

# Novější či méně běžné metody

Mirka Beňovská

# Copeptin

- C-terminální fragment prekursoru vazopresinu
- Copeptin a vazopresin se ekvimolárně uvolňují z téhož prekursorového hormonu do krevního řečiště
- Copeptin se využívá jako zástupný marker pro nestabilní vazopresin
- Diagnostika pacientů
  - s akutní myokarditidou - odlišení mladých pacientů od akutního koronárního syndromu
  - s poruchou vodního hospodářství (př. Syndrom nepřiměřené sekrece ADH)

# Copeptin

- Odběr - sérum, plazma (EDTA, heparin)
- Princip stanovení – homogenní imunofluorescenční analýza
- Přístroj Kryptor (reagencie Brahms)
- Referenční rozmezí  
0,7-10 pmol/l

# 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)

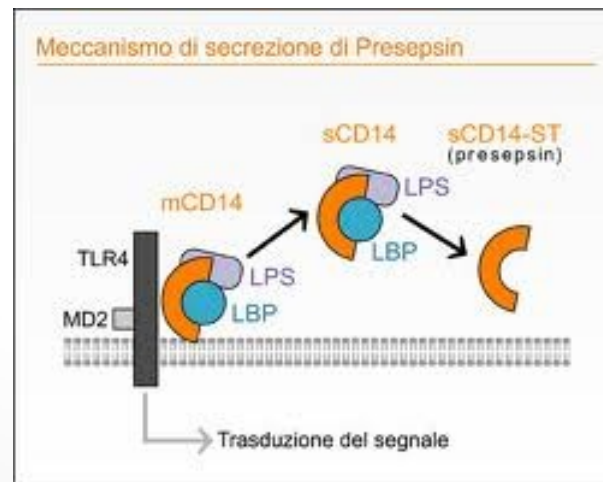
Materiál: **U,P,S**

# NGAL

Cut off - moč:132 ng/ml

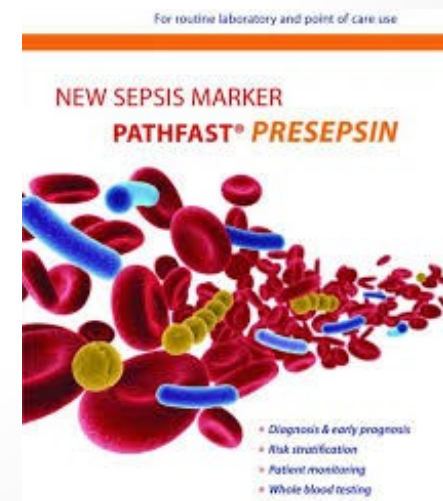
# Presepsin

- 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

# 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-PLA<sub>2</sub>

- fosfolipáza A<sub>2</sub> 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-PLA<sub>2</sub> poukazuje na **nestabilní aterosklerotický plát**, může vést k IM nebo CMP
- nízká hladina Lp-PLA<sub>2</sub> - **stabilní aterosklerotický plát** prokázána **negativní prediktivní hodnota**

