

Metody využívané v laboratorní diagnostice v oblasti welfare



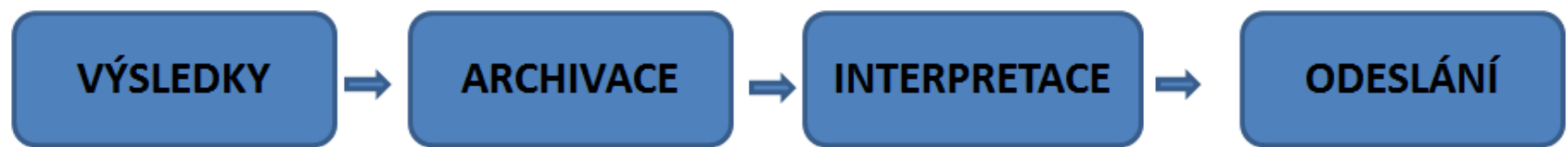
PREANALYTICKÁ FÁZE



ANALYTICKÁ FÁZE

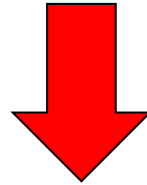


POSTANALYTICKÁ FÁZE



CHYBY V PRŮBĚHU PROCESU LABORATORNÍHO VYŠETŘENÍ????

VOLBA VHODNÉ METODY PRO ANALÝZU



- **analyzovaný ukazatel** (meze detekce, objem vzorku, interference)
- **vybavení laboratoře** (ekonomické hledisko, náročnost přípravy)
- **druh biologické matrice** (krev, plazma, sérum, moč, exkrementy, sliny a další)
- **využití komerčních kitů** (ELISA, biochemické analyzátory)



VOLBA VHODNÉ METODY PRO ANALÝZU

- manuální x automatizované provedení
- všechny měřící postupy musí být validované
- používání kalibrace = vztah mezi měřeným signálem a množstvím analytu popsáný matematickým modelem (kalibrátory, referenční materiály - CRM) – stabilita, četnost kalibrace, recalibrace
- přesnost, preciznost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, linearita a další
- **používané metody**
 - separační metody
 - imunochemické metody
 - optické metody
 - molekulárně-biologické metody

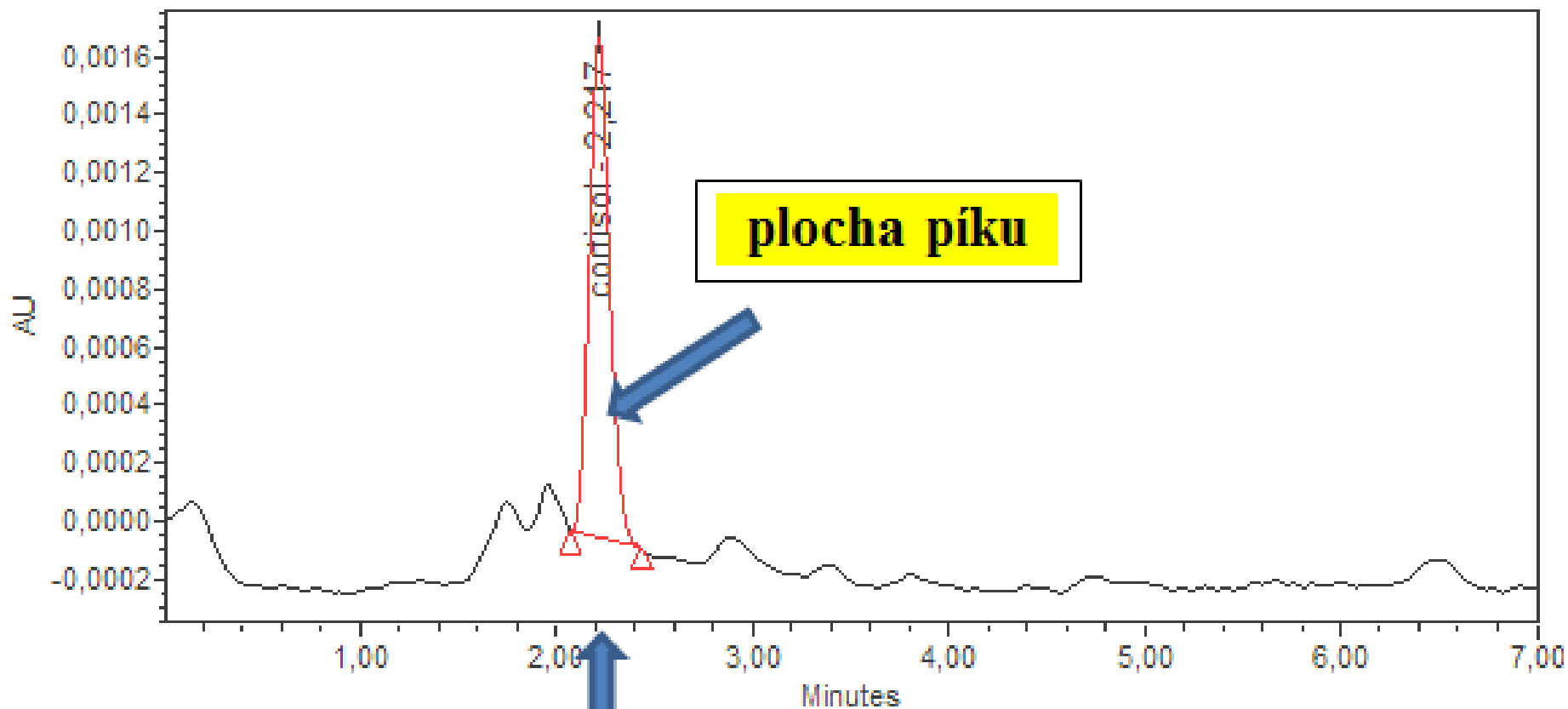
Separační metody

- metody, při kterých dochází k rozdělení vzorku minimálně na dva odlišné podíly na základě jejich různých vlastností
- **metody založené na rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze** (LC, GC)
- **membránové separace** (využívají rozdílů v rychlosti pohybu jednotlivých složek přes omezující rozhraní jako je například membrána, např. ultrafiltrace, dialýza, reverzní osmóza)
- **separace polem** (separace založená na využití rozdílů v pohyblivosti částic v silovém poli, např. elektroforéza, izotachoforéza, hmotnostní spektrometrie – m/z)

Chromatografické metody

- vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (**stacionární a mobilní fáze**), kde dochází k opakované distribuci
- zachycení analytu stacionární fází → separace jednotlivých složek
- dělení **podle skupenství mobilní fáze** (kapalinová, plynová)
- dělení **podle uspořádání stacionární fáze** (kolonová, plošná)
- dělení **podle povahy děje převládajícím při separaci** (rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnná, gelová, afinitní)
- kvalitativní x kvantitativní analýza
- vhodná úprava vzorku, online systémy



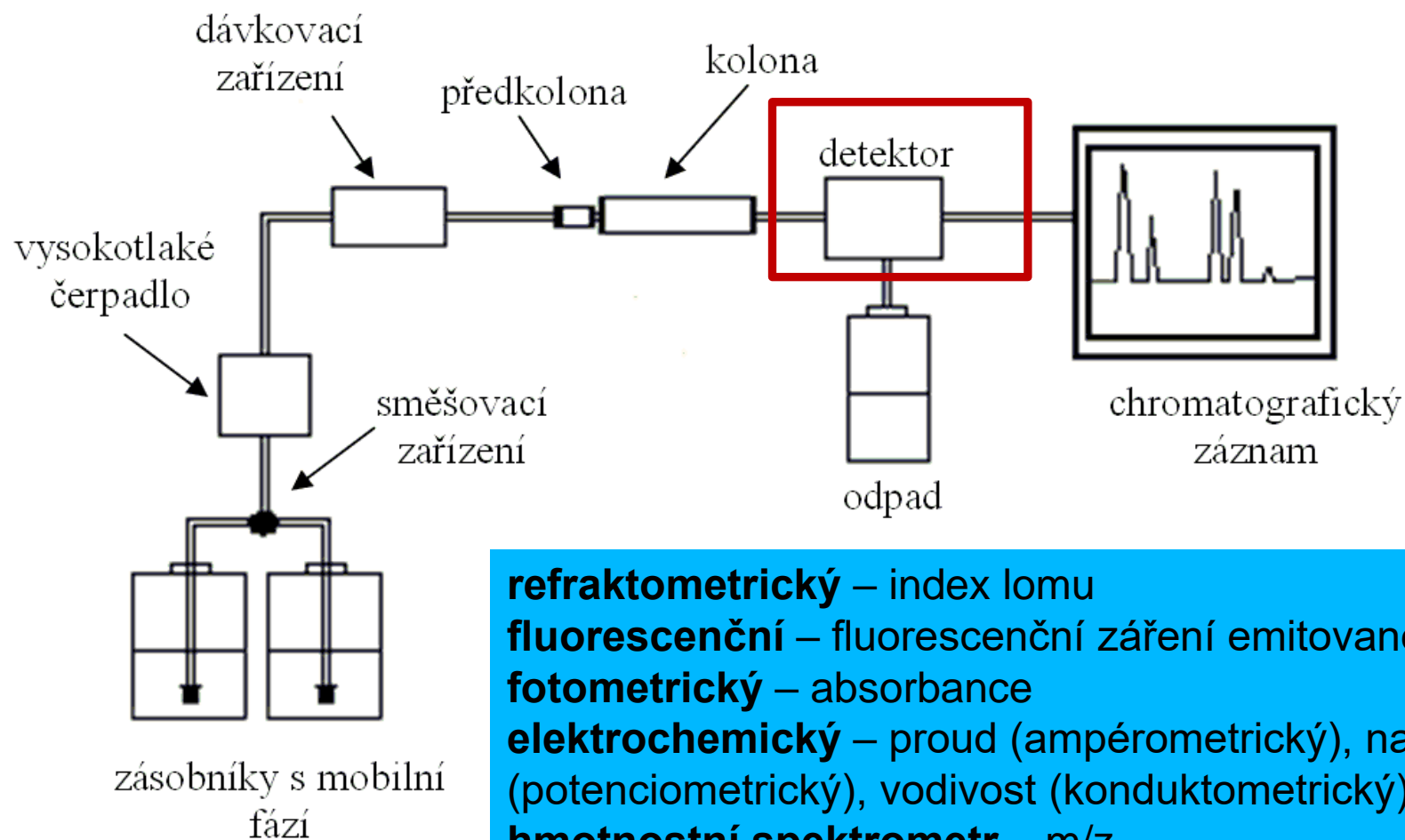


retenční čas

Kapalinová chromatografie

- mobilní fáze – kapalina (jedna látka x směs, pH) – eluční síla MF
- stacionární fáze – tuhá látka/kapalina
- plošné x **kolonové uspořádání**
- chromatografie s normálními fázemi (SF – polární, oxid hlinitý, oxid křemičitý a další; MF – nepolární, cyklohexan, hexan a další)
- chromatografie s reverzními fázemi (SF – nepolární, C18, C8 a další; MF – polární rozpouštědlo, voda, ACN, MetOH, pufry)
- široké spektrum použití
- kalibrační křivka
- izokratická x gradientová eluce, derivatizace (fluorescence)

Kapalinová chromatografie



refraktometrický – index lomu

fluorescenční – fluorescenční záření emitované analyty

fotometrický – absorpance

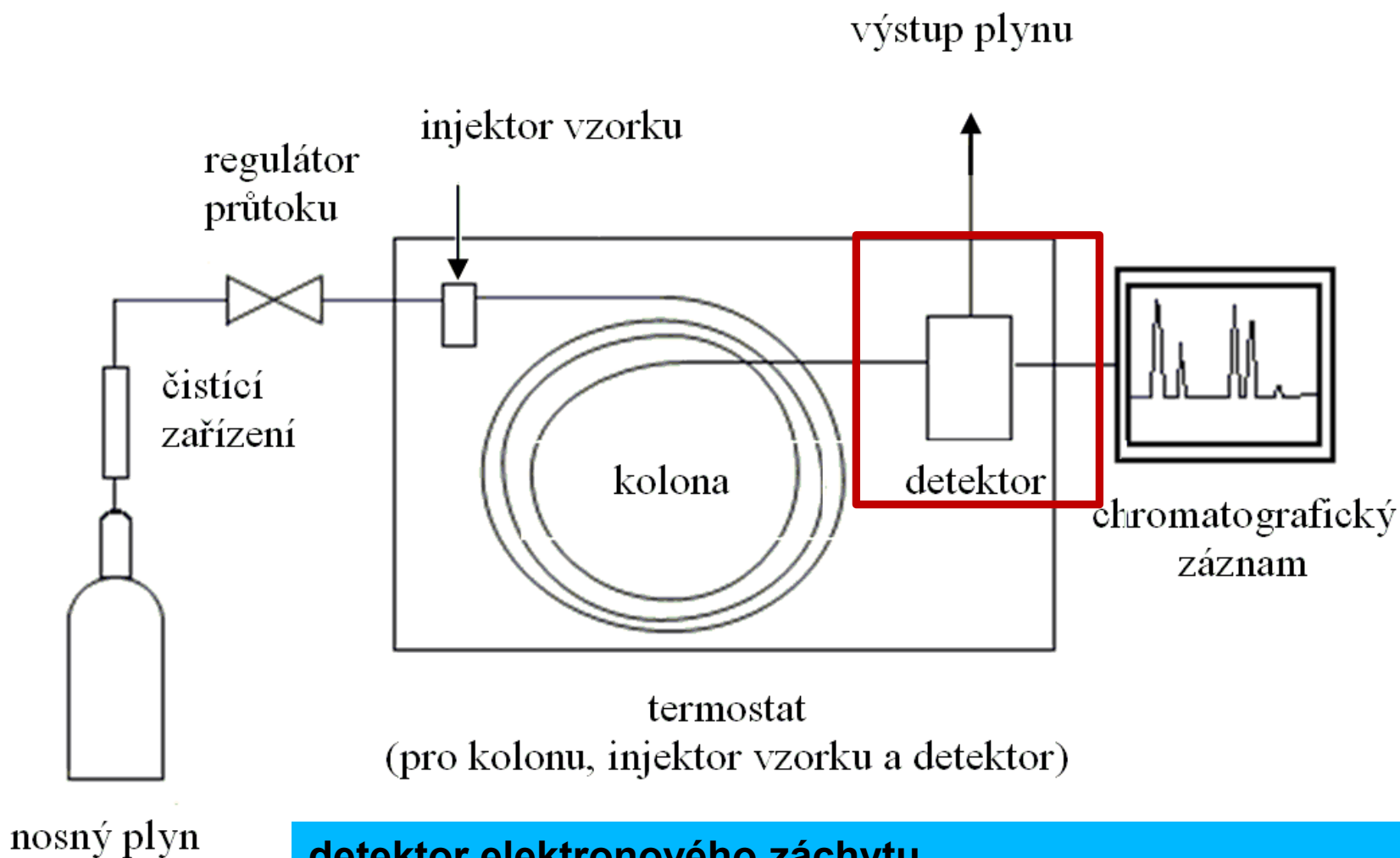
elektrochemický – proud (ampérometrický), napětí (potenciometrický), vodivost (konduktometrický)

hmotnostní spektrometr – m/z

Plynová chromatografie

- mobilní fáze – inertní nosný plyn v tlakových lahvích o definované čistotě (helium, argon, dusík, vodík)
- stacionární fáze – tuhá látka/kapalina
- separované látky musí být převedeny do plynného stavu, termostabilita, možnost derivatizace (chemická x pyrolytická)
- významnou roli hraje **teplota**
- široké spektrum použití, ale v porovnání s LC není tak univerzální
- kalibrační křivka

Plynová chromatografie



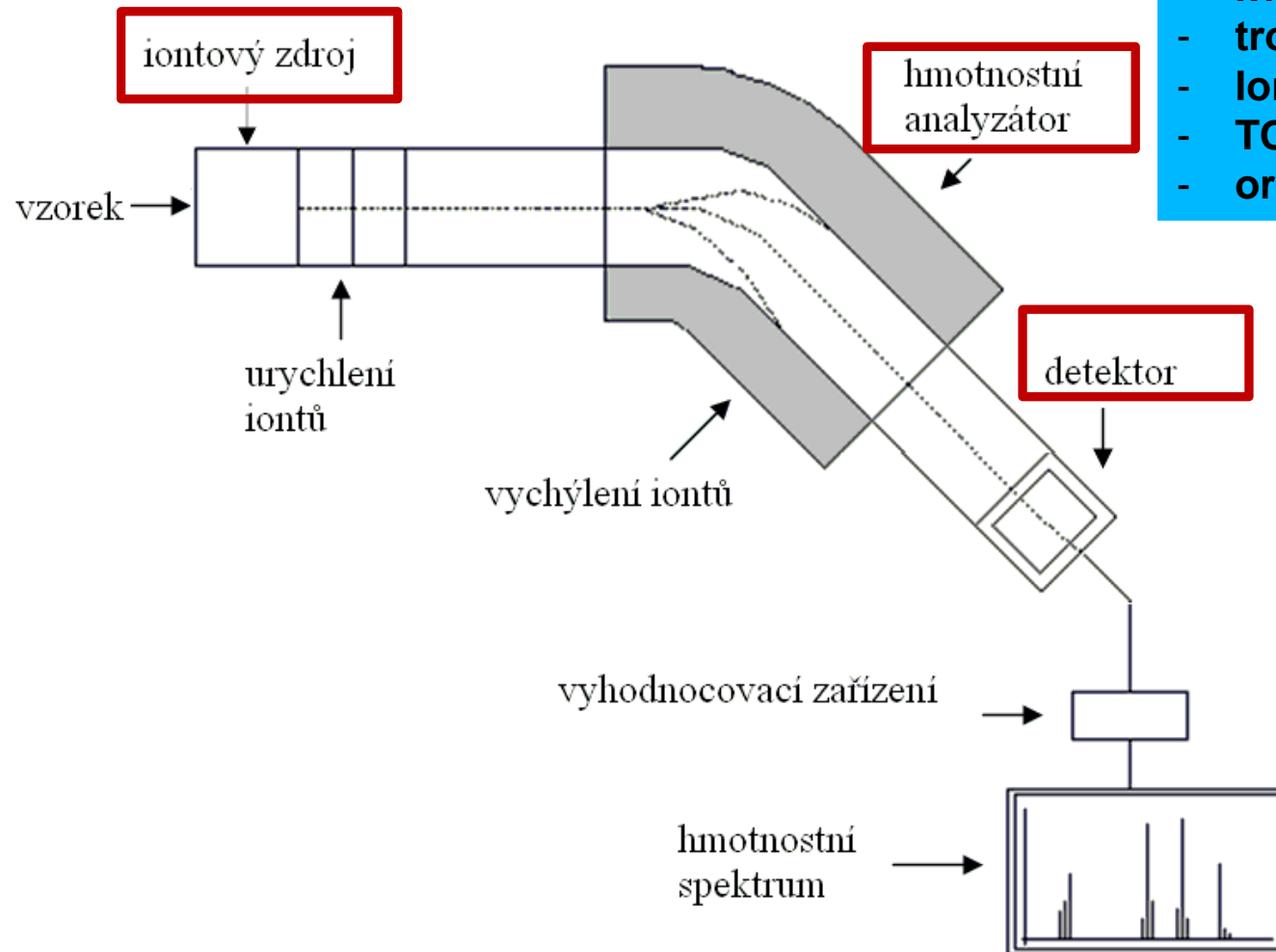
detektor elektronového záchytu
plamenově-ionizační detektor
tepelně-vodivostní
hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometrie

- metoda založená na separaci ionizovaných částic na základě hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z)
- metoda pro určování hmotnosti atomů, molekul a jejich fragmentů po převedení na kladně nebo záporně nabitě ionty
- podmínkou analýzy je převedení analyzované části do iontové podoby → vlastní analýze předchází ionizace (měkké a tvrdé ionizační techniky)
- časté spojení se separačními metodami
- všestranná, rychlá a citlivá metoda, finančně náročná, destruktivní metoda
- kvalitativní x kvantitativní analýza, informace o struktuře, relativní molekulové hmotnosti, izotopické složení

