

# **Současné možnosti elektroforézy v laboratorní praxi**

Mgr. Jana Gottwaldová

# Elektroforetické systémy pro gelovou elektroforézu na agaróze

- **Systemy HYDRASYS ( Sebia)**
- **Systemy SAS (Helena)**
- **Interlab G 26 (Interlab)**



# Sebia (Francie)

## **HYDRASYS 2, HYDRASYS 2 SCAN:**

- 30 SPE vzorků na gel ( až 54 vzorků s kratším průběhem stopy)
- kapacita přístroje: 162 SPE /hod.

### ***Poloautomatizované systémy:***

*Automatizované kroky* – nanesení vzorku, migraci, inkubaci, sušení, barvení.

*Manuální kroky:* manipulace s gely, pipetování vzorků, antisér, reagensů....

Pro vyhodnocení: densitometr Gelscan nebo scanner (software Phoresis)

# Helena (Anglie)

- SAS -1/2 : 24 SPE vzorků na gel
- SAS -3/4 : 60 SPE vzorků na gel (až 80/100 vzorků s kratším průběhem stopy)

Poloautomatizované systémy pro gelovou elektroforézu s odděleným barvicím modulem, 20 programů k nanášení vzorků speciální aplikační hřebínky



Pro vyhodnocení lze použít software Platinum 4)

# Interlab (Italie)

## Interlab G26

- 26 (39) SPE vzorků na gel
- Kapacita: 117 SPE / hod.

Plně automatizovaný systém pro SPE, využívá primární zkumavky s čárovým kódem

Pro vyhodnocení: scanner (software Elfolab)

# Nabídka testů

test	SEBIA	HELENA	Microgel
Sérové proteiny (5 frakcí)	*	*	*
Sérové proteiny (6 frakcí)	*	*	*
HR sérové proteiny	*	*	*
Proteiny v moči	*	*	*
Imunofixace	*	*	*
Imunofixace v moči	*	*	*
Pentavalentní fixace	*	*	*
Zásaditá elfo Hb	*	*	*
Kyselá elfo Hb	*	*	*
IFE Hb	*	*	*
ISO ALP	*	*	*
ISO CK/LD	*	*	*
Lipoproteiny	*	*	*
IFE IgG - OP	*	*	*
IFE CDT	*	*	
IFE transferinu	*	*	
Alfa-1 antitrypsin	*	*	

# HYDRAGEL 30 $\beta$ 1 – $\beta$ 2 (SEBIA)

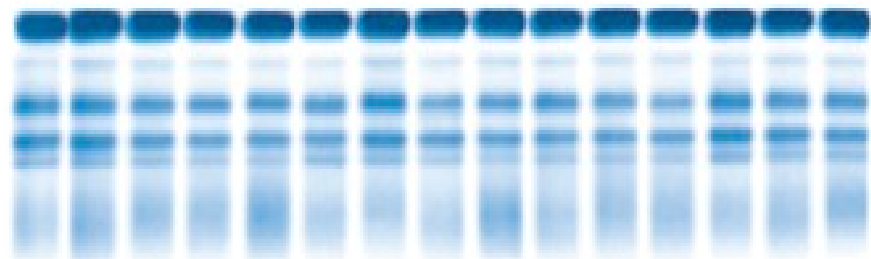
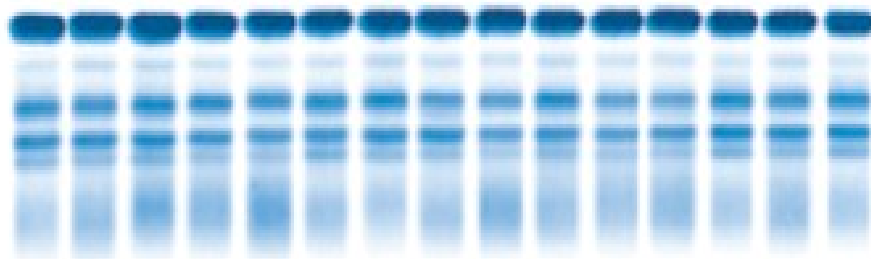
- **nosné médium:** agarózový gel –konc. 8 g/l, saturováno **alkalickým pufrem (pH 8,5)**
- **množství vzorku:** 10  $\mu$ l
- **migrace:** probíhá při konst. výkonu 20W, s časem migrace asi 7 min.(napětí 240 V, teploty 20 °),sušení gelu při t=65°C, asi 10 min.,
- **barvení gelu:** amidočerň (c= 4 g/l, t = 23 min.)
- **Denzitometrické skenování:** při 570 nm
- **vzorky:** sérum, zahuštěná moč

# HYDRAGEL 30 $\beta$ 1 – $\beta$ 2

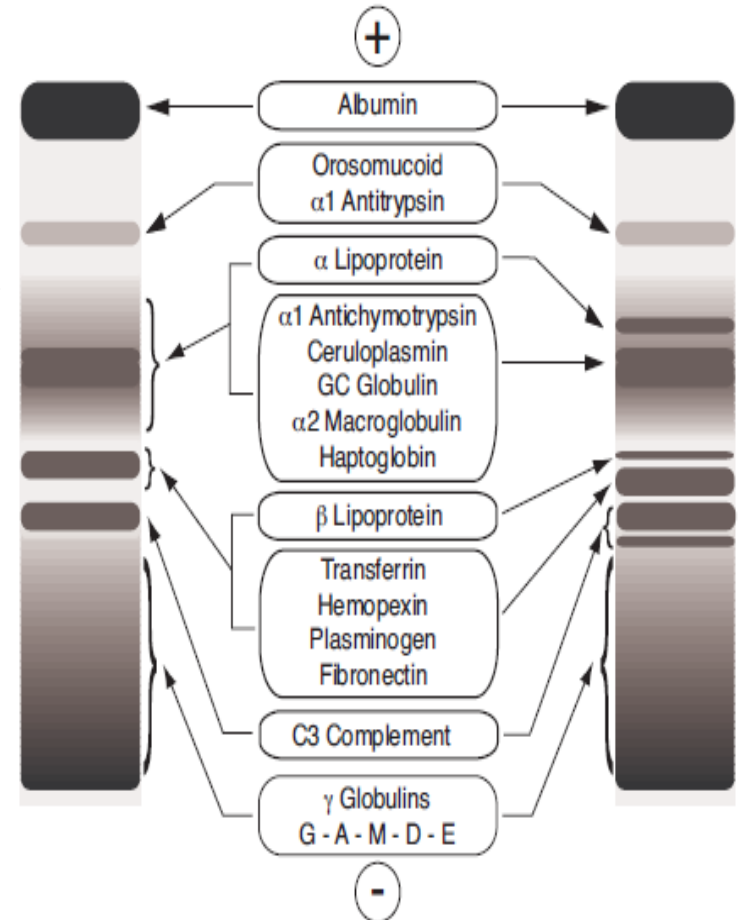
HYDRAGEL 01-02 15/30

sebia

10 17 10 19 20 21 22 23 24 25 26 27 20 29 30



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



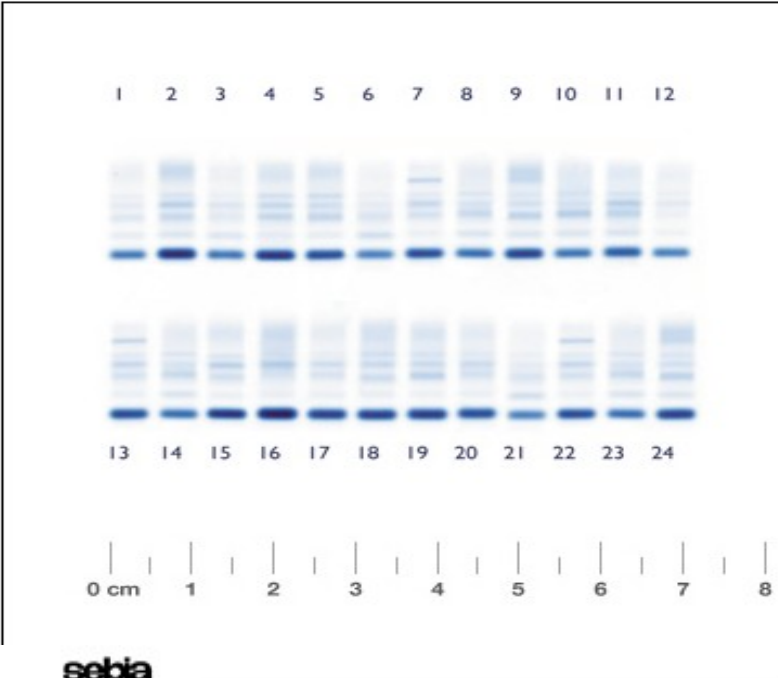


# SAS SPE $\beta 1 - \beta 2$ (HELENA)

- **nosné médium:** agarózový gel v tris/barbitálovém pufru
- Množství vzorku: 35  $\mu$ l
- **migrace:** probíhá při napětí 100 V s časem migrace asi 23 min. ( při  $t = 20^\circ$  ), sušení gelu při  $t = 54^\circ\text{C}$ , asi 8 min.
- **barvení gelu:** kyselé modré barvivo (doba barvení: 57 min.)
- **Denzitometrické skenování:** při 595 nm
- **vzorky:** sérum, zahuštěná moč

# G 26 SPE ( $\beta 1 - \beta 2$ ) v séru

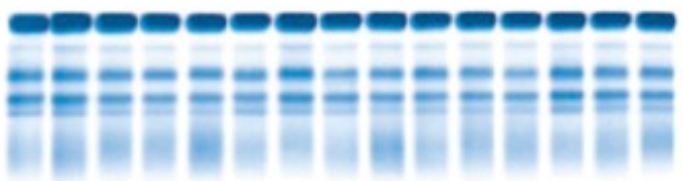
- **nosné médium:** agarózový gel
- **barvení gelu:** kyselé modré barvivo
- **vzorky:** sérum, zahuštěná moč a CSF ( CB  $\geq$  20g/l)



HYDRAGEL 01-02 15/30

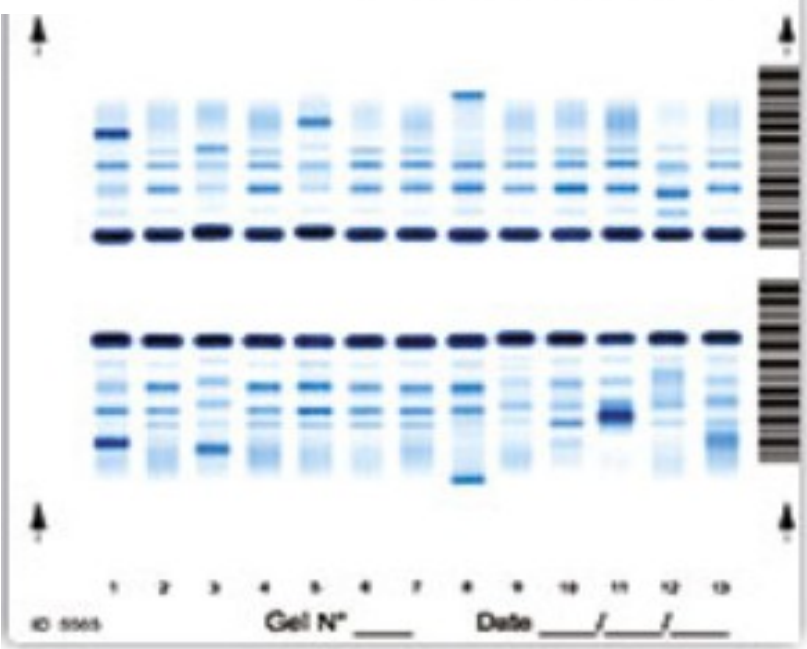
sebia

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



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

SPE - 0. G<sub>0</sub>



# Parametry metod

	SEBIA	HELENA	INTERLAB
Mez detekce	440mg/l, 240 mg/l moč	250 m g/l	neuvádí
opakovatelnost	1,2-8,5 %	3,7-9,7 %	1,1-4,8 %
reprodukovatelnost	2,1 – 6,0 %	3,9- 12,7 %	1 – 4,7 %
IKK	ano	ano	ano
EHK	SEKK AKS - 4x ročně pro frakci albuminu a gama		

# Normální hodnoty

frakce	<u>Sebia</u> (%)	Helena (%)	<u>Interlab</u> (%)
albumin	54,3-65,6	53,1-65,5	50-65
<u>Alfa - 1</u>	1,2-3,3	2,3-4,6	2-4,3
Alfa -2	8,3-15	6,5-10,9	6,3-13,5
Beta -1	6,5-11,5	6,5-10,7	7-14
Beta - 2	2,5-7,2	3,7-6,0	2,2-6,2
gama	7,1-19,5	11,6-18,6	10-21

# AKS 2/2017

<b>(31) Albumin (elfo)</b>		[-]				92					92	87	95%	
Vzorky a skupiny														
<b>Vzorek A</b>		0,610	0,04	7,1	92	CVP	0,61	0,011	15%	0,518	0,702	92	89	97%
(34) Sebia		0,625	0,03	5,8	59	0						59		
(213) Interlab Srl		0,574	0,03	6,2	27	0						27		
Ostatní					6	1						6		
-----						1x 18, 1x 49, 1x 60, 1x 94, 1x 100, 1x 999					92	89	97%	
<b>Vzorek B</b>		0,643	0,03	4,9	92	CVP	0,643	,0082	15%	0,546	0,74	92	89	97%
(34) Sebia		0,645	0,03	5,1	59	0						59		
(213) Interlab Srl		0,637	0,02	4,0	27	0						27		
Ostatní					6	1						6		
						1x 18, 1x 49, 1x 60, 1x 94, 1x 100, 1x 999								

<b>(32) gama-globulin (elfo)</b>		[-]				91					91	86	95%	
Vzorky a skupiny														
<b>Vzorek A</b>		0,134	0,01	11	91	CVP	0,134	,0039	30%	0,093	0,175	91	88	97%
(34) Sebia		0,130	0,01	11	59	0						59		
(213) Interlab Srl		0,144	0,01	9,3	27	0						27		
Ostatní					5	0						5		
-----						1x 18, 1x 49, 1x 94, 1x 100, 1x 999					91	88	97%	
<b>Vzorek B</b>		0,122	0,01	9,7	91	CVP	0,122	,0030	30%	0,085	0,159	91	88	97%
(34) Sebia		0,121	0,01	10	59	0						59		
(213) Interlab Srl		0,123	0,01	8,7	27	0						27		
Ostatní					5	0						5		
						1x 18, 1x 49, 1x 94, 1x 100, 1x 999								

