉ ANALÝZY



Většina současných glukometrů využívá k měření glykémie elektrochemickou metodu, která je založena na měření [elektrického proudu](#) mezi pracovní a registrační [elektrodou](#) tzv. metodou [ampérometrie](#).

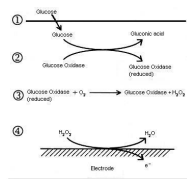
Na testacím proužku je úzká [kapilára](#), kterou je krev nasávána dovnitř.

Zde proběhne oxidace glukózy za vzniku peroxidu vodíku.

Čím více je glukózy v krvi, tím více vznikne molekul peroxidu vodíku.

Peroxid vodíku je v glukometru [elektrolyticky](#) rozkládán.

Takto vzniká proud záporně nabitých částic, jenž může být změněn glukometrem jako elektrický proud. Velikost proudu odpovídá výsledné glykémii



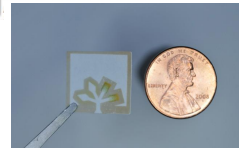
PAPÍROVÁ MIKROFLUIDIKA

<http://gmwgroup.harvard.edu/>

George M. Whitesides

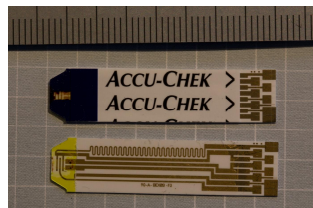


George M. Whitesides was born August 3, 1939 in Louisville, KY. He received an A.B. degree from Harvard University in 1960 and a Ph.D. from the California Institute of Technology (with J.D. Roberts) in 1964. He was a member of the faculty of the Massachusetts Institute of Technology from 1963 to 1982. He joined the Department of Chemistry of Harvard University in 1982, and was Department Chairman 1986-89, and Mallinckrodt Professor of Chemistry from 1982-2004. He is now the Woodford L. and Ann A. Flowers University Professor.

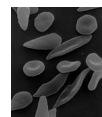


ACCU CHECK (Roche)

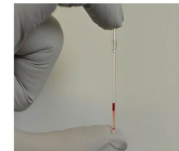
<https://www.accu-check.cz/>



Srpkovitá anemie



změna tvaru červených krvinek tzv. promáčknutých pískotů na protažené srpky



Průměrná délka života lidí postižených touto nemocí je 42 let u mužů a 48 let u žen

A low-cost, rapid test for sickle cell disease. After centrifugation over an aqueous multiphase system, blood cells from a donor with sickle cell disease separate by density. Dense cells characteristic of sickle cell disease form a red layer at the bottom of the test.

A paper-based electrochemical sensor that can be read with a commercial glucose meter. (A) Wax printing allows the high-throughput production of devices with hydrophobic regions and screen printing is used to add electrodes on top of the printed devices. (B) Comparison of a commercial test strip for glucose with a paper-based test strip. (C) The paper-based test strip fits into a commercial glucose meter.

NO MONITORING

www.nioxmino.com, www.aerocrine.com

The New NIOX MINO[®]
Asthma Inflammation Monitor

A universal mobile electrochemical detector (uMED). The uMED device (left) can perform a variety of electrochemical analyses on commercial and custom electrodes. Results can be transferred through the audio jack of any phone to enable connectivity (right).

ASTHMA

Asthma is a disease that causes the airways of the lungs to swell and narrow, leading to wheezing, shortness of breath, chest tightness, and coughing.

#ADAM

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/aboutnlm/>

MONITORING DECHU

Spirometry measures how fast and how much air you breathe out.

Peak flow meter

#ADAM

A peak flow meter is commonly used by a person with asthma to measure the amount of air that can be expelled from the lungs. If the airways become narrow or blocked due to asthma, peak flow values will drop because the person cannot blow air out of the lungs as well. A peak flow meter can be a useful aid in monitoring a person's asthma over time and can also be used to help determine how well a patient's medications are working.

Pollen

Dust mites

Mold

Pet dander

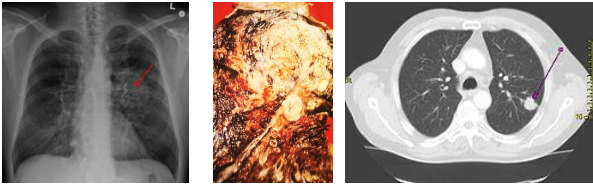
#ADAM

Proper warm-up and cool-down may prevent or reduce the incidence of exercise-induced asthma.