Hmotnostní spektrometrie

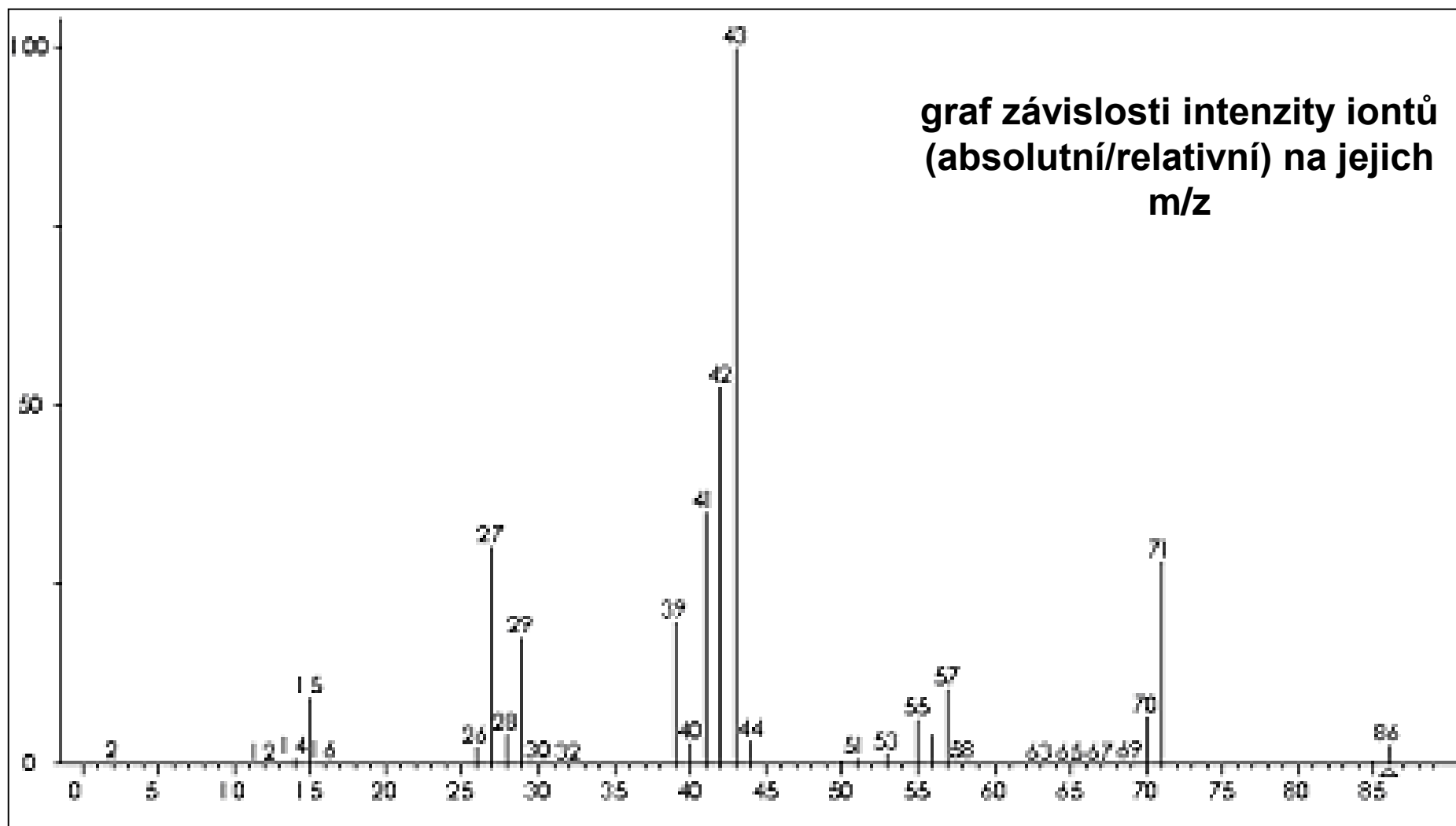
měkké a tvrdé ionizační techniky



separace dle m/z

- kvadrupólový analyzátor
- trojitý kvadrupól
- iontová past
- TOF – průletový analyzátor
- orbitrap

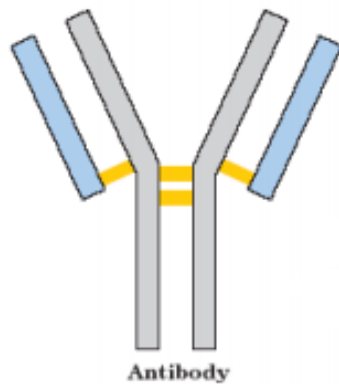
Hmotnostní spektrometrie



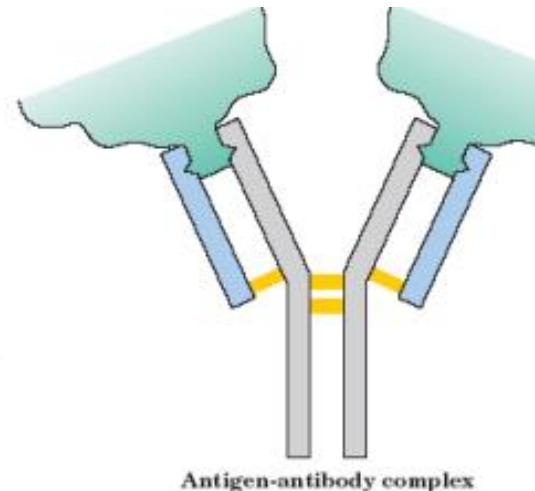
HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM

Imunochemické metody

- metody založené na specifické reakci antigenu a specifické protilátky → **imunokomplex**
- při vzniku imunokomplexu nevzniká kovalentní vazba, ale pouze **slabé interakce** (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní vazby)



PROTILÁTKA



KOMPLEX ANTIGEN-PROTILÁTKA

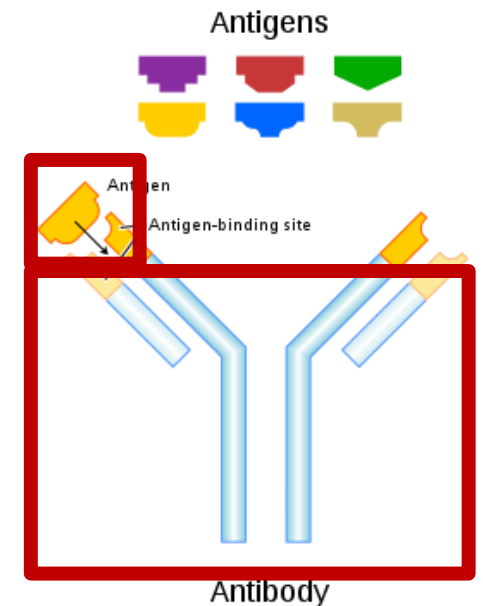
Imunochemické metody – základní pojmy

protilátka

- protein (imunoglobulin - glykoprotein)
- látka tělu vlastní, která jako součást imunitního systému identifikuje a zneškodňuje cizí objekty
- váže se na specifický antigen (systém zámek – klíč)

antigen (antibody generator)

- látka tělu vlastní nebo pocházející z vnějšího prostředí
- v organismu navozuje produkci protilátek
- z chemického hlediska nejčastěji proteiny nebo polysacharidy
- **hapten** = nekompletní antigen (např. lék, hormon) vyvolávající tvorbu protilátek pouze je-li vázán na bílkovinný nosič



Oblast použití

rozdělení metod podle techniky použité k měření signálu

- **radioimunoizotopové** (RIA – radioizotopem značený antigen)
- **enzymatické** (značení antigenu/protilátky enzymem, ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay)
- **fluorescenční** (FIA – fluoroimunno assay)
- **luminiscenční** (CLIA – chemilumminiscene immunoassay)

Rozdělení imunochemických metod

oblast použití

hormony (glukokortikoidy, katecholaminy + metabolity)

farmaka, specifické markery, bílkovin, infekčních agens

detekce protilátek nebo antigenů

plazma, sérum, moč, féces, tkáně, mozkomíšní mok

Výhody/nevýhody imunochemických metod

- + cena (?), přístrojové vybavení
- + malý objem vzorku (často bez nutné úpravy vzorku)
- + technicky nenáročné, rutinní postupy
- + možnost automatizace, nízké detekční limity
- + dostupnost komerčních kitů

- nutnost zpracovat sadu vzorků (stripy)

