

# Metody používané v klinické praxi

- Metody využívající sérologické reakce
- Testy funkce a počtu buněk imunitního systému
- Základy alergologického vyšetření
- Imunologické vyšetření a základy interpretace výsledků imunologických laboratoří
- Příklad vyšetření v laboratořích

# metody využívající sérologické reakce

## A. Precipitační metody

V kapalinách

V gelu

## B. Imunodifuzní metody

- Jednoduchá imunodifúze
- dvojitá imunodifúze

## C. Imunoelektroforetické metody

Kombinace s elfo

- Imunoelektroforéza podle Williamse a Grabara
  - Raketová imunoelektroforéza
    - Protisměrná
    - Dvojrozměrná
  - D. Aglutinační metody
  - E. Hemaglutinační
  - F. Komplementové
  - G. Immunoblotting
  - Zákalové reakce
    - Immunonefelometrie
    - Imunoturbidimetrie

## H. Imunochemické metody

a) RIA

b) FIA

c) EIA

# Časové rozdělení metod

## Metody I.generace

- Některé techniky v roztoku – precipitační, aglutinační, KFR

## Metody II.generace

- Kvantitativně i složité směsi antigenu,
- Imunodifúze, imunoelfo

## Metody III.generace

- Velmi citlivé metody, stanoví Ag, Ab i hapteny
- Imunoanalýzy – př. RIA, FIA, EIA, imunoturbidimetrie
- – nefelometrie, -fluorimetrie, popř jejich kombinace

## Metody IV.generace

- Kontinuálně měří Ag, Ab i hapteny
- imunosenzory

# ***Příklady metod I.-IV. generace***

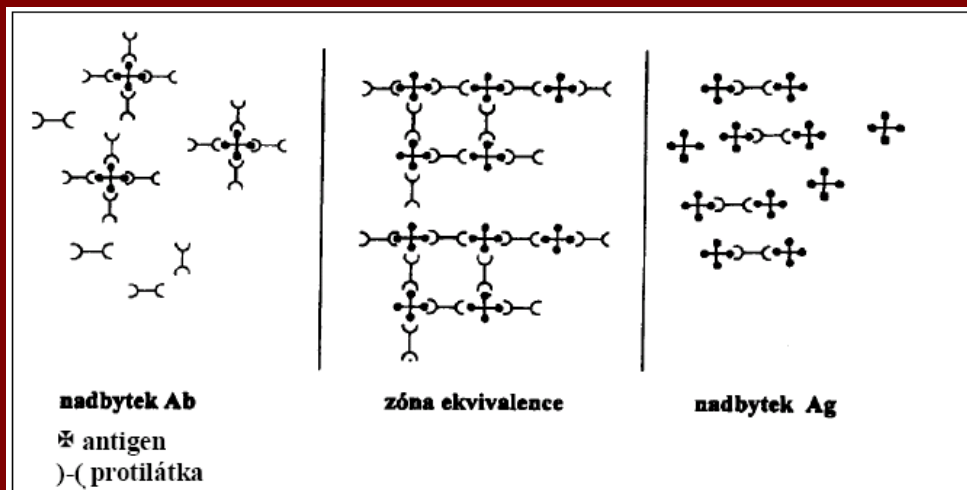
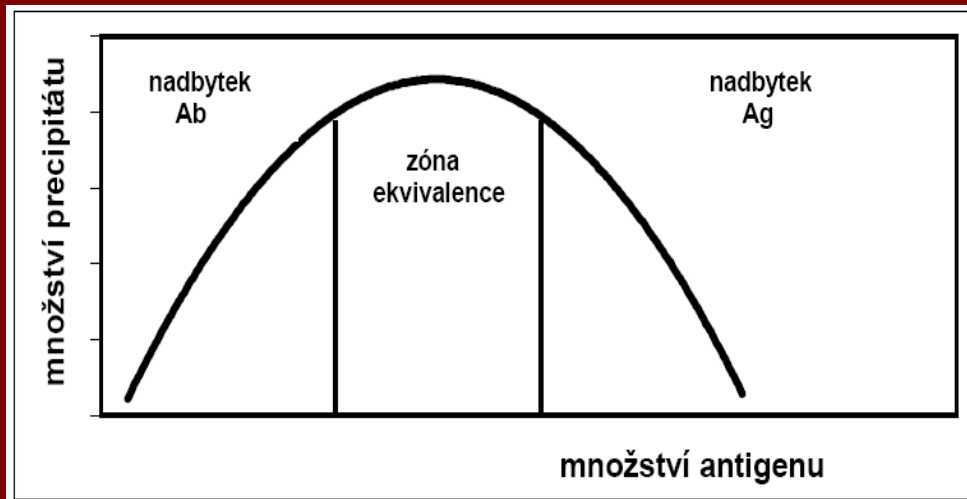
- **Metody I.generace** – pacientův vzorek obsahující *S. aureus* koaguluje králičí plasmu
- **Metody II.generace** – ve vz. pacienta se identifikují povrchové Ag *S. aureus* pomocí fibrinogenu / IgG, rutinní, následuje citlivost
- **Metody III.generace** – stanovení Ag pouzdra *S. aureus*, odhalení MRSA (metycilin rezist.), bez pouzdra – reakce s fibrinogenem nebo neo IgG
- **Metody IV.generace** – zjištění rezistentního kmene hned! CM-MP částice (Carboxylate modified microparticles) navázány na latex a detekují kapsulární polysacharidy *S. aureus* ve vzorku pacienta. Silná, jasně viditelná aglutinace za 20s.