# AKS 2/2018

Zkouška	[jednotka]					Srovnatelnost								
		RoM	SD	CV [%]	N <sub>tot</sub>	N <sub>out</sub>	AV	U <sub>AV</sub>	D <sub>max</sub>	LL	UL	N <sub>eva</sub>	N <sub>suc</sub>	S <sub>rel</sub>
<b>(31) Albumin (elfo)</b>		[-]				97					97	90	93%	
Vzorky a skupiny														
<b>Vzorek A</b>		0,603	0,05	8,5	97	CVP	0,603	0,013	15%	0,512	0,694	97	92	95%
(34) Sebia		0,625	0,03	5,1	62	0						62		
(213) Interlab Srl		0,548	0,03	6,5	29	0						29		
Ostatní					6	1						6		
-----						1x 0, 1x 18, 1x 49, 1x 94, 1x 100, 1x 999					97	92	95%	
<b>Vzorek B</b>		0,617	0,04	7,2	97	CVP	0,617	0,011	15%	0,524	0,71	97	92	95%
(34) Sebia		0,635	0,03	5,0	62	0						62		
(213) Interlab Srl		0,575	0,04	7,4	29	0						29		
Ostatní					6	1						6		
						1x 0, 1x 18, 1x 49, 1x 94, 1x 100, 1x 999								
<b>(32) gama-globulin (elfo)</b>		[-]				96					96	92	96%	
Vzorky a skupiny														
<b>Vzorek A</b>		0,137	0,01	12	96	CVP	0,137	,0042	30%	0,095	0,179	96	93	97%
(34) Sebia		0,130	0,01	9,5	62	0						62		
(213) Interlab Srl		0,152	0,01	9,2	29	0						29		
Ostatní					5	0						5		
-----						1x 18, 1x 49, 1x 94, 1x 100, 1x 999					96	94	98%	
<b>Vzorek B</b>		0,133	0,01	11	96	CVP	0,133	,0036	30%	0,093	0,173	96	94	98%
(34) Sebia		0,128	0,01	9,4	62	0						62		
(213) Interlab Srl		0,145	0,01	11	29	0						29		
Ostatní					5	0						5		
						1x 18, 1x 49, 1x 94, 1x 100, 1x 999								

# Spec. úprava vzorků před aplikací na gel

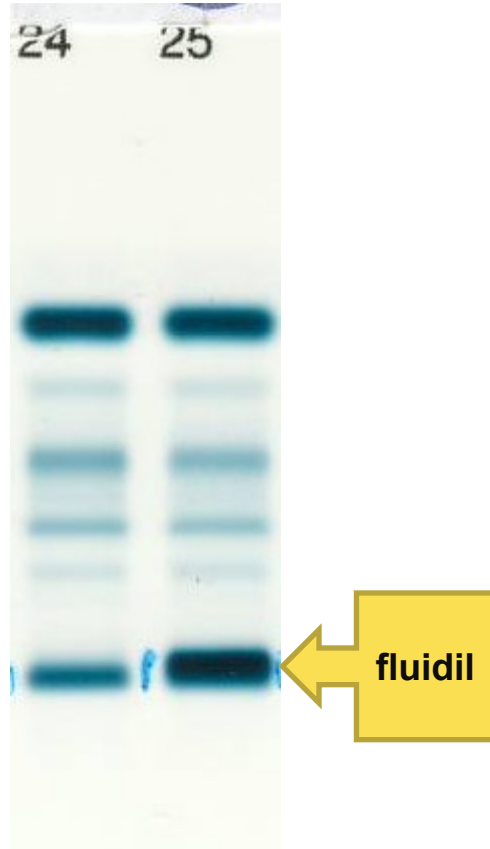
- vzorky séra s konc. CB > 100 g/l, vizkózní nebo zkalené: ředění s fluidilem
- vzorky séra s přítomností kryoproteinu: 37°C, 15 min. inkubace s BME
- vzorky moče: zakoncentrování na U/CB 15-20 g/l - koncentrační zkumavky

VIVASPIN Sartorius Stedim:

Membrána je vyrobena z polyethylensulfonátu (PES), triacetátu celulózy (CTA) nebo ze stabilizované celulózy (Hydrostat), má cutoff hodnotu podle molekulové hmotnosti pro kterou je nepropustná. (5, 10 a 30 kDa).



CB=112,5g/l  
mlg=25,7 g/l  
mlg (fluidil)=54,8 g/l



CB = 123,0 g/l  
mlg= 34,7 g/l  
mlg (fluidil)= 58,9 g/l









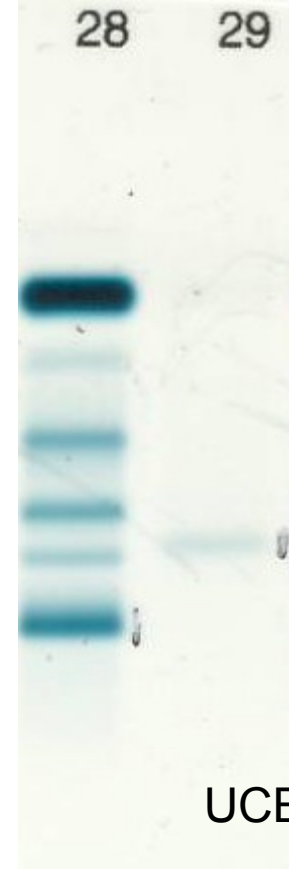
UCB=0,79 g/l



UCB=0,08 g/l



UCB=1,76 g/l



UCB=0,22g/l

# HYDRAGEL 2,4, 9 IFE (SEBIA)

- **nosné médium:** agarózový gel –konc. 8 g/l, saturováno **alkalickým pufrem (pH 9,1)**
- **migrace:** probíhá při konst. výkonu 20 W, s časem migrace asi 7 min.(t= 20 °C)
- **imunofixace:** antiséra, fixační rozrok (inkubace při 20 °C, trvá 5 min.)
- Sušení gelu při t=50°C, asi 6 min.,
- **barvení gelu:** kyselá violet' (c= 2 g/l)
- **hodnocení:** vizuální
- **vzorky:** naředěné vzorky séra, zahuštěné moče
- k dispozici antiséra: IgD, IgE, kappa free, lambda free

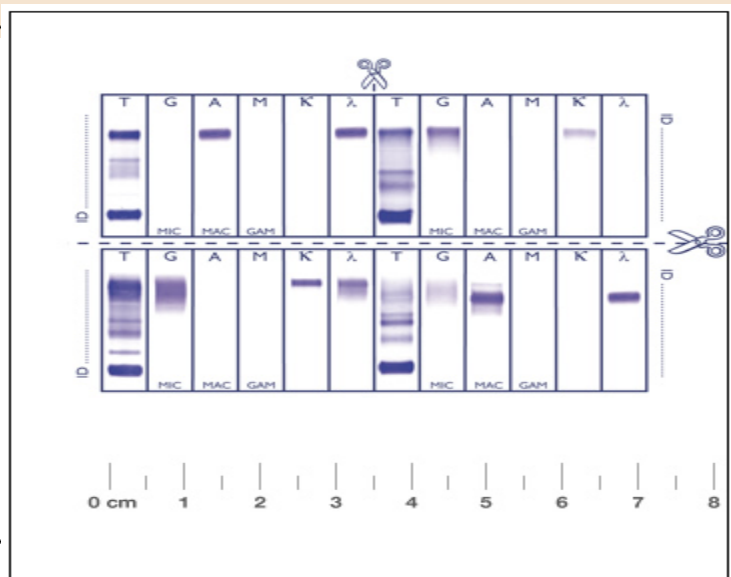
# SAS -3 IFE 2,4,9 (HELENA)

- **nosné médium:** agarózový gel v tris/barbitálovém pufru
- **migrace:** probíhá při napětí 650 V, s časem migrace asi 6,5 min. (t= 21 °C)
- **imunofixace:** antiséra, fixační rozrok (inkubace při 21 °C, trvá 10 min.)
- Sušení gelu při t=54°C, asi 8 min.
- **barvení gelu:** kyselá violet'
- **hodnocení:** vizuální
- **vzorky:** naředěné vzorky séra, nativní moče (aplikace 10x), zahuštěné moče
- k dispozici antiséra: IgD, IgE, kappa free, lambda free, kontrola kvality

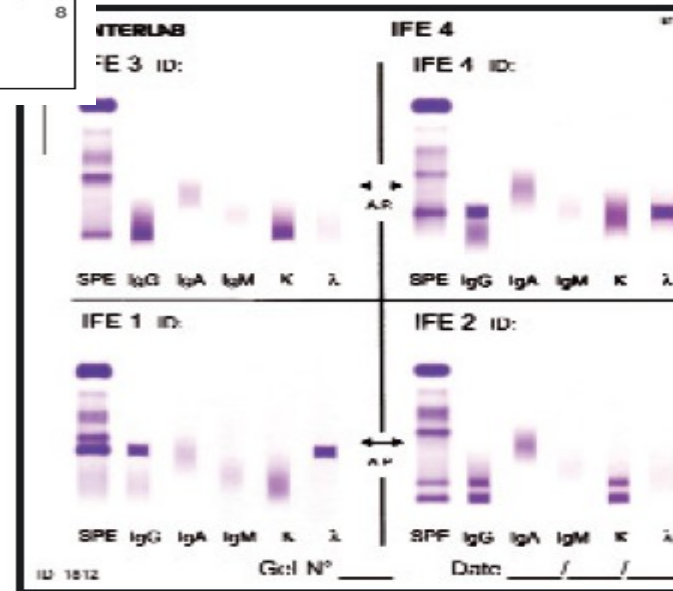
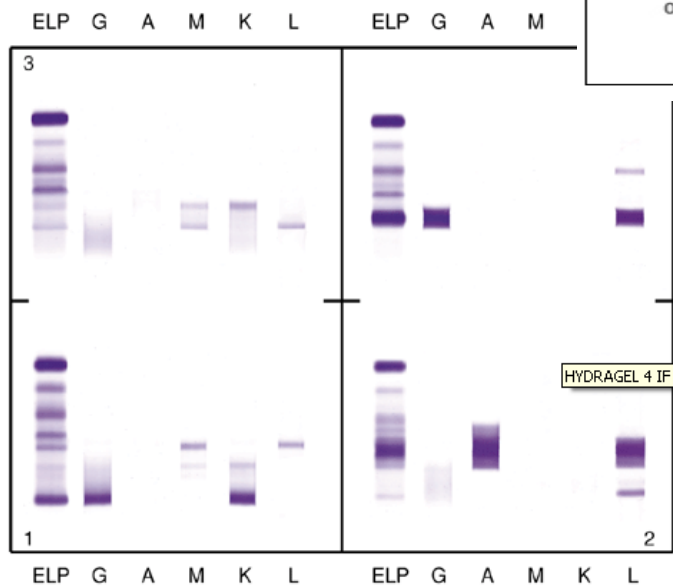
# G26 IFE 2,4 (Interlab)

- **nosné médium:** agarózový gel
- **barvení gelu:** kyselá violet', kyselá modř
- **hodnocení:** vizuální
- **vzorky:** naředěné vzorky séra, zahuštěné moče

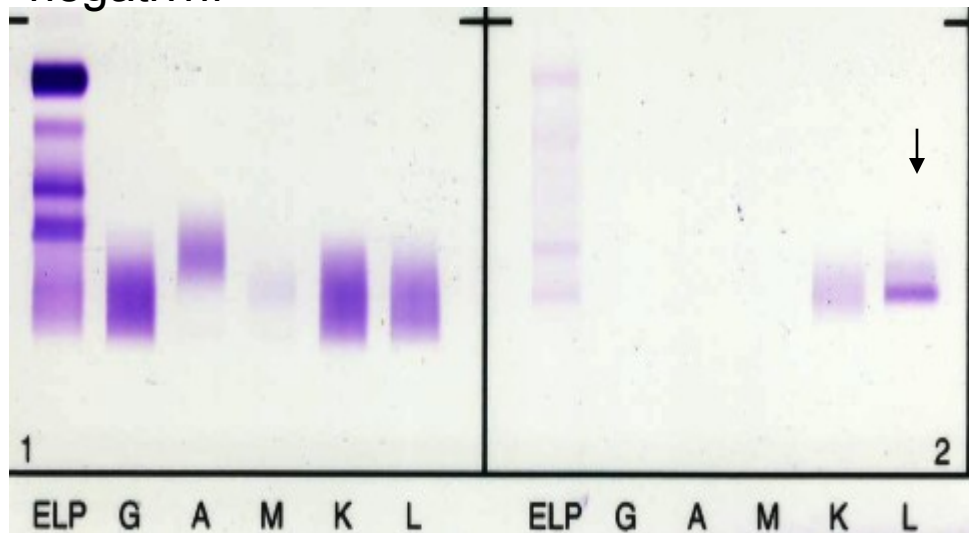
	SEBIA	HELENA	INTERLAB
Mez detekce	120-250 mg/l	neuvádí	neuvádí
IKK	není	ano	není
EHK	SEKK <u>gammapatie</u> (2xročně)		