# Stanovení Lp-PLA<sub>2</sub> - PLAC test

- ELISA
- Fotometrická metoda

# Cut off

Hodnoty Lp-PLA<sub>2</sub> menší než 200ng/ml - nízké riziko

Hodnoty Lp-PLA<sub>2</sub> v rozmezí 200-235ng/ml – hraniční riziko

Hodnoty Lp-PLA<sub>2</sub> 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

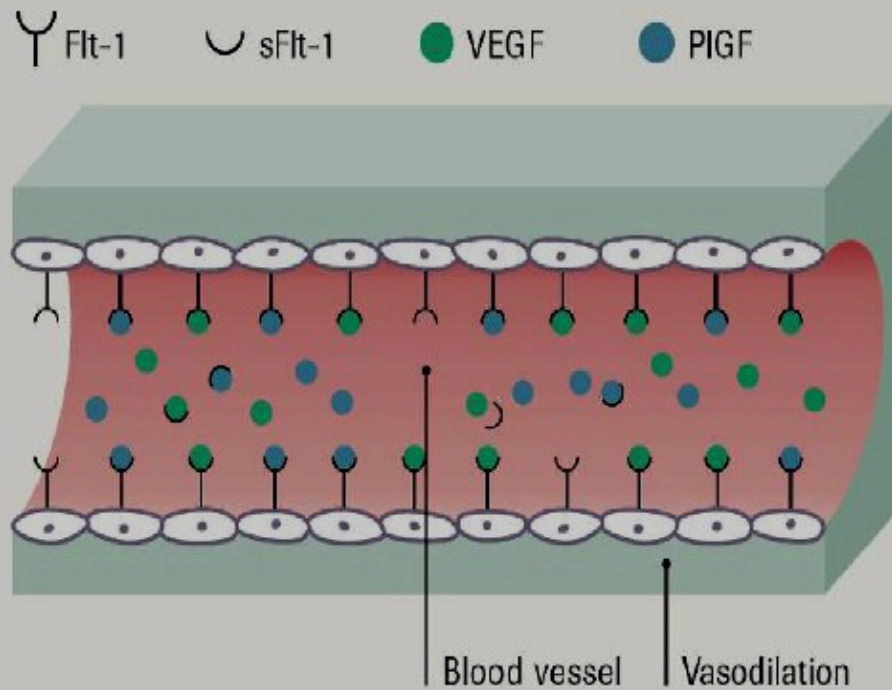
## Poměr sFlt-1/PIGF

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