## Precipitační křivka

- 1929 Heidelberg a Kendall – popsali reakci rozpustného Ag s odpovídající Ab ve vhodném poměru.
  - Výsledek reakce – precipitát
- Stanovili precipitační křivku a 3 oblasti reakce Ag s Ab

# Serologické metody - precipitace

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)



## Oblast ekvivalence

*Precipitační metody*

## Oblast nadbytku protilátky

*Nekompetitivní metody*

- zákalové nefelometrie
- turbidimetrie

- s markerem EIA, IRMA..

## Oblast nadbytku antigenu

*Kompetitivní metody*

- heterogenní RIA, ELISA..
- homogenní EMIT (EIA)...

## - faktory ovlivňující precipitaci:

**typ Ab** /např. IgG/

**teplota** – se zvyšující se teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/

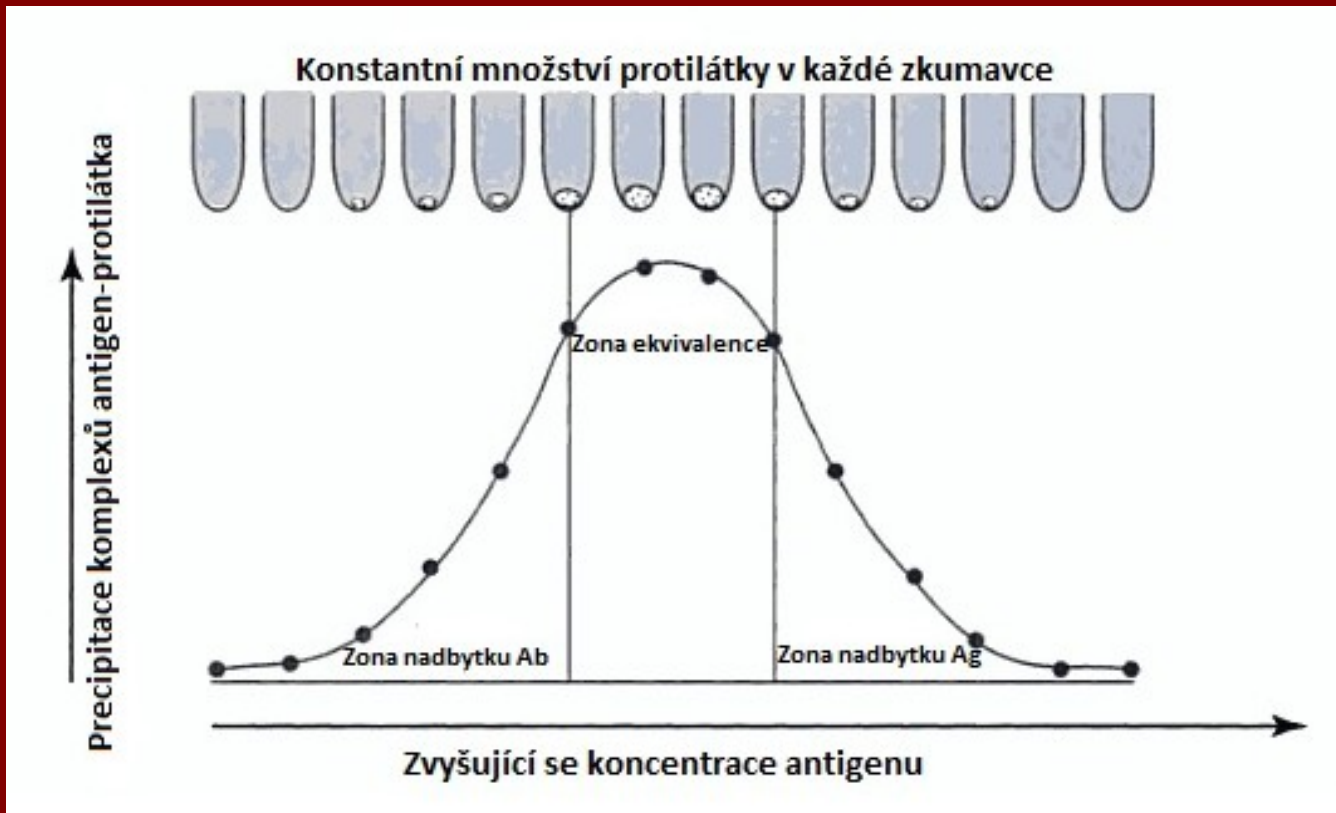
**vzájemná koncentrace Ag a Ab**

**pH**

**iontový náboj**

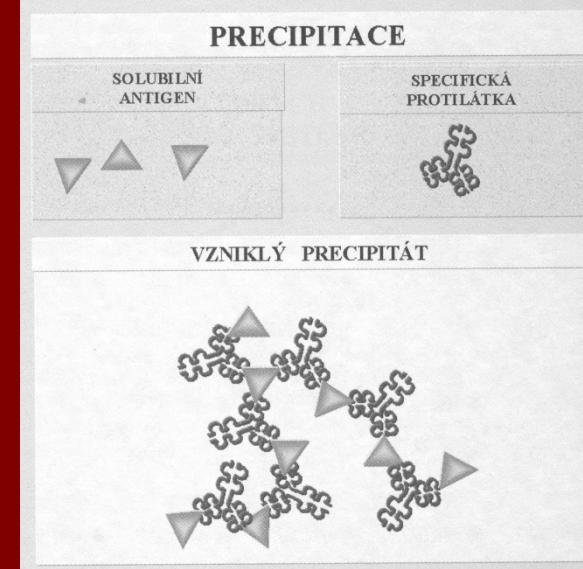
**tvář a velikost části**

# Precipitační křivka



Závislost tvorby precipitátu na vzájemné koncentraci protilátka – antigen (Stanly, 2002)

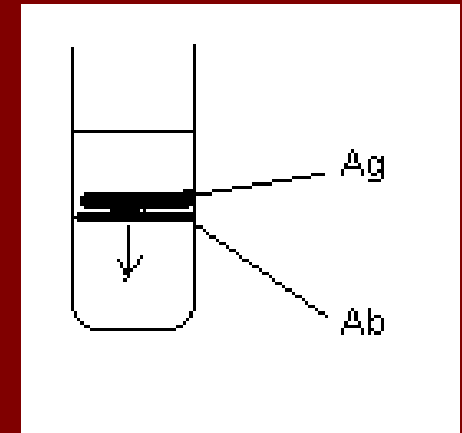
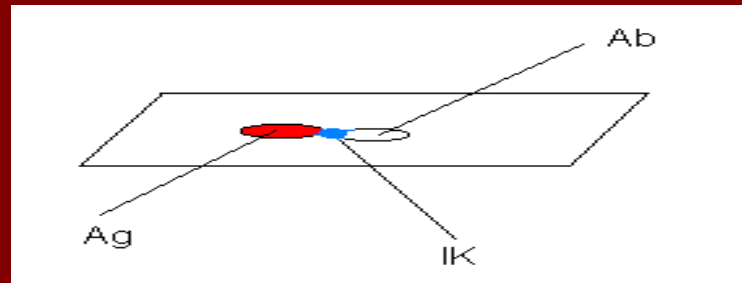
# PRECIPITAČNÍ metody:



