

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



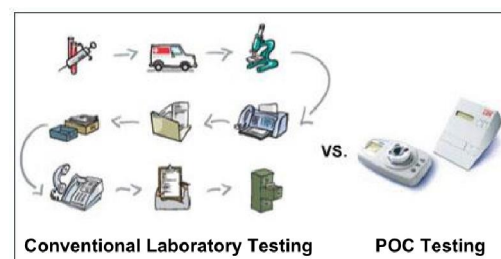
Doc. RNDr. Petr Kubáň, Ph.D.
CEITEC Masarykova Universita
Skupina Bioanalytická Instrumentace
petr.kuban@ceitec.muni.cz

Point-of-care (POC) diagnostika

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



TROCHA HISTORIE

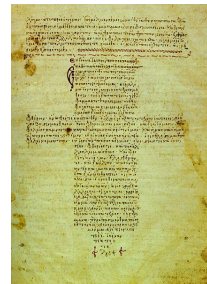
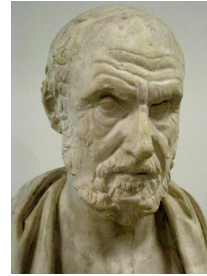
ANALÝZA DECHU

Hippokrates (460 BC . c. 370 BC)

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

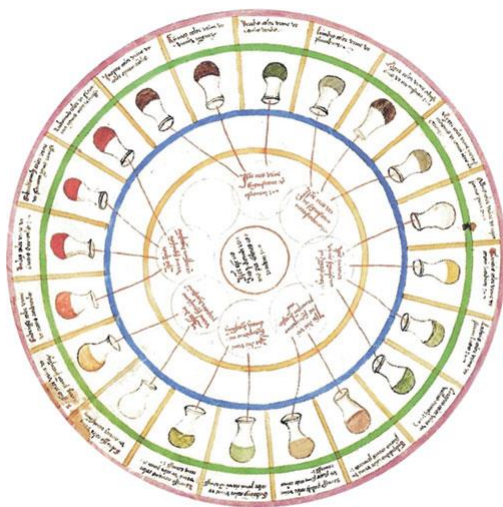
Hippocrates, *The Corpus: The Hippocratic Writings*, Kaplan Publishing, New York, 2008.

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



TROCHA HISTORIE

URINE WHEEL – POC diagnostika v 15 století



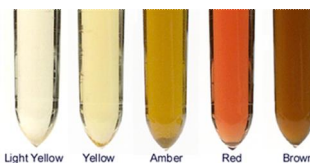
1506 by Ulrich Pinder

Epiphanie Medicorum

Testování moči - uroskopie

Sladká
Hn davá
ervené zbarvení, p na
Krev

- diabetes
- Oloutenka
- ledviny
- rakovina mo ového ústrojí



Light Yellow Yellow Amber Red Brown



Clear Slightly Cloudy Cloudy Turbid

- 1874 Anstie alkohol je obsažen i v dechu
- 1897 Nebelthau jedinci, kteří trpí cukrovkou mají v dechu aceton
- 1927 Bogen první alko tester
McNalley Breathalyzer
- 1936 Patent Harger



PŘÍKLADY POC ZAŘÍZENÍ



Na jedno použití
Ruční
Přenosné
Laboratorní (přenosné)

DRUHY POC ZAŘÍZENÍ

Indikátorové papírky (analyty v moči, pH, atd)

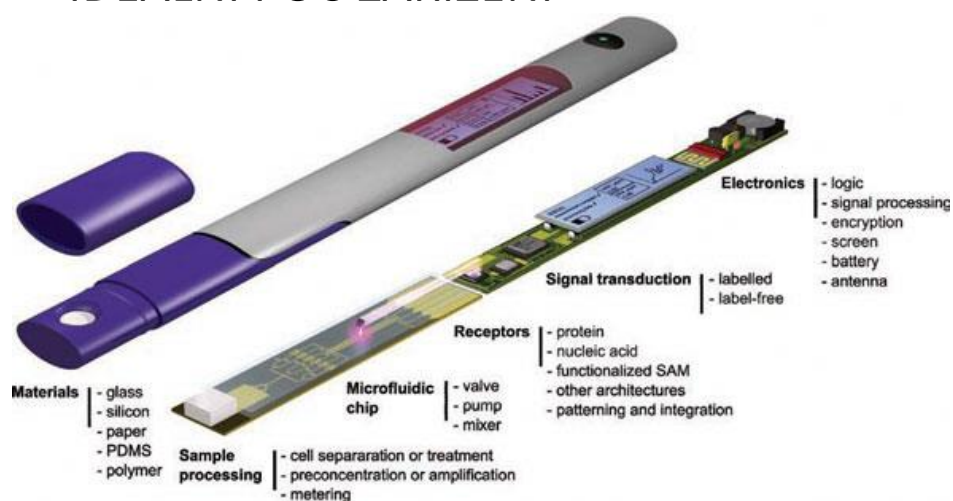
Papírové mikrofluidické platformy

Lateral flow assays (LFA)

Mikrofluidické analyzátoary

Zařízení na bázi chytrých telefonů

IDEÁLNÍ POC ZAŘÍZENÍ



<http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=21383.php>

INDIKÁTOROVÉ PAPIRKY



Indikátorové pH papírky s rozsahem měření pH 5,0-9,0 jsou vhodné pro orientační měření pH, např. při zjišťování kyselosti organismu a následné úpravě stravovacího režimu.