**HYDRAGEL IF 2/4**

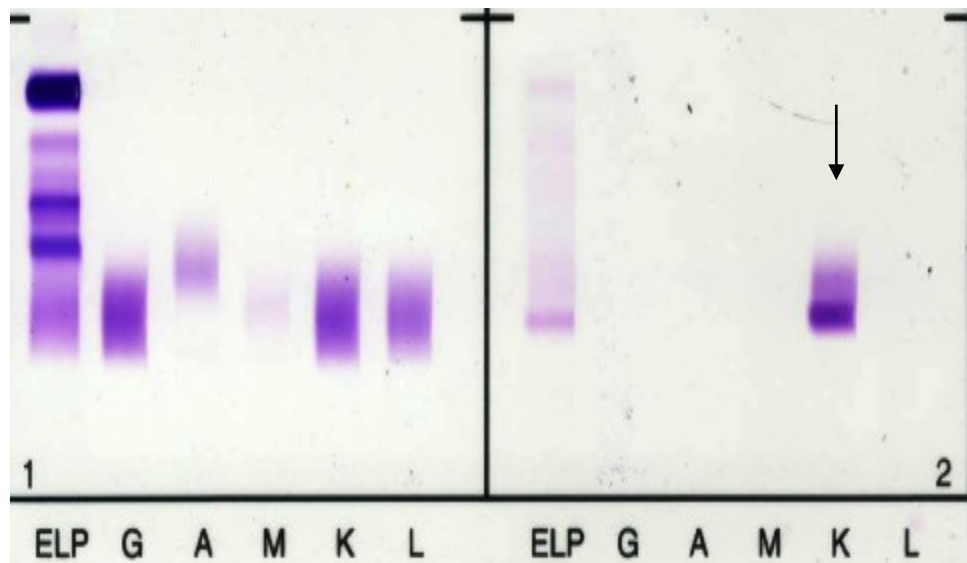


Fixace sérum -  
negativní



Fixace moč - pozitivní

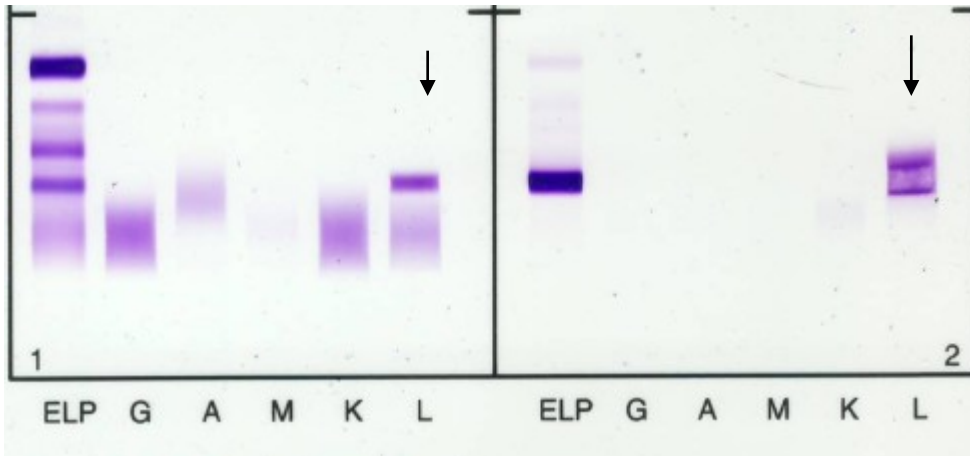
Fixace sérum -  
negativní



Fixace moč - pozitivní

sérum

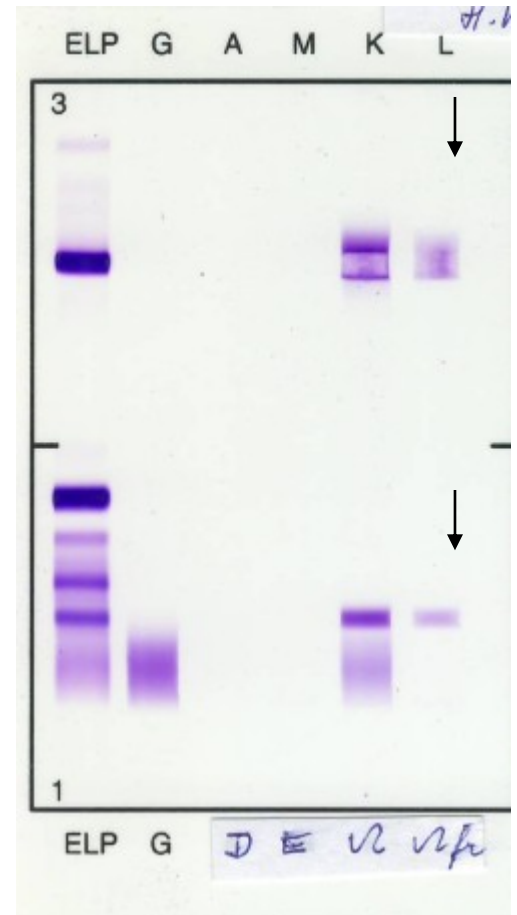
moč



Fixace IgD, IgE, λ, λfree

moč

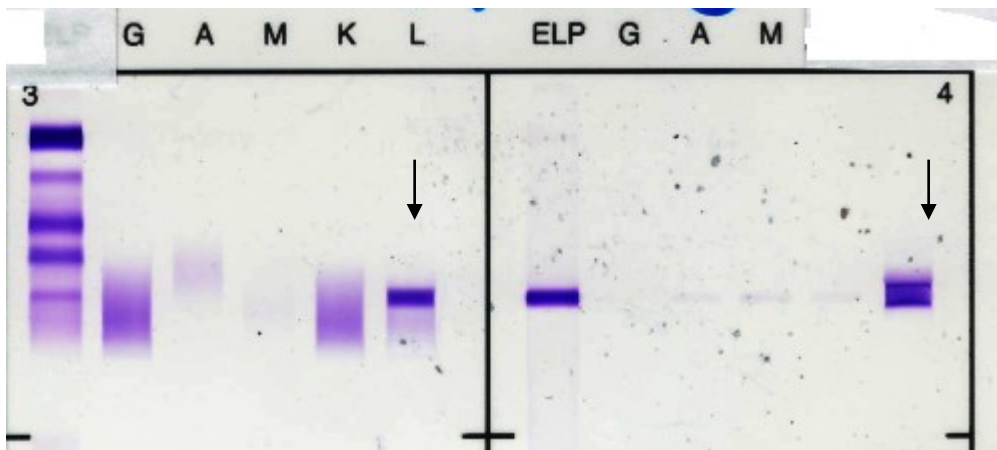
sérum



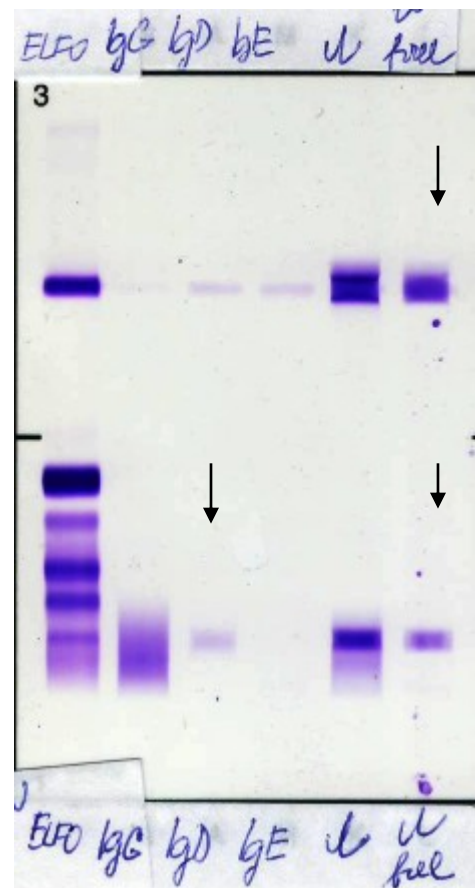


sérum

moč

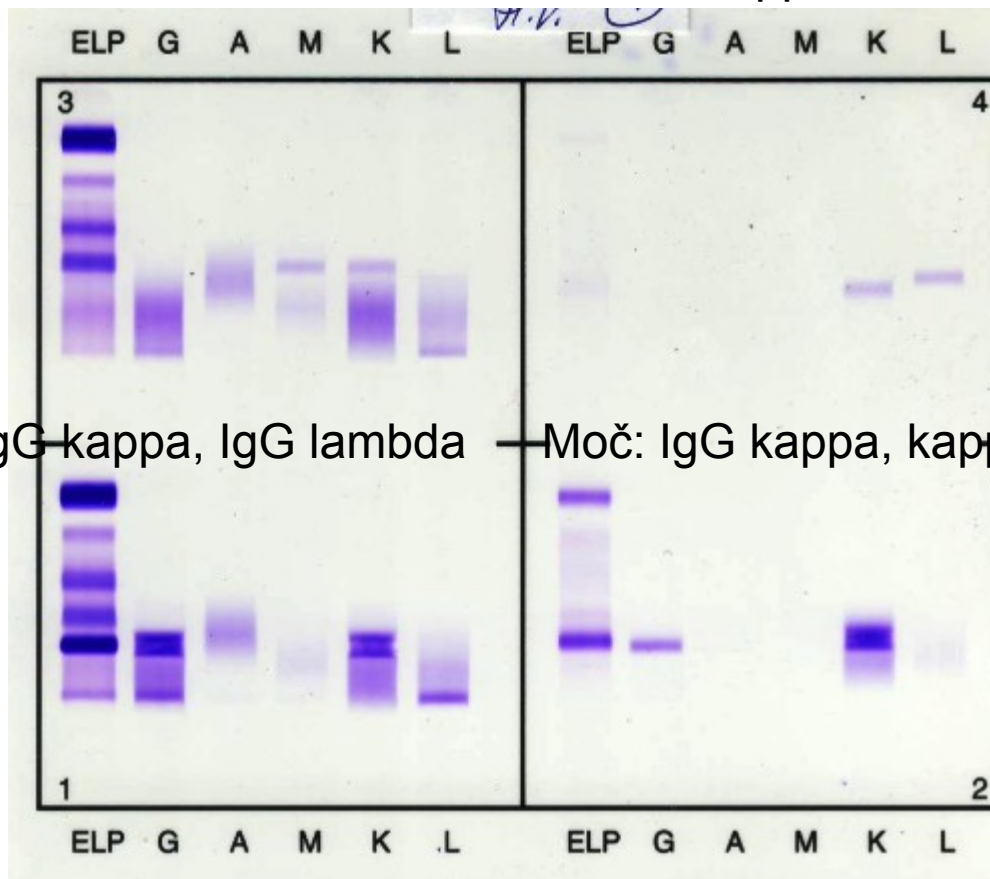


Fixace IgD, IgE,  $\lambda$ ,  $\lambda$ free



Sérum: IgM kappa, IgG lambda

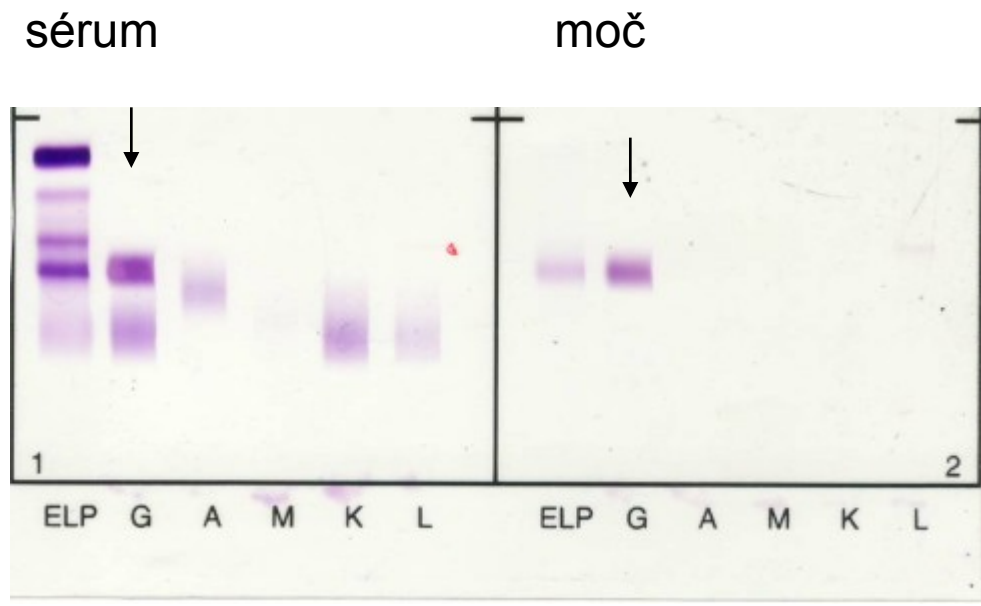
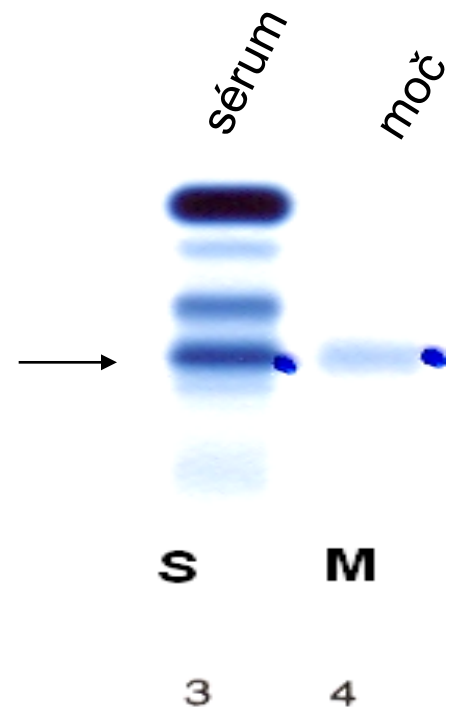
Moč: kappa free, lambda free



Sérum: IgG kappa, IgG lambda

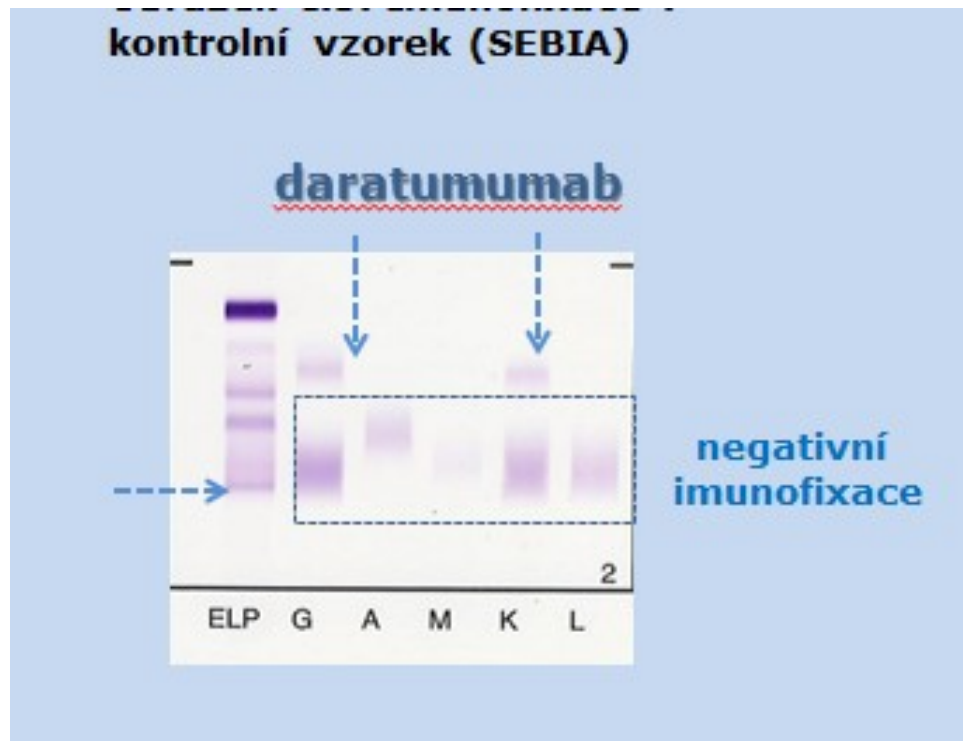
Moč: IgG kappa, kappa free

Nemoc těžkých řetězců (heavy chain diseases) - lymfoproliferativní neoplastická onemocnění s produkcí monoklonálních těžkých řetězců



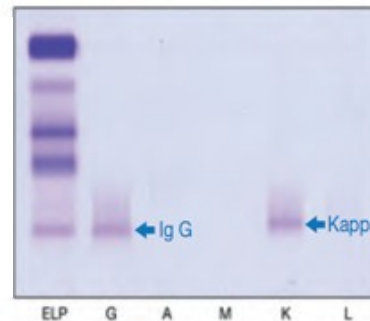
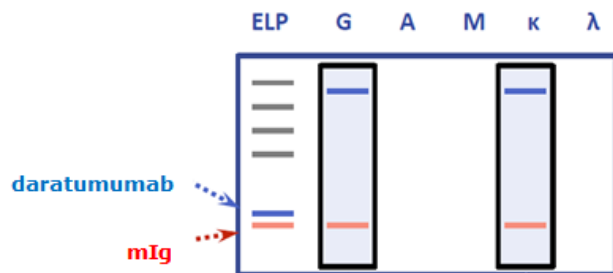
# Biologická léčba -interference

**Daratumumab-** první monoklonální protilátkou schválenou k léčbě MM byl Je to lidská IgG1κ monoklonální protilátka cílená proti CD38 znaku plazmatické buňky. Sérové koncentrace daratumumabu dosahují až 1 g/l.