BLK

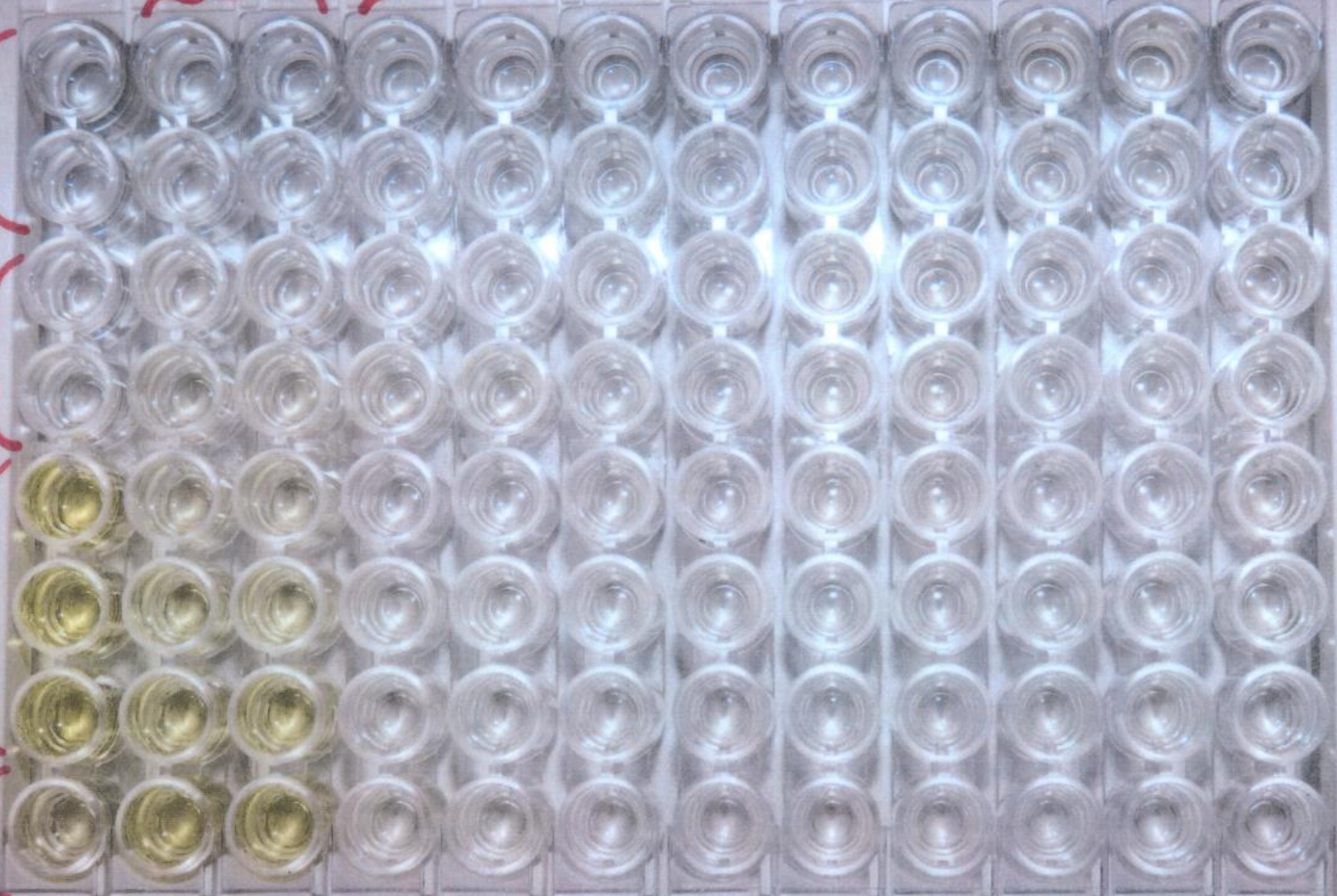
NBB

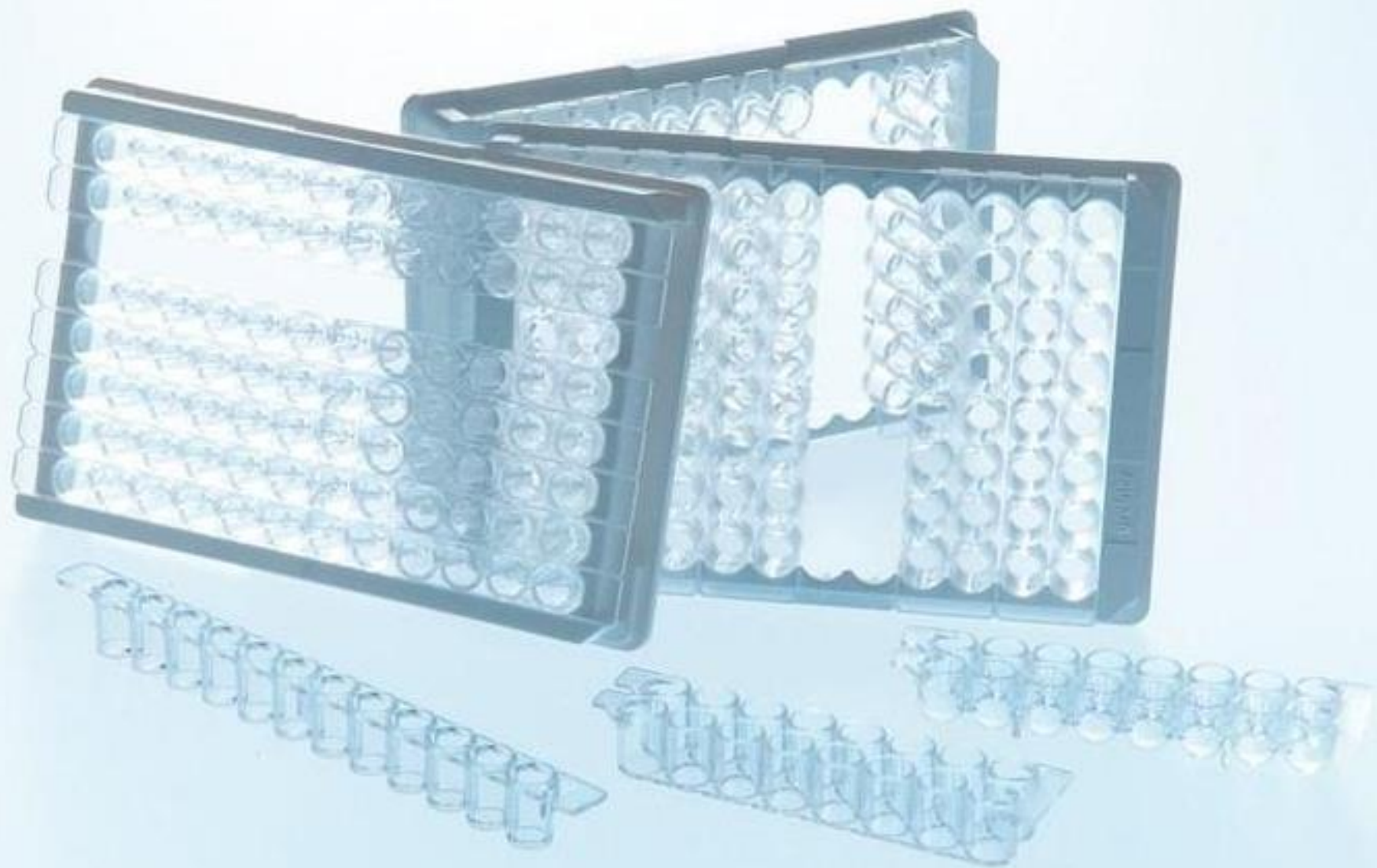
DO

TA

STD

VZORKY





Výhody/nevýhody imunochemických metod

- + cena (?), přístrojové vybavení
- + malý objem vzorku (často bez nutné úpravy vzorku)
- + technicky nenáročné, rutinní postupy
- + možnost automatizace, nízké detekční limity
- + dostupnost komerčních kitů

- nutnost zpracovat sadu vzorků (stripy)
- cross reaktivita (nespecifické)

Specificity:

Compound	Cross Reactivity
Corticosterone	100%
11-Dehydrocorticosterone	11%
11-Deoxycorticosterone	7%
Progesterone	0.31%
Cortisol	0.17%
Aldosterone	0.06%
Testosterone	0.03%
Pregnenolone	0.02%
5 α -DHT	0.01%
Androstenedione	<0.01%
Cortisone	<0.01%
DHEA	<0.01%
DHEA-S	<0.01%

Table 4. Specificity of the Corticosterone ELISA Antiserum

Výhody/nevýhody imunochemických metod

- + cena (?), přístrojové vybavení
- + malý objem vzorku (často bez nutné úpravy vzorku)
- + technicky nenáročné, rutinní postupy
- + možnost automatizace, nízké detekční limity
- + dostupnost komerčních kitů

- nutnost zpracovat sadu vzorků (stripy)
- cross reaktivita (nespecifické)
- dostupnost ve formě komerčních kitů, bezpečnost (RIA)

screeningové metody → pozitivní nález → chromatografická analýza)

ENZYMATICKÉ IMUNOMETODY - ELISA

- koncentrace analytu se stanovuje na základě kalibrační křivky
- nejčastější provedení v mikrotitračních destičkách



NEKOMPETITIVNÍ



KOMPETITIVNÍ

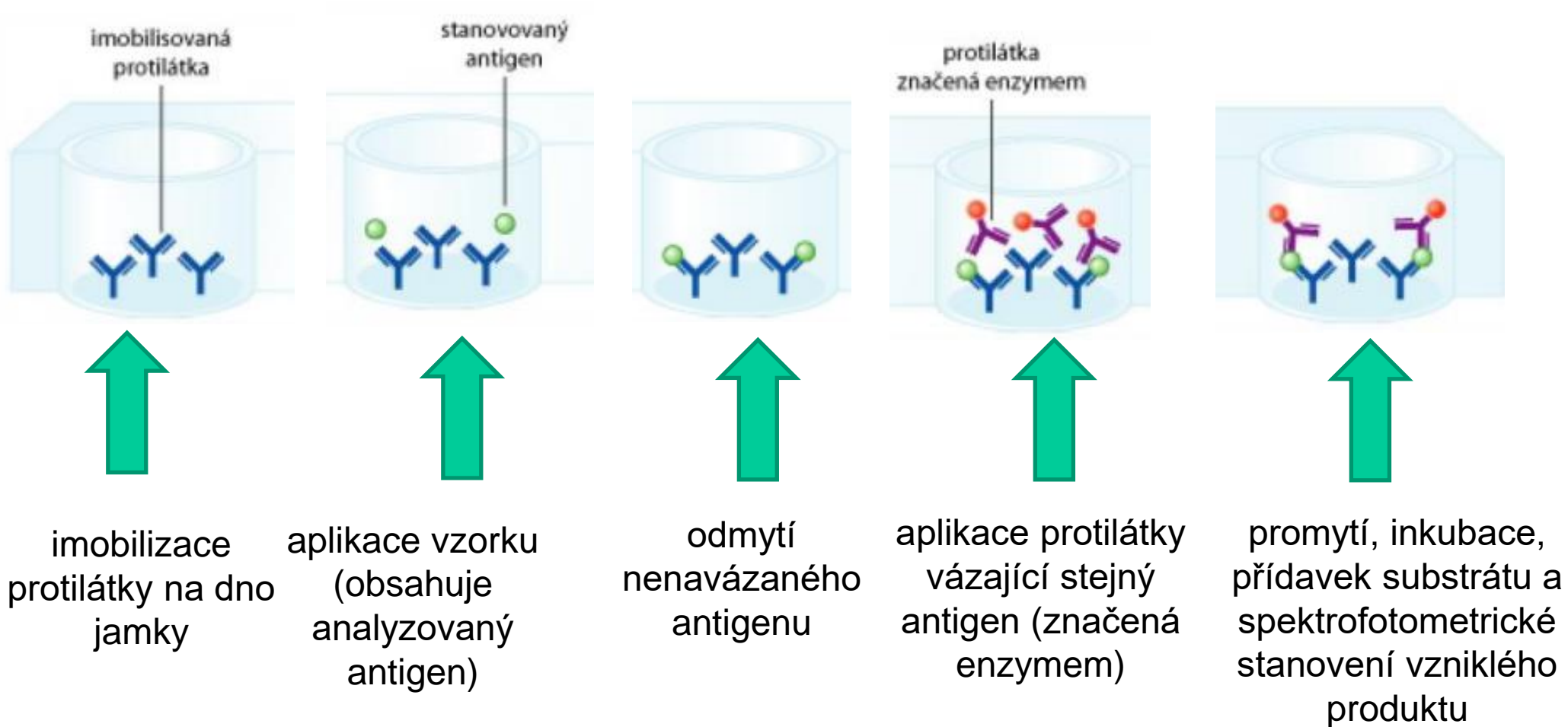
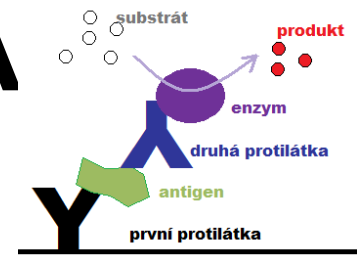


PŘÍMÁ

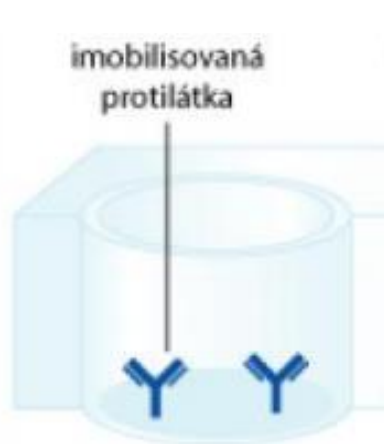


NEPŘÍMÁ

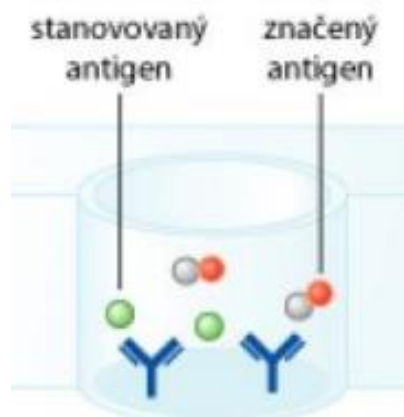
NEKOMPETITIVNÍ ELISA (sendvičová)



