

ELISA

Mgr. Jana Gottwaldová

OSNOVA

- používáné protilátky, antigeny
- enzymové konjugáty, enzymy používané ke značení
- ELISA techniky podle typu reakce antigen –protilátka:
 - Kompetitivní heterogenní imunoanalýza
 - Nekompetitivní heterogenní imunoanalýza (sendvičová)
- Využití ELISA metod
- Technická instrumentace :vertikální fotometry, automatizované linky
- Příklad praktického využití ELISA metod při monitorování biologických léčiv

ELISA= Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

- imunochemická analytická metoda určená ke kvantitativnímu stanovení analytu v neznámém vzorku.
- má **vysokou citlivost a specificitu.**
- v typické imunochemické reakci je **stanovován antigen jako analyt a protilátka je použita jako reagensie.**
- ELISA patří do skupiny metod **EIA** (enzyme immunoassay), které používají **enzym** ke značení protilátky (nebo antigenu).
- enzym po přidání substrátu do reakční směsi katalyzuje reakci, na jejímž konci je **barevný produkt vhodný k fotometrické detekci.**
- **heterogenní imunochemické stanovení** - vyžadují separaci volné a vázané frakce

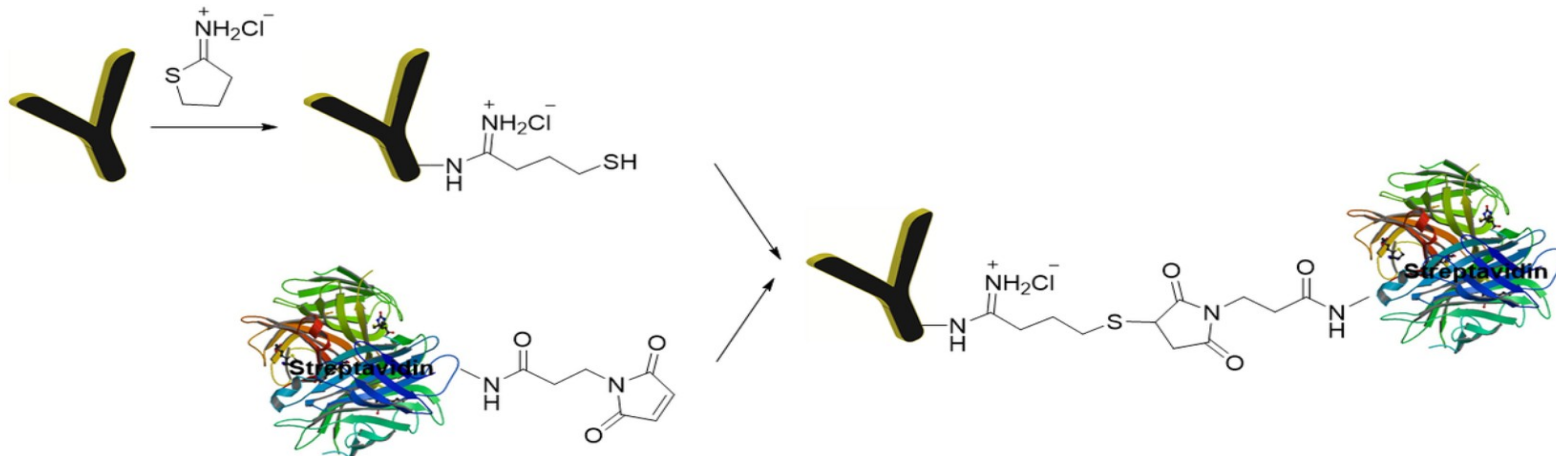
ELISA techniky

Pro správné provedení ELISA techniky:

- antigen nebo protilátka musí být navázán na povrch nosiče bez ztráty imunoreaktivity.
- stabilita enzymů a také imunologická reaktivita konjugátu (komplex $AbAg^*$) musí být během reakce stabilní.
- aktivita enzymů, které jsou použity při značkování, se nemůže přirozeně vyskytovat v analyzovaných biologických tekutinách.
- použité enzymy musí mít vysokou specifickou aktivitu, tj. přeměňují velká množství substrátu na detekovaný produkt.

ELISA techniky - enzymové konjugáty

- Enzymové konjugáty jsou buď **antigeny** nebo **protilátky** kovalentně navázané na vybraný enzym.
- Při přípravě konjugátu lze postupovat tak, že protilátky jsou **nekovalentně značkovány biotinem** a pak se využívá jeho silné vazebné afinity k **streptavidinu, který je vázán na enzym**.



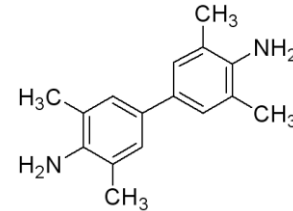
Enzymy používané ke značení

- musí být stabilní,
- struktura enzymu musí umožnit vytvoření kovalentní vazby s protilátkou či antigenem,
- nesmí dojít k výraznému ovlivnění katalytické aktivity enzymu.
- měl by mít co nejnižší molekulovou hmotnost,
- by měl mít co nejvyšší katalytickou aktivitu
- měl by být dostupný v potřebné čistotě

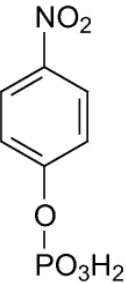
Produkt enzymové reakce musí být snadno detekovatelný i ve velmi nízkých koncentracích.

Enzymy používané ke značení

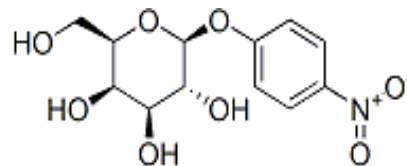
- **Křenová peroxidáza** (HRP – peroxidáse, EC 1.11.1.7)
Substrát: 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin (*TMB*), detekce produktu při 450 nm



- **Alkalická fosfatáza** (EC 3.1.3.1)
Substrát: p-nitrofenylfosfát, detekce produktu při 405 nm



- **β – D - galaktosidáza** (EC 3.2.1.23)
Substrát: o-nitrofenyl – β – D –galaktopyranosid, detekce produktu při 420 nm

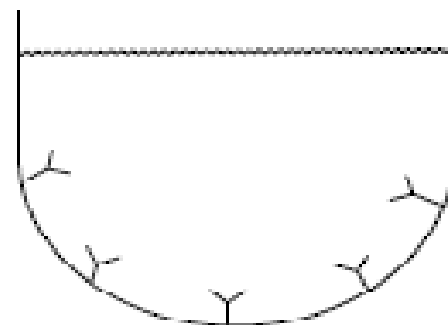
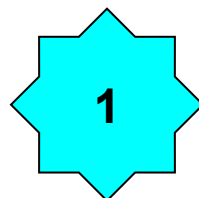


ELISA techniky podle typu reakce antigen –protilátka

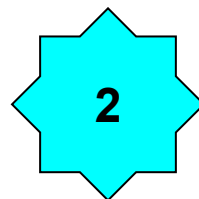
- *Kompetitivní heterogenní imunoanalýza*
- *Nekompetitivní heterogenní imunoanalýza (sendvičová)*

ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

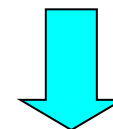
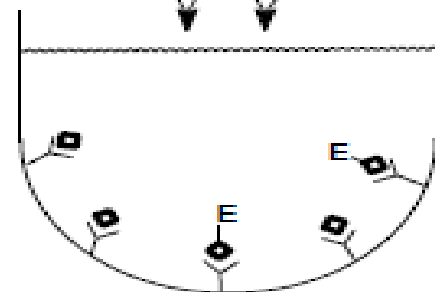
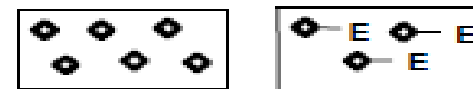
1. **protilátka** je pevně vázána na stěnu jamky mikrotitrační destičky



2. přidání stanovovaného vzorku a značeného antigenu



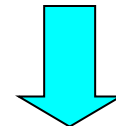
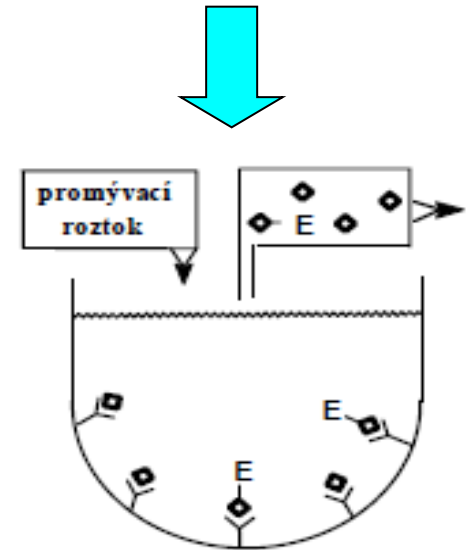
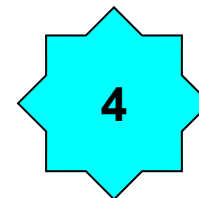
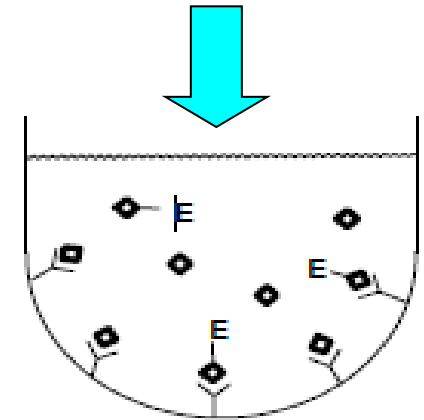
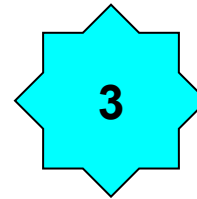
neznačený antigen značený antigen



ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

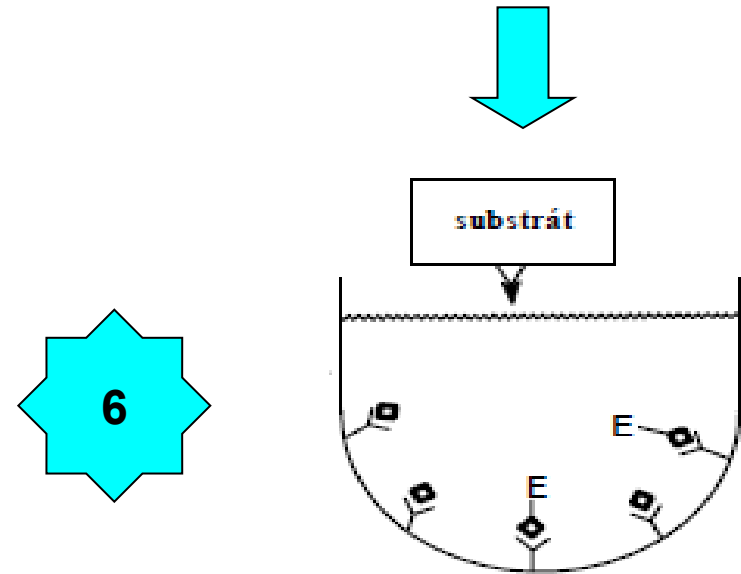
3. inkubace: kdy o vazebné místo na protilátce soutěží značený antigen a nezačený antigen (analyt) ze vzorku

4. promývání: přebytek nenavázaného antigenu (značeného i nezačeného – tzv. volná frakce), který nezreagoval, se vymyje pomocí promývacího roztoku

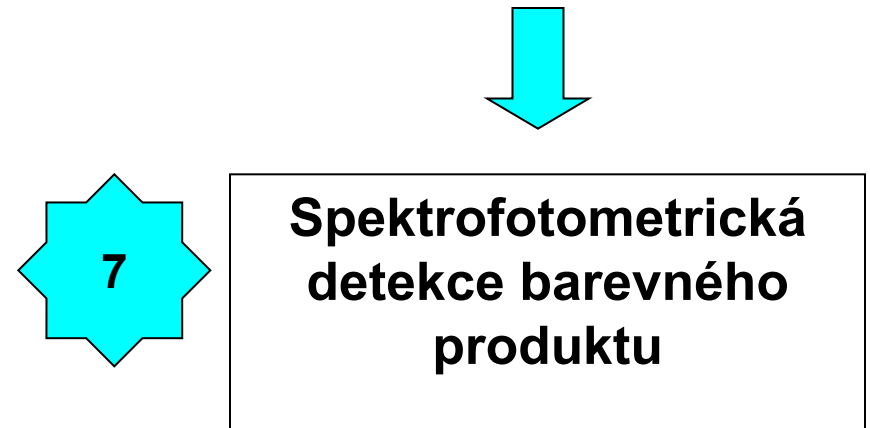


ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

6. přidání substrátu



7. **Měření** intenzity barevného zbarvení vytvořeného barevného produktu

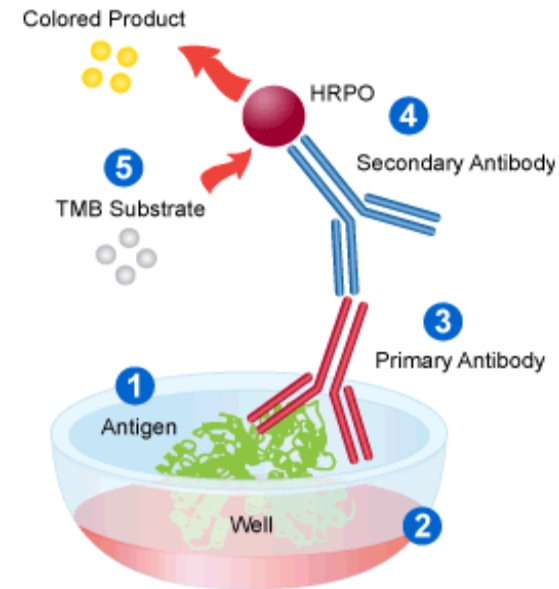


ELISA - *Kompetitivní heterogenní reakce*

Platí zde nepřímá úměra: čím vyšší koncentrace analytu (neznačeného antigenu), tím nižší intenzita zbarvení (tím méně navázaného značeného antigenu).

Kompetitivní ELISA metodu lze použít **i ke stanovení protilátek:**

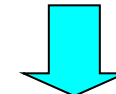
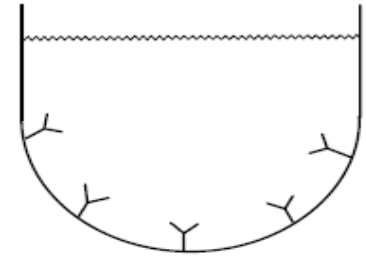
- na povrchu jamky mikrotitrační destičky je ukotven antigen a v tomto případě soutěží neznačené protilátky z analyzovaného vzorku se značenými protilátkami (z reagensie, o známé koncentraci) o vazbu na antigen, opět zde platí nepřímá úměra



ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

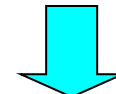
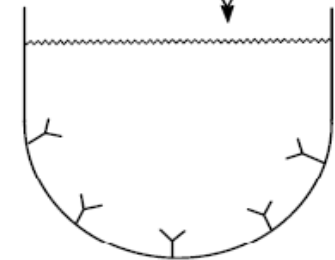
1. první protilátka je
navázána v nadbytku na
stěně jamky mikrotitrační
destičky

1



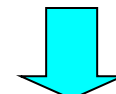
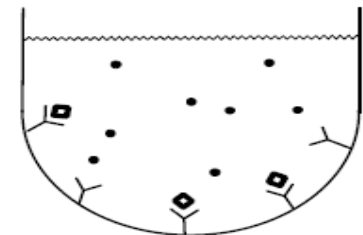
2. přidání vzorku (antigenu)

2



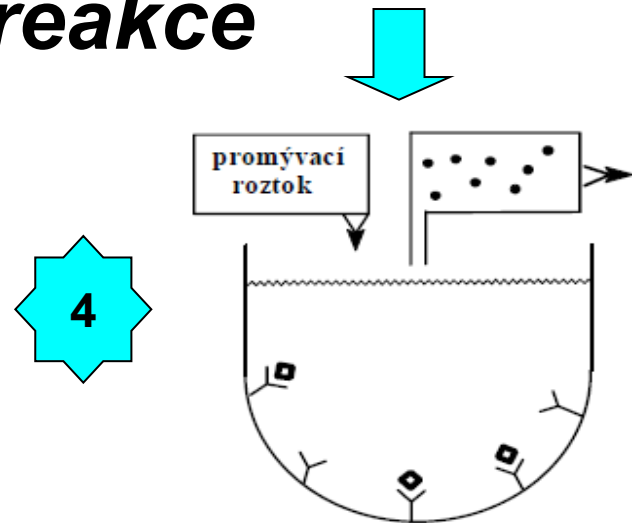
3. první inkubace: vytvoření
imunokomplexu (antigen –
1. protilátka)

3

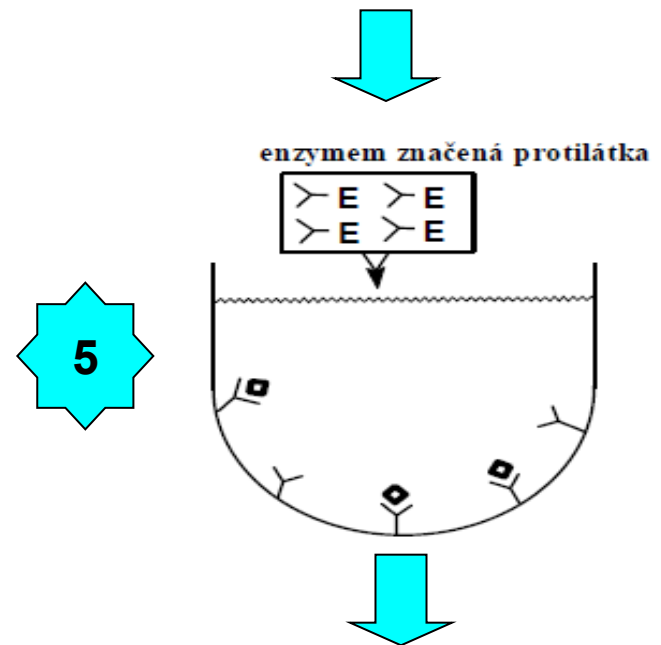


ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

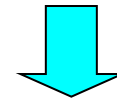
4. promývání: z reakční směsi
promytím odstraní
nenavázaná frakce



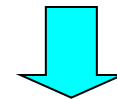
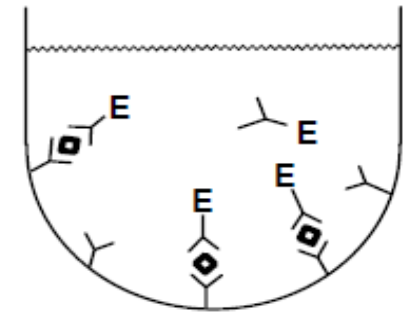
5. přidá se druhá protilátka:
značená enzymem (tzv.
konjugát), která je namířena
proti druhé antigenní
determinantě na stejném
antigenu



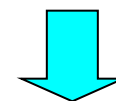
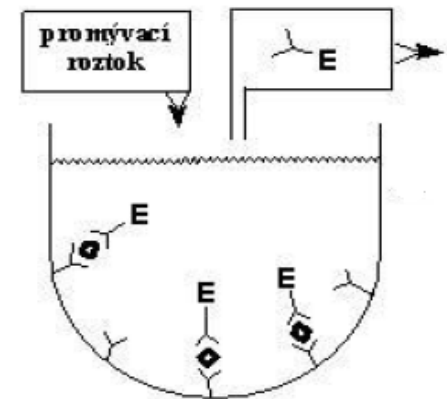
ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce



6. druhá inkubace: je vytvořen „sendvičový“ komplex



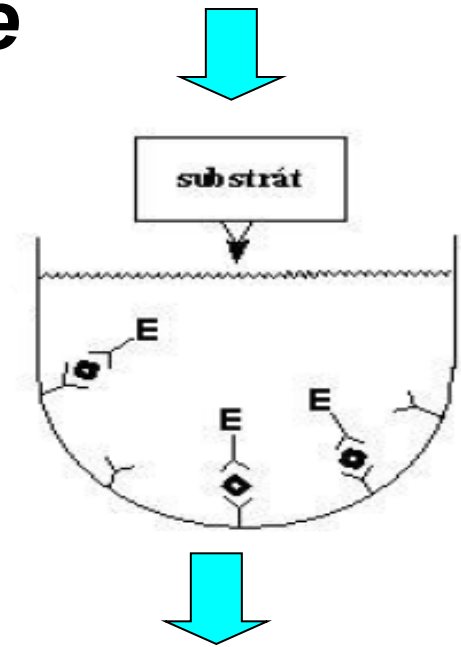
7. druhé promytí: dojde k separaci nadbytečného nenavázaného konjugátu



ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

8. přidání substrátu

8



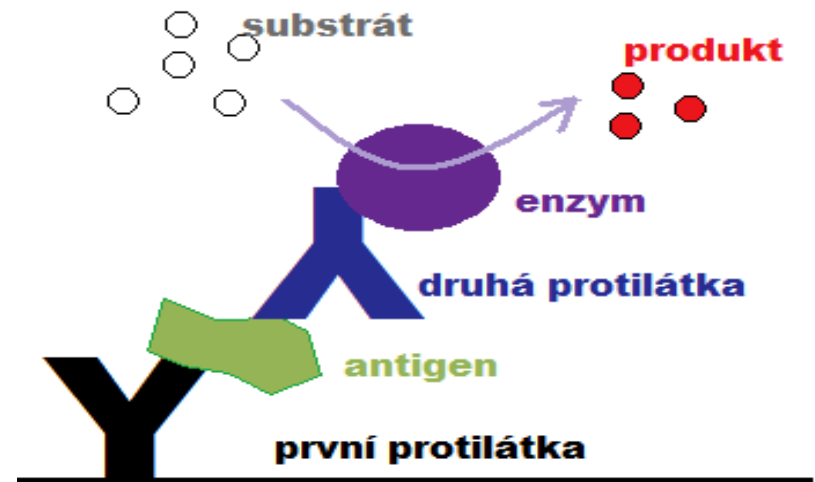
9. měření: změření intenzity zbarvení vytvořeného barevného produktu

9

Spektrofotometrická detekce barevného produktu

ELISA - Nekompetitivní (sendvičová) heterogenní reakce

- nejvíce používaná ELISA metoda
- **platí zde přímá úměra: čím vyšší koncentrace analytu, tím vyšší intenzita zbarvení.**



Využití ELISA metod

ELISA metody lze použít pro stanovení nízkomolekulárních látek, jako jsou :

- proteiny,
- karbohydráty,
- nukleové kyseliny,
- lipidy aj.

Stanovení se provádí různých typech biologického materiálu..

Využití ELISA metod

Nejčastěji jsou analyzovány vzorky:

- séra, plazmy,
- moče,
- mozkomíšního moku,
- tkáně nebo lyzáty buněk.

ELISA metody mají široké uplatnění ve zdravotnických laboratořích hlavně v imunologii a mikrobiologii (méně v biochemii nebo hematologii), kde se používají pro stanovení např. infekčních agens nebo protilátek.

Využití ELISA metod

Výhody:

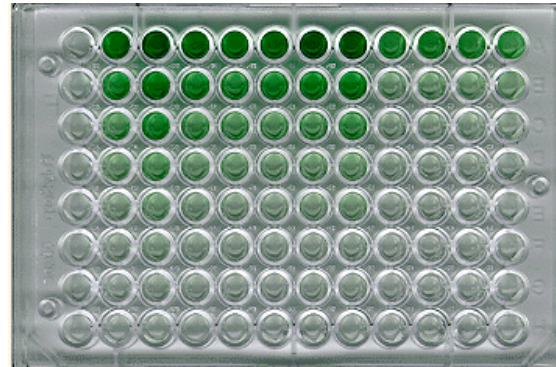
- jsou citlivé a specifické
- mají nízké pořizovací náklady na technickou instrumentaci.

Nevýhody:

- analýza vzorků pouze v sériích,
- časová náročnost (doba jedné inkubace je více než 30 min., obvykle 1-2 hod.)
- manuální pipetování
- vzorky nelze ředit během analyzované série

ELISA - Technická instrumentace

Provádí se ve speciálních nádobkách uspořádaných do tzv. **mikrotitračních destiček**.



Každá destička obsahuje 96 jamek uspořádaných ve 12 řadách po 8 jamkách.

ELISA - Technická instrumentace

Mikrotitrační destičky vyžadují **při promývání:**

- použití speciálních osmikanálových pipet
- automatických ELISA promývaček.

Pokud to metoda vyžaduje, lze **během inkubace** mikrotitrační destičku umístit **do třepačky s možností nastavení intenzity třepání a inkubační teploty.**

Pro měření výsledného produktu detekční reakce se používají speciální vertikální spektrofotometry - ELISA readry mikrotitračních destiček.

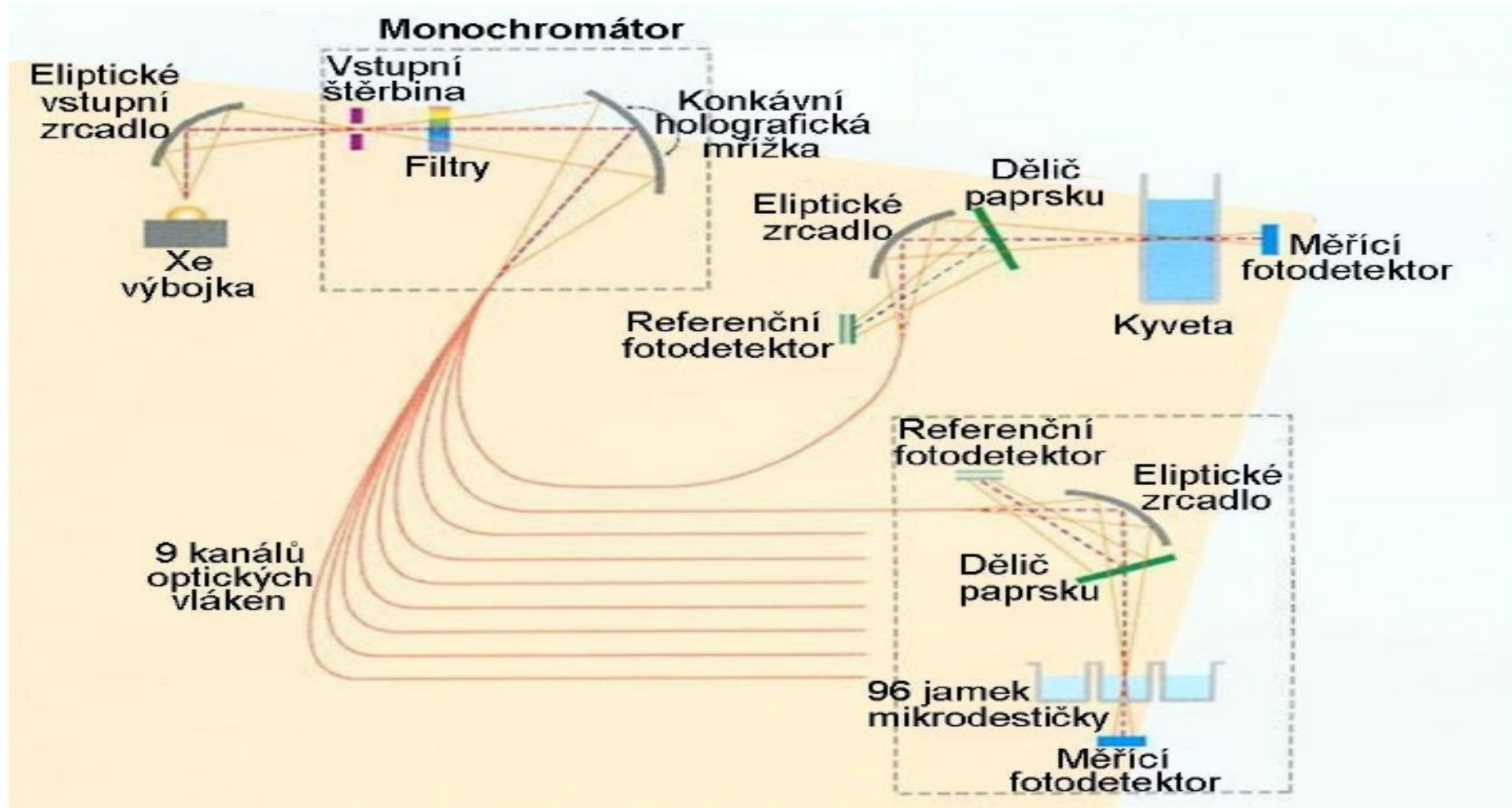
ELISA - Technická instrumentace

Pro měření výsledného produktu detekční reakce se používají **speciální vertikální spektrofotometry - ELISA readry mikrotitračních destiček**: je uspořádán tak, že světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru.

ELISA reader (vertikální spektrofotometr)

- Princip:** světelný paprsek ze zdroje prochází přes zvolený interferenční filtr (podle požadované vlnové délky) do optických kabelů,
- které zabezpečují distribuci do 9 oddělených kanálů: 8 z nich vedou přes jamky mikrotitrační destičky a dopadají na pole fotodiod, které detekují intenzitu světla.
 - Devátý optický kabel je použit na kontrolu intenzity záření vycházejícího ze zdroje (obrázek č.8).
 - Ve zlomku vteřiny se změří celá řada jamek (8), mikrotitrační destička se posune a může se měřit řada následující.

ELISA reader (vertikální spektrofotometr)



ELISA reader (vertikální spektrofotometr)

Součásti vertikálního fotometru:

- **zdroj záření:** nejčastěji používá halogenová žárovka nebo xenonová výbojka.
- **Interferenční filtry:** jsou umístěny v posuvném držáku filtrů, obvykle se používá 6 filtrů (pro λ 400-800 nm).
- **Optický systém:** se skládá z 9 optických kabelů (světlovodiče), štěrbin a zrcadel pro vedení světelného paprsku ze zdroje do optického prostředí (jamka mikrotitrační destičky).
- **Detektor:** používají se fotodiody.

Rychlost měření je 5s (celá mikrotitrační destička - 96 jamek).

Vertikální fotometrie

- Vztah mezi změřeným signálem (absorpcí) a koncentrací se určuje **kalibrací**. Obvykle se změří absorbance **6-ti standardních roztoků** o známé vzrůstající koncentraci a blank (slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky) při určité vlnové délce.

Vertikální fotometrie

- Při ELISA metodě se vyžaduje měření všech vzorků v duplikátech.
- Poté software přístroje sestrojí kalibrační křivku (naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y, hodnoty koncentrace na ose x), ze které odečte hodnoty koncentrací neznámých vzorků
- Při vertikální fotometrii závisí dosažené výsledky měření pouze na přesnosti pipetování kalibrátorů, kontrolních materiálů a vzorků.

ELISA automatická linka

- Automatická linka provádí:
- automatické pipetování vzorků, reagensů, kalibrátorů a kontrol pomocí pipetovacího systému (2, 4, 8 jehel).
- Má zabudovanou čtečku čárového kódu, což umožňuje pozitivní identifikaci patientských vzorků.
- Linka má obvykle 3-4 místa pro umístění mikrotitračních destiček.
- Dále sestává z inkubátoru (místo pro inkubaci vzorků),
- promývačky a readeru mikrotitračních destiček.
- Transport destiček mezi jednotlivými částmi provádí pomocí robotického ramene. S
- systém provádí automatické ředění vzorků a je opatřen softwarem pro automatické vyhodnocení měření.

ELISA automatická linka

- Velkou výhodou automatické linky je použití čárových kódů, a tím zabránění záměny mezi vzorky. Dále je to přesnost pipetování vzorků a reagensů, vysoká kapacita přístroje.
- Nevýhodou je vyšší spotřeba používaných reagensů.

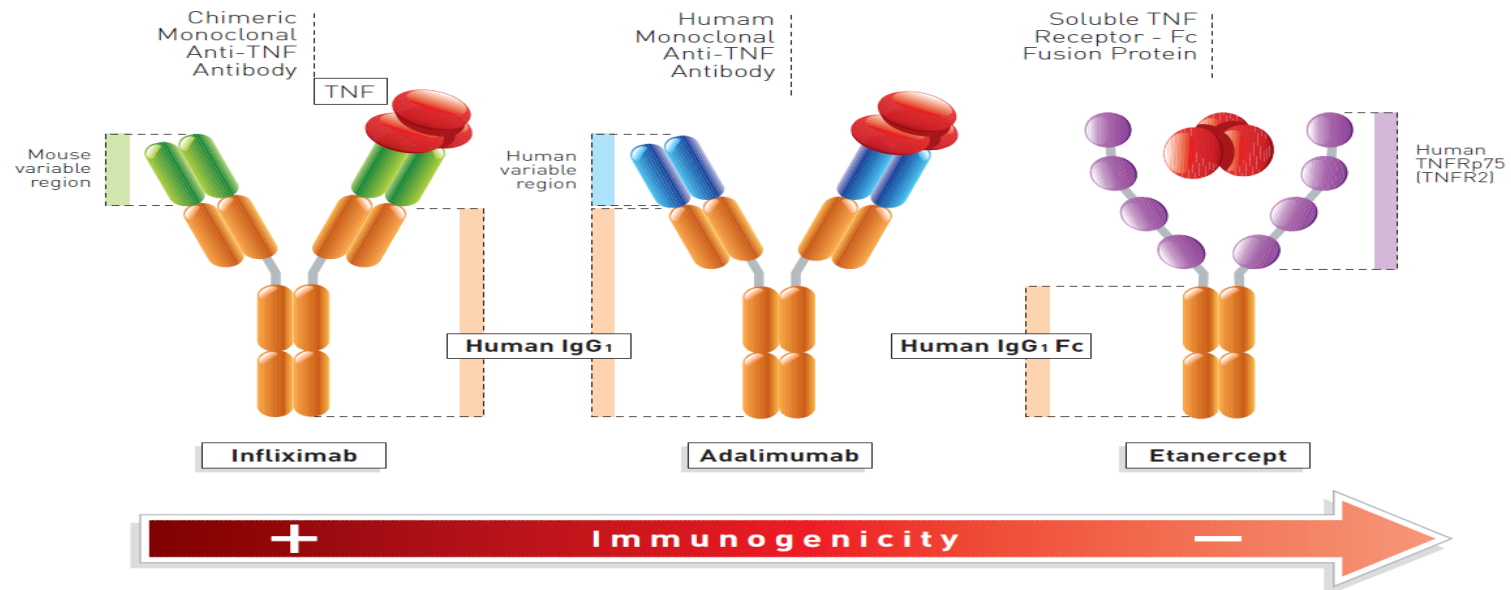
Praktické využití ELISA metod:

laboratorní monitorování hladin léků a
protilátek ELISA technikou



Biologická léčba – inhibitory $\text{TNF}\alpha$

- Infliximab (Remicade)
- Adalimumab (Humira)
- Etanercept (Enbrel)



Laboratorní monitorování biologické léčby

- Stanovení hladin léků
- Stanovení hladin protilátek proti lékům

**U léčených pacientů dochází k vytvoření
protilátek proti lékům:**

- u léku remicade asi 40%
- u léku Humira asi 18%
- u léku enbrel asi 5%.

Promonitor ELISA kits (Proteomika, Spain)

- 6 diagnostických souprav určených ke kvantitativnímu stanovení hladin léků a protilátek v séru pacienta
- *Nekompetitivní imunoanalýza (sendvičová)*, analyt je vázán mezi dvě vysoce specifické protilátky
- Doba stanovení: asi 3,5 hodiny (2,5 hod. inkubace)
- Vysoká specifita 100 % a senzitivita > 90%
- Určeno pro max 40 stanovení (2 ředění)

Preamalytické požadavky

Vzorky: sérum (pro plazmu není diag. souprava validována)

Minimální množství: 300 μ l séra

Odběr: zkumavky bez aditiv, nebo zkumavky s gelem

Stabilita po centrifugaci: 48 hod. při 2-8 °C, pro delší skladování -20 °C (nesmí se opakovaně rozmrazit)

Transport: do 48 hod. při 2-8 °C, > 48 hod. při-20 °C

Analytické znaky stanovení

Detekční limit:

- Remicade: 1 ng/ml, anti –remicade: 2 AU/ml
- Humira: 1,25 ng/ml, anti-humira: 3,13 AU/ml
- Enbrel: 3,1 ng/ml, anti-enbrel: 60 AU/ml

Měřicí rozsah:

- Remicade: 2-72 ng/ml, anti –remicade: 2-144 AU/ml
- Humira: 1,25-60 ng/ml, anti-humira: 3,13-200 AU/ml
- Enbrel: 3,1-200 ng/ml, anti-enbrel: 60-450 AU/ml

Počty stanovení pro 1 diag. soupravu

- 1 série vzorků = max 40 pacientů
- 2 série vzorků = max 36 pacientů
- 3 série vzorků = max 24 pacientů
- 4 série vzorků = max 16 pacientů



Každý vzorek je analyzován při 2 různých ředěních.

Každá série zahrnuje analýzu standardních a kontrolních vzorků v duplikátu.

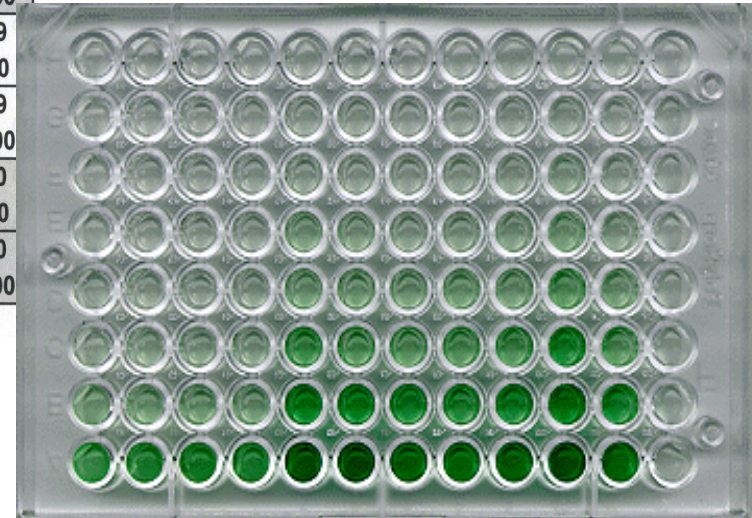
Stabilita soupravy po otevření je 6 měsíců