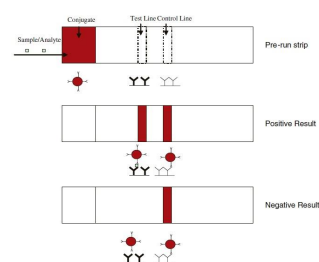
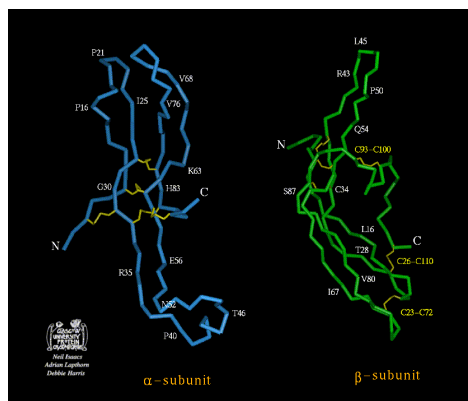
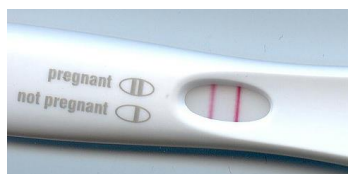
Analyty: bílé krvinky
 dusitan
 proteiny
 pH
 krev
 ketony
 urobilinogen
 bilirubin
 glukosa

TESTS AND READING TIME	
LEU	LEUKOCYTES 2 minutes NEGATIVE (light green) TRACE (light brown) SMALL (medium brown) MODERATE (dark brown) LARGE (black)
NIT	NITRITE 60 seconds NEGATIVE (yellow) POSITIVE (any degree of orange/pink color)
URO	UROBILINOGEN 60 seconds NORMAL (0.2, 1 mg/dL URINE (1 mg = approx. 1 EU)) MODERATE (2, 4) LARGE (8)
PRO	PROTEIN 60 seconds NEGATIVE TRACE 30 100 300 2000 or more
pH	pH 60 seconds 5.0 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5
BLO	BLOOD 60 seconds NEGATIVE NON-HEMOLYZED TRACE MODERATE HEMOLYZED TRACE MODERATE LARGE
SG	SPECIFIC GRAVITY 45 seconds 1.000 1.005 1.010 1.015 1.020 1.025 1.030
KET	KETONE 40 seconds NEGATIVE 5 15 40 80 160
BIL	BILIRUBIN 30 seconds NEGATIVE SMALL MODERATE LARGE
GLU	GLUCOSE 30 seconds NEGATIVE 50 (1%) 100 (2%) 250 (5%) 500 (10%) 1000 (20%) 2 or more (40% or more)

TĚHOTENSKÝ TEST

hCG - lidský choriogonadotropin - hormon

byl objeven v moči těhotných žen poprvé roku 1927 a na jeho detekci je dnes založena naprostá většina těhotenských testů.



hCG glykoproteinový hormon je hCG možné zjistit také v moči

hCG tvořen dvěma podjednotkami, označovanými jako α a β

α podjednotka hCG není specifická

β podjednotka hormonu hCG je specifická

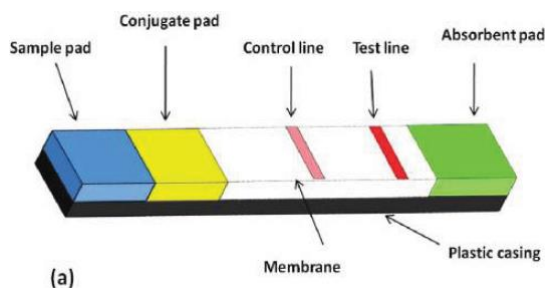
v sedmdesátých letech 20. století, v souvislosti s objevem výše zmíněné β podjednotky hCG a od let devadesátých můžeme teprve hovořit o těhotenských testech vysoké spolehlivosti, které jsou schopny zachytit těhotenství i relativně časně, jejichž užití je velmi snadné a výsledek zjistitelný zpravidla během pár minut.

Po aplikaci moč vzlíná testovacím proužkem. Pokud je v moči přítomný hCG, naváže se na v testu obsaženou protilátku spřaženou s barvivem. Takto vzniklý komplex vzlíná k testovací zóně (první okénko), kde je přítomna další protilátka proti hCG. Dochází k zachycení imunokomplexu a vytvoření barevné reakce (běžně barevný proužek, či jiná značka). Zbytek „obarvené“ protilátky dále vzlíná k tzv. kontrolní zóně (druhé okénko), kde se rovněž zobrazí zmíněný barevný efekt, značící, že test byl správně proveden.

Citlivé těhotenské testy jsou schopné zachytit přítomnost hCG v moči od koncentrace 10 mIU/ml, zpravidla však až od 20 mIU/ml. Test je vhodný nejdříve v předpokládaném třetím týdnu těhotenství. Pro srovnání – krevní test dokáže detekovat hCG již od hodnoty 2 mIU/ml.

LATERAL FLOW ASSAYS (LFA)

série navzájem se překrývajících membrán
materiál obvykle celulosa, nitrocelulosa, cellulose acetate, skleněná vlákna atd.



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 navázány na částice, které lze detekovat
- modrá barva – latexové částice (velikost nm)
- červená barva – Au nanočástice

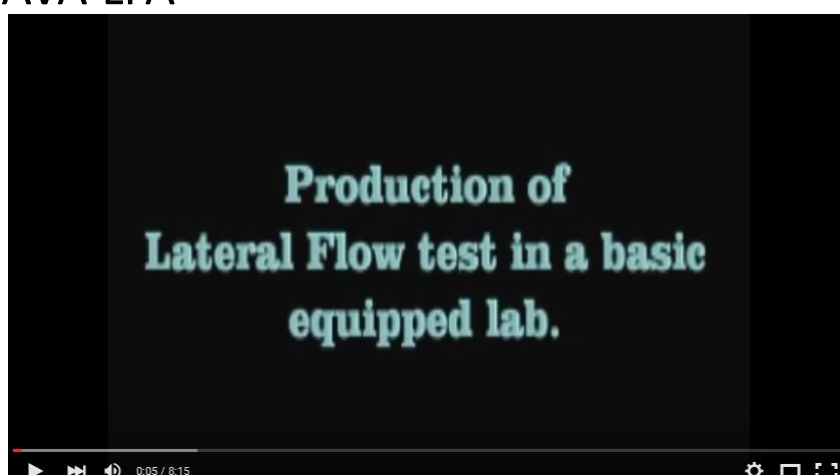
MEMBRÁNA

- celá řada materiálů, obvykle hydrofilní nitrocelulóza
- na membránu se nanese 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