KOMPETITIVNÍ ELISA - přímá



imobilizace protilátky
na dno jamky



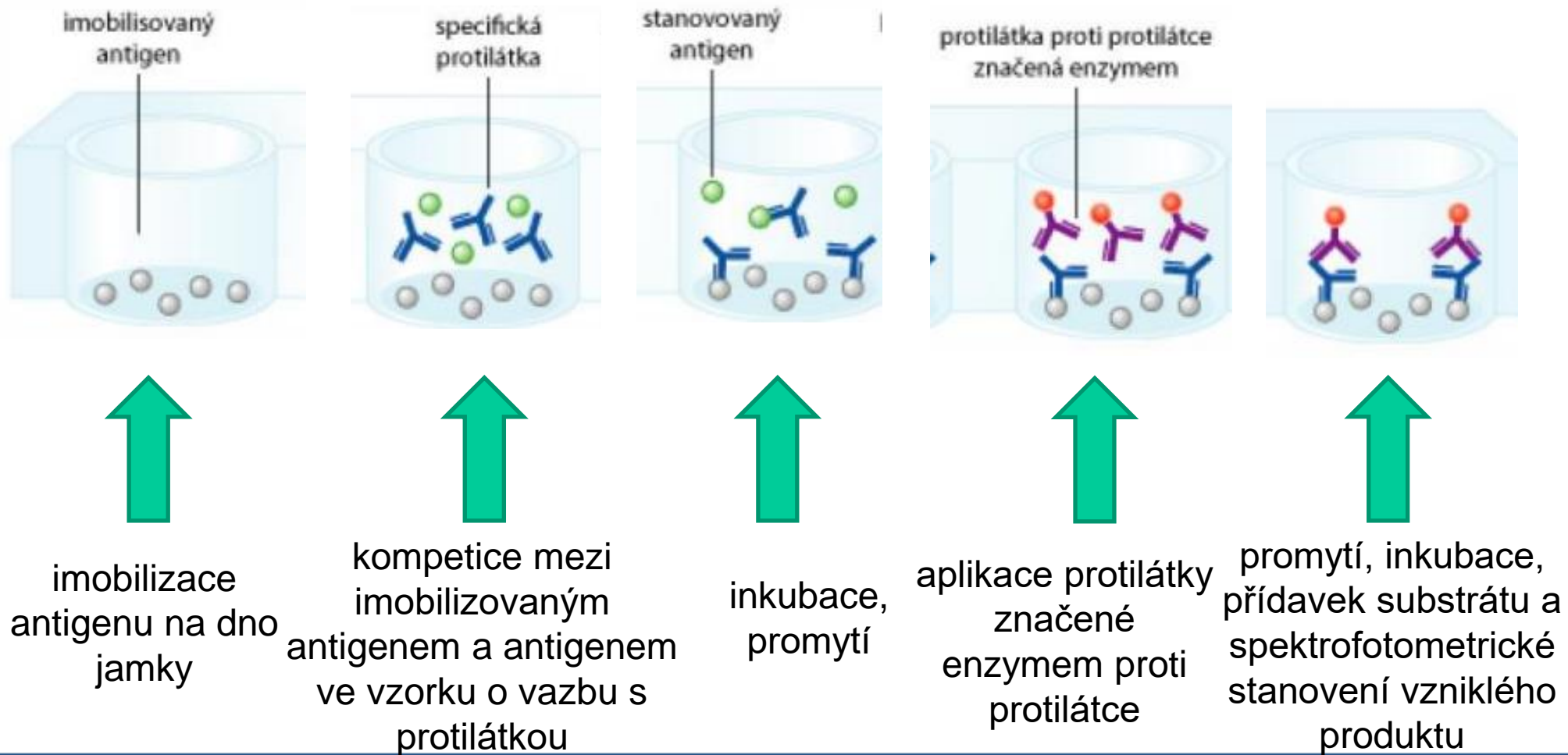
interakce protilátky s antigenem
ve vzorku a antigenem
značeným (kompetice = soutěž),
omezený počet vazebných míst



promytí, inkubace, přidavek
substrátu a
spektrofotometrické
stanovení vzniklého produktu

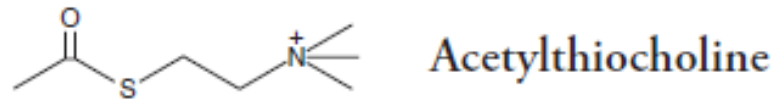
čím vyšší intenzita zbarvení, tím nižší koncentrace analytu

KOMPETITIVNÍ ELISA - nepřímá

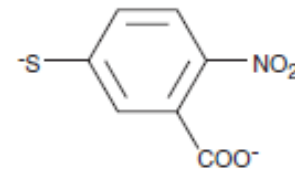
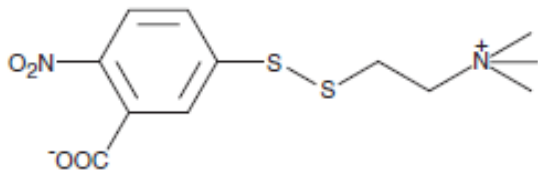
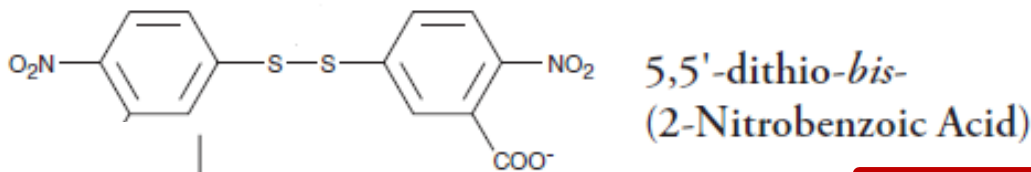
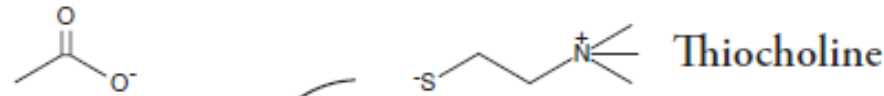


čím vyšší intenzita zbarvení, tím nižší koncentrace analytu

**ELLMANOVO
ČINIDLO
(ACETYLCHOLIN +
DTNB)**



**AChE
(hydrolýza)**



5-thio-2-Nitrobenzoic Acid

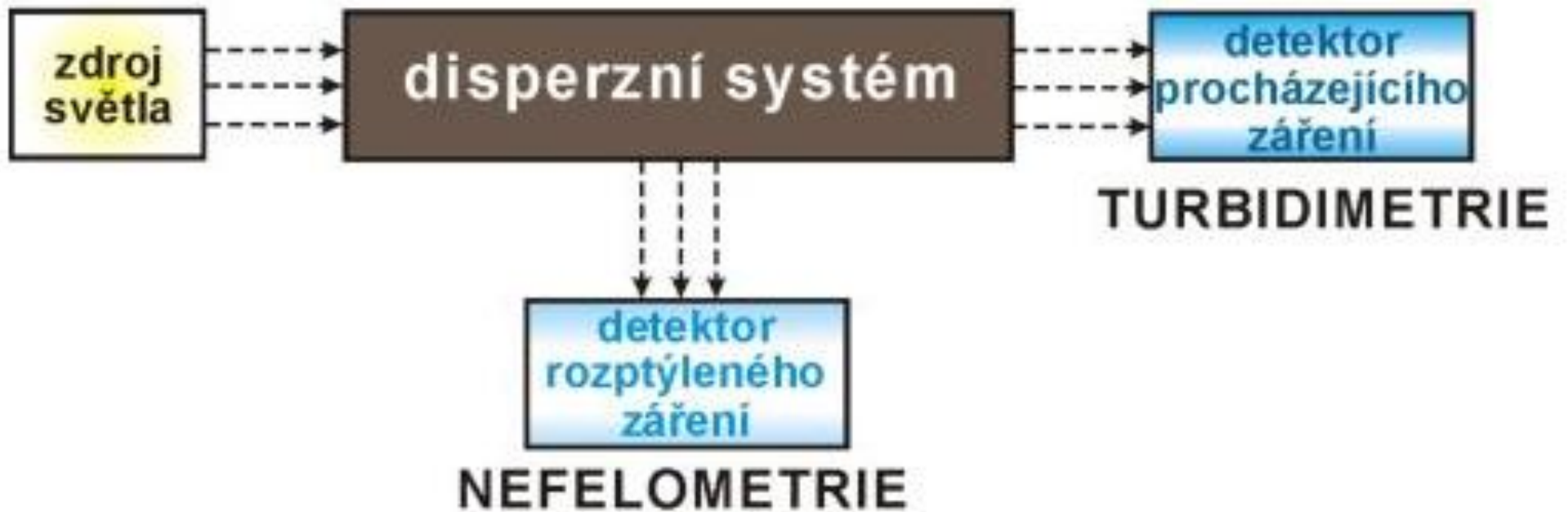
λ_{\max} : 412 nm

ϵ : 13,600

čím vyšší intenzita zbarvení, tím nižší koncentrace analytu

Optické metody

- fyzikální metody založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením nebo na vyzařování elektromagnetického záření vzorkem
- **nespektrální metody** (nesledujeme výměnu energie mezi látkou a zářením, ale sledujeme změny některých vlastností záření – rozptyl záření, otáčení roviny polarizovaného světla a další)
 - refraktometrie, polarimetrie, nefelometrie, turbidimetrie
- **spektrální metody** (metody založené na výměně energie mezi látkou a zářením)
 - emisní metody (měření záření vysílaného neboli emitovaného)
 - absorpční metody (měření sledující absorpci záření)



Nefelometrie a turbidimetrie se liší způsobem snímání

- hodnocení **rozptylu světla** na heterogenních částicích v koloidním roztoku
- liší především umístěním detektoru
- v nefelometrii měříme rozptýlené záření ve směru kolmém na vstupující paprsek a používá se především pro nižší koncentrace
- v turbidimetrii je detektor v ose paprsku a používá se pro koncentrovanější roztoky

Optické metody

- fyzikální metody založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením nebo na vyzařování elektromagnetického záření vzorkem
- **nespektrální metody** (nesledujeme výměnu energie mezi látkou a zářením, ale sledujeme změny některých vlastností záření – rozptyl záření, otáčení roviny polarizovaného světla a další)
 - refraktometrie, polarimetrie, nefelometrie, turbidimetrie
- **spektrální metody** (metody založené na výměně energie mezi látkou a zářením)
 - emisní metody (měření záření vysílaného neboli emitovaného)
 - absorpční metody (měření sledující absorpci záření)

Optické metody

- elektromagnetické záření (vlnění) je příčné postupné vlnění elektromagnetického a elektrického pole
- EZ lze popsat příslušnou frekvencí, **vlnovou délkou** a časovou periodou
- využívání především **UV/VIS** záření (RTG – zobrazovací techniky)
- je-li vlnová délka dostatečně velká, tak záření proniká i skrz překážky (např. rádiové vlny pronikají v terénu od vysílače)

Přehled elektromagnetických vln a záření



Spektrální metody

→ Metody emisní

- založeny na měření záření vysílaného (emitovaného) vzorkem
- emise se vyvolá dodáním energie vzorku v podobě tepla, elektrické energie, proudu elementárních částic, nebo jiného elektromagnetického záření
- přijetím této energie se atomy nebo molekuly so dostávají do méně stabilních energetických stavů a při zpětném přechodu se energie zabavují ve formě elektromagnetického záření

→ Metody absorpční

- metody sledují pohlcování (absorpci) záření vzorkem
- využíváme při nich vlnové délky z různých oblastí spektra elektromagnetického záření
- podle použitého záření a charakteru vzorku se dělí na mnoho metod (ultrafialová a viditelná spektrometrie, infračervená spektrometrie)

**Elementární
analýza**

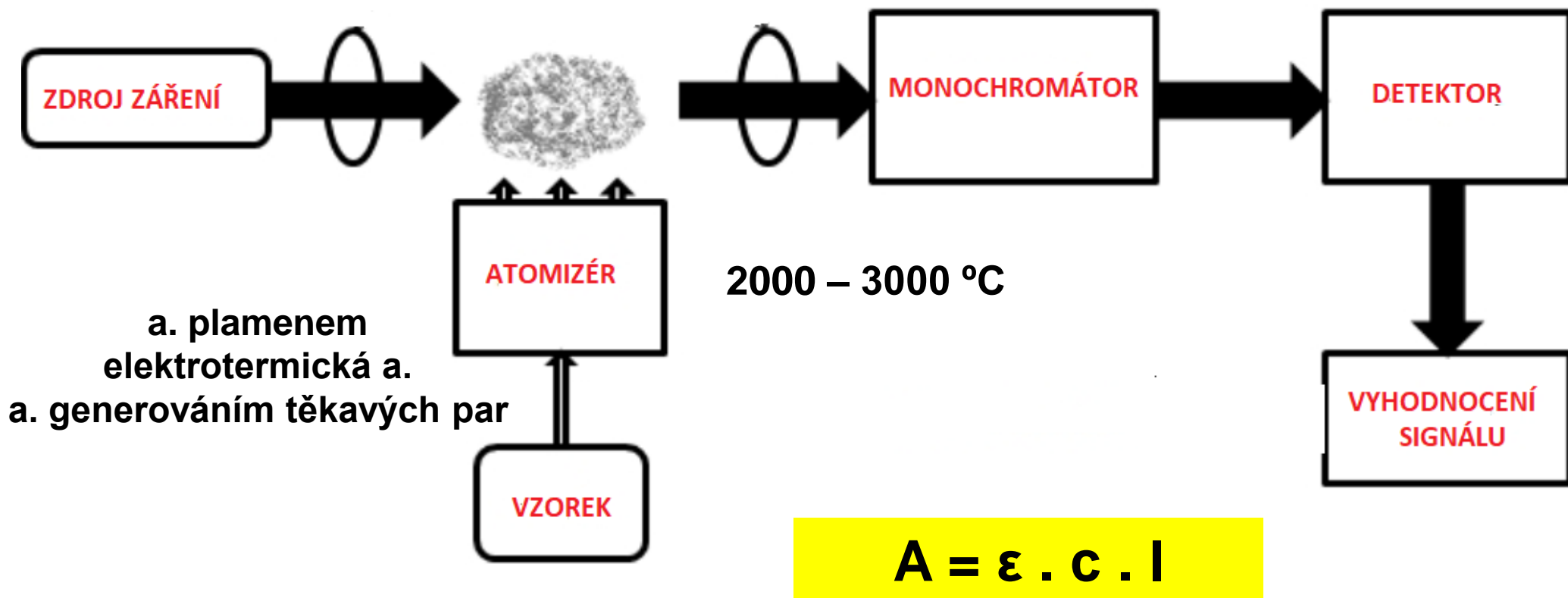


**Molekulová
analýza**

Atomová absorpční spektrometrie

- metoda založená na absorpci UV a VIS elektromagnetického záření **volnými atomy v plynné fázi**
- **využití pro prvkovou analýzu** → analýza makroprvků
→ analýza esenciálních prvků
→ analýza kontaminujících/toxických prvků
- analýza tělních tekutin, tkání, krmiva atd.
- kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení

Atomová absorpční spektrometrie



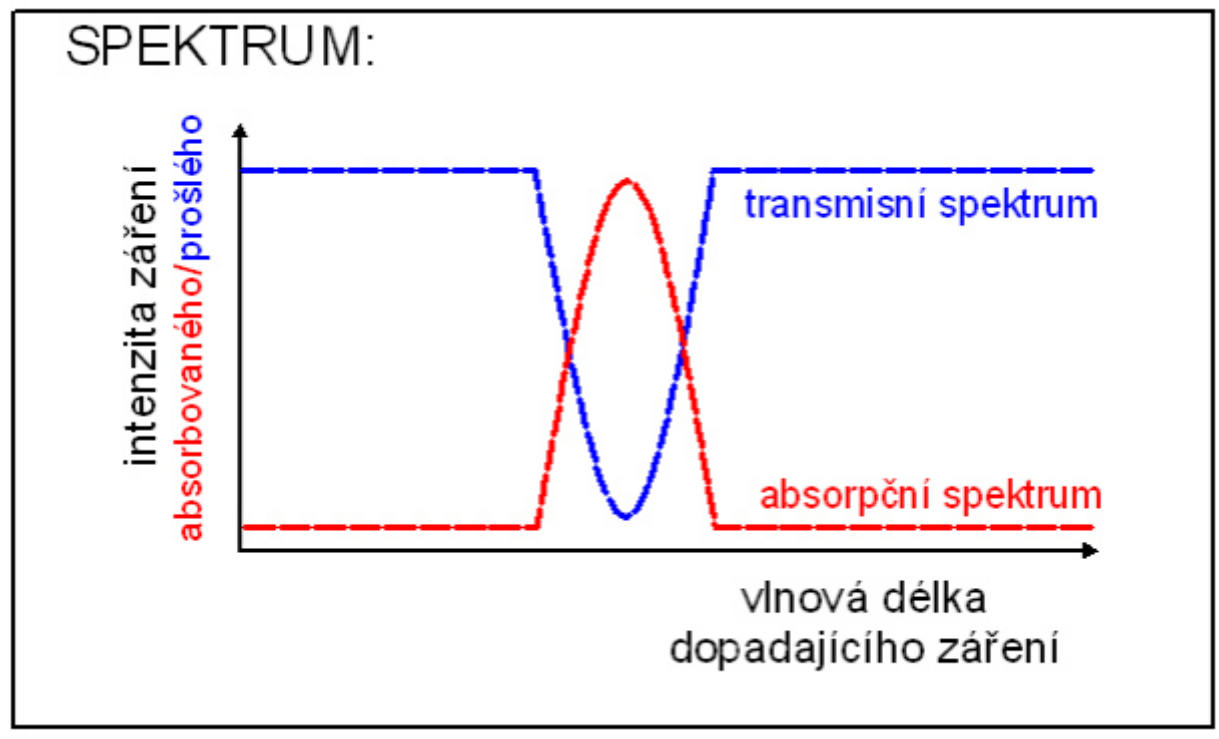
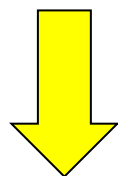
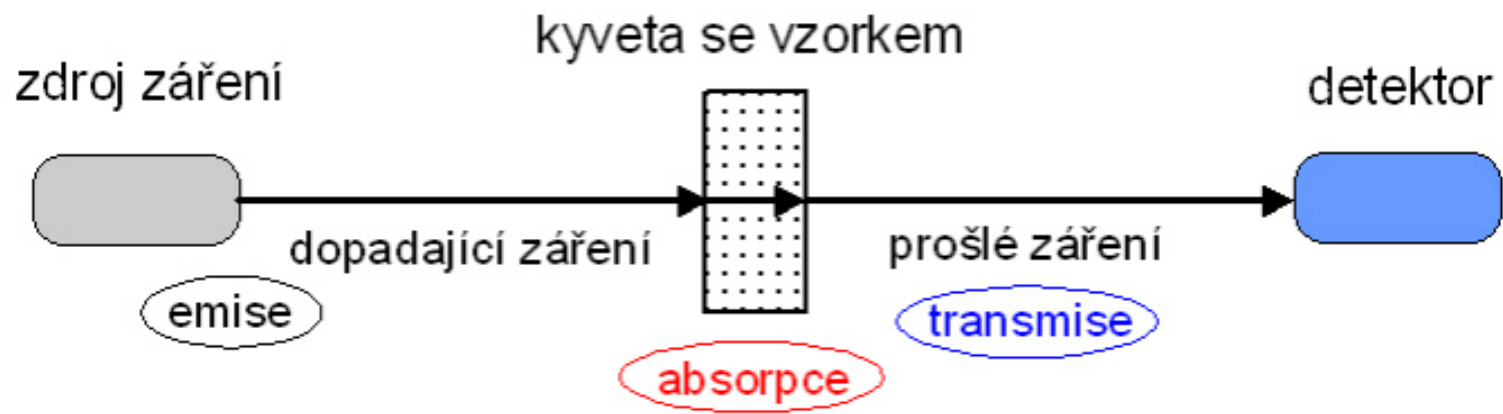
- úbytek primárního záření je mírou koncentrace volných atomů prvku, který záření absorboval
- rozdíly energií mezi jednotlivými elektronovými stavy atomu jsou charakteristické pro každý prvek

Molekulová absorpční spektrometrie

- metoda založená na absorpci UV a VIS elektromagnetického záření **molekulami látek**
- široké uplatnění – samostatná metoda x detekční zařízení (např. LC)
- analyzátoři na principu fotometrů
- analýza tělních tekutin, tkání a dalších
- kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení
- end point x kinetika
- kyvety x mikrotitrační destičky (velikost, materiál, průtočné kyvety)