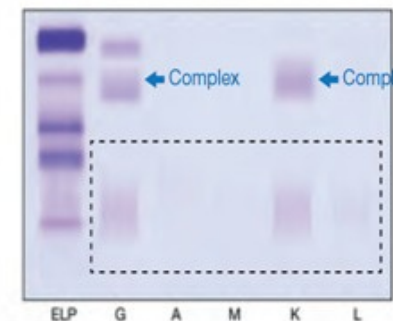


# Biologická léčba- interference

- Imunofixační postup HYDRASHIFT (SEBIA) s použitím antidaratumumabu provedený na gelu HYDRAGEL IF 2/4 je založen na vytvoření komplexu daratumumab/antidaratumumab a jeho posunutí mimo oblast gamaglobulinů.



HYDRAGEL IF



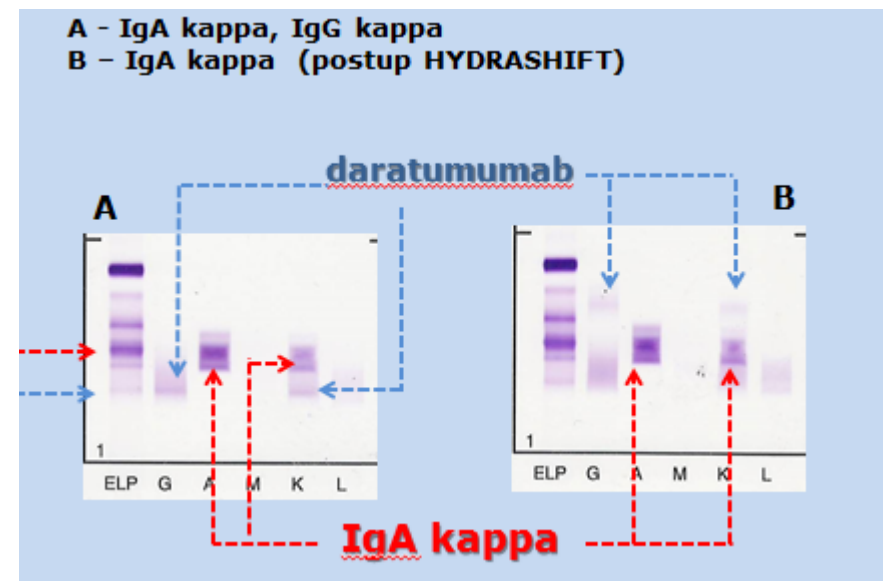
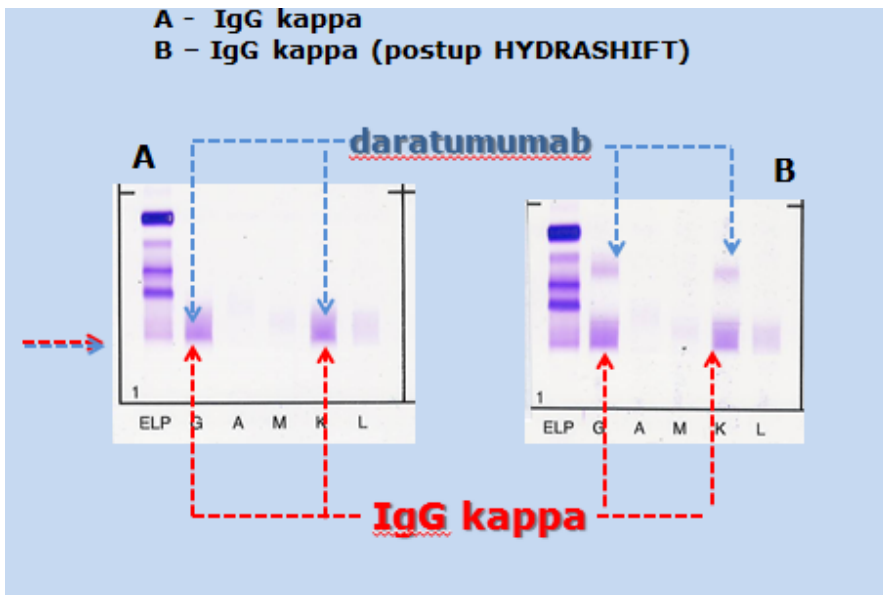
dara/antidara

negativní  
imunofixace

HYDRASHIFT 2/4 daratumumab

# Biologická léčba- interference

- může mít stejnou elektroforetickou pohyblivost jako Mlg přítomný v séru pacienta, a tak může vést k arteficiálnímu nadhodnocení jeho množství.
- může simulovat přítomnost patologického Mlg, který ve skutečnosti není přítomen, a tak falešně podhodnocovat odpověď na léčbu.



# HYPRAGEL 6 IF PENTA (SEBIA)

- **nosné médium:** agarózový gel –konc. 8 g/l, saturováno **alkalickým pufrem (pH 9,1)**
- **migrace** probíhá při konst. výkonu 20 W, s časem migrace asi 9 min.(při 20 °C)
- **imunofixace:** antiséra (pentavalentní), fixační roztok (inkubace při 20 °C, trvá 5 min.)
- Sušení gelu při  $t=50^{\circ}\text{C}$ , asi 6 min.
- **barvení gelu:** amidočerně (c= 4 g/l)
- **hodnocení:** vizuální
- **vzorky:** séra, zahuštěné moče

# SAS - IF PENTA (HELENA)

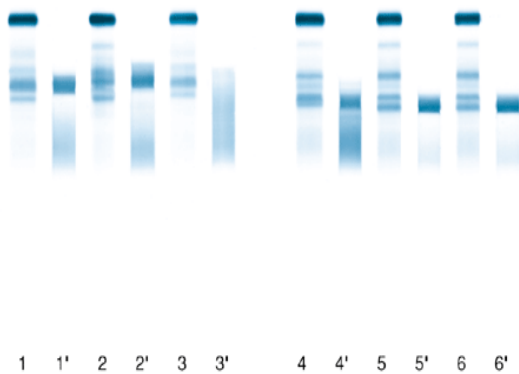
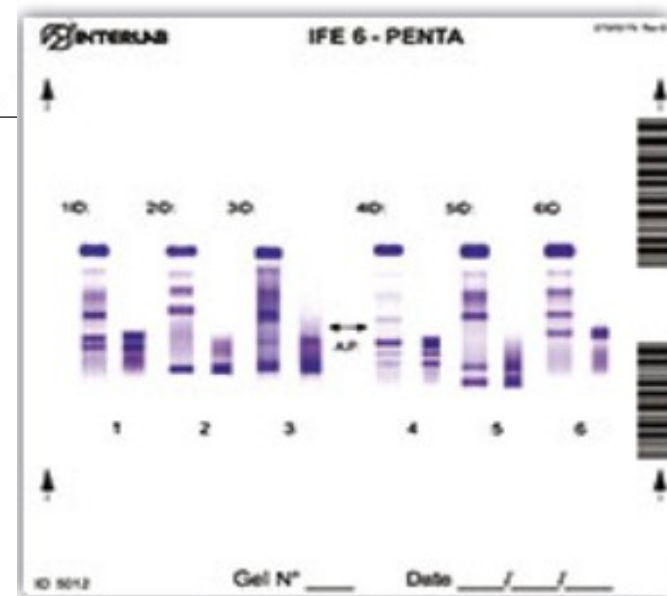
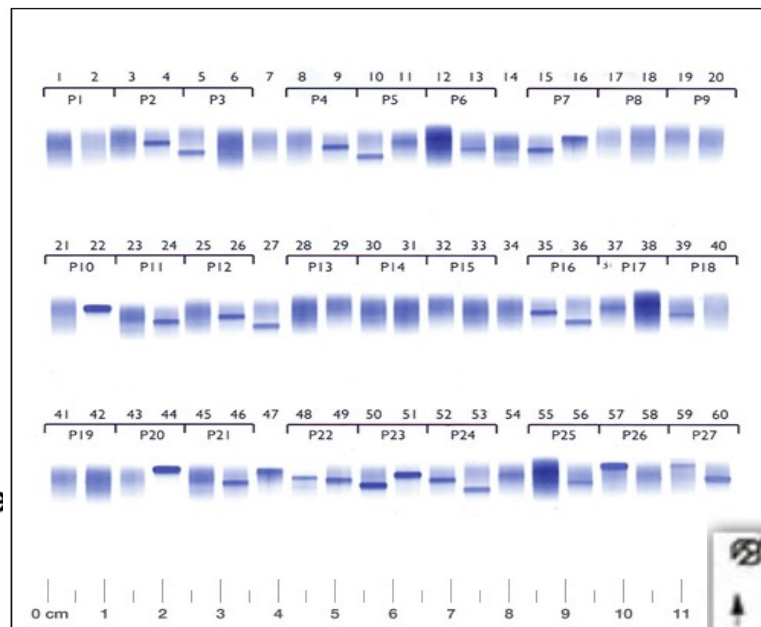
- **nosné médium:** agarózový gel v tris/barbitálovém pufru
- **migrace** probíhá při napětí 650 V, s časem migrace asi 6,5 min.(při 21 °C)
- **imunofixace:** antiséra (pentavalentní), inkubace při 21 °C, trvá 10 min.
- sušení gelu při  $t=50^{\circ}\text{C}$ , asi 6 min.
- **barvení gelu:** kyselá modř
- **hodnocení:** vizuální
- **vzorky:** séra, zahuštěné moče



# G 26 - IF PENTA (Interlab)

- **nosné médium:** agarózový gel
- **barvení gelu:** kyselá violet'
- **hodnocení:** vizuální
- **vzorky:** séra, zahuštěné moče

	SEBIA	HELENA	INTERLAB
Mez detekce	340 mg/l	10 mg/l (pro 10 aplikací)	neuvádí
IKK	není	není	není
EHK	není		



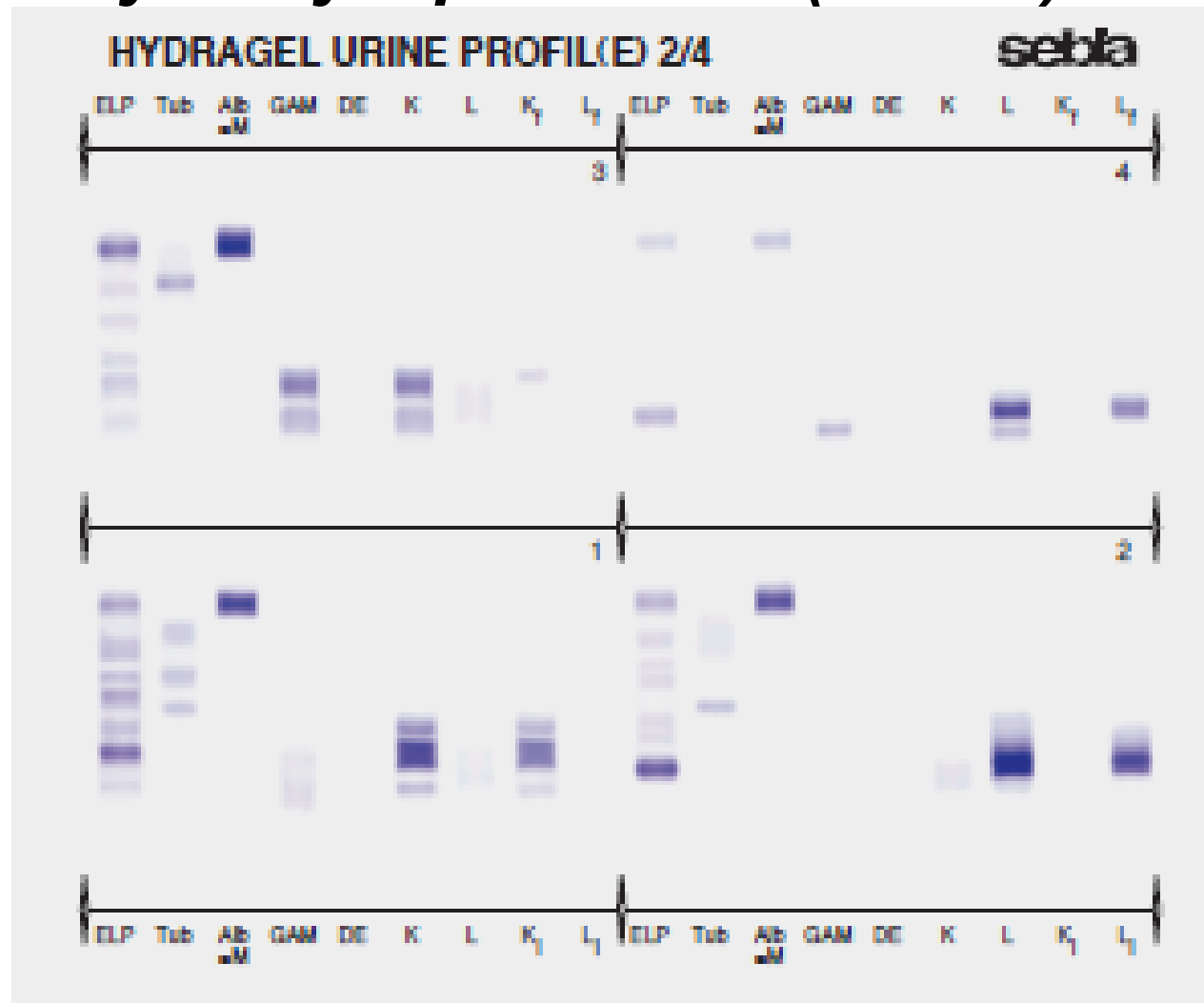
HYDRAGEL IF Penta 6/12

# ***Gelová elektroforéza moče na agarózovém gelu v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům (SEBIA)***

**Postup:** Vzorek **zahuštěné moče** je současně podroben elektroforéze v 9. stopách na alkalicky pufovaném agarózovém gelu (pH 9.1) :

- po elektroforéze slouží jedna stopa (ELP) jako referenční pro znázornění elektroforetického uspořádání bílkovin ve vzorku.
- zbývajících osm stop je imunofixováno příslušným antisérem.
- nevysrážené, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny pomocí odsávání a promývání.
- precipitovaný komplex antigen-protilátka je zachycen v matrici gelu.
- vysrážené bílkoviny jsou vizualizovány barvením kyselou violetí, přebytečné barvivo se odstraňuje kyselým roztokem.

# Gelová elektroforéza moče na agarózovém gelu v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům (SEBIA)



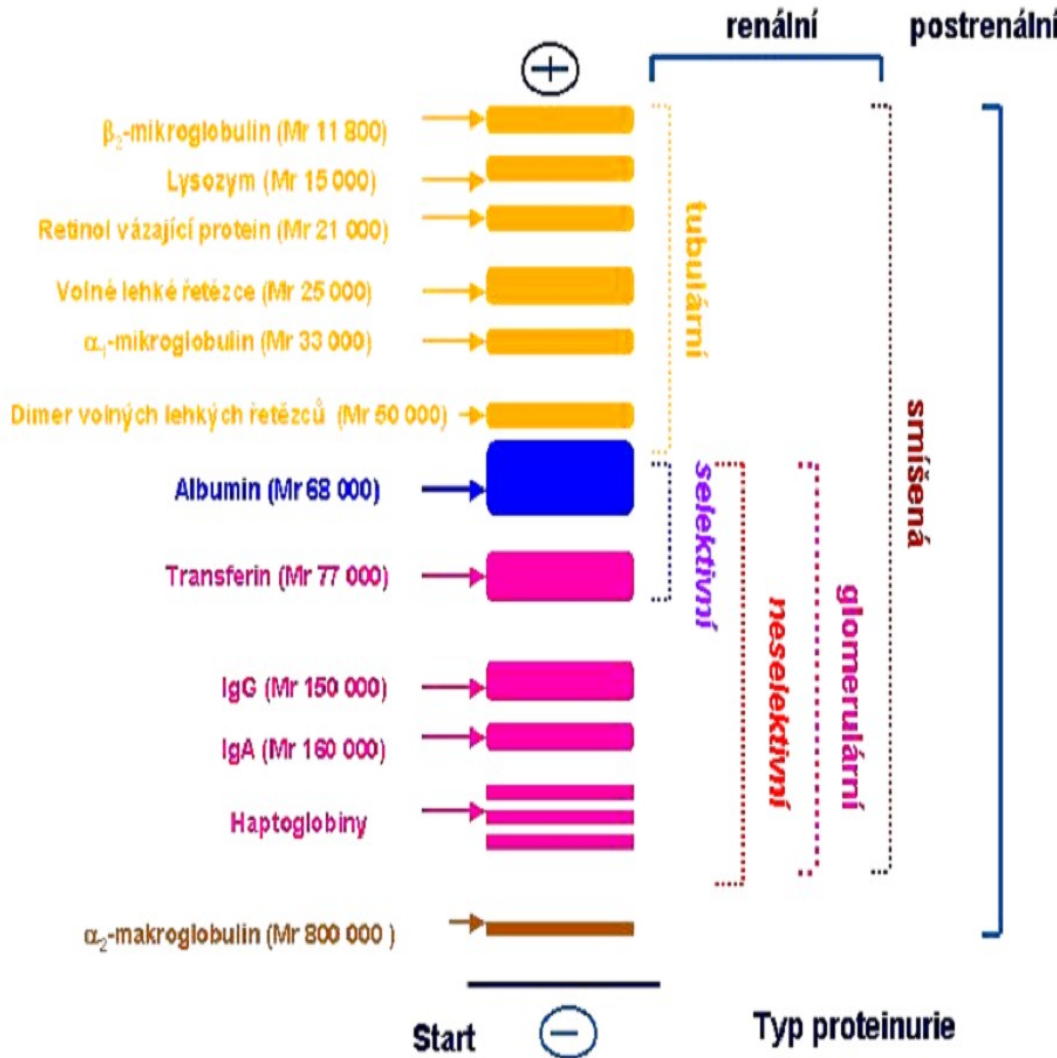
## ***SDS – elektroforéza moče na agarózovém gelu (SDS AGE) (SEBIA)***

- Používají se neutrálně pufované SDS gely - separují močové bílkoviny podle jejich molekulové hmotnosti a zcela jasně odlišuje bílkoviny tubulární od bílkovin glomerulárního původu.
- Výsledek elektroforetického dělení proteinů obarvených kyselou violetí je vizuálně porovnáván s proteinovými markery v referenční stopě.
- provádí se v nezahuštěné moči,
- minimální detekční hladina je 15 mg/L na frakci.

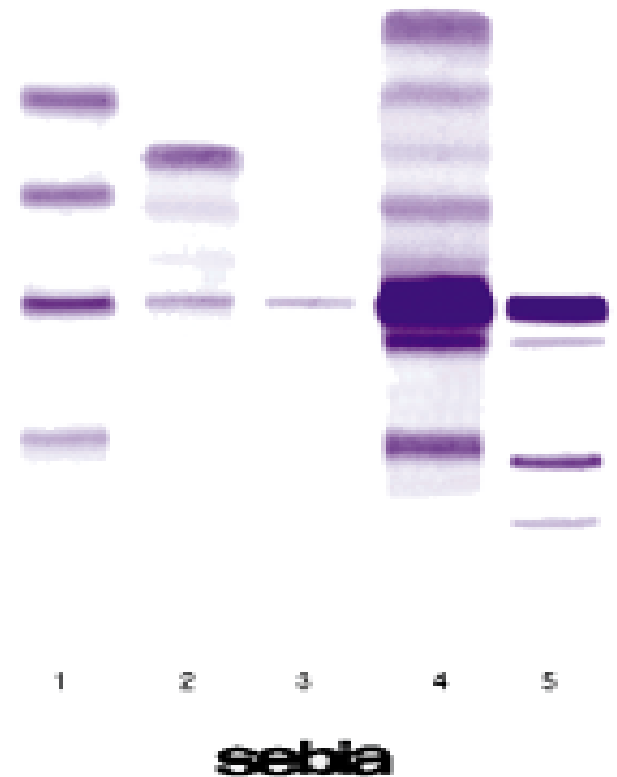
## ***SDS – elektroforéza na agarózovém gelu (SDS AGE)***

- V přebytku detergentu SDS jsou bílkoviny změněny v komplexy kde dochází k rozrušení nativní struktury bílkovin a zaujetí uniformní struktury o stejném negativním elektrickém náboji na jednotku hmotnosti.
- Používají se gely s vysokou koncentrací – 10%, kde dochází k rozdělení močových bílkovin dle jejich molekulární hmotnosti.
- Jednotlivé bílkoviny tubulárního původu (M.V. < 65 - 70 kDa) jsou jasně odlišeny od glomerulárních (M.V. > 65 - 70 kDa).

# SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)



HYDRAGEL 5 PROTEINURIE



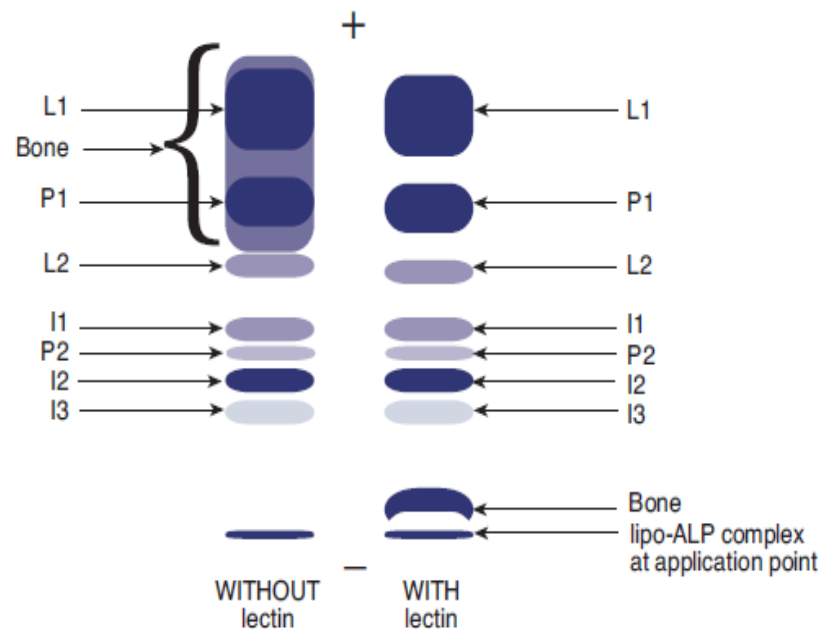
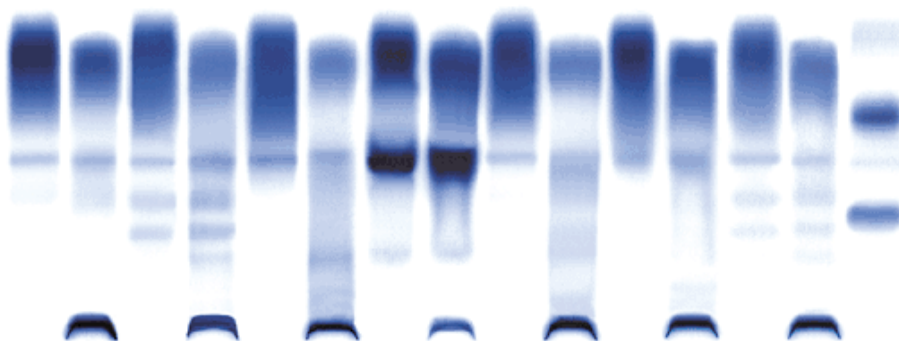
# HYDRAGEL ISO ALP (SEBIA)

- **nosné médium:** agarózový gel –konc. 10 g/l, saturováno **alkalickým pufrem (pH 9,1)**
- **migrace:** probíhá při konst. výkonu 20 W, s časem migrace asi 18 min. Séra jsou nanášeny v duplikáty, v průběhu migrace v jedné dráze procházejí zónou s aplikovaným lektinem. (kostní-frakce precipituje, zůstává na startu)
- **vizualizace:** pomocí specifického substrátu (t=37 °, 45 min.)
- sušení gelu: při t=50°C, asi 6 min.
- **hodnocení:** denzitometrické při 570 nm
- vzorky: séra



# HYDRAGEL 15 ISO-PAL

sebia

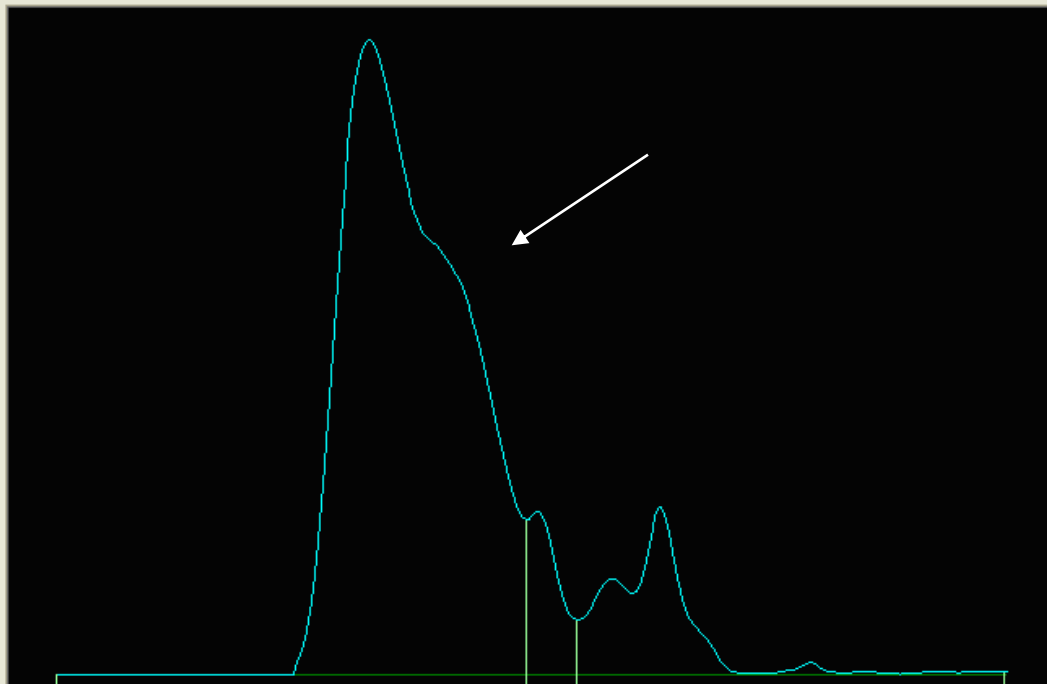


1 1' 2 2' 3 3' 4 4' 5 5' 6 6' 7 7' CTL

	ŽENY		MUŽI		DĚTI	
	%	IU/L	%	IU/L	%	IU/L
*Celková ALP		≤ 80		≤ 122		≤ 410
L1	18 - 72	≤ 45	15 - 71	≤ 64	1 - 31	≤ 51
B	20 - 74	≤ 44	23 - 75	≤ 73	62 - 100	≤ 370
L2	1 - 14	≤ 8	1 - 9	≤ 8	1 - 7	≤ 19
I1, I2, I3	Chybí u 60 % normálních subjektů, pokud přítomny nepřesáhnou 14 %					

**Fraction values**

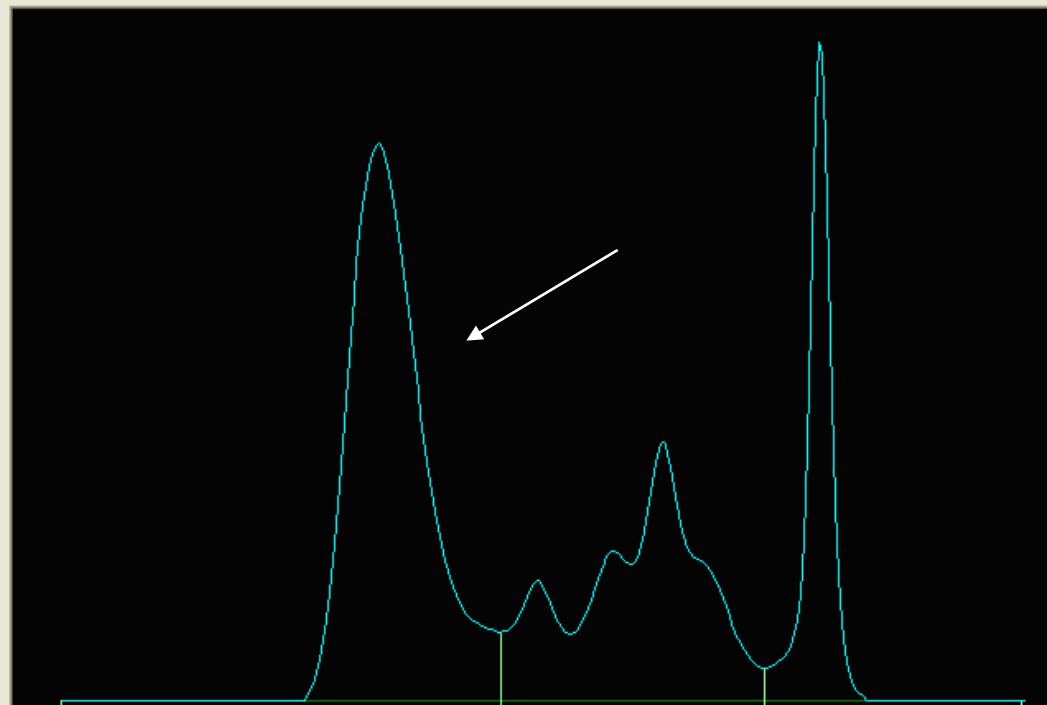
Names	%
Kost+J1	82,1
J2	5,6
Intest.	12,3



A/G Ratio    Conc.

**Fraction values**

Names	%
Kost+J1	49,8
J2	32,5
Intest.	17,7



A/G Ratio    Conc.



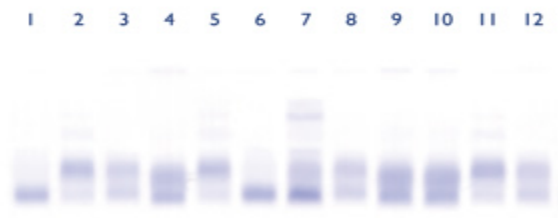
# SAS – ALP ISO (HELENA)

- **nosné médium:** agarózový gel v tris/barbitálovém pufru
- **migrace:** probíhá při 220 V, s časem migrace asi 13 min.
- **Separace izoenzymů:** pomocí neuraminidázy (oddělení jaterní a kostní izoformy) , inkubace 10 min. při 15-30 °C
- **vizualizace:** pomocí specifického substrátu (t=37 °C, 30 min.)
- **hodnocení:** vizuálně, denzitometrické scanování během 2 hod. od dokončení gelu
- **vzorky:** séra

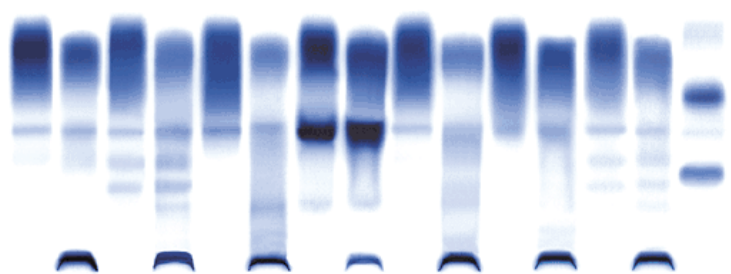
# G 26 – ALP ISO (Interlab)

- **nosné médium:** agarózový gel
- **Separace izoenzymů:** pomocí neuraminidázy
- **vizualizace:** pomocí specifického substrátu
- **hodnocení:** vizuálně
- **vzorky:** séra

	SEBIA	HELENA	INTERLAB
Mez detekce	2-3 U/l	3 U/l	neuvádí
opakovatelnost	J-1,7%,K-24%	J-4,4%,K-8,4%	neuvádí
reprodukovatelnost	J- 6,2%, K-4,1%,I-7,1-13,9%, P1-3,1, P2- 7,3%	<u>J-4,8%,K-9,2%</u>	neuvádí
IKK	ano	ano	ano
EHK		není	

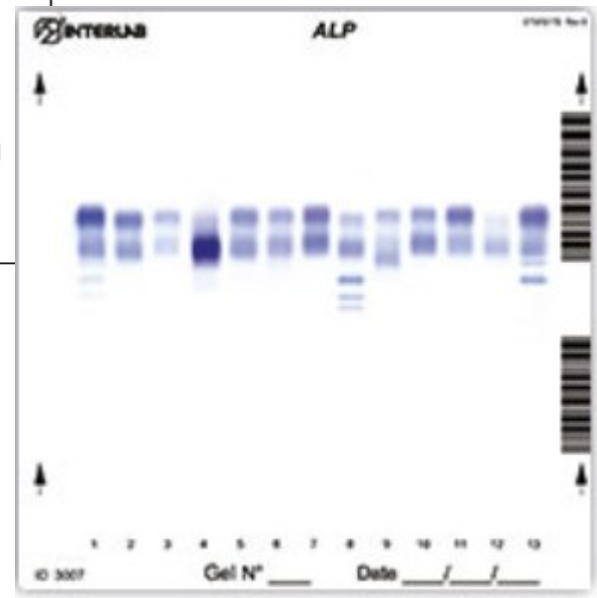


HYDRAGEL 15 ISO-PAL



1 1' 2 2' 3 3' 4 4' 5 5' 6 6' 7 7' CTL

sebia

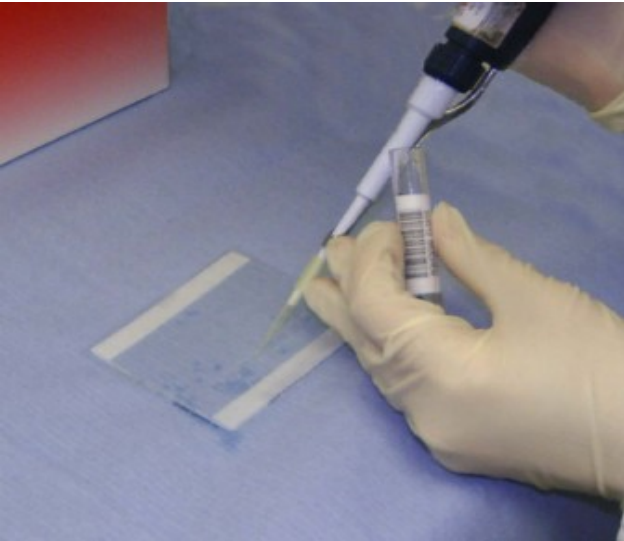


# HYDRAGEL 3,6,9 CSF ISOFOCUSING (SEBIA)

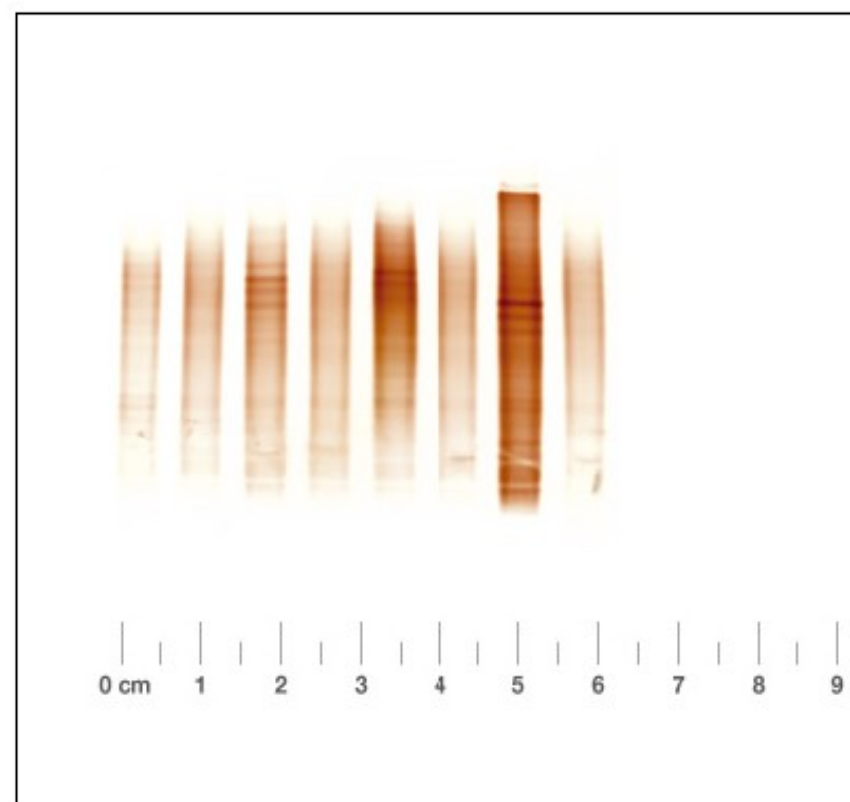
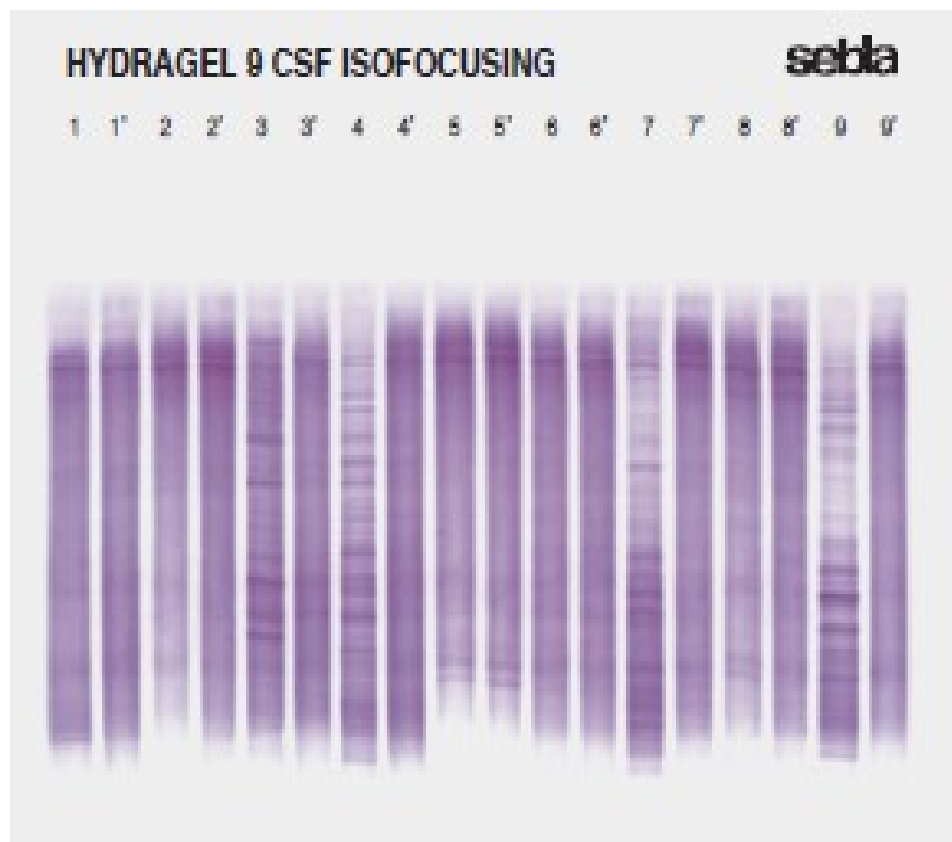
- metoda zahrnuje **izoelektrofokusaci** na agarózovém gelu – 10g/l, **s následovanou immunofixací s anti-Ig G antisérem** značeným enzymem (peroxidáza, 100x vyšší citlivost).
- Vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány.
- Do roztoku pro přípravu gelu se přidávají 2-2.5% amfolyty. Jedná se o směs nízkomolekulárních oligoamino-oligokarboxylových kyselin, které mají rozdílné pI hodnoty.
- **lineární gradient pH** (v rozmezí pH 3-10) s nejnižší hodnotou pH při anodě a nejvyšší při katodě.

# SAS – IgG IFE (HELENA)

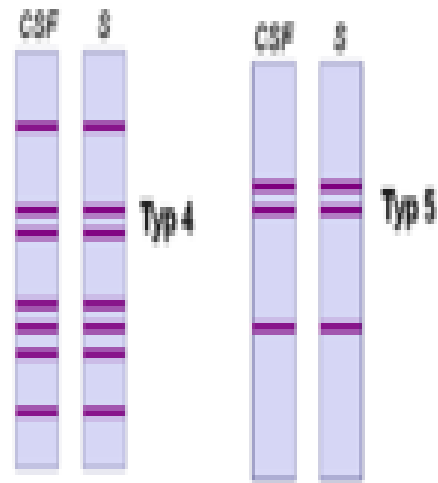
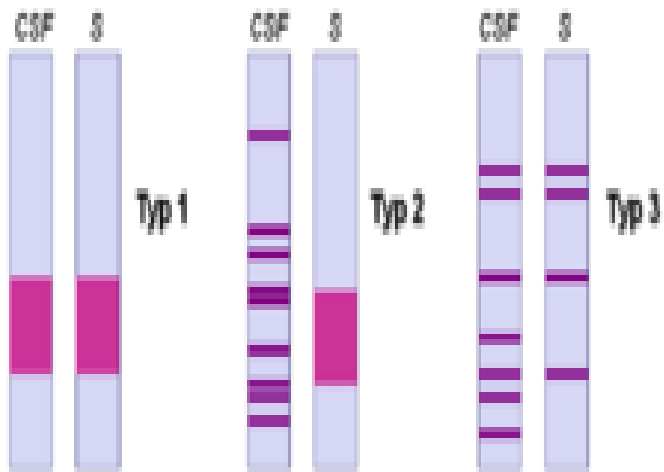
- metoda zahrnuje **izoelektrofokusaci** na agarózovém gelu s **gradient pH** v rozmezí pH 3-10.
- Proteiny jsou poté **přeneseny na nitrocelulózu** a poté **následuje immunofixace s anti-Ig G antisérem** značeným enzymem (peroxidáza)
- Vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány.



	SEBIA	HELENA	INTERLAB
Mez detekce	0,31 mg/l	0,25 mg/l	0,40 mg/l
opakovatelnost	Vzorky 4 pacientů testovány na 2 gelech různých šarží	1 vzorek testován v 20 drahách jednoho gelu	neuvádí
reprodukovatelnost	8 párů vzorků testováno na 10 gelech	Jeden vzorek testován na 3 různých gelech	neuvádí
IKK	ano	ano	nevím
EHK	SEKK CSFF – 2x ročně		



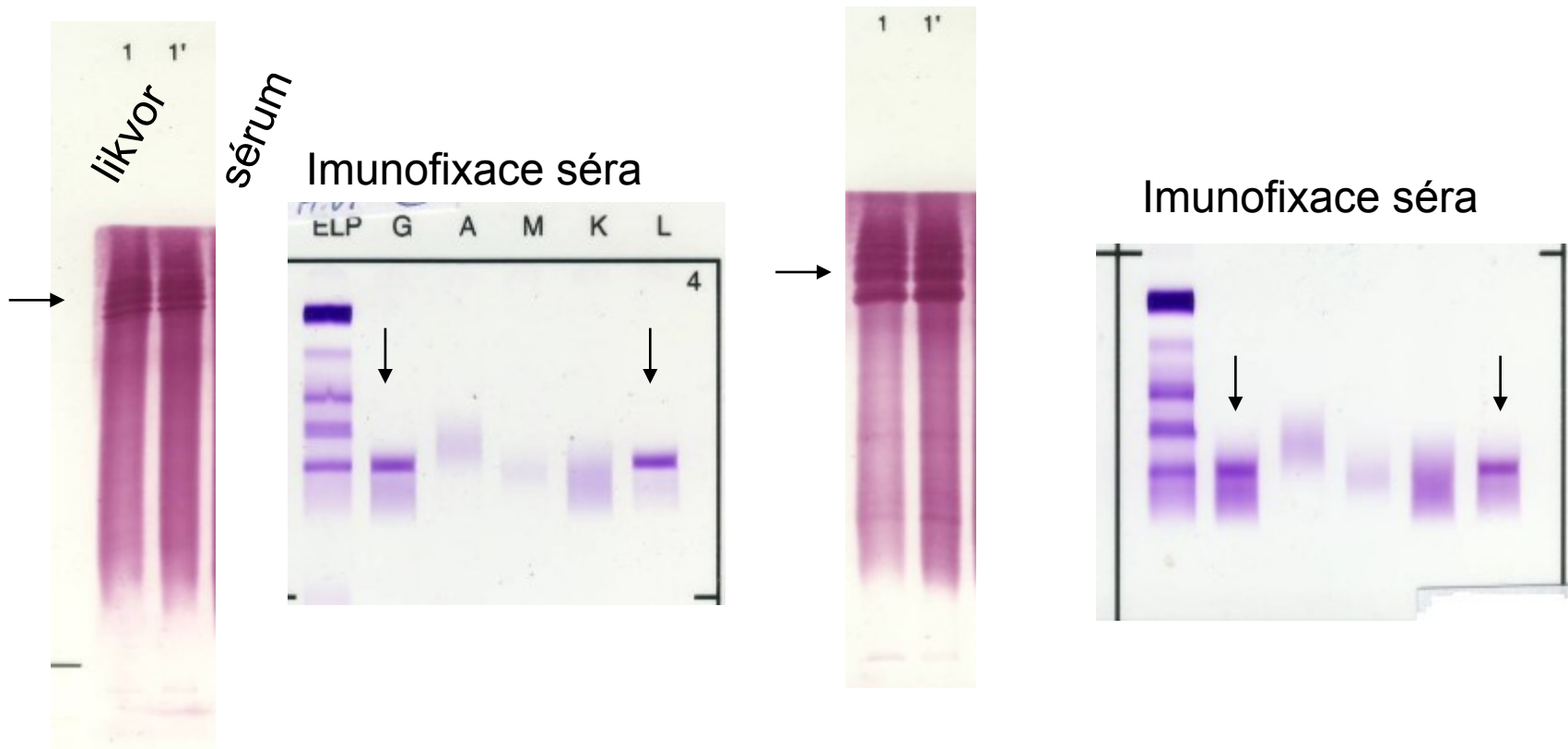




## Základní typy :

- **Typ 1** – v séru i v moku pouze polyklonální IgG – normální nález;
- **Typ 2** – oligoklonální proužky pouze v likvoru – lokální syntéza IgG (např. u roztroušené sklerózy);
- **Typ 3** – oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v likvoru i v séru – lokální syntéza IgG a produkce protilátek v organismu (např. chronická infekce CNS, roztroušená skleróza);
- **Typ 4** – identické oligoklonální proužky v séru i moku (tzv. „zrcadlový“ obraz proužků v séru a v likvoru – dochází k průniku protilátek z krve do likvoru) – systémová imunitní aktivace bez lokální syntézy IgG v CNS;
- **Typ 5** – identické monoklonální proužky v séru i moku v krátkém úseku pH gradientu, jde o přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu (myelom, monoklonální gamapatie)

**Typ 5** – identické monoklonální proužky v séru i likvoru v krátkém úseku pH gradientu



# Elektroforéza bílkovin v sekretu – průkaz likvorey (SEBIA)

- **průkaz přítomnosti mozkomíšního moku** (likvorey) provádíme v tekutině z ucha, nosu, úst nebo z operační rány
- nejčastěji se jedná o pacienty po úrazech, operacích nebo po komplikovaných infekčních zánětech centrálního nervového systému
- dříve se pro detekci likvorey využívalo stanovení glukózy nebo celkové bílkoviny
- mezi specifické markery elektroforetické stanovení **beta 2 transferin**

## HYDRAGEL 6 $\beta$ 2 TRANSFERRIN (SEBIA)

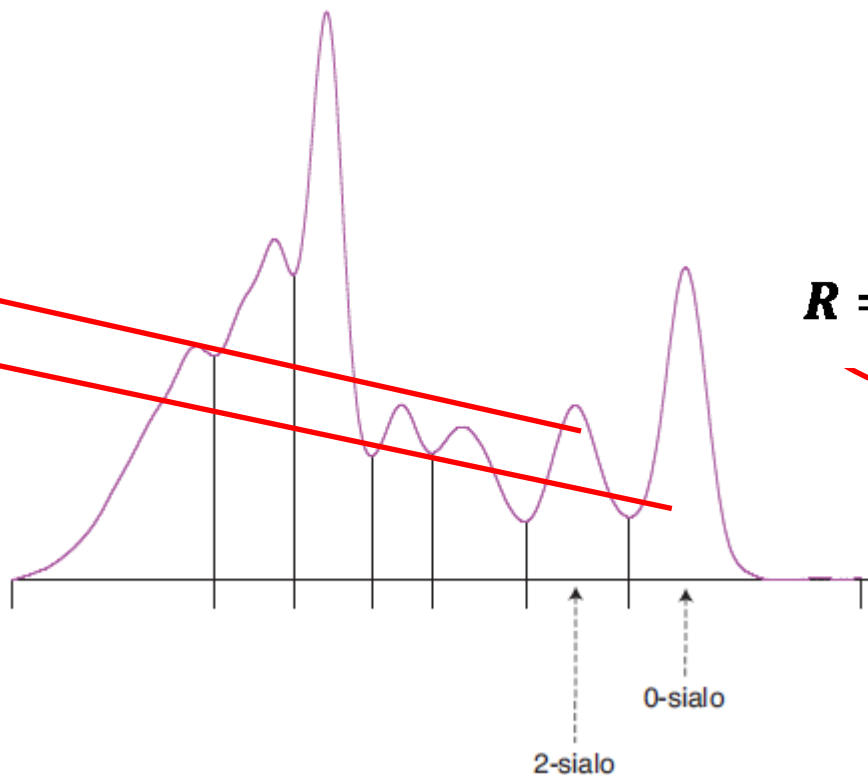
**Princip:** elektroforéza s následnou imunofixací s ANTI-Transferin –PER

- **množství vzorku:** 10  $\mu$ l bez předchozí úpravy, zároveň analýza séra pacienta (kontaminace příměsí krve)
- **stabilita:** při 2 až 8 °C 1 týden
- **doba analýzy:** 2,5 hod.
- **mez detekce:** 80-100  $\mu$ g/l
- **vyhodnocení:**

kvalitativní, kvantitativní



# Kvantitativní hodnocení



## Frakce

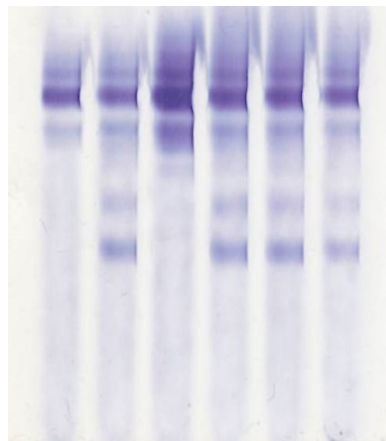
**2 - sialo = 9,7 %**  
**0 - sialo = 14,4 %**

$$R = \frac{0 - sialo}{2 - sialo} = 1,48$$

# Hodnocení

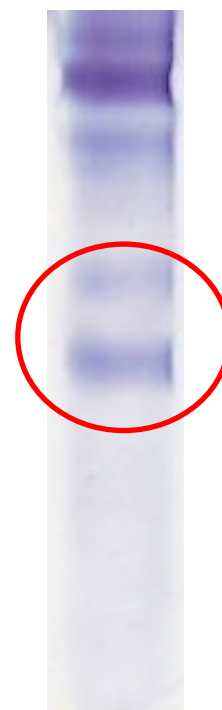
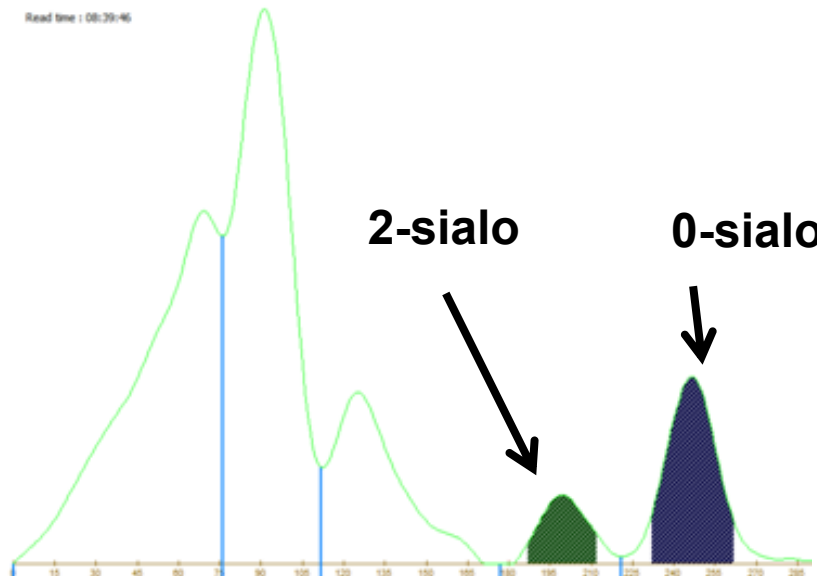
<b>poměr</b>	<b>vzorek sekretu</b>	<b>vzorek séra</b>	<b>hodnocení</b>
<b>asialo/disialo - transferin</b>	<b>&gt; 1</b>	analýza není požadována	pozitivní
<b>asialo/disialo - transferin</b>	<b>≤ 1</b>	poměr asialo/disialo – transferin ze séra ≥ poměr asialo/disialo –transferin ze vzorku sekretu	negativní (znečištění plazmou)
		poměr asialo/disialo – transferin ze séra < poměr asialo/disialo –transferin ze vzorku sekretu	pozitivní (část asialo – transferinu pochází z CSF)

# Vzorek č.1 – sekret z ucha



- 1- neg. kontrola – sérum  
75x řed'.
- 2 - poz. kontrola – likvor
- 3 - sérum pacienta: 10 řed'.
- 4 - sekret pacienta: neř.**
- 5 - sekret pacienta: řed'. 1:1
- 6 - sekret pacienta: řed'. 1:2

1 2 3 4 5 6



4

**2-sialo = 3,6 %**  
**0-sialo = 10,5%**  
**R = 0-sialo/2-sialo = 2,9**

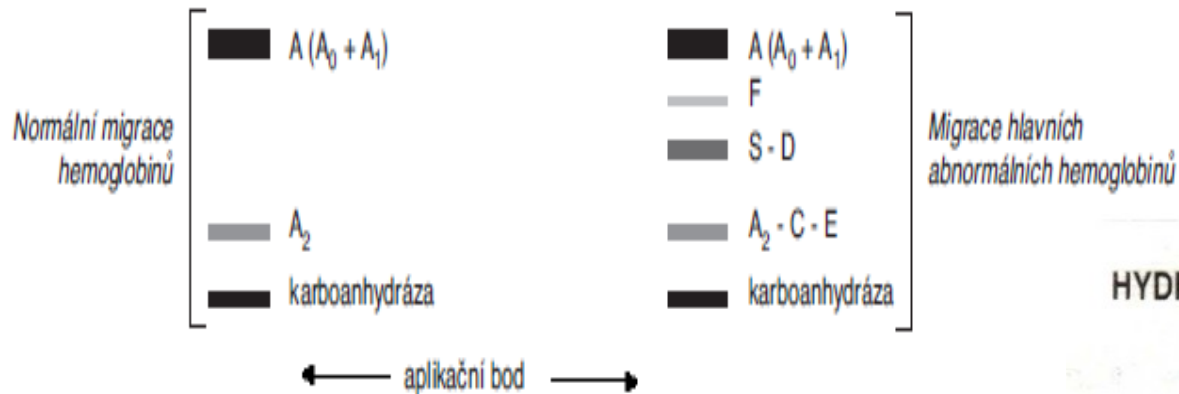
**Poměr 0-sialo/ 2-sialo TRF v sekretu > 1- pozitivní**

# HYDRAGEL 7/15 HEMOGLOBINE (SEBIA)

- **stanovení frakcí hemoglobinu**
- určen k separaci normálních hemoglobinů (A a A2)
- pro detekci hlavních variantních forem hemoglobinu : S nebo D, C nebo E,
- elektroforéza na agarozových gelech o pH 8.5
- 10  $\mu$ l hemolyzátu krve, doba analýzy 30 min. (migrace + sušení), barvení amidočerně
- denzitometrické skenování jednotlivých hemoglobinových zón (při 570 nm)
- Normální hodnoty : Hemoglobin A  $\geq$  96.5 %, Hemoglobin F < 2.0 % (\*), Hemoglobin A2  $\leq$  3.5 %



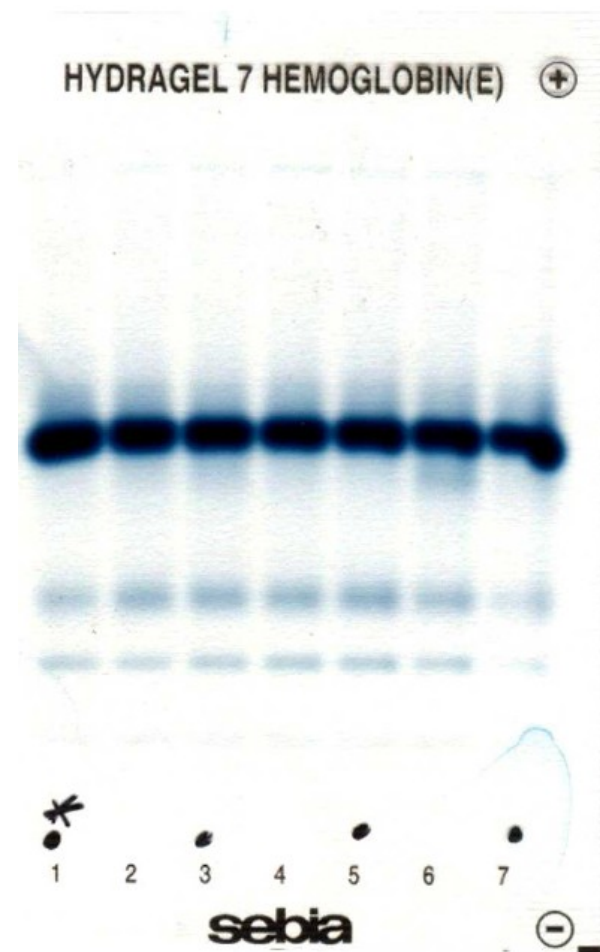
### 3. Migrační typy



$A_0$  : Neglykovaná frakce normálního hemoglobinu A dospělých.