Mikrotitrační destička - 1 série vzorků

Assay plate if 40 samples are analyzed in a single run

oldizell ai 14 ? /dlw basyiena nd nso jartf atmetiq to rodmun

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL-A	CAL-A	S1 1:10	S5 1:10	S9 1:10	S13 1:10	S17 1:10	S21 1:10	S25 1:10	S29 1:10	S33 1:10	S37 1:10
B	CAL-B	CAL-B	S1 1:200	S5 1:200	S9 1:200	S13 1:200	S17 1:200	S21 1:200	S25 1:200	S29 1:200	S33 1:200	S37 1:200
C	CAL-C	CAL-C	S2 1:10	S6 1:10	S10 1:10	S14 1:10	S18 1:10	S22 1:10	S26 1:10	S30 1:10	S34 1:10	S38 1:10
D	CAL-D	CAL-D	S2 1:200	S6 1:200	S10 1:200	S14 1:200	S18 1:200	S22 1:200	S26 1:200	S30 1:200	S34 1:200	S38 1:200
E	CAL-E	CAL-E	S3 1:10	S7 1:10	S11 1:10	S15 1:10	S19 1:10	S23 1:10	S27 1:10	S31 1:10	S35 1:10	S39 1:10
F	CAL-F	CAL-F	S3 1:200	S7 1:200	S11 1:200	S15 1:200	S19 1:200	S23 1:200	S27 1:200	S31 1:200	S35 1:200	S39 1:200
G	PC	PC	S4 1:10	S8 1:10	S12 1:10	S16 1:10	S20 1:10	S24 1:10	S28 1:10	S32 1:10	S36 1:10	S40 1:10
H	NC	NC	S4 1:200	S8 1:200	S12 1:200	S16 1:200	S20 1:200	S24 1:200	S28 1:200	S32 1:200	S36 1:200	S40 1:200



http://www.myassays.com



Find your assay/data analysis here... Search

Home List Tools Account Profile Su



Welcome to MyAssays,

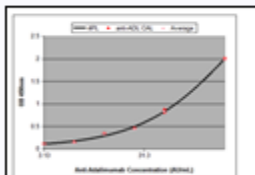
This is your personal MyAssays home page; from here you can access your bookmarked assays, uploaded raw data and generated reports. To get started use the search tool above to find your assay or follow our [getting started guide](#).

The MyAssays Team

Your Recent Analyses

Promonitor®-anti-ADL

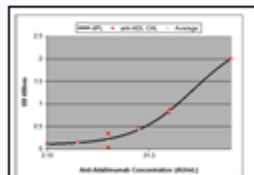
Wednesday, October 16, 2013, 12:06 PM



Calibration Curve	Concentration (pg/mL)	Time (Days)	Mean	Stdev	SNR	Quality
+	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00
+	0.05	1	0.05	0.01	0.05	0.05
+	0.10	2	0.10	0.01	0.10	0.10
+	0.15	3	0.15	0.01	0.15	0.15
+	0.20	4	0.20	0.01	0.20	0.20
+	0.25	5	0.25	0.01	0.25	0.25
+	0.30	6	0.30	0.01	0.30	0.30
+	0.35	7	0.35	0.01	0.35	0.35
+	0.40	8	0.40	0.01	0.40	0.40
+	0.45	9	0.45	0.01	0.45	0.45
+	0.50	10	0.50	0.01	0.50	0.50

Promonitor®-anti-ADL

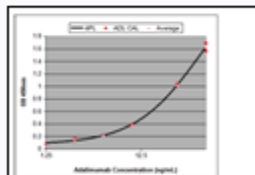
Wednesday, October 16, 2013, 12:06 PM



Calibration Curve	Concentration (pg/mL)	Time (Days)	Mean	Stdev	SNR	Quality
+	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00
+	0.05	1	0.05	0.01	0.05	0.05
+	0.10	2	0.10	0.01	0.10	0.10
+	0.15	3	0.15	0.01	0.15	0.15
+	0.20	4	0.20	0.01	0.20	0.20
+	0.25	5	0.25	0.01	0.25	0.25
+	0.30	6	0.30	0.01	0.30	0.30
+	0.35	7	0.35	0.01	0.35	0.35
+	0.40	8	0.40	0.01	0.40	0.40
+	0.45	9	0.45	0.01	0.45	0.45
+	0.50	10	0.50	0.01	0.50	0.50

Promonitor®-ADL Ref.

Wednesday, October 16, 2013, 12:02 PM



Calibration Curve	Concentration (pg/mL)	Time (Days)	Mean	Stdev	SNR	Quality
+	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00
+	0.05	1	0.05	0.01	0.05	0.05
+	0.10	2	0.10	0.01	0.10	0.10
+	0.15	3	0.15	0.01	0.15	0.15
+	0.20	4	0.20	0.01	0.20	0.20
+	0.25	5	0.25	0.01	0.25	0.25
+	0.30	6	0.30	0.01	0.30	0.30
+	0.35	7	0.35	0.01	0.35	0.35
+	0.40	8	0.40	0.01	0.40	0.40
+	0.45	9	0.45	0.01	0.45	0.45
+	0.50	10	0.50	0.01	0.50	0.50

Your Assays

[Promonitor®-ADL Ref. 5080230000](#)

[Promonitor®-anti-ADL Ref. 5090230000](#)

[Promonitor®-anti-ETN Ref. 5120230000](#)


[Promonitor®-anti-IFX Ref. 5070230000](#)

[Promonitor®-IFX Ref. 5060230000](#)

http://www.myassays.com

1

Measurements

Supply your measurement data: 

Raw File

2.557	2.552	0.183	0.269	0.202	0.226	3.978	0.369	3.704	2.133	0.000	0.000
1.552	1.550	0.162	0.146	0.142	0.140	1.197	0.144	0.698	0.270	0.000	0.000
0.637	0.650	0.371	3.165	0.401	4.077	3.999	2.804	2.849	0.162	0.000	0.000
0.395	0.360	0.129	0.377	0.139	2.247	1.473	0.318	0.341	0.129	0.000	0.000
0.245	0.234	0.143	0.152	0.162	2.311	1.059	1.720	0.644	0.000	0.000	0.000
0.184	0.221	0.193	0.132	0.134	0.257	0.184	0.227	0.156	0.000	0.000	0.000
0.319	0.328	3.939	1.404	2.540	0.190	3.982	0.179	3.964	0.000	0.000	0.000
0.127	0.119	0.881	0.202	0.304	0.125	1.709	0.128	1.291	0.000	0.000	0.000

 Paste  Flag Positions

2

Microplate



3

Standard Concentrations



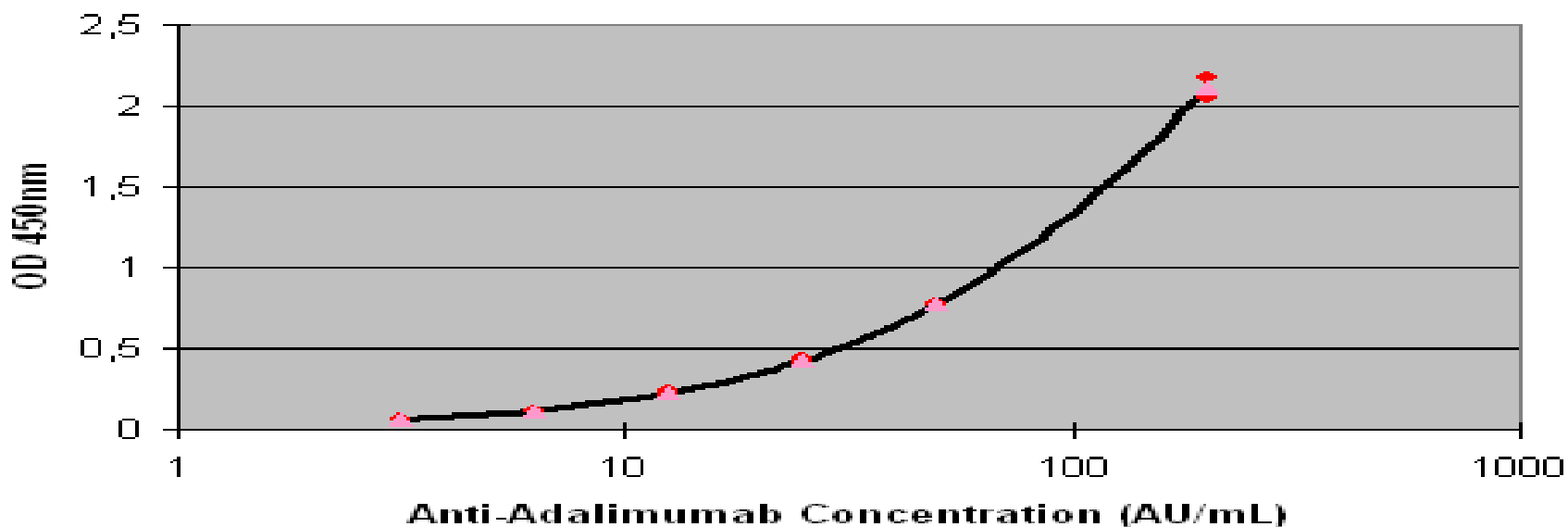
4



Sample IDs











21 Calibration Curve								
	Calibrator	Conc. □ (AU/mL)	Wells	Raw	Raw □ (Average)	SEM	Backfit □ (AU/ml)	Recovery □ %
23	● anti-ADL CAL1	200	A1	2,18	2,11	0,0645	> Calibrators	-
24			A2	2,05			189,8	94,89
25	● anti-ADL CAL2	50	B1	0,776	0,777	0,0005	49,93	99,86
26			B2	0,777			50,01	100
27	● anti-ADL CAL3	25	C1	0,414	0,427	0,0125	24,23	96,91
28			C2	0,439			25,86	103,4
29	● anti-ADL CAL4	12,5	D1	0,21	0,226	0,0165	11,62	92,94
30			D2	0,243			13,57	108,6
31	● anti-ADL CAL5	6,25	E1	0,107	0,112	0,005	5,75	92
32			E2	0,117			6,304	100,9
33	● anti-ADL CAL6	3,13	F1	0,058	0,061	0,003	< Calibrators	-
34			F2	0,064			3,411	109

— 4PL ● anti-ADL CAL ▲ Average



Sample	Dilution	Wells	Raw	Raw \square (Average)	Validation	Result
38 39  PC		G1	0,491	0,49	PC \geq anti-ADL CAL4	PASS
40		G2	0,488			
41  NC		H1	0,019	0,0205	NC < anti-ADL CAL6	PASS
42		H2	0,022			

Sample	Dilution	Wells	Raw	Interpolated \square Conc. (AU/ml)	Conc. \square (AU/ml)	Anti-Adalimumab \square Conc. (AU/ml)	Result*	Interpretation*
46 47  3803/23/4	1:1	A3	0,047	< Calibrators	< Calibrators	≤ 3.5	Negative	Negative for antibodies to ADL
48	1:10	B3	0,011	< Calibrators	< Calibrators			
49  3807/25/4	1:1	C3	0,021	< Calibrators	< Calibrators	≤ 3.5	Negative	Negative for antibodies to ADL
50	1:10	D3	0,01	< Calibrators	< Calibrators			
51  3804/26/4	1:1	E3	0,013	< Calibrators	< Calibrators	≤ 3.5	Negative	Negative for antibodies to ADL
52	1:10	F3	0,002	< Calibrators	< Calibrators			
53  3813/2/5	1:1	G3	0,0172	< Calibrators	< Calibrators	≤ 3.5	Negative	Negative for antibodies to ADL
54	1:10	H3	0,013	< Calibrators	< Calibrators			
55  3817/14/5	1:1	A4	0,213	11,79	11,79	37,87	Positive	Positive for antibodies to ADL
56	1:10	B4	0,071	3,787	3,787			
57  3806/15/5	1:1	C4	0,161	8,783	8,783	42,73	Positive	Positive for antibodies to ADL
58	1:10	D4	0,08	4,273	4,273			
59  3806/24/5	1:1	E4	0,03	< Calibrators	< Calibrators	≤ 3.5	Negative	Negative for antibodies to ADL
60	1:10	F4	0,012	< Calibrators	< Calibrators			
61  3803/4/6	1:1	G4	0,025	< Calibrators	< Calibrators	≤ 3.5	Negative	Negative for antibodies to ADL
62	1:10	H4	0,013	< Calibrators	< Calibrators			

Interpretace výsledků

Hladina léků:

- Negativní = lék nebyl detekován
- Slabě pozitivní = sub-terapeutická hladina léku
- Pozitivní = terapeutická hladina léku

Hladina protilátek:

- Negativní = negativní pro protilátky proti léku
- Pozitivní = pozitivní pro protilátky

Cut-off hodnoty

- **Remicade:** $\geq 1,5 \mu\text{g/ml}$ (pozitivní), $\leq 0,035 \mu\text{g/ml}$ (negativní), $0,035-1,5 \mu\text{g/ml}$ (slabě pozitivní)
- **anti remicade:** $\leq 2 \text{ AU/ml}$ (negativní), $>2 \text{ AU/ml}$
- **Humira:** $\geq 0,8 \mu\text{g/ml}$ (pozitivní), $\leq 0,024 \mu\text{g/ml}$ (negativní), $0,024-0,8 \mu\text{g/ml}$ (slabě pozitivní)
- **anti-humira:** $\leq 3,5 \text{ AU/ml}$ (negativní), $>3,5 \text{ AU/ml}$
- **Enbrel:** $\leq 0,035 \mu\text{g/ml}$ (negativní), $\geq 0,035$ (pozitivní)
- **anti-enbrel:** $\leq 142 \text{ AU/ml}$, $>142 \text{ AU/ml}$

Děkuji za pozornost