Molekulová absorpční spektrometrie





Atomová emisní spektrometrie

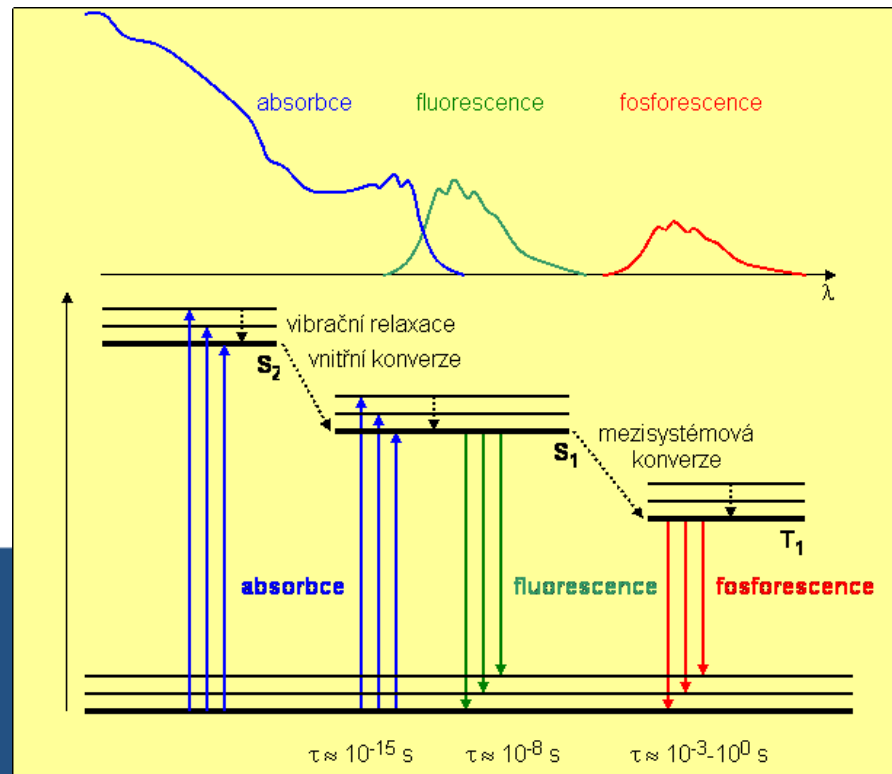
- dodáním energie je vzorek rozložen **na volné atomy** a dochází k přechodům valenčních elektronů na vyšší energetickou hladinu (excitace)
→ při návratů z excitované hladiny dochází k vyzáření elektromagnetického záření charakteristické pro jednotlivé prvky
- lepší detekční limity než AAS, vyšší pořizovací náklady
- **prvková analýza**
- **instrumentace** – budící zdroj (dodá energii pro vyvolání emise)
 - optický spektrometr (rozkládá záření budícího zdroje na jednotlivé spektrální čáry a měří jejich intenzitu)
- **podle budícího zdroje rozlišujeme**
 - plamenová emisní spektrometrie
 - emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
 - emisní spektrometrie s elektrickým buzením, buzením laserem

Luminiscenční spektrometrie

- luminiscence je děj, při kterém molekuly nacházející se v excitovaném stavu při své návratu do základního stavu **emitují** elektromagnetické záření
- energie emitovaného záření je **nižší** než energie záření excitačního → **emitované světlo má větší vlnovou délku**
- kvalitativní x kvantitativní analýza
- využití jako detekčních systémů, v imunochemických metodách
- podle toho jak dochází k excitaci elektronů rozlišujeme:
 - **světlem** (fotoluminiscence) – **fluorescence, fosforescence**
 - **chemicky** (chemiluminiscence)

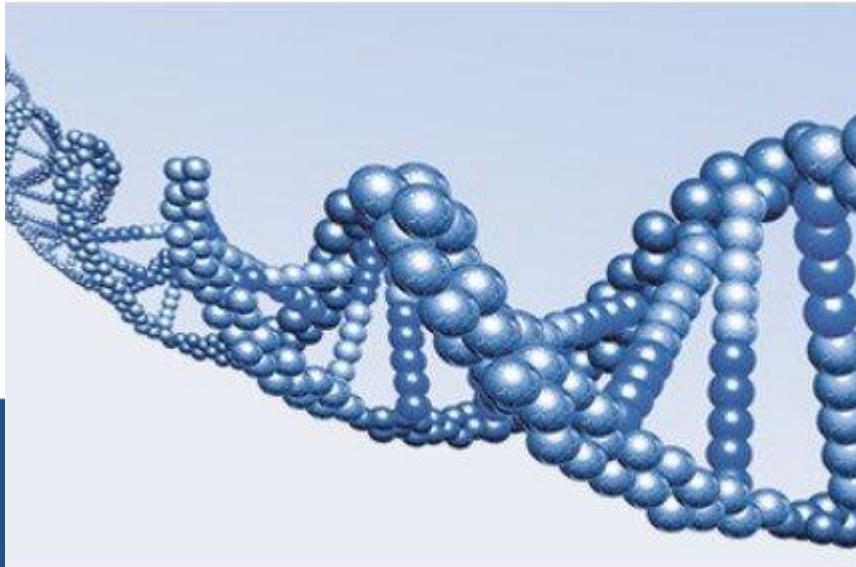
Luminiscenční spektrometrie

- **fluorescence** = emise fluorescenčního záření začne okamžitě po absorpci excitujícího záření a končí v okamžiku, kdy je excitující záření zastaveno (**zpoždění 10^{-5} až 10^{-8} s**) – fotoluminiscence s krátkým dosvitem
- **fosforescence** = emise fosforescenčního záření na rozdíl od fluorescenčního pokračuje mnohem déle, kdy je excitující záření zastavené (**zpoždění 10^{-2} až několik dní**) – fotoluminiscence s dlouhým dosvitem



Molekulárně-biologické metody

- široké využití v základním a aplikovaném výzkumu v oblasti biologie, genetiky, biochemie, forenzní účely, antropologie a další
- nemladší ale nejprogresivněji se rozvíjející oblast
- molekulární biologie studuje strukturu významných biomakromolekul, které se podílejí na uchování, expresi a reprodukci genetické informace (DNA, RNA a proteiny)
- analýza širokého spektra matric



Molekulárně-biologické metody

- **základní výzkum** (izolace genů, sekvenování), **aplikovaný genetický výzkum** (detekce mutací v genech, prenatální diagnostika), **využití v klinických disciplínách** (detekce patogenních MO, určení pohlaví)
- nevýhoda – falešně pozitivní výsledky (kontaminace)
- purifikace a separace nukleových kyselin (homogenizace, extrakce, centrifugace, elektroforéza)
- amplifikace specifického úseku DNA i z velmi malého množství (PCR)

NUKLEOVÉ KYSELINY

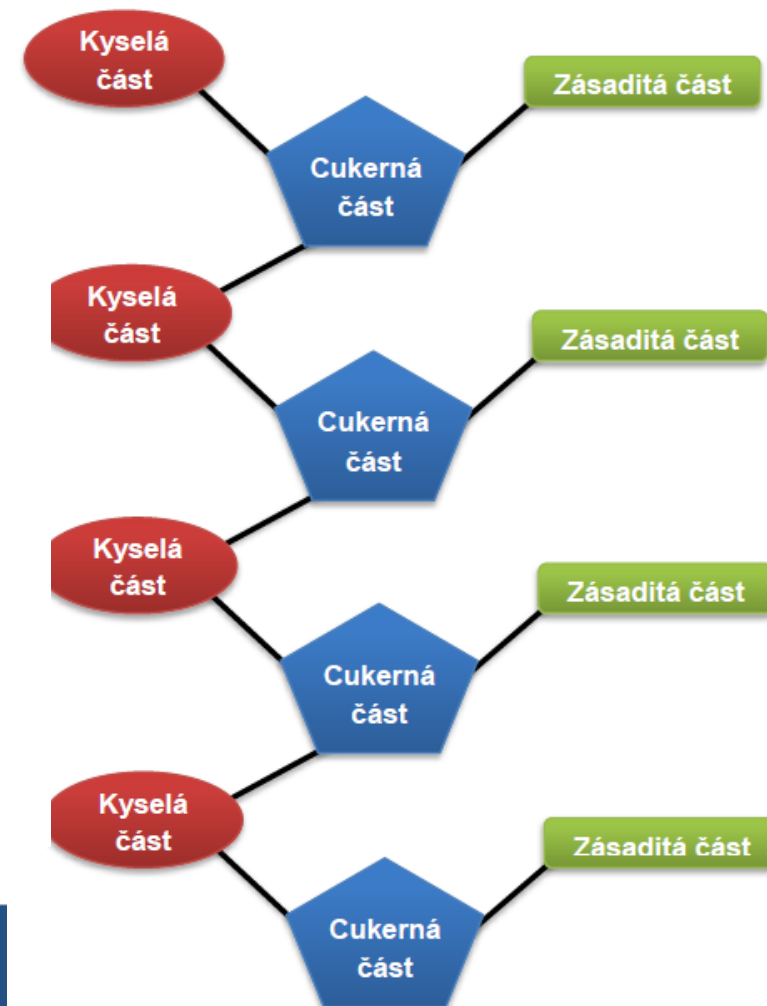
- ✓ **makromolekulární sloučeniny** (lineární polymery) přítomné ve všech buňkách → **DNA a RNA**
- ✓ podílí se na přenosu a uchovávání genetické informace a určují průběh **biosyntézy bílkovin** v buňkách
- ✓ stavební jednotkou (monomer) je nukleotid

SLOŽENÍ NUKLEOTIDU

→ **kyselá část**
(zbytek H_3PO_4)

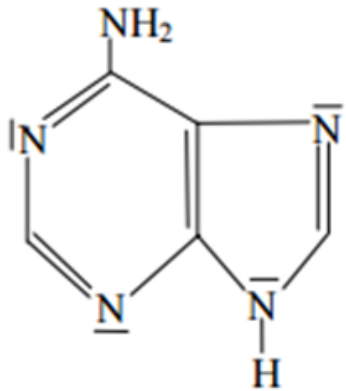
→ **zásaditá část**
(purinová nebo pyrimidinová báze)

→ **cukerná část - pentosa**
(β -D-ribofuranosa či 2-deoxy- β -D-ribofuranosa)