$A_1$  : Glykovaná frakce normálního hemoglobinu A dospělých.

POZN. : U typů dělení – viz výše je katoda dole a anoda nahoře.

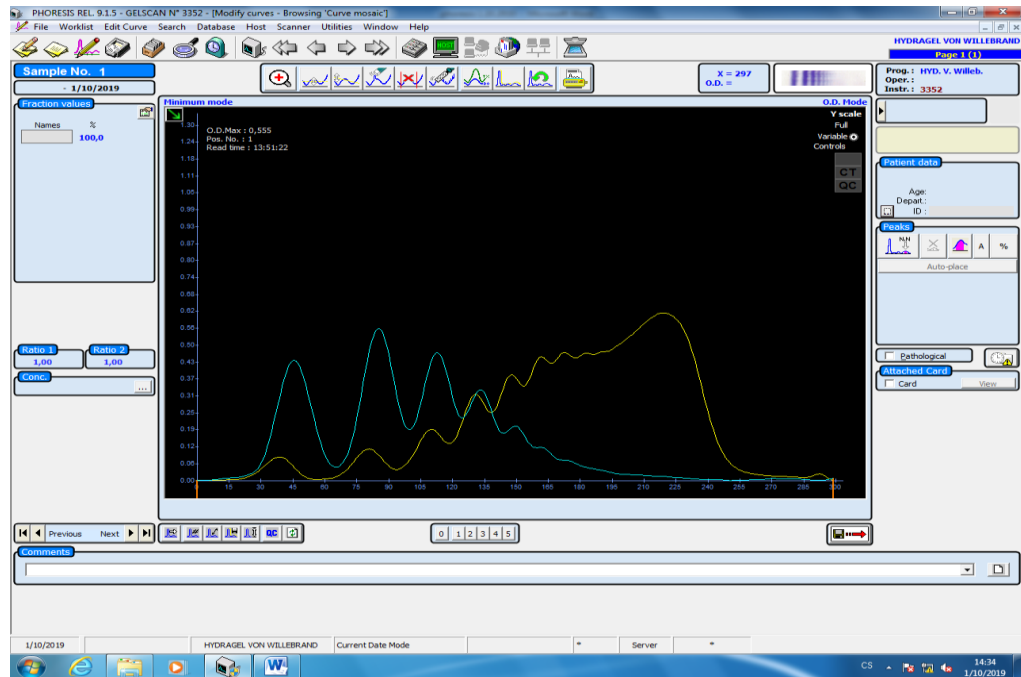
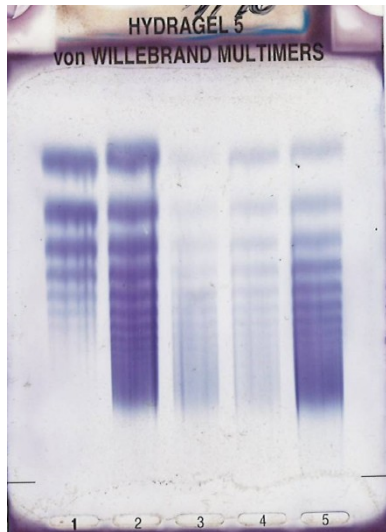


# HYDRAGEL 5/11 von WILLEBRAND MULTIMERS (SEBIA)

- k detekci deficitu multimerů von Willebrandova faktoru (vWF) v lidské plazmě
- Von Willebrandova choroba (vWCH) je krvácivá choroba způsobená vrozeným defektem koncentrace, struktury nebo funkce von Willebrandova faktoru (vWF)
- elektroforetická separace vWF multimerů se provádí po inkubaci vzorků s detergentem, který nese vysoký náboj, po vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin, separace bílkovin v gelu jen podle rozdílné molekulové hmotnosti
- po separaci proteinů probíhá imunofixace s protilátkou proti vWF, dále s protilátkou IgG, která je značena peroxidázou. Vizualizace vWF se provádí přidáním substrátu

# HYDRAGEL 5/11 von WILLEBRAND MULTIMERS

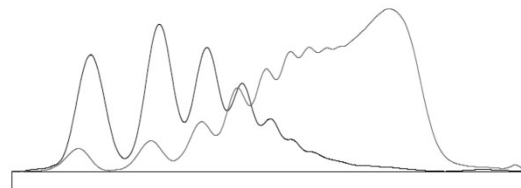
- vzorky plazmy musí být ihned po odběru zamraženy při -70/-80 °C
- Inkubace s detergentem, nanesení na gel, migrace, inkubace s antisérem, imunofixace s IgG, promývání, hydratace gelu vizualizace se sustrátem....celkem 29 kroků - doba analýzy asi 7 hod.
- U normálních vzorků - na gelu jsou jasně viditelné frakce multimerů vWF s LMW, IMW a HMW
- U vzorků s typem 1, 2M a 2N – frakce na gelu mají normální rozložení, u typu 1 je snížena intenzita
- U vzorků s typem 2A - na gelu jsou snižené nebo chybí frakce multimerů vWF s, IMW a HMW
- U vzorků s typem 2B - na gelu jsou snižené nebo chybí frakce multimerů vWF s HMW
- U vzorků s typem 3 - chybí všechny frakce multimerů vWF



Sample num.: 1

Date : 1/10/2019

ID :



**Electrophoresis**

Fractions      %

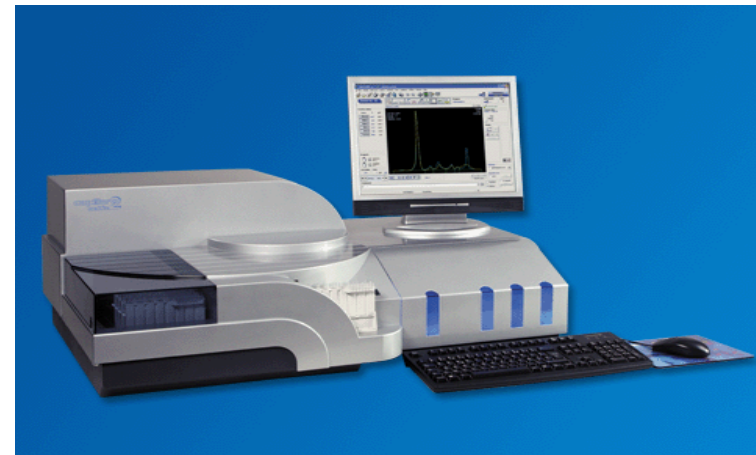
100,0

# Kapilární elektroforéza- *CAPILLARYS* (*SEBIA*)

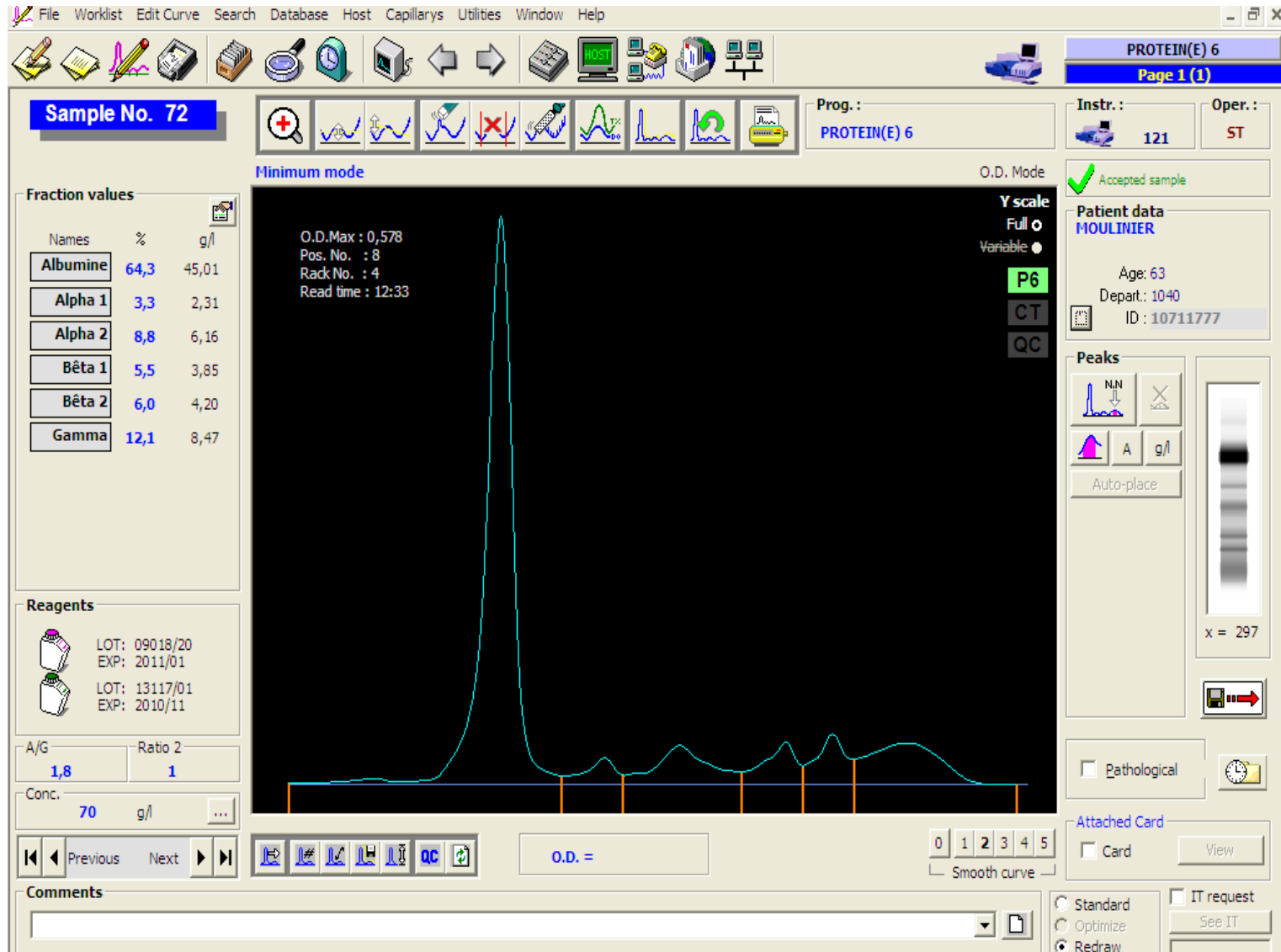
- Plně automatizovaný systém pro kapilární elektroforézu provádí elektroforetickou separaci současně na osmi kapilárách
- je schopen analyzovat 80 vzorků za hodinu
- Životnost kapiláry je 3000 vzorků/1 kapilára, tzn. 24 000 vzorků pro celý systém.
- Pro detekci se používá optický UV – VIS detektor s detekcí vlnové délky v závislosti na stanovovaných parametrech

# Kapilární elektroforéza- *CAPILLARYS (SEBIA)*

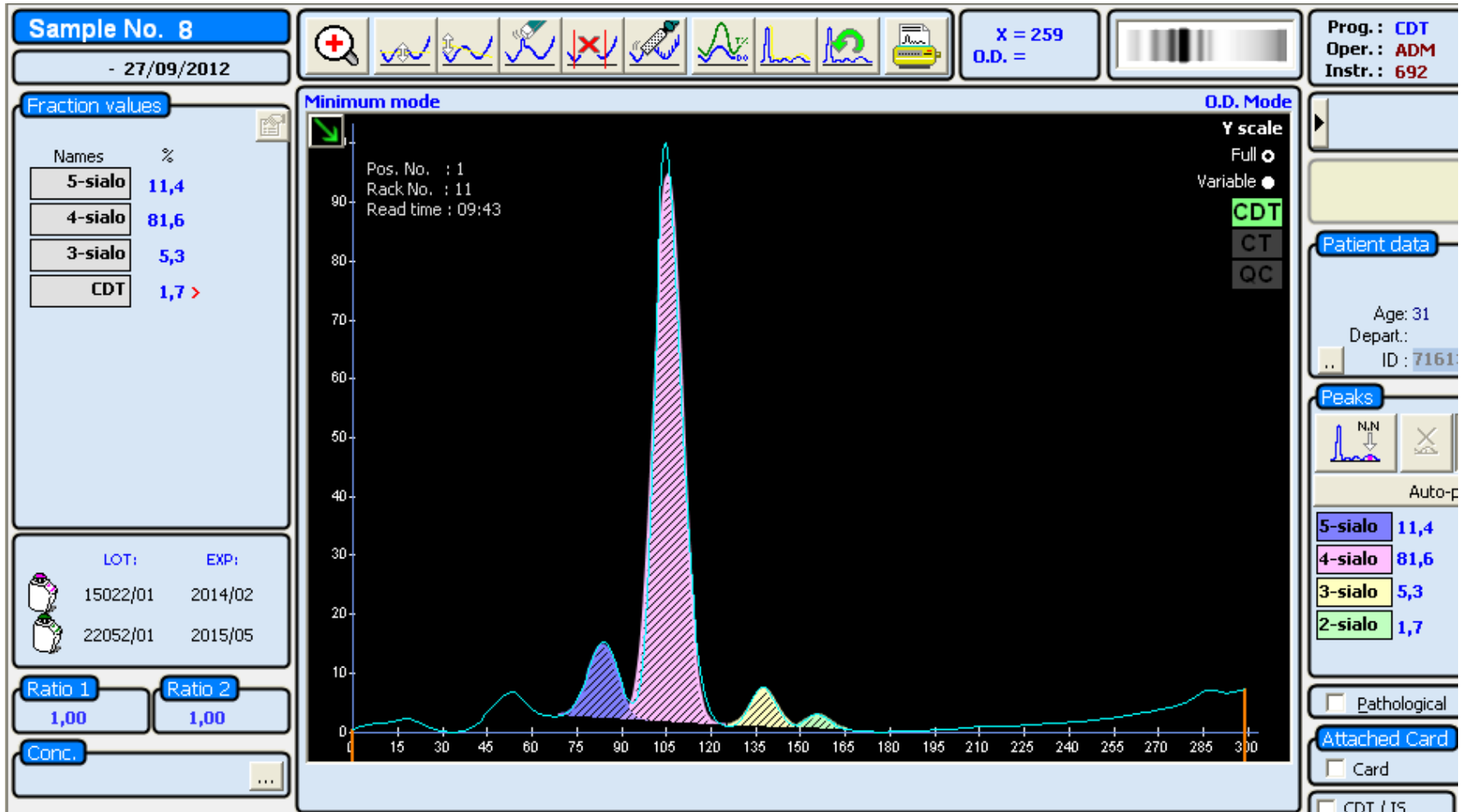
- elektroforéza séra a moče
- imunofixace séra a moče
- glykovaný hemoglobin
- variantní formy hemoglobinu
- karbohydrát deficientní transferin (CDT)



# Elektroforéza séra



# CDT





**Děkuji za pozornost**