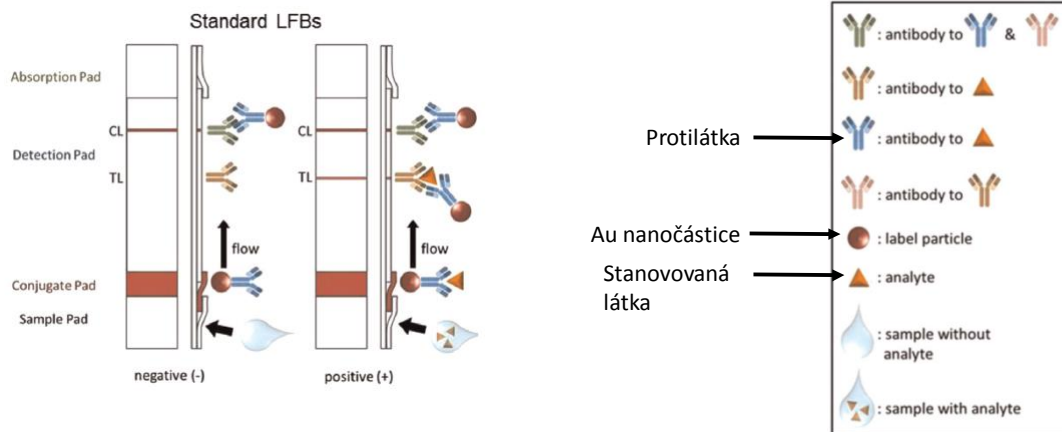
ABSORBENT PAD

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

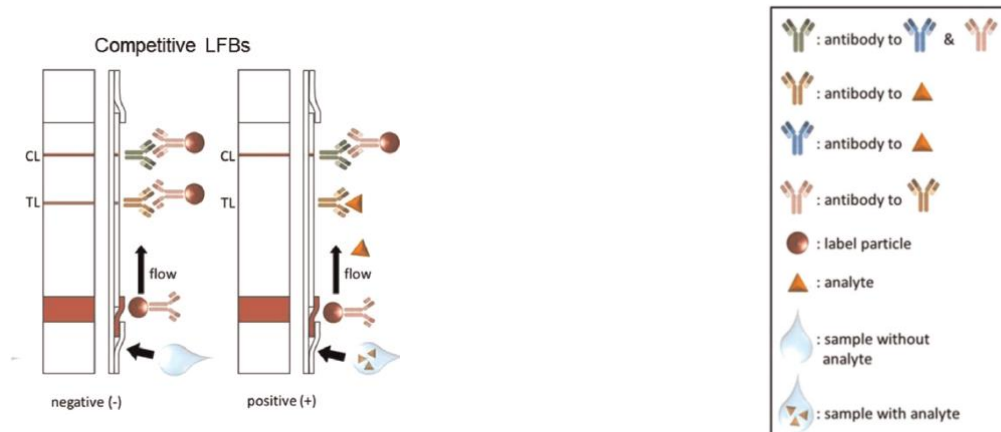
PŘÍPRAVA LFA



STANDARDNÍ PROVEDENÍ LFA



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.

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.

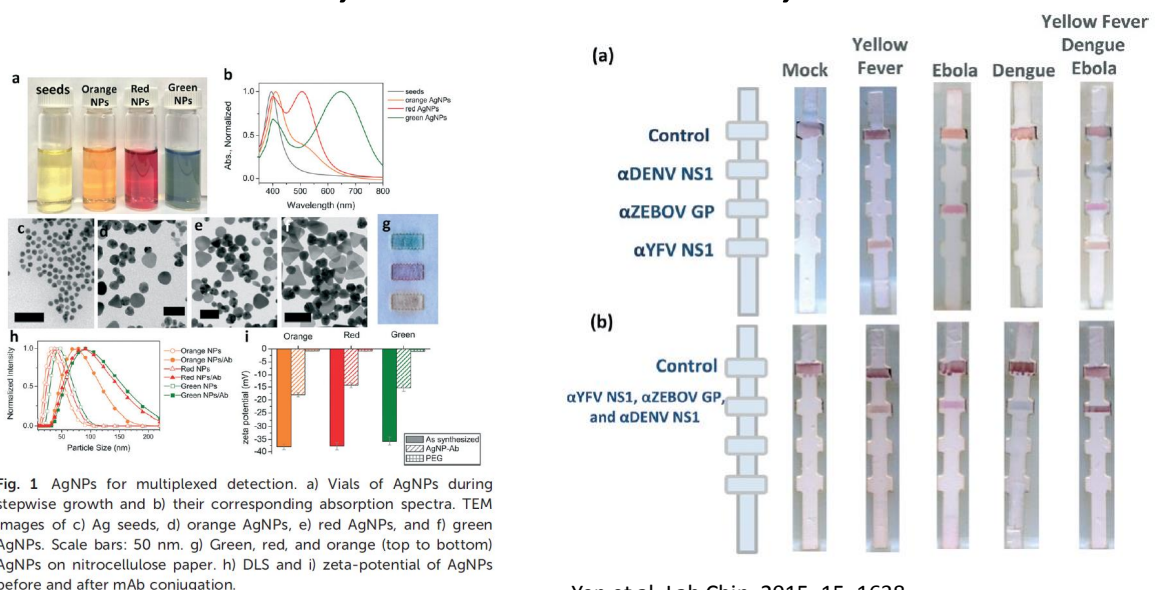
Test je snadno ovladatelný a poskytuje odpověď na otázku zda "lčít" nebo "ne" do 40 minut.

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.

TEST NA EBOLU, HOREČKU DENGUE, ŽLUTOU ZIMNICI



Yen et al. Lab Chip, 2015, 15, 1638

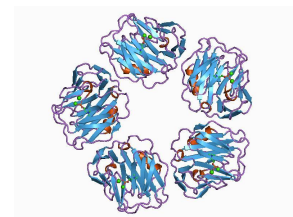
CRP test

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 specializovaná pracoviště.



CRP pentamer
v krevní plasmě



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 nediabetika.

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

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

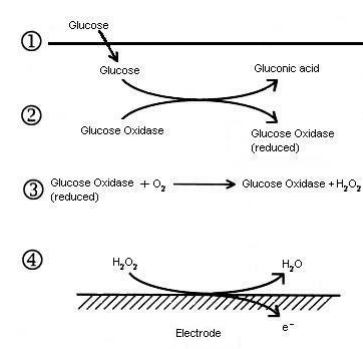
Na testacím proužku je úzká [kapilára](#), kterou je krev nasávána dovnitř.