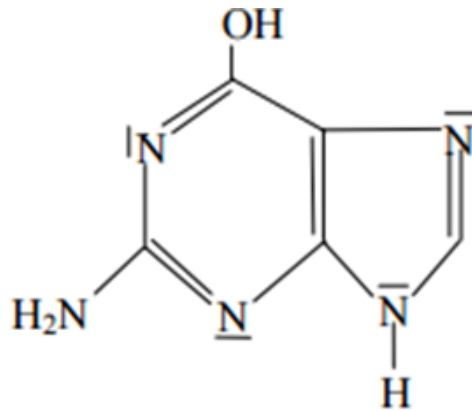


SLOŽKY NUKLEOVÝCH KYSELIN

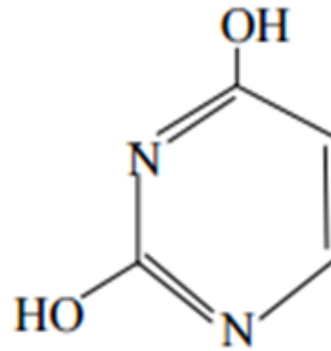
PURINOVÉ A PYRIMIDINOVÉ BÁZE



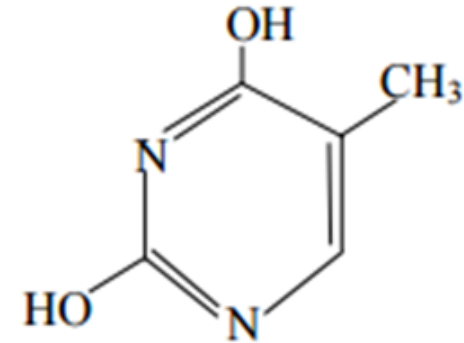
ADENIN



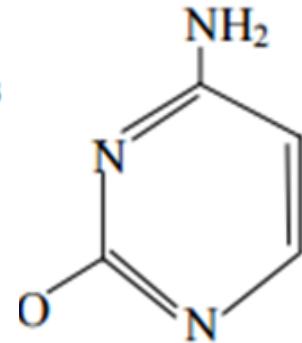
GUANIN



URACIL



THYMIN



CYTOSIN

DNA

ADENIN

THYMIN

2 můstky v DNA

CYTOSIN

GUANIN

3 můstky v DNA

RNA

ADENIN

URACIL

2 můstky v RNA

CYTOSIN

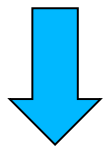
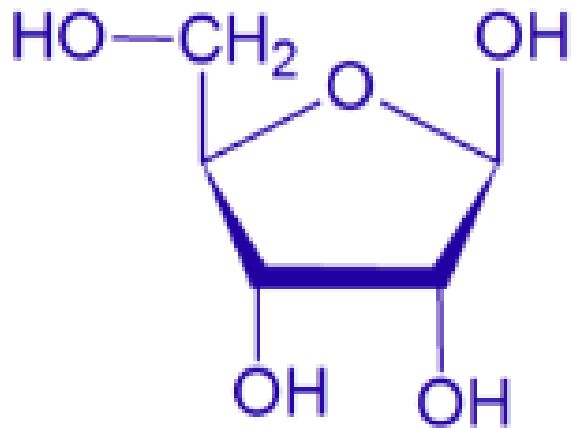
GUANIN

3 můstky v RNA

SLOŽKY NUKLEOVÝCH KYSELIN

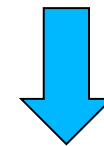
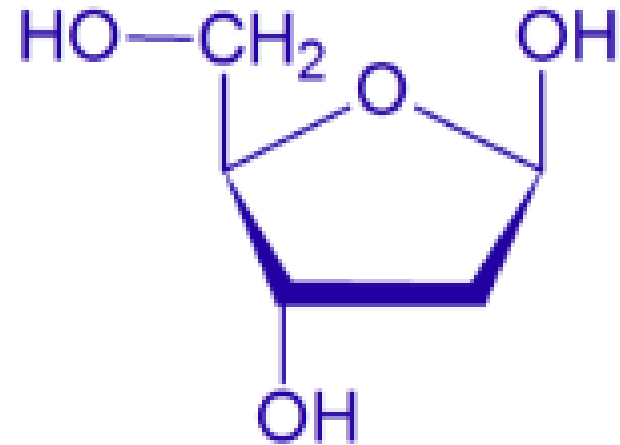
CUKERNÁ SLOŽKA - PENTOSA

β -D-ribofuranosa



RNA

β -2-deoxy-D-ribofuranosa



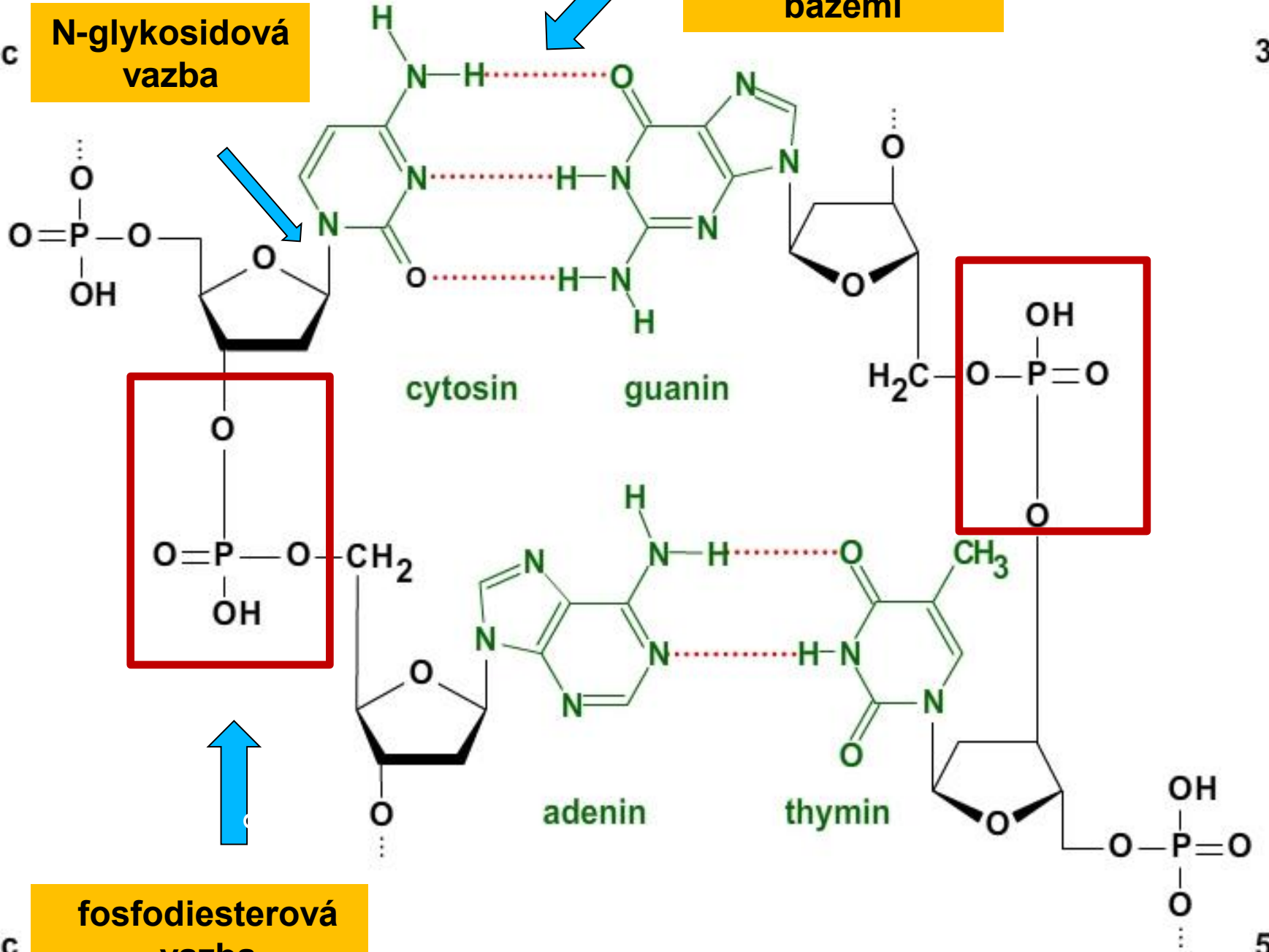
DNA

vodíkové vazby
mezi dusíkatými
bázemi

N-glykosidová
vazba

5'-konec

3'-konec



fosfodiesterová
vazba

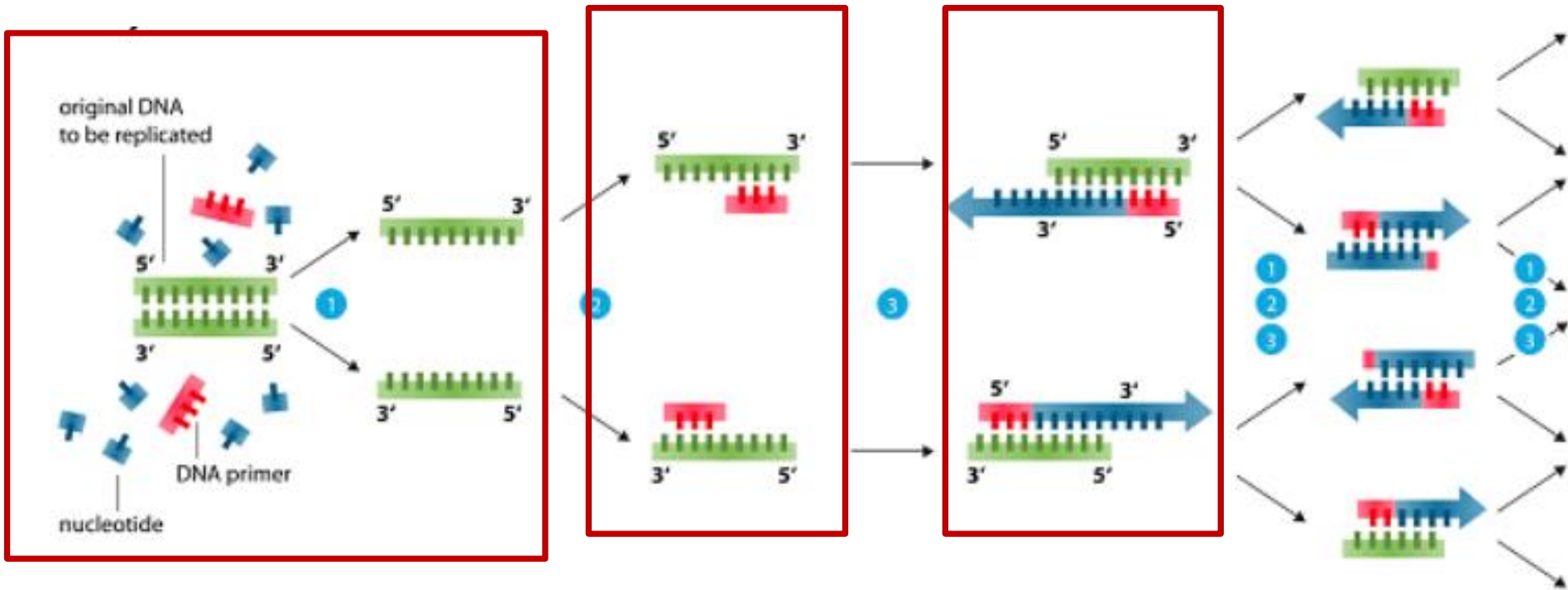
3'-konec

5'-konec

Polymerázová řetězová reakce

- in vitro metoda umožňující získat velké množství určitého úseku DNA
- probíhá v termocykleru
- denaturace (narušení vodíkových můstků mezi vlákny DNA)
- hybridizace (annealing, dosednutí primerů – oligonukleotidů o délce cca 20 až 30 nukleotidů)
- elongace (syntéza nových řetězců, DNA polymeráza)
- klasická PCR umožňuje kvalitativní analýza, kvantitativní analýza pomocí RT-PCR (hodnocení exprese genu)

PCR (polymerázová řetězová reakce)



1 Denaturation at 94-96°C

2 Annealing at ~68°C

3 Elongation at ca. 72 °C