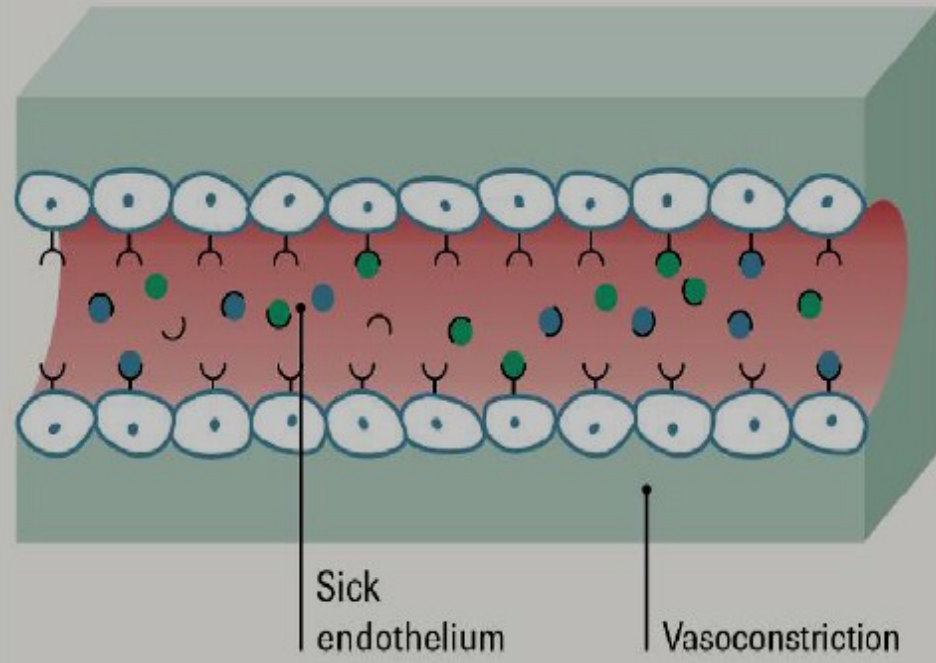


# Aktivita sFlt-1 a PlGF na endotelu cév během normálního těhotenství a při preeklampsii

## Normal pregnancy

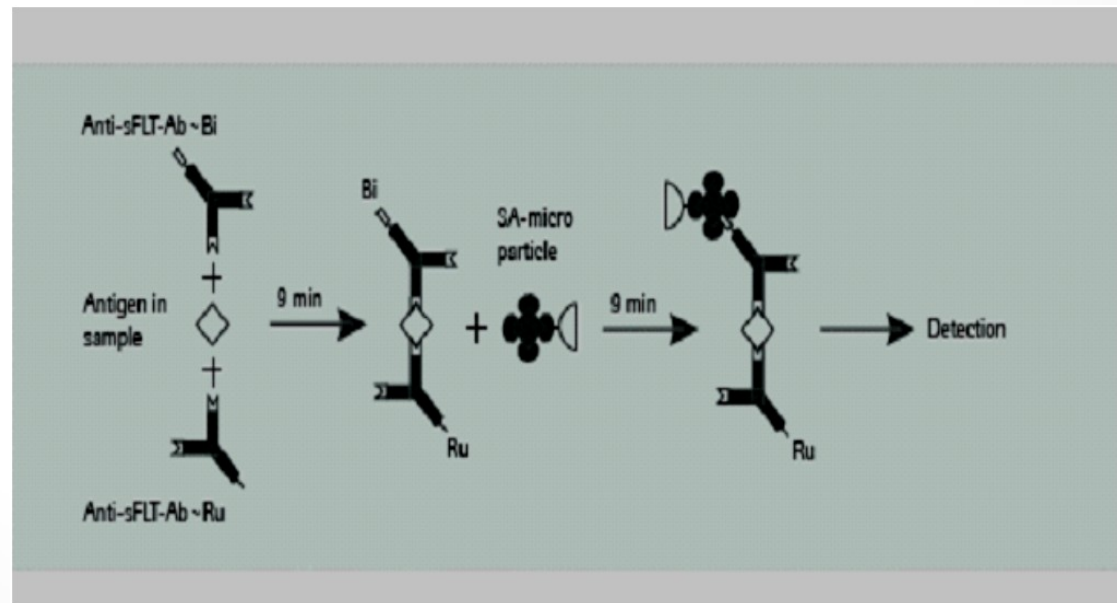


## Preeclampsia



# 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

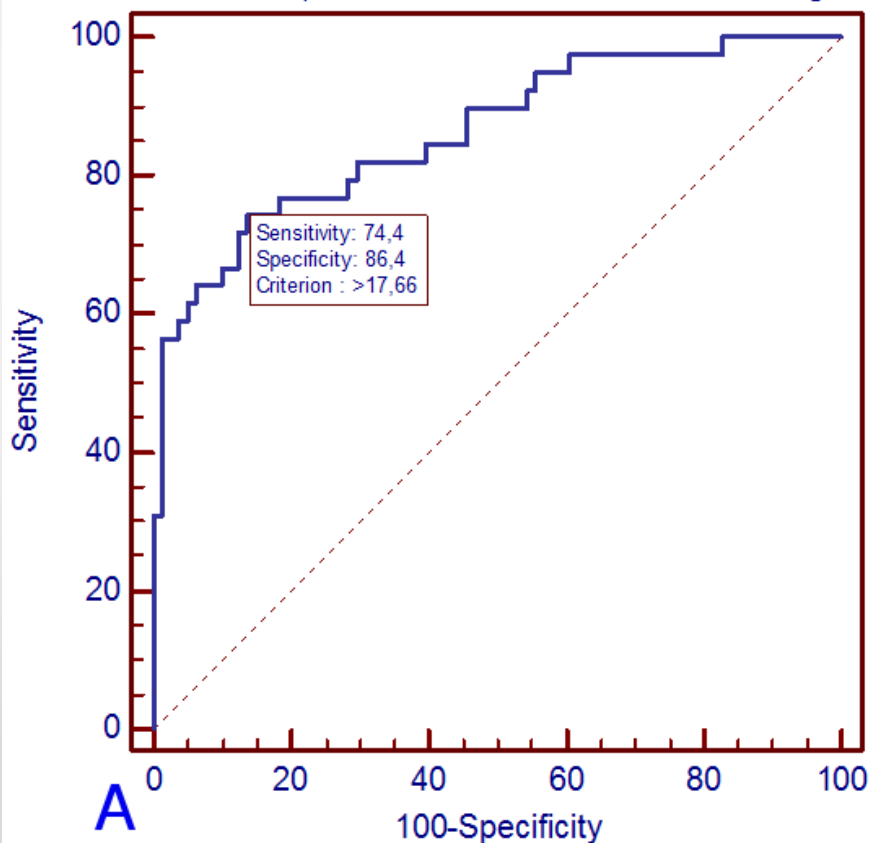
# ROC křivka pro poměr sFlt-1/PlGF – 16.-20. týden gravidity

Časná PE

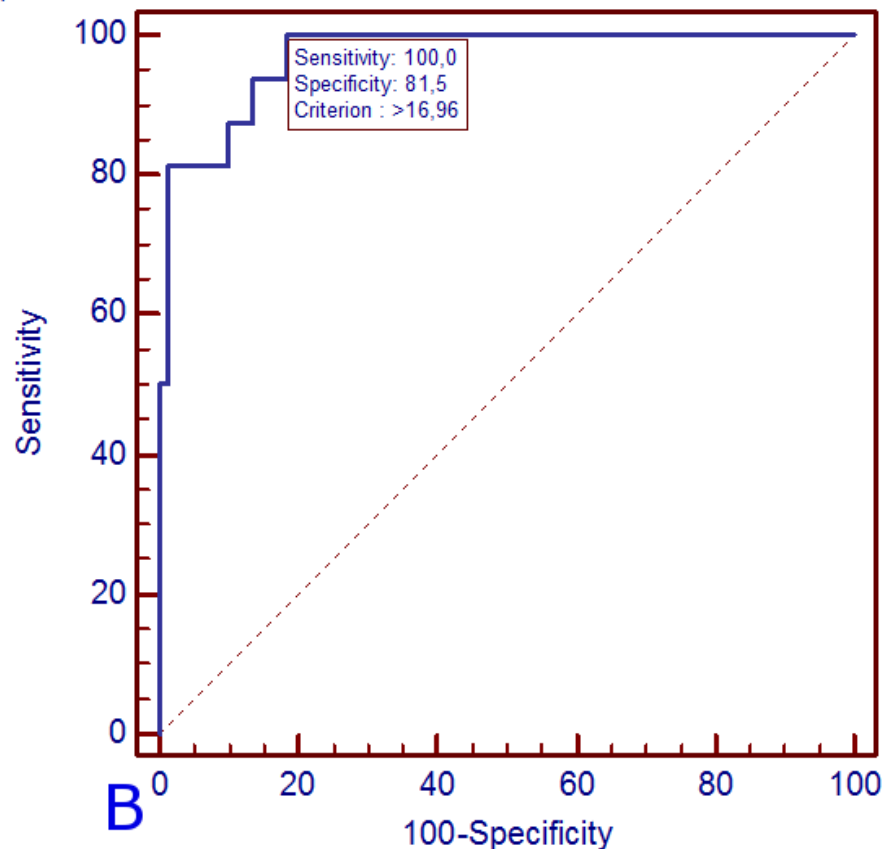
**Zdravé 81**  
**Preeklamptický 39**  
**AUC = 0,863**

**Zdravé 81**  
**Preeklamptický 16**  
**AUC = 0,970**

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



Rate sFlt-1/PlGF (PE onset in  $\leq 34$  weeks of gestation)



# Žlučové kyseliny

- Hlavním produkt metabolismu cholesterolu
- Různé **hydroxyderiváty kyseliny cholánové**
- 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- $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenasa (3- $\alpha$ -HSD)

žlučové kyseliny + NAD<sup>+</sup> -->3-oxo žlučové kyseliny + NADH + H<sup>+</sup>

NADH + NBT --> NAD<sup>+</sup> + 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	<b>Většinou &lt; 100 pg/ml (nejčastěji 15 – 80 pg/ml)</b> 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)	<b>&lt; 100 pg/ml</b>
Malobuněčné plicní karcinomy	<b>&gt; 100 pg/ml</b> (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
- Dvukroková chemiluminiscenční analýza, separace pomocí paramagnetických mikročástic
- 
- Materiál pro analýzu: plazma, sérum

# AMH

## (Anti- Müllerian 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](http://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