

# Bílkoviny

## **CB v séru, plasmě, moči a likvoru:**

- Mezi základní biochemická vyšetření patří stanovení celkové bílkoviny. Hlavní skupiny bílkovin tvoří albumin (asi 50%) a globuliny
- Albumin je tvořen převážně v játrech. Udržuje stabilní onkotický tlak (podílí se na něm ze 75%) a má významné transportní funkce
- Globuliny - patří tam různé typy proteinů, které dělí na alfa, beta a gamaglobuliny. Globuliny jsou syntetizovány také v játrech, nebo jsou tvořeny imunitním systémem

# Celková bílkovina

- *Speciální preanalytické požadavky: nejsou*
- *Referenční rozmezí:*

S/P	64-83 g/l
moč	0-0,15 g/l
likvor	0,15-0,45 g/l
- *TMU (toleranční rozpětí): S 4,0%*

# Celková bílkovina

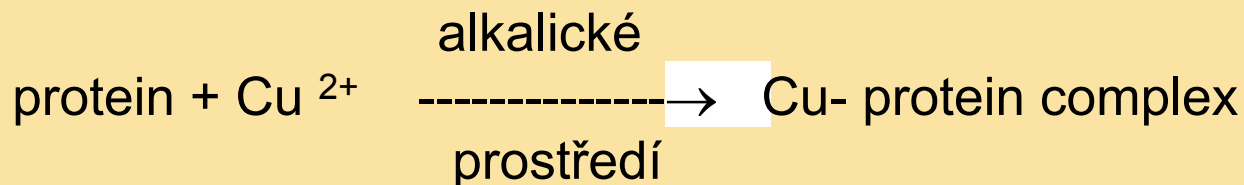
## *Metody stanovení:*

- Referenční metoda: reakce s biuretovým činidlem ( pro CB v séru )
- Certifikovaný referenční materiál: NIST/SRM 927a ( pro CB v séru )
- Doporučené rutinní metody: reakce s biuretovým činidlem ( pro CB v séru )

# Fotometrické metody

## Metoda s biuretovým činidlem :

- Závisí na přítomnosti peptidových vazeb ve všech proteinech
- Doporučená metoda ke stanovení celkové bílkoviny v séru a plasmě
- Peptidové vazby reagují v alkalickém prostředí s roztokem **mědnaté soli** a tvoří fialově zbarvený komplex nedefinovaného složení
- Komplex je vhodný k fotometrickému stanovení při 540 – 550 nm
- Biuretová reagensie dále obsahuje:
  - **tartarát sodno-draselný** ke komplexaci měďnatých iontů a zabránění vysrážení hydroxidu měďnatého
  - **jodid draselný** - antioxidant - zabraňuje autoredukci mědi



# Celková bílkovina v séru a plasmě

## Metoda s biuretovým činidlem– pokračování:

- Barevný chelát vzniká mezi  $\text{Cu}^{2+}$  a látkou kde jsou alespoň dvě  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-$ ,  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-$ ,  $\text{CH}_2-$ ,  $\text{H}_2\text{N}-\text{CS}-$  skupiny spojené přímo nebo přes C nebo N atom
- Měďnatý iont je vázán koordinační vazbou k šesti peptidovým vazbám
- Aminokyseliny a dipeptidy nereagují - malé peptidy dávají růžové zbarvení, ale vzhledem k jejich nízké koncentraci v séru je jejich příspěvek nevýznamný
- Intenzita zbarvení je úměrná počtu peptidových vazeb
- Detekční limit bývá kolem 2 g/l
- Interference: Hemolýza a lipémie vadí až při vysokých koncentracích ( hemoglobin reaguje jako protein)

# Fotometrické metody

## **Metody využívající vazbu proteinu na barvivo:**

- Pyrogallolová červeň, Coomassie blue
- stanovení v moči a likvoru
- přestávají se používat

## **Nevýhody:**

- nedostatečná stabilita činidla
- nerovnoměrná schopnost vazby na barvivo pro různé typy bílkovin
- falešné snížení koncentrace globulinů