- Ag + Ab → Ag-Ab
- precipitinogen precipitin precipitát sraženina
- solubilní /rozpustný/
- **Koncentrace 0,1g/ a vyšší!!**
- - dělíme:
- **A) v kapalinách :**
- **I. prstencová**
- – prstenec sraženiny precipitátu

- **II. sklíčková** – určení pod mikroskopem

- **B) v gelu:**
- **IMUNODIFÚZE**



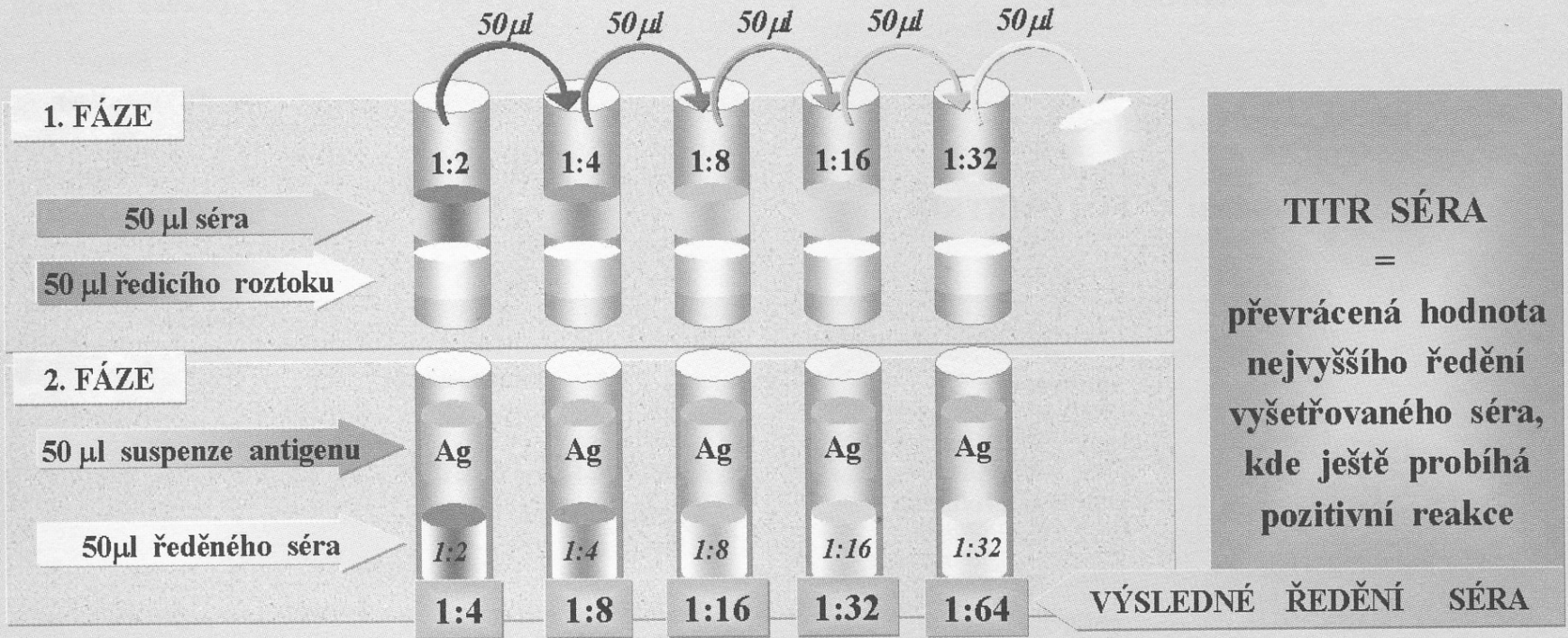
- **využití** : ke stanovení Ag, Ab, H



## PRECIPITAČNÍ metody:

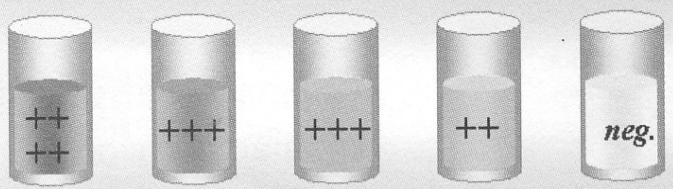
- **praxe** – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění 2. identifikace Ag (patogena)
- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.
- = **nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag**
- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem
- **kvantitativně** :
  - a, zjištěním **množství precipitátu**
  - b, zjištěním **množství Ag** v precipitátu či supernatantu
  - c, změna **optických vlastností** vzorku – 2 metody :
  - **NEFELOMETRIE – TURBIDIMETRIE**
  - **Velmi nízké mn. precipitátu lze hodnotit pomocí detekčních systémů využívajících Ab nebo Ag značené radioizotopem, fluoresc. Látkou, enzymem, luminiscenční látkou**

# Titrace séra



**TITR SÉRA**  
=  
převrácená hodnota  
nejvyššího ředění  
vyšetřovaného séra,  
kde ještě probíhá  
pozitivní reakce

**PŘÍKLAD:**  
pacient XY

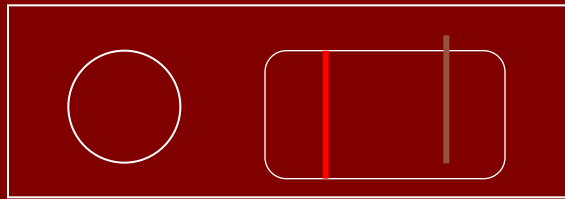


poslední pozitivní reakce  
probíhá ve zkumavce  
s ředěním séra 1:32  
 $\Rightarrow\Rightarrow\Rightarrow$  TITR = 32

# př. Precipitační imunochemické metody

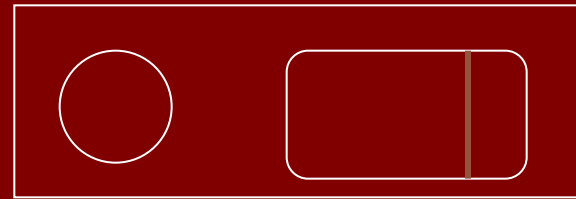
*Screeningové metody* – jednoduché precipitační testy terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence, imunochromatografické

**Vzorky:** moč, výtěr z nosu, pochvy, konečníku, ne krev! Stanovení Ag nebo Ab a jejich vizualizace barevnou složkou



S T C

Negativní výsledek



S T C

Pozitivní výsledek

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

## Využití:

Rychlé chromatografické testy – stanovení přítomnosti drogy v tělesných tekutinách,

Ab (na desce přítomný antigen

nebo Ag (na desce přítomná protilátka, např. u infekčních nemocí (*Chlamydie*, *Streptococcus pneumoniae*, gonádotropin u těhotných žen

*Adenovirus*, *Rotavirus*, *Helicobacter pylori*, Influenza A,B)

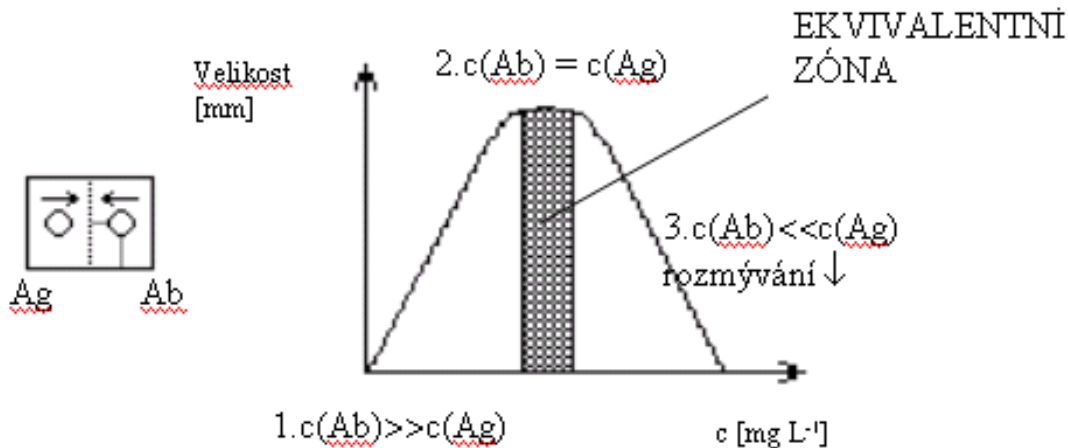
# Imunodifúze

- specifická **reakce Ag s Ab - precipitace**  
*/gel z agaru nebo agarózy/-* **AGAR** ■ směs polysacharidů extrahovaných z červených mořských řas  
■ přírodní agar nutno přečišťovat ■ **frakcionací**  
vznikají 2 složky: ■ **agaróza**
- neobsahuje vedlejší aniontové skupiny - pro difúzi více vhodná
- *standardnější složení* než agar a nižší schopnost *nespecifické adsorpce*  
■ **agaropektin**
- obsahuje aniontové skupiny ■ **pro difúzi nevhodný**

# imunodifúze

- příprava gelu:
- rozvaření agarózy v pufru na vodní lázni
- nanesení na skleněné destičky – ztuhnutí ve vodorovné poloze /při teplotě pod 42°C/
- princip ID:
- - vzájemná **volná difúze Ab a Ag** v gelu na základě **koncentračního spádu** až do místa střetnutí **zde vznikají precipitační linie, ploučky, stence, kruhy** /záleží na použitém materiálu/
- - vzniklé precipitáty **detekujeme:**
  - **okem** - zákal
  - **barvením** – Coomassie blue, amidočern
  - **sekundárními protilátkami**
  - **Au, Ag, radioizotopy**
- - vznik precipitátů je **děj postupný!!!**

# Imunodifúze



1. nejdříve vznikají rozpustné imunokomplexy (IK) – nedostatek Ag
2. po vyrovnání  $c(\text{Ab}) = c(\text{Ag})$  vznikají pevné IK – detekce sraženiny  
...EKVIVALENTNÍ ZÓNA
3. převaha Ag nad Ab ~ rozpad IK (Ag naráží na IK – rozmyívání sraženiny)

## - rozdělení imunodifúzních metod:

**jednoduchá imunodifúze** – gelem difunduje pouze jedna složka – Ag nebo Ab

**dvojitá imunodifúze** – gelem difundují obě složky – Ag i Ab

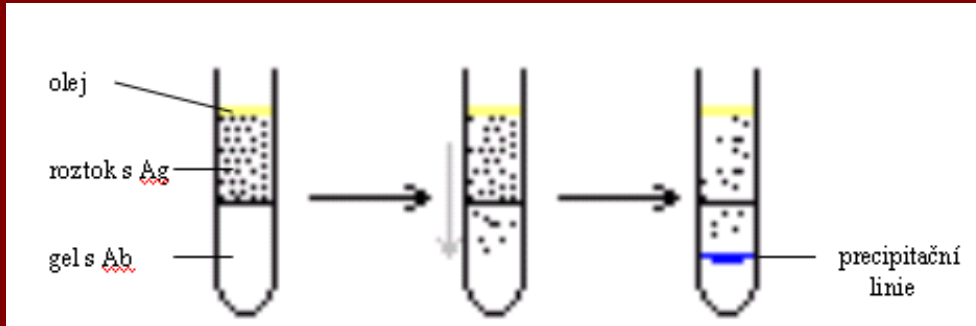
**jednorozměrná** – složka putuje v gelu jedním směrem

**dvojezměrná /radiální/** – složka putuje více směry

Ag a Ab si *neodpovídají* – **nevytvoří se precipitační linie**

Směs více typů Ag a Ab – počet **linií** odpovídá **počtu** *sobě si odpovídajících* párů **Ab a Ag**

# Imunodifúze



roztok s Ag  
gel s Ab  
olej

- **jednoduchá imunodifúze** - migruje 1 složka:
- **1. složka se smíchá s gelem už při jeho přípravě (nemigruje)**
- **2. složka se aplikuje následně do vyřezaných jamek – MIGRUJE – v místě vyrovnání koncentrