

Novější či méně běžné metody

Mirka Beňovská

NGAL

- *Neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipocalin*
- Přítomen v tkáni plic, žaludku, tenkého střeva a ledvin
- Při poškození ledvin NGAL vylučován do moči a plazmy
- **Časný ukazatel akutního poškození ledvin** - hladina stoupá v moči a krvi během dvou hodin od vzniku poškození ledvin

NGAL

Metody:

Imunoanalýza – Abbott, Roche

Imunoturbidimetrie – zesílená na polystyrénových částicích

ELISA – firma Bioporto (dodává Lab Mark)

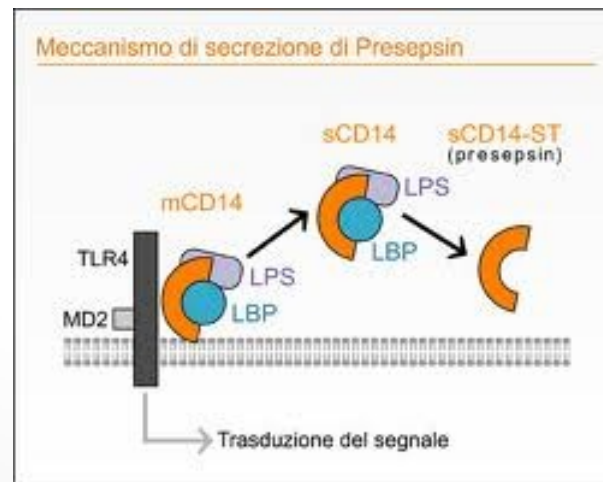
Materiál: **U,P,S**

NGAL

Cut off - moč:132 ng/ml

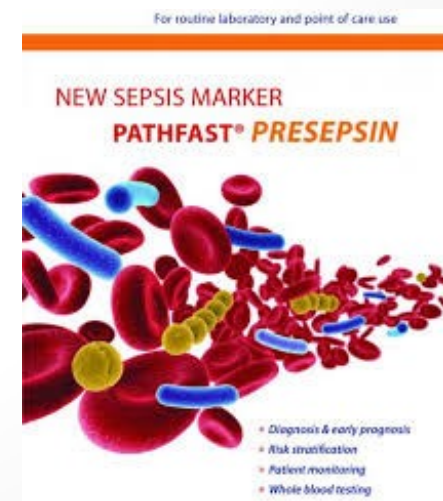
Presepsin

- nový specifický marker septických stavů
- rozpustný N-terminální fragment CD14
- **CD14 je glykoprotein exprimovaný na povrchu membrány monocytů a makrofágů**
- CD 14 je receptorem pro lipopolysacharidy bakterií, navázáním se aktivuje TLR4 prozánětlivá signalizační kaskáda a zánětlivá reakce
- **mechanismus vzniku presepsinu – rozštěpení membrány CD14 lysozomálními enzymy granulocytů**
- **CD14 je uvolňován do krve a vlivem plazmatických proteáz štěpen na sCD14-ST = PRESEPSIN**



Presepsin

- zvyšuje se při systémové i lokální bakteriální infekci
- rychlý vzestup hladiny v krvi (cca za 2 hodiny)
- důležitá je dynamika koncentrace
- uplatnění trendu ve dnech 1-7 při předpovědi 30 denní mortality



Použitý princip

- stanovení presepsinu na přístroji PATHFAST, Mitsubishi Chemical (dodává Medesa)



Použitý princip



- stanovení presepsinu na přístroji PATHFAST, Mitsubishi Chemical (dodává Medesa)
 - chemiluminiscenční enzymová imunoanalýza s MAGITRATION technologií
 - odběrový materiál – heparinát litný
 - cena 350 Kč/test, souprava 21000 Kč na 60 testů
 - neproplácen pojišťovnou

Referenční rozmezí

Presepsin

0 - 337 pg/ml

Presepsin

- marker sepse pro diagnostiku, monitorování i prognózu podobně jako PCT
- presepsin a PCT se nechovají zcela totožně
- snižuje se pomaleji než PCT, při špatné prognóze zůstává vysoký
- jeví se jako lepší ukazatel negativní prognózy
- důležitý je trend, ne absolutní hodnota (uplatnění při předpovědi 30 denní mortality)
- výhodné kombinovat více markerů sepse dohromady

Lp-PLA₂

- fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny
- výskyt plazma nebo sérum,
- enzym hydrolyzující oxidované fosfolipidy uvolňuje lyzofosfatidylcholin s prozánětlivými účinky podporuje protržení aterosklerotického plátu
- vázána na lipoproteiny o nízké hustotě

- vysoká hladina Lp-PLA₂ poukazuje na **nestabilní aterosklerotický plát**, může vést k IM nebo CMP
- nízká hladina Lp-PLA₂ - **stabilní aterosklerotický plát** prokázána **negativní prediktivní hodnota**

Stanovení Lp-PLA₂ - PLAC test

- ELISA
- Fotometrická metoda

Cut off

Hodnoty Lp-PLA₂ menší než 200ng/ml - nízké riziko

Hodnoty Lp-PLA₂ v rozmezí 200-235ng/ml – hraniční riziko

Hodnoty Lp-PLA₂ větší než 235ng/ml - považovány za vysoké riziko

Predikční markery preeklampsie, Roche

PIGF - placentární růstový faktor

- **zodpovědný za normální funkci placenty**
- u fyziologické gravidity koncentrace PIGF narůstá během prvních dvou trimestrů a klesá na konci gravidity
- **u preeklampsie nižší**

sFlt-1 - rozpustná tyrozinkináza-1

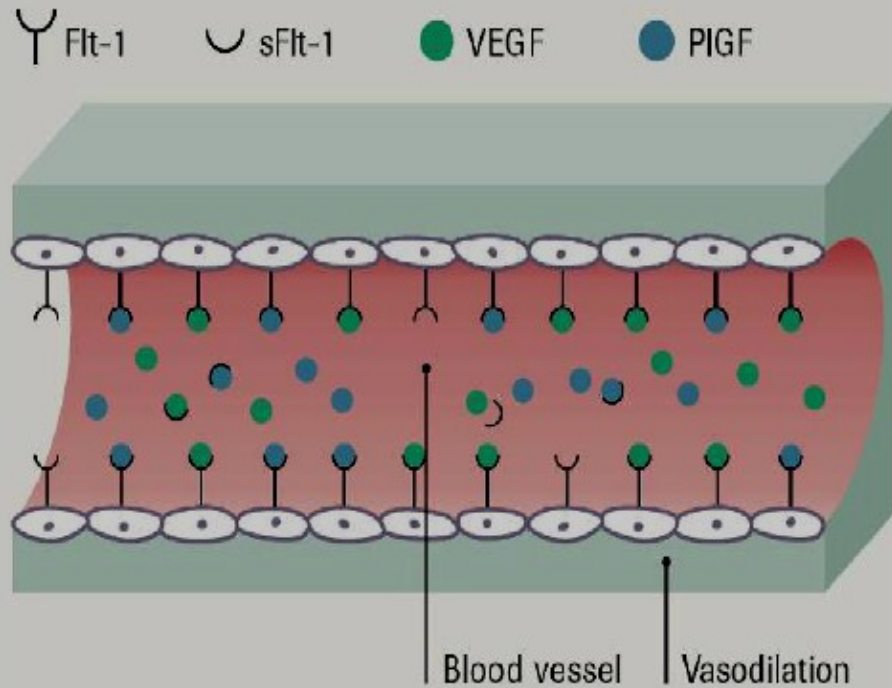
- **má vliv na ukončení těhotenství**
- hladina zůstává stabilní v prvních dvou trimestrech, pak narůstá až do porodu
- **u preeklampsie se sFlt-1 zvyšuje** již v časných fázích gravidity
- zvýšení je spojeno s ischemií a hypoxií

Poměr sFlt-1/PIGF

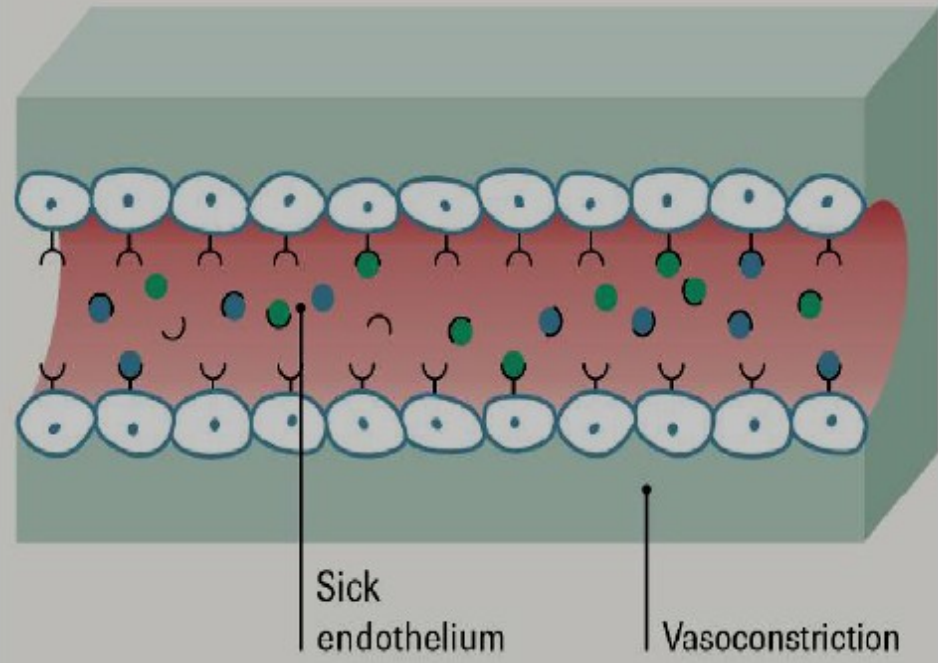
- **citlivější ukazatel**
- **při preeklampsii vyšší**

Aktivita sFlt-1 a PlGF na endotelu cév během normálního těhotenství a při preeklampsii

Normal pregnancy

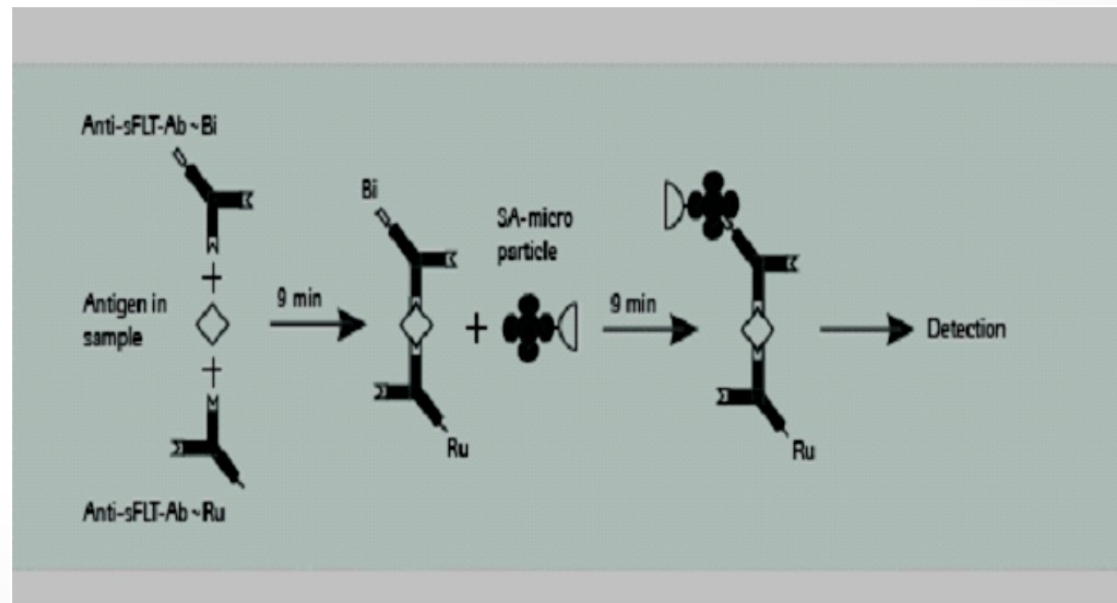


Preeclampsia



Princip stanovení sFlt-1, PlGF

- **Heterogenní nekompetitivní imunoanalýza na systémech Roche**
- Protilátka značená **rutheinovým komplexem**
- Separace na mikročasticích
- Elektrochemiluminiscenční reakce - substrát **tripropylamin**
- **Oxidace** na platinové elektrodě
- Vznik **chemiluminiscenčního záření**



Princip stanovení sFlt-1

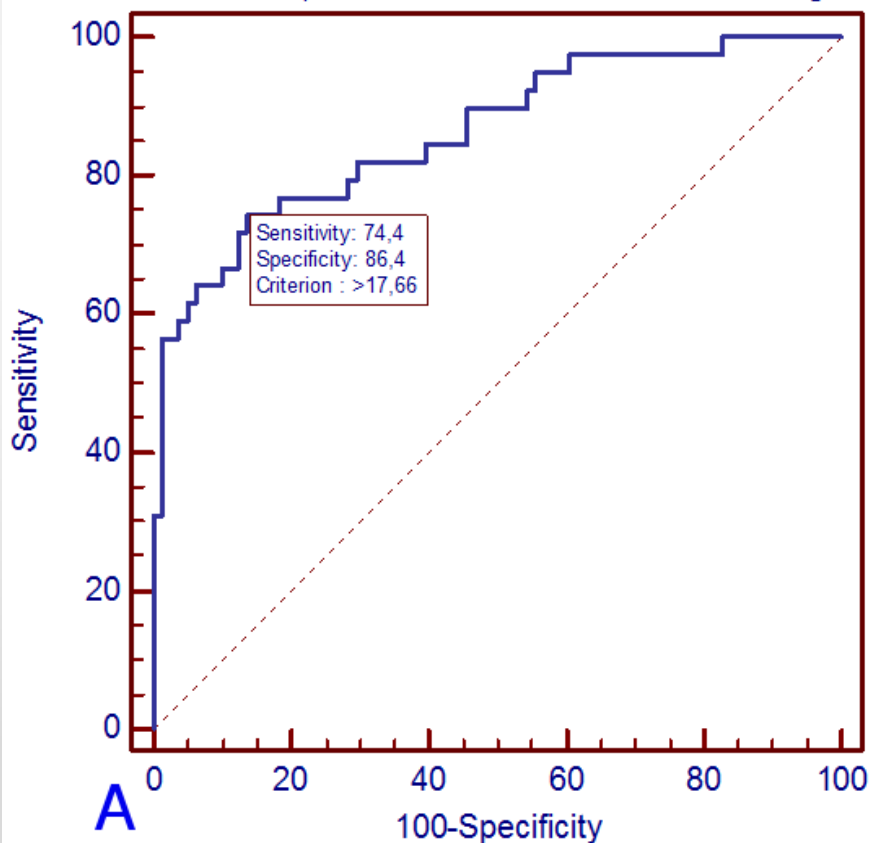
ROC křivka pro poměr sFlt-1/PlGF – 16.-20. týden gravidity

Časná PE

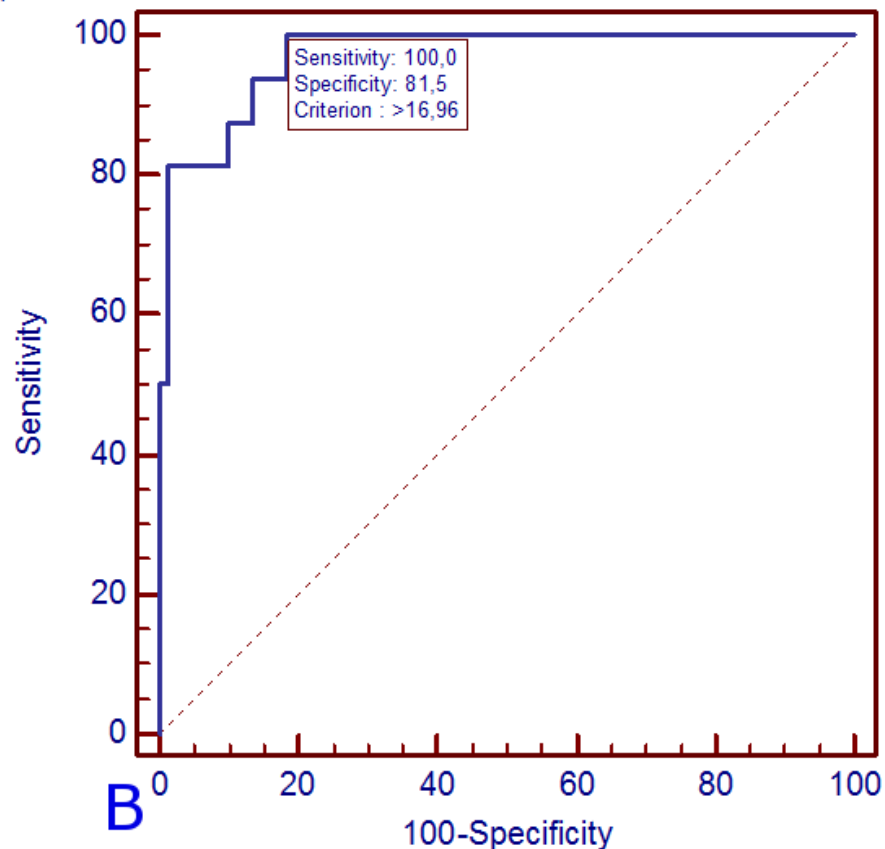
Zdravé 81
Preeklamptický 39
AUC = 0,863

Zdravé 81
Preeklamptický 16
AUC = 0,970

Rate sFlt-1/PlGF (PE onset in ≤ 34 and >34 weeks of gestation)



Rate sFlt-1/PlGF (PE onset in ≤ 34 weeks of gestation)



Žlučové kyseliny

- Hlavním produkt metabolismu cholesterolu
- Různé **hydroxyderiváty kyseliny cholanové**
- Základními žlučovými kyselinami jsou **cholová** a **chenodeoxycholová**
- V organismu se zapojují do trávení, vstřebávání a metabolismu lipidů
- Transportují se společně se žlučí do střeva, kde jsou z 95 % znovu resorbovány a vrací se do jater
- Jsou **ukazatelem správné funkce hepatocytů**
- Zvýšený obsah žlučových kyselin v séru je zaznamenán u pacientů s akutní hepatitidou, chronickou hepatitidou, jaterní steatózou a rakovinou jater

Indikace k vyšetření žlučových kyselin (S)

- Význam pro diagnostiku **intrahepatální cholestázy těhotných** (poruchu vylučování žluči do duodena)
- Ta zvyšuje riziko předčasného porodu či intrauterinní úmrtí plodu
- Sleduje se u pacientů s jaterní cirhózou
- Stanovení lze použít při studiu exkreční schopnosti jater nebo při studiu vrozených defektů metabolismu žlučových kyselin

Metody stanovení

Fotometrické stanovení

3- α -hydroxysteroiddehydrogenasa (3- α -HSD)

žlučové kyseliny + NAD⁺ -->3-oxo žlučové kyseliny + NADH + H⁺

NADH + NBT --> NAD⁺ + formazan

Formazan je měřen fotometricky při 405 nm, je přímo úměrný koncentraci žlučových kyselin

(NBT - nitrotetrazoliová modř)

ELISA

Referenční rozmezí

M, Ž:	0-150 let	do 8 $\mu\text{mol/l}$
Těhotné:		do 11 $\mu\text{mol/l}$

proGRP

- **Pro-Gastrin-Releasing Peptide**
- Nádorový marker pro malobuněčný karcinomem plic (SCLC)
- *SCLC představuje agresivnější formu plicních karcinomů*
- ProGRP je prekurzorem GRP (**GRP** je neuropeptid)

proGRP - nejvhodnější marker SCLC

- :
- Uvolňován jen ve velmi malém množství u lidí, kteří trpí nenádorovými plicními chorobami a jinými zhoubnými nádory
- Uvolňování proGRP stoupá již v ranném stádiu SCLC --> význam pro časnou detekci tumoru
- Dále sledování průběhu choroby, účinnosti terapie a odhalení recidivy
- Lepší než embryonální antigen (CEA)

Rozdíly v koncentracích ProGRP u různých klinických stavů:

Zdraví lidé	2 – 60 pg/ml
Benigní onemocnění	Většinou < 100 pg/ml (nejčastěji 15 – 80 pg/ml) Výjimka: pacienti s poruchou funkce ledvin - ProGRP zvýšeny i výrazně nad 100 pg/ml, a vzácně u některých onemocnění gastrointestinálního a urogenitálního traktu
Nemalobuněčné plicní karcinomy a ostatní tumory (vyjma SCLC)	< 100 pg/ml
Malobuněčné plicní karcinomy	> 100 pg/ml (za předp. norm. fce ledvin) při hodnotách kolem 150 pg/ml je téměř 100% jistota existence tumoru při hodnotách > 200 pg/ml se v 99% případů jedná právě o SCLC

Metody stanovení

- Imunoanalytický - analyzátor Architect i 2000 SR firmy Abbott
- Dvoukroková chemiluminiscenční analýza, separace pomocí paramagnetických mikročástic
-
- Materiál pro analýzu: plazma, sérum

AMH

(Anti- Müllerianí hormon)

- **Müllerian inhibiting faktor**
- Glykoprotein, patří mezi růstové transformující faktory (regulace tvorby a růstu malých ovariálních folikulů)
- Produkován granulózními buňkami folikulů
- Jeho role a množství se mění v závislosti na pohlaví a věku

Stanovení AMH

- **Biochemický ukazatel ovariální rezervy**– hladina v krvi je odrazem „biologického věku“ vaječníků
- Predikce nástupu menopauzy
- Diagnostika polycystického ovariálního syndromu
- Tumormarker některých typů karcinomů
- Vyšetření u nejasného genitálu u novorozenců

Význam v asistované reprodukci

- Korelace hladiny AMH s počtem rostoucích folikulů a ziskem oocytů ve stimulovaných cyklech
- Predikce odpovědi na kontrolovanou ovariální stimulaci (COS)
- Vyšetření potenciálních dárkyň oocytů

Metody stanovení

- Automatická imunoanalýza – systémy Beckman
- ELISA

Příklad interpretace hodnot AMH

Interpretation (women under age 35)	AMH Blood Level
High (often PCOS)	Over 4.0 ng/ml
Normal	1.5 - 4.0 ng/ml
Low Normal Range	1.0 - 1.5 ng/ml
Low	0.5 - 1.0 ng/ml
Very Low	Less than 0.5 ng/ml

Zdroj:

www.advancedfertility.com

Prognosticky špatné AMH < 0,7 ng/ml

Aktivní vitamín B12

- Vitamin B12 je esenciální pro různé buněčné funkce (syntéza DNA)
- Deficience vitamínu B12 způsobuje únavu, perniciózní anémii, zhoršení neurologických funkcí
- Příčinou deficience vitamínu B12 bývá malabsorpce, chronická závislost na alkoholu, dieta vegetariánská nebo veganská, věk nad 60 let

Aktivní vitamín B12

- Přibližně 20 % cirkulujícího B12 vázáno na transportní protein transkobalamin (TC)
- Komplex se nazývá holotranskobalamin (holoTC)
- Představuje metabolicky aktivní formu B12
- Podle recentních studií je holoTC lepší marker než celkový B12
- Slouží k detekci subklinické deficiencie vitamínu B12
-
- Časnější ukazatel vyčerpání zásob B12 v organismu

Metoda stanovení akt. B12

- Elektrochemiluminiscence, cobas 6000 nebo cobas 8000, Roche
- Chemiluminiscence, Advia Centaur, Siemens

Stanovení tau proteinu celkového, tau proteinu fosforylovaného a beta amyloidu v likvoru

Využívá se u pacientů

- S **neurodegenerativním onemocněním**, zejména s Alzheimerovou chorobou
- S **hydrocefalem**

Počítá se také poměr **tTau/Abeta42** a **pTau/Abeta42**

Klinika:

- V mozku pacientů s tímto onemocněním je tau protein hyperfosforylovaný
- Beta amyloid (1-42), bývá u Alzheimerovy choroby naopak snížený vzhledem k jeho agregaci a ukládání v placích

Stanovení tau proteinu celkového, tau proteinu fosforylovaného a beta amyloidu v likvoru

Stanovení

- ELISA stanovení
- Pomocí automatizovaných imunochemických metod firmy Roche

GDF-15 (Growth differentiation factor)

- Zvyšuje se u kardiovaskulárních onemocnění
- Marker celkové mortality, mortality z kardiovaskulárních příčin
- Monitoruje srdeční selhávání a atriální fibrilaci
- Zvyšuje se rovněž u pacientů s některým druhem karcinomu
- Má prognostický význam a je součástí ABC skóre rizika krvácení u pacientů se srdečním selháváním



GDF-15

Stanovení

- ELISA stanovení
- Pomocí automatizovaných imunochemických metod firmy Roche