# Turbidimetrické metody:

## Stanovení s benzethonium chloridem:

- Koncentrace celkové bílkoviny o dva řády nižší
- Využívají se citlivější metod

## Doporučená metoda

- Celková bílkovina reaguje s **benzethonium chloridem** za vzniku zákalu, který se měří turbidimetricky při 505
- Reakce probíhá v alkalickém prostředí v přítomnosti EDTA, který denaturuje bílkovinu a eliminuje interferenci hořečnatých iontů
- Výhoda metody - podobná reaktivita činidla s albuminem a gama globuliny
  - peptidy s krátkým řetězcem neinterferují

# Turbidimetrické metody:

- Metoda využívající precipitace bílkovin s kyselinou trichloroctovou nebo sulfosalicylovou:
  - vykazuje nestabilitu nebo flokulaci precipitátu a také rozdíly v chování činidla k jednotlivým bílkovinám ve směsi
  - je nezbytně nutné nepoužívat kalibrátor na basi albuminu, ale zahrnující spektrum bílkovin tak, jak se vyskytují v moči



# Další metody

## **Metoda s kyselinou sulfosalicylovou:**

jako doplňující zkumavkový test pro semikvantitativní stanovení bílkoviny při chemické analýze moče pomocí diagnostických proužků, které zachycují pouze albumin a nikoliv lehké řetězce

## **Metody založeny na schopnosti proteinů vázat barvivo – např. Amido čern, kyselou violet'**

Využívají se zejména k barvení po elektroforetickém rozdělení

# Další metody

## Kjeldahlova metoda:

- Historicky nejstarší metoda ke stanovení celkové bílkoviny
- Založena na mineralizaci vzorku s kyselinou sírovou a vydestilování amoniaku do předlohy s kyselinou
- Dojde k přeměně bílkovinného dusíku na amonnou sůl
- Její koncentrace se pak stanoví titrací s hydroxidem sodným
- Výsledek se koriguje o dusík nebílkovinné povahy ( tato hodnota se získá po vysrážení bílkovin s kyselinou trichloroctovou)
- Nedá se automatizovat, tudíž se v laboratořích klinické biochemie nepoužívá
- Má význam při definování referenčních materiálů pro biuretovu metodu

# Albumin

- *Analyzovaný materiál:* sérum, plasma, moč, likvor
- *Speciální preanalytické požadavky:* nejsou
- *Referenční rozmezí:*

S/P	34-48 g/l
moč	0-30 mg/l
likvor	120-300 mg/l
- *TMU:* S 4,2%

# Albumin v séru

- Ve slabě kyselém prostředí se albumin chová jako kation
- Stanovení založeno na reakci s aniontovým barvivem většinou se skupinou –  $\text{SO}_3\text{H}$
- Využívají se barviva, která se specificky vážou na albumin v přítomnosti ostatních sérových bílkovin
- Nutný posun absorpčního maxima komplexu albumin-barvivo proti absorpčnímu maximu samotného barviva

# Stanovení albuminu s bromkresolovou zelení (BCG) v séru a plasmě:

- Žlutozelený roztok bromkresolové zeleně tvoří při pH 4,2 s albuminem zelenomodrý komplex s maximem 630 nm
- Vazba albuminu na barvivo není zcela specifická - barvivo částečně reaguje také s  $\alpha 1$  - a  $\alpha 2$ -globuliny, ale pomaleji než s albuminem
- Nespecifickou vazbu minimalizuje odečítáním absorbance krátce (30s) po smíchání séra s barvivem
- Jedná se o nejčastěji používanou metodu

# Stanovení albuminu s bromkresolovým purpurem (BCP) v séru a plasmě :

- Žlutý roztok bromkresolového purpuru tvoří při pH 5,2 za přítomnosti povrchově aktivních látek s albuminem zelený komplex – maximum 600 nm
- Metoda je vysoce specifická

# Stanovení albuminu v séru a plasmě

- Referenční metoda – neexistuje
- Historicky používaná metoda s methyl oranží - vzhledem k nežádoucím interferencím se nepoužívá

# Albumin v moči

- Podobně jako při stanovení CB se jedná o mnohem nižší koncentrace než v séru

## **Imunoturbidimetrie nebo imunonefelometrie**

- Se specifickou protilátkou proti lidskému albuminu tvoří albumin precipitát imunokomplexu
- Vzniklý zákal se měří imunoturbidimetricky nebo imunonefelometricky

Dříve se ke stanovení albuminu v moči používala metoda ELISA nebo RIA



# Stanovení dalších proteinů

- Další proteiny přítomné v séru v nízkých koncentracích se převážně stanovují **imunoturbidimetry** nebo **imunonefelometry**
- Pro stanovení v séru a moči postačuje imunoturbidimetrie, pro stanovení v likvoru je pro svou citlivost vhodná imunonefelometrie
- **Historicky** - reakce na agarose s obsahem protilátky  
Radiální imunodifuze – po obarvení kroužky  
Elektroimunodifuze (elfo + imunoreakce současně) -  
raketky

# CRP v séru a plasmě

- C-reaktivní protein - **nejčastěji stanovovaný** velmi citlivý **protein akutní fáze**
- Jeho koncentrace se prudce zvedá při zánětu
- Není specifický
- Stanovuje se většinou imunoturbidimetry
- Existují metody pro stanovení supersenzitivního CRP (pro novorozence, kardio) stanovované např. luminiscenční analýzou - v praxi se neprosadily
- Rozšířené jsou metodiky na stanovení širokospektrálního CRP s mezí stanovitelnosti kolem 1 mg/l
- **Imunoturbidimetrické stanovení** zesílené na částicích (**particle-enhanced**) – antigen (CRP) reaguje a protilátkou proti CRP, která je navázaná na latexových mikročásticích. Vzniklý komplex – precipitát se stanoví turbidimetry

# Imunoglobuliny v séru (plasmě) a likvoru

## Imunoglobuliny v séru a likvoru

- dostatečnou citlivost mají pouze imunochemické metody

**Imunoglobuliny G, A a M** v séru či plasmě - stanovují se imunoturbidimetry (imunonefelometry)

v likvoru pouze imunonefelometrie  
(dostatečná citlivost)

- Imunoturbidimetrické i turbidimetrické metody jsou založeny na měření zákalu vytvořeného interakcí měřeného analytu se specifickou protilátkou
- Vznik precipitátu se projevuje vzrůstem zákalu reakční směsi
- U imunoturbidimetrických metod reakce často probíhá v přítomnosti PEG, který zvyšuje rychlost reakce, citlivost a výrazně omezuje možnost rozpouštění precipitátu v přítomnosti nadbytku antigenu
- Hlavní vlnová délka pro měření absorbance - 340 nm

# Imunoglobuliny

- Analýza jednotlivých polyklonálních imunoglobulinů zahrnuje stanovení koncentrace směsi proteinů různé velikosti s podobnou konstantní částí a různou variabilní částí
- Protilátky a referenční kalibrátory jsou postaveny proti normálním lidským sérum složeným ze směsi imunoglobulinových podtříd
- Stanovení jednotlivých polyklonálních imunoglobulinů - spolehlivé

# Imunoglobuliny

- Stanovení monoklonálních imunoglobulinů – problematické
- Monoklonální imunoglobuliny mají pouze některé z determinant, s kterými protilátky v antiséru reagují
- Dochází k rychlé tvorbě precipitátu, pro vysoké koncentrace monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů) jsou výsledky získané zejména po naředění nadhodnoceny
- Pro absolutní koncentraci paraproteinů - elektroforéza a denzitometrie
- Imunochemické metody lze využít ke sledování změny koncentrace téhož paraproteinu

# Imunoglobuliny D a E

## Imunoglobuliny D a E v séru

- Vyžadují ke stanovení ještě citlivější analytické metody
- Obvykle se využívají imunoanalyzátory na principu chemiluminiscence

# Další proteiny:

- **Prealbumin a transferin** - velmi časté stanovení - v séru (imunoturbidimetricky) a likvoru (imunonefelometricky)
- **Orosomukoid, Haptoglobin** v séru (imunoturbidimetricky) a likvoru (imunonefelometricky)
- **Alfa 1 – antitrypsin, Proteiny komplementu C3 , C4** v séru (imunoturbidimetricky)
- **Alfa 2 – makroglobulin** v séru a moči, **Alfa 1 – mikroglobulin** v moči (imunoturbidimetricky)
- **Ceruloplasmin** – imunonefelometricky v séru – zejména pro monitorování Wilsonovy choroby nutná velmi citlivá metoda

# Volné lehké řetězce $\kappa$ a $\lambda$

- **Imunoglobulinové molekuly :**
  - dva těžké řetězce (  $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma$  nebo  $\mu$ , které určují imunoglobulinovou třídu)
  - dva identické lehké řetězce
  - každý lehký řetězec je kovalentně navázán na těžký řetězec
  - těžké řetězce jsou kovalentně spojeny v stěžejní část
- U zdravých jedinců je koncentrace volných lehkých řetězců minimální
- Volné lehké řetězce kappu existují v séru převážně jako monomery a řetězce lambda jako dimery
- Proto různý poměr u glomerulární filtrace
- V séru je poměr volných kappu ku lambda 0,625 zatímco poměr vázaných volných lehkých řetězců je 2
- Ke stanovení se používá imunonefelometrická případně imunoturbidimetrická metoda



# Nízkomolekulární proteiny či polypeptidy

**Procalcitonin** – polypeptid, prekurzor hormonu kalcitoninu

- Tvorba je stimulována bakteriální a mykotickou infekcí (bakteriální meningitidy, sepse)
- Vysoká specificita, ale ne 100% (např. tumory)
- Stanovení v na principu luminometrie (Brahms)  
chemiluminiscence (Roche)

**Cystatin C** – polypeptid, jeho koncentrace stoupá úměrně poklesu glomerulární filtrace

- imunonefelometricky v séru se specifickou protilátkou chemicky vázanou na polystyrénových částicích (Particle-Enhanced Nephelometry)

**Beta2 – mikroglobulin** v séru - luminiscence

# Referenční hodnoty (dospělí)

- C3 0,9 - 1,8 g/l
- C4 0,1 - 0,4 g/l
- CRP 0,0 – 5,0 mg/l
- alfa - antitrypsin 0,9 - 2,0 g/l
- orosomukoid 0,25 - 4,0 g/l
- prealbumin 0,2 - 0,4 g/l
- transferin 2,0 - 3,6 g/l
- haptoglobin 0,3 - 2,0 g/l

# Referenční hodnoty (dospělí)

- IgA 0,7 – 4,0 g/l
- IgG 7,0 – 16,0 g/l
- IgM 0,4 – 2,3 g/l
- ceruloplasmin 0,22 - 0,4 g/l M  
0,25 - 0,6 g/l Ž
- prokalcitonin 0,0 – 0,5 ug/l

# Kalprotektin

- Leukocytární cytosolový protein – stanovení ELISA nebo POCT
- Uvolňuje se z leukocytů po jejich aktivaci nebo lýze
- Tvoří jej především [monocyty](#) a [neutrofilly](#)
- Kalprotektin je rezistentní vůči enzymatické degradaci, proto je možné stanovování jeho koncentrace v sekretu
- Vhodný ukazatel při diagnostice i monitorování akutních i chronických střevních zánětlivých onemocnění – [ulcerózní kolitidy](#), [Crohnovy choroby](#) a [nekrotizující enterokolitidy](#) u dětí
- Obsah kalprotektinu ve stolici koreluje s množstvím leukocytů vyloučených do střevního lumen.
- Stanovení koncentrace ve vzorku stolice - cut-off hodnota 30 mg/l
- Pro diferenciální diagnostiku mezi akutní Crohnovou chorobou a syndromem dráždivého tračníku
- Kalprotektin ve stolici je rovněž testován jako marker [kolorektálního karcinomu](#)

# Další bílkoviny

- Není zde pojednáno o dalších parametrech, které sem patří složením
- Vzhledem k diagnostickému významu jsou zařazeny jinde ( např. ferritin, volný hemoglobin, glykovaný hemoglobin, fruktosamin, C – peptid)