#ADAM

RAKOVINA PLIC


nejčastější formou rakoviny na světě




nemalobuněčný typ a malobuněčný typ

nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC) se někdy léčí [chirurgicky](#)
malobuněčný plicní karcinom (SCLC) má obvykle lepší odezvu na léčbu [chemoterapií](#)

ANALÝZA DECHU

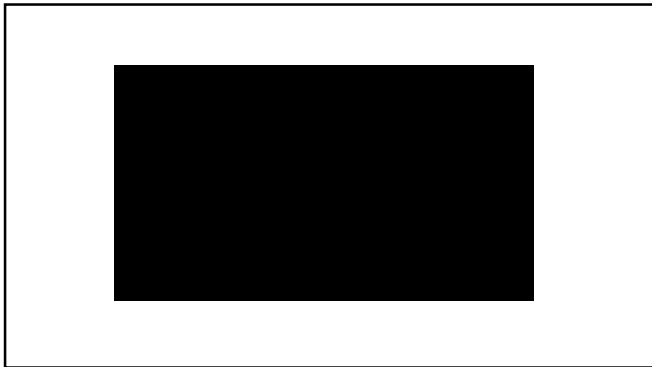


Antoine Lavoisier 1784



Breath Research Institute of the Austrian Academy of Sciences

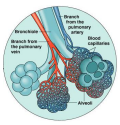
40




BREATH ANALYSIS

What Your Breath Reveals

Average person exhales between 10-90.000 L of air per day



Some analytes can be analyzed by CE-C4D, some by CE-LIF

39

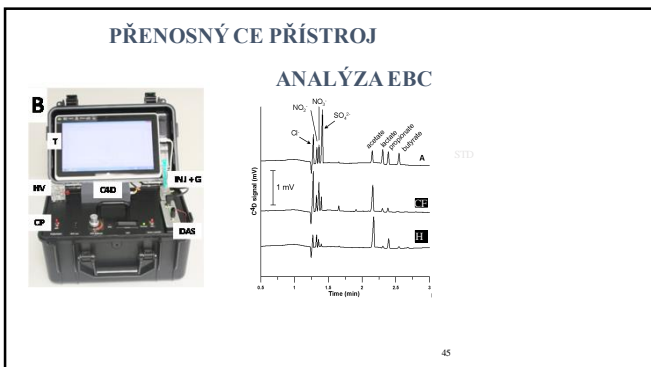
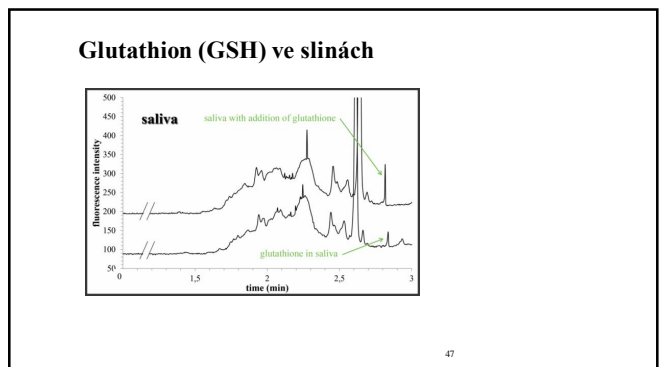
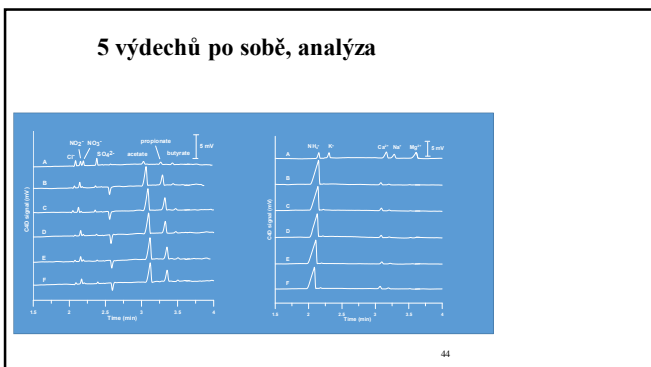
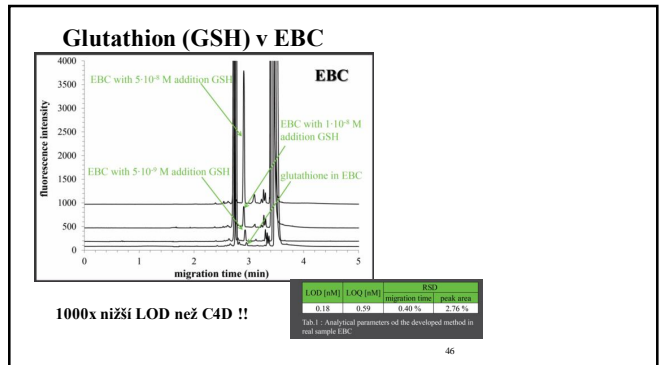
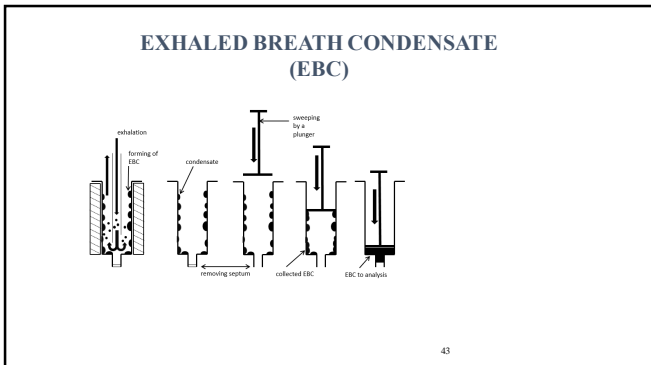
KONDENZÁT VYDECHOVANÉHO VZDUCHU (EBC)– analýza jednoho výdechu



Price: 0,05 EUR
Volume of EBC/1 breath: 20 µL

Price: 20 EUR
Volume of EBC/1 breath : 25 µL

42



CF – cystická fibróza

lidská di nánemoc, která postihuje p eváOn dýchací a trávicí soustavu.

Jde o autozomální recesivní vrozené onemocnění ní zp sobené mutací genu produkujícího protein CFTR (anglicky Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Lé ba se v sou asnosti souste uje zejména ná lé bu dýchacího ústrojí . inhalace, fyzioterapie, antibiotika. Nemocní uívají trávicí enzymy v kapsích, tedy ná odstra ování d sledk onemocnění. Jeho p í ina je lé ítelná, ale zatím nevylé ítelná.^[1]

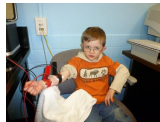
Polovina nemocných se dnes v eské republice doívá alespo 32 let. P edpokládá se, že kaOdý 25. lov k v populaci je p enaze em postiženého genu, ale jeliko má jednu kopii pozkozenou a druhou v po ádku, onemocnění se u n ho neprojevuje

DIAGNOSTIKA CF

diagnostické onemocnění
 nefunkční iontový transport
 dýchací obtíže, infekce, GI trakt atd.

DIAGNÓZA:

**ZVÝŠENÁ HLADINA
 CHLORIDŮ V POTU**



POUŽITÍ IONTOVÝCH POMĚRŮ vs. CHLORIDY

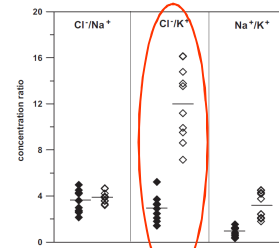


Fig. 4. The concentration ratios of chloride, sodium and potassium in a group of healthy individuals (●, n = 10) and patients with cystic fibrosis (○, n = 10). The horizontal lines indicate the average of concentration ratios of the selected ions in each group. Samples analyzed by DOBEI-CE, CE conditions: the same as in Fig. 1.

POTNÍ TEST



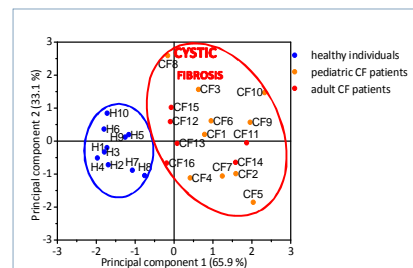
- BOLESTIVÉ**
- POUŽITÍ CHEMIKÁLIÍ NA POKOŽCE (pilocarpine)**
- DOBA TESTU ca 30 MINUT**

ALTERNATIVNÍ SBĚR POTU



- BEZBOLESTNÝ**
- BEZ POUŽITÍ CHEMIKÁLIÍ (DI WATER)**
- DOBA TESTU ca 10 VTEŘIN**

PCA V DIAGNOSTICE CF



CE-C4D SIMULTÁNNÍ ANALÝZA IONTŮ

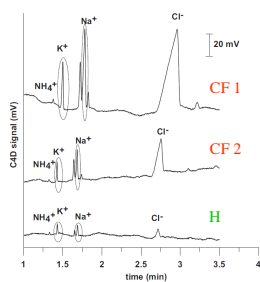
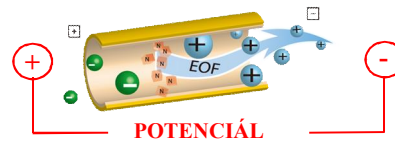


Fig. 2. DOBEI-CE separation of skin wipe of a person with ΔF508 and G551D mutation before (A) and 14 days after (B) the treatment with Kafoyles. Trace (C) is a comparison with skin wipe from a healthy volunteer. CE conditions: the same as in Fig. 1.

KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (CE) V DIAGNOSTICE OTRAV

**RYCHLÁ
 MALÉ OBJEMY VZORKŮ
 VYSOKÉ ROZLIŠENÍ**



METABOLISMUS METANOLU

Chemical reaction: CH3OH >> CH2=O >> C(=O)OH

Alcohol dehydrogenase: CH3OH + NAD+ -> CH2=O + NADH + H+

Formaldehyde dehydrogenase: CH2=O + NAD+ -> C(=O)OH + NADH + H+

Formic acid is circled in red with the note: "Metabolic poison and tissue injury".

Chromatogram shows peaks for: 20 min (alcohol), 25 min (formaldehyde), 30 min (formic acid), 35 min (lactate), 40 min (pyruvate), 45 min (oxalate).

← **CE**

Fig. 3. Normalised chromatogram of standard samples with 100% relative retention times. 100% relative retention times: 20.0 min (alcohol), 25.0 min (formaldehyde), 30.0 min (formic acid), 35.0 min (lactate), 40.0 min (pyruvate), 45.0 min (oxalate). The x-axis is time (min) and the y-axis is detector signal (mV).

CE SEPARACE KREVNIHO SÉRA PACIENTA OTRÁVENÉHO METANOLEM

MONITORING OF HAEMOLYTIC TREATMENT

Chromatograms (A-E) show peaks for lactate and formate. Trace A is labeled "patient", B "lactate", C "lactate", D "lactate", E "formate". A red arrow indicates "haemolytic treatment" between traces B and C.

Graph: Lactate concentration (mmol/L) vs. data hemodialyzy (hod). The concentration drops from ~10 to ~0.5 over 10 hours.

Fig. 4. CE analysis of diluted serum samples and a standard solution. Diluted serum sample of a patient in the beginning phase of haemodialysis treatment (trace A), 1h after the first sample (trace B), 2h thereafter (trace C) and 1 hour after (trace D). Trace E is a standard solution containing 1 mM citrate and 0.1 mM concentrations of other analytes. CE conditions as in Fig. 3.

MOŽNOST DETEKCE METANOLU ALKOTESTEREM?

56

PŘENOSNÝ ANALYZÁTOR INTOXIKACE METANOLEM (GRANT TAČR)

Je schopen zjistit p řítomnost metanolu a kyseliny mraven ní do 5-10 min
 Analýza z kapky krevního séra (1-10 uL)
 Jednoduché pouřítí, ambulance, vozidla RZS

PACIENT INTOXIKOVANÝ METANOLEM UMĚLÉ DÝCHÁNÍ

Endotracheal tube goes through patient's nose and into the stomach.

Respiratory condenser: Means air or air mix is cooled rapidly, through which the patient's always.

None particularly clear in the patient.

As breathing to the patient condenses ethylene glycol, which forms and releases formate.

Exhaled air flows away from the patient.

NO FORMATE IN BREATH CONDENSATE

NEED FOR INVASIVE SAMPLING 6 BLOOD/SERUM

OTRAVY ETHYLENGLYCOLEM

occurs usually as unintentional ingestion of antifreeze (small children, pets)

Symptoms not easy to distinguish from other intoxications

Chemical reaction: C2H4(OH)2 + NAD+ -> C2H4(O)2 + NADH + H+

Glycolate is converted to Glyoxylate, which is then converted to Oxalate.

Pyruvate is converted to Lactate.

ETHYLENE GLYCOL INTOXICATION

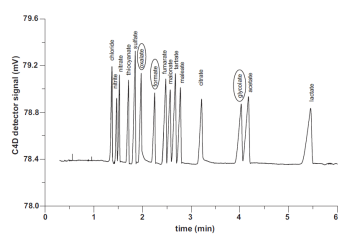
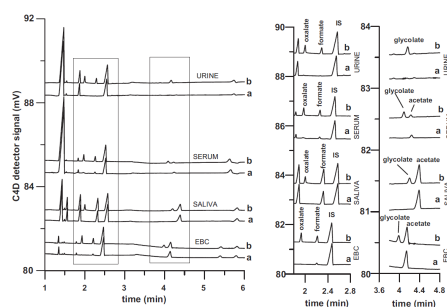


Fig. 2. Separation of model mixture of 15 inorganic and organic anions. CE conditions: separation voltage -15 kV, detection C4D, analyte concentrations: $50 \mu\text{M}$, except glycolate, acetate and lactate ($100 \mu\text{M}$).

CE ANALÝZA BIOLOGICKÝCH VZORKŮ



ZÁVĚR

ANALYTICKÁ CHEMIE NALÉZÁ ZNAČNÉ UPLATNĚNÍ V POC
DIAGNOSTICE

JEDNODUCHOST JE HLAVNÍ DEVIZA

POUŽITÍ V TERÉNU, LEVNÉ ZAŘÍZENÍ

JE STÁLE CO OBJEVovat ☺