Zde proběhne oxidace glukózy za vzniku peroxidu vodíku.

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

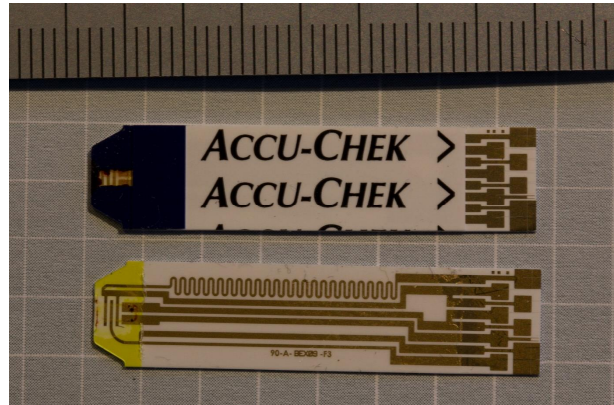
Peroxid vodíku je v glukometru [elektrolyticky](#) rozkládán.

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

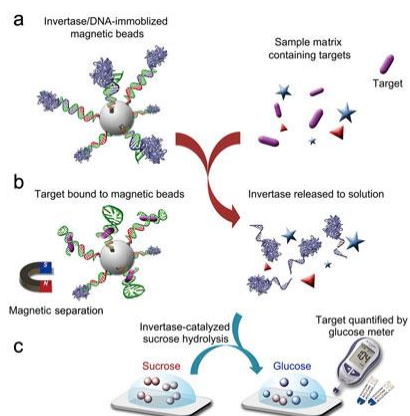


ACCU CHECK (Roche)

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



PŘÍKLAD VYUŽITÍ GLUKOMETRU PRO JINÉ ANALÝZY



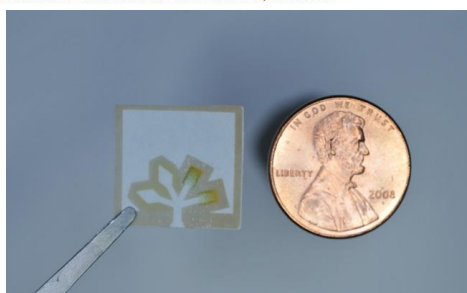
PAPÍROVÁ MIKROFLUIDIKA

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

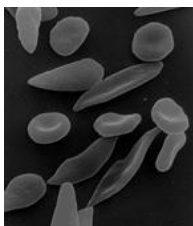
George M. Whitesides



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.

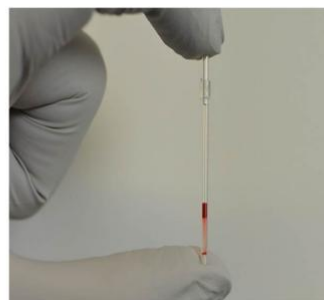


Srpkovitá anemie

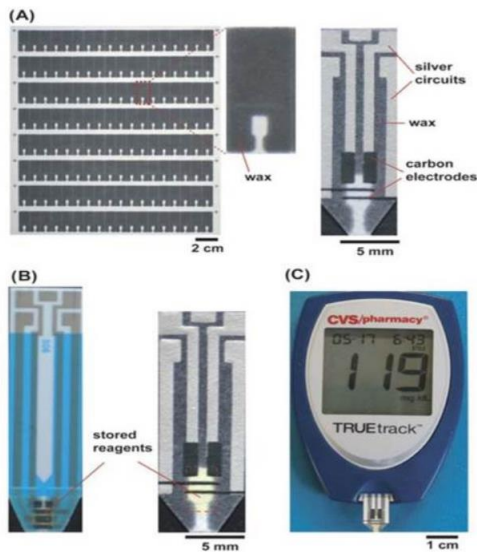


změna tvaru červených krvinek
tzv. promáčknutých piškotů na
protažené srpky

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.

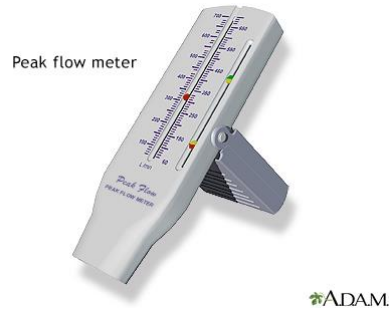
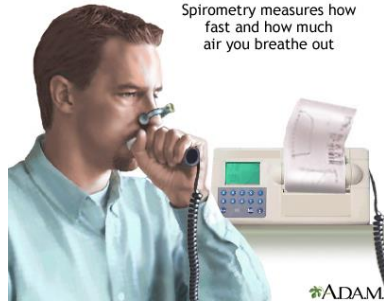


A paper-based electrochemical sensor that can be read with a commercial glucose meter. (A) Wax printing allows the high-throughput production of devices with hydrophobic regions and screen printing is used to add electrodes on top of the printed devices. (B) Comparison of a commercial test strip for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



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).

MONITORING DECHU



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.

NO MONITORING

www.nioxmino.com, www.aerocrine.com

The New NIOX MINO®
Asthma Inflammation Monitor
From the company that is revolutionizing the way asthma is managed



Niox® (niox) is produced in the epithelial cells of the bronchial wall as part of the inflammatory process. NIOX produces increases when there is an eosinophilic airway inflammation.

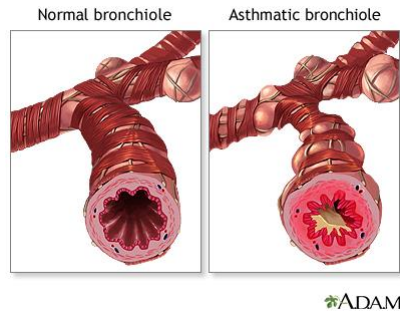
The presence of endogenous N2 in exhaled air was first reported in 1991 by Cates and et al. and in 1993. Along with NIOX, an individual was recruited to patients with asthma. These researchers are among the founders of the company Aerocrine.

There has been a continuous line of research and a large body of data (>1,000 publications) in peer reviewed medical journals that confirm the clinical value of exhaled NIOX measurements.



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.



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



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



RAKOVINA PLIC

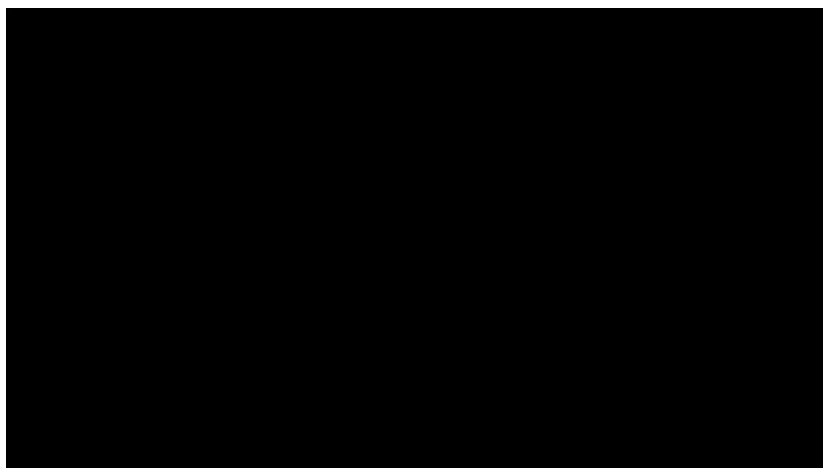
nejčastější formou rakoviny na světě



nemalobuněčný typ a malobuněčný typ

nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC) se někdy léčí [chirurgicky](#)

malobuněčný plicní karcinom (SCLC) má obvykle lepší odezvu na léčbu [chemoterapií](#)



BREATH ANALYSIS

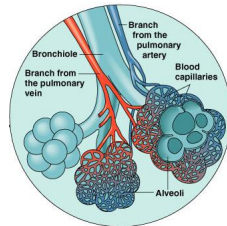
What Your Breath Reveals

EXHALED BREATH CONTAINS thousands of chemical compounds that can signal health issues. Scientists are developing tests to diagnose a growing list of diseases based on breath. Some diseases—and the clues that come out of your mouth.

- ASTHMA:** *Nitric oxide* levels rise when airways are inflamed.
- STOMACH ILLNESS:** The gut bacteria *H. Pylori*, when removed with a chemical treatment, emits a *carbon isotopic* in breath.
- LUNG CANCER:** Tumors create dozens of unique *volatile organic compounds*, while sensory arrays identify subtle patterns.
- DIABETES:** Elevated levels of *acetone* in breath indicate ketosis, which reflects insufficient glucose.
- KIDNEY DISEASE:** "Electronic nose" test recognizes *ammonia-like odor* linked to renal failure.
- LIVER DISEASE:** Patients whose livers can't metabolize a tracer solution containing methacetic acid show changes in *carbon dioxide* levels.
- IRRITABLE BOWEL SYNDROME:** *Elevated hydrogen* in breath can indicate bacterial overgrowth in small intestine.
- LACTOSE MALABSORPTION:** Undigested lactose in the colon is fermented by bacteria, raising *hydrogen* breath levels.
- HEART TRANSPLANT REJECTION:** Rejection creates oxidative stress that produces *alkanes* and *methylketones* in breath.



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

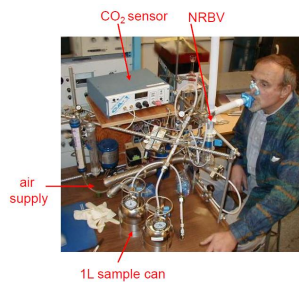


Some analytes can be analyzed by CE-C4D, some by CE-LIF

ANALÝZA DECHU



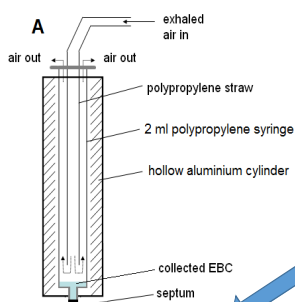
Antoine Lavoisier 1784



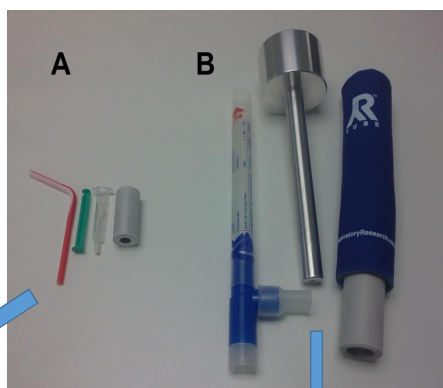
Breath Research Institute of the Austrian Academy of Sciences



KONDENZÁT VYDECHOVANÉHO VZDUCHU (EBC)– analýza jednoho výdechu



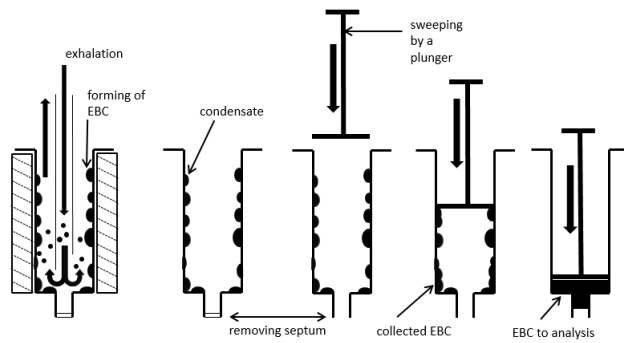
Price: 0,05 EUR
Volume of EBC/1 breath:
20 μL



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

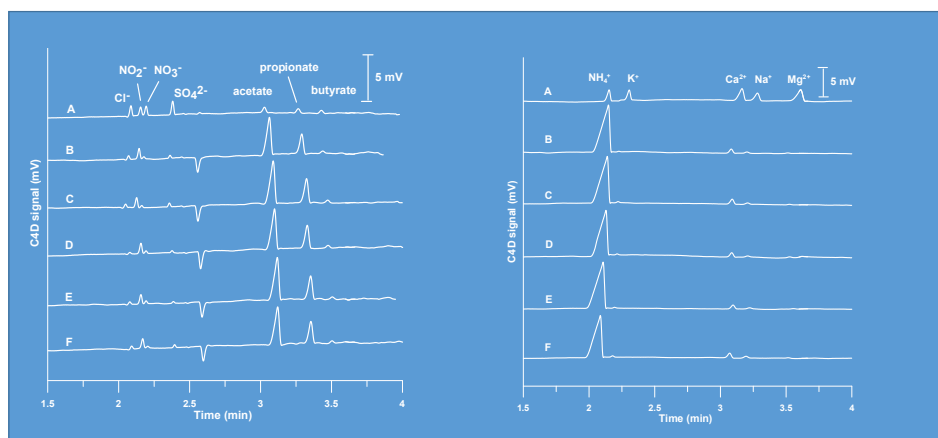
42

EXHALED BREATH CONDENSATE (EBC)



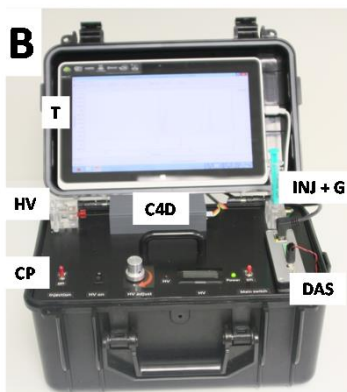
43

5 výdechů po sobě, analýza

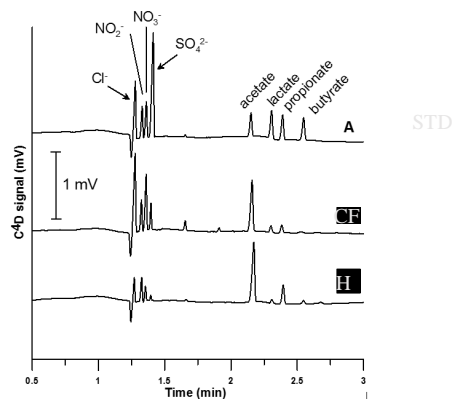


44

PŘENOSNÝ CE PŘÍSTROJ

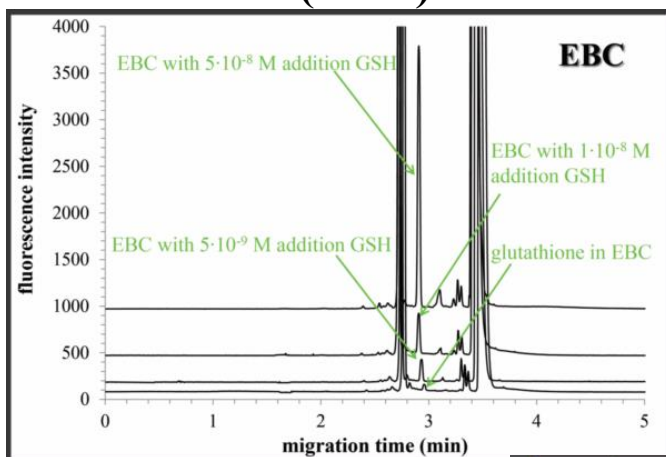


ANALÝZA EBC



45

Glutathion (GSH) v EBC



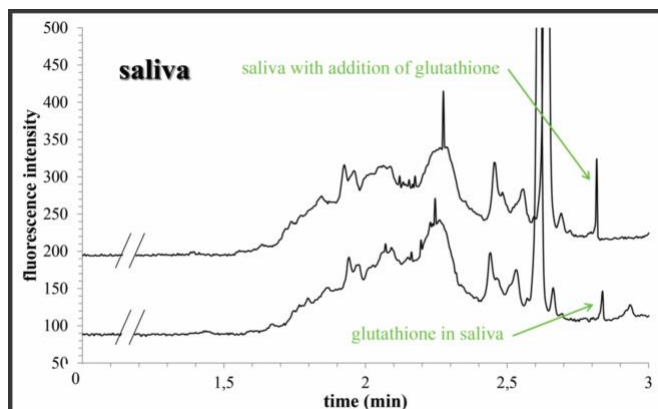
1000x nižší LOD než C4D !!

LOD [nM]	LOQ [nM]	RSD	
		migration time	peak area
0.18	0.59	0.40 %	2.76 %

Tab.1 : Analytical parameters of the developed method in real sample EBC.

46

Glutathion (GSH) ve slinách



47

CF – cystická fibróza

lidská di děná [nemoc](#), která postihuje p evá0n [dýchací](#) a [trávicí soustavu](#).

Jde o [autozomální recesivní vrozené onemocnění](#) způsobené [mutací genu](#) produkujícího protein [CFTR](#) ([anglicky](#) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Léba se v současnosti soustřeďuje zejména na léčbu dýchacího ústrojí: inhalace, fyzioterapie, antibiotika. Nemocní užívají trávicí enzymy v kapslích, tedy na odstranění následků onemocnění. Jeho příčina je léčitelná, ale zatím nevyřešitelná.^[1]

Polovina nemocných se dnes v České republice dožívá alespoň 32 let. Předpokládá se, že každý 25. člověk v populaci je přenašečem postiženého genu, ale jelikož má jednu kopii pozkozenou a druhou v pořádku, onemocnění se u něho neprojevuje.

DIAGNOSTIKA CF

dědičné onemocnění

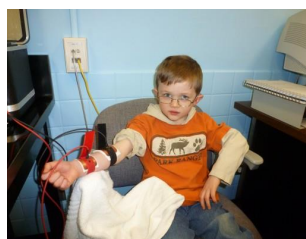
nefunkční iontový transport

dýchací obtíže, infekce, GI trakt
atd.

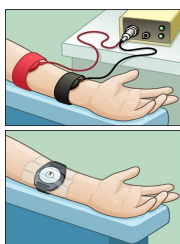


DIAGNÓZA:

**ZVÝŠENÁ HLADINA
CHLORIDŮ V POTU**



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

50

CE-C4D SIMULTÁNNÍ ANALÝZA IONTŮ

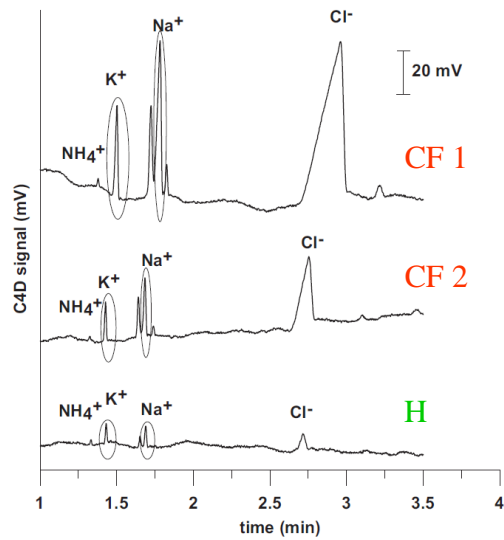


Fig. 2. DOI-CE separation of skin wipe of a person with ΔF508 and G551D mutation before (A) and 14 days after (B) the treatment with Kalydeco. Trace (C) is a comparison with skin wipe from a healthy volunteer. CE conditions: the same as in Fig. 1.

51

POUŽITÍ IONTOVÝCH POMĚRŮ vs. CHLORIDY

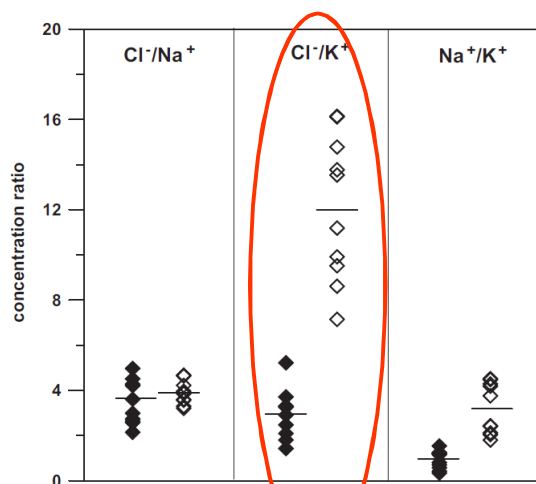
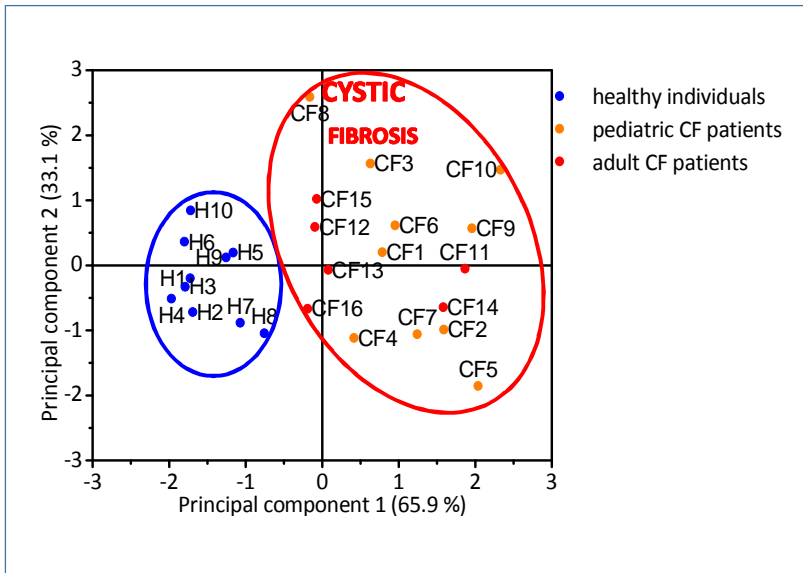


Fig. 4. The concentration ratios of chloride, sodium and potassium in a group of healthy individuals (\blacklozenge , $n=10$) and patients with cystic fibrosis (\lozenge , $n=10$). The horizontal lines indicate the average of concentration ratios of the selected ions in each group. Samples analyzed by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

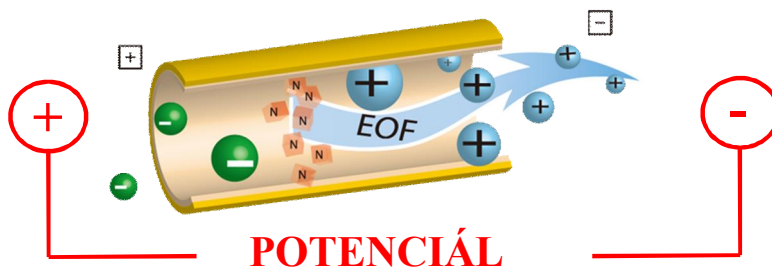
52

PCA V DIAGNOSTICE CF



KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (CE) V DIAGNOSTICE OTRAV

**RYCHLÁ
MALÉ OBJEMY VZORKŮ
VYSOKÉ ROZLIŠENÍ**



METABOLISMUS METANOLU

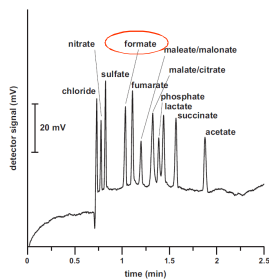
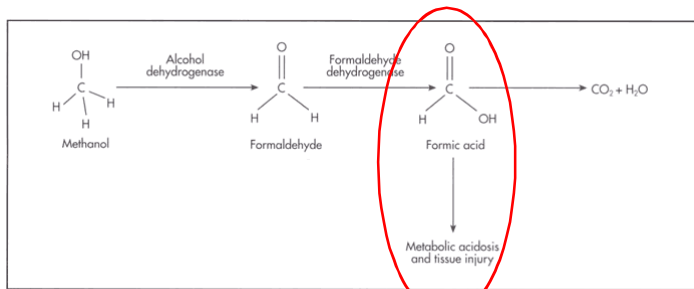


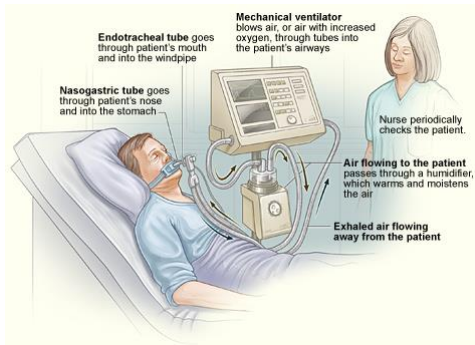
Fig. 3. Separation of model mixture of 13 anions and organic acids. CE conditions: separation electrolyte: 10 mM HBS/5 mM GEL; 30 μM CTAB; pH: 4.68. Separation voltage: -18 kV. Hydrodynamic injection: 10 cm/20 s. Anion concentrations: 50–200 μM . CAD detection.

← CE

MOŽNOST DETEKCE METANOLU ALKOTESTEREM?



PACIENT INTOXIKOVANÝ METANOLEM UMÉLÉ DÝCHÁNÍ



**NO FORMATE IN
BREATH CONDENSATE**



NEED FOR INVASIVE SAMPLING 6 BLOOD/SERUM

CE SEPARACE KREVNÍHO SÉRA PACIENTA OTRÁVENÉHO METANOLEM

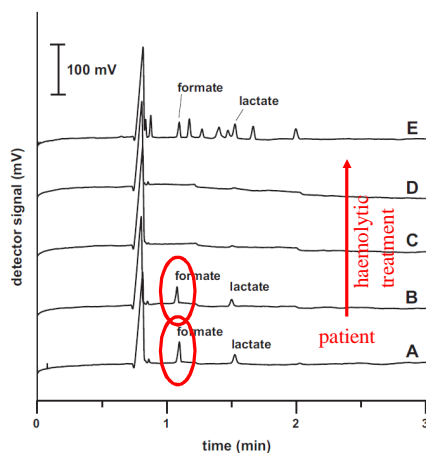
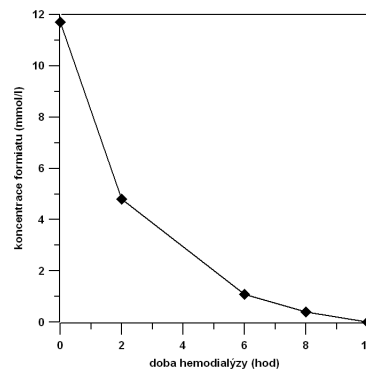


Fig. 6. CE analysis of diluted serum samples and a standard solution. Diluted serum sample of a patient in the beginning phase of hemodialytical treatment (trace A), 1 h after the first sample (trace B), 25 h thereafter (trace C) and 1 week after (trace D). Trace E is a model solution containing 1 mM chloride and 0.1 mM concentrations of other analytes. CE conditions as in Fig. 3.

MONITORING OF HAEMOLYTIC TREATMENT



58

PŘENOSNÝ ANALYZÁTOR INTOXIKACE METANOLEM (GRANT TAČR)

Je schopen zjistit přítomnost metanolu a kyseliny mravenčí do 5-10 min

Analýza z kapky krevního séra (1-10 uL)

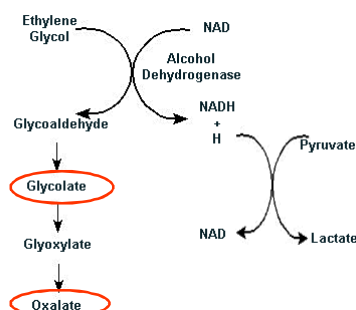
Jednoduché použití, ambulance, vozidla RZS



OTRAVY ETHYLENGLYCOLEM

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

Symptoms not easy to distinguish from other intoxications



ETHYLENE GLYCOL INTOXICATION

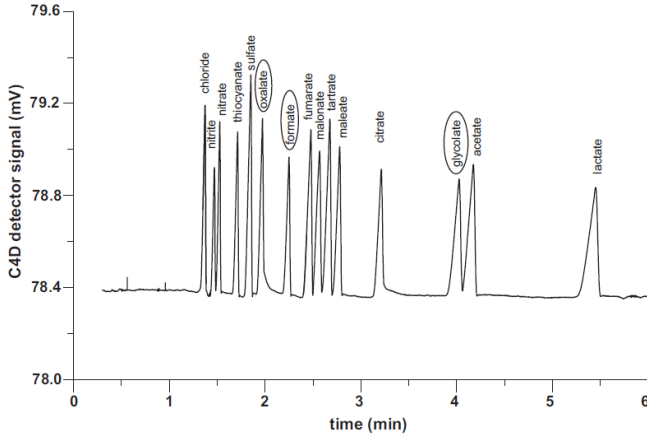
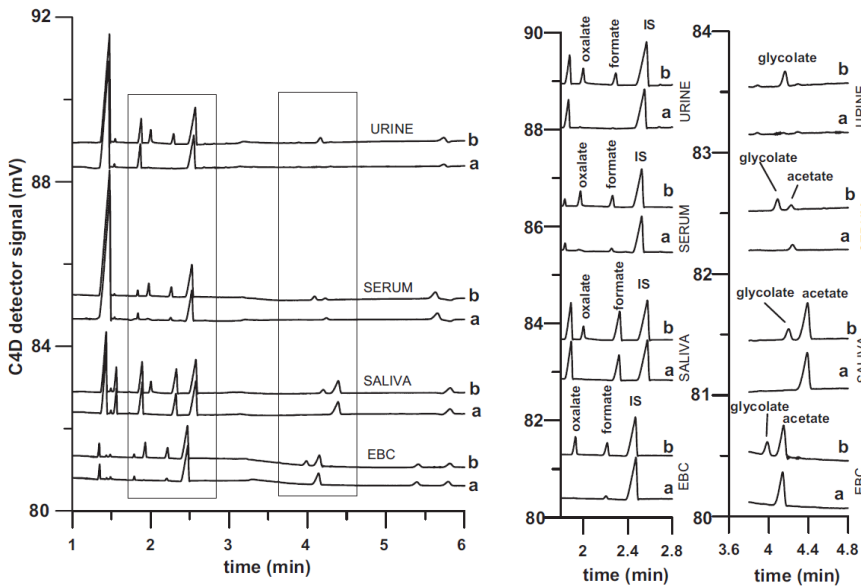


Fig. 2. Separation of model mixture of 15 inorganic and organic anions. CE conditions: separation voltage -15 kV, detection C4D, analyte concentrations: 50 μ M, except glycolate, acetate and lactate (100 μ M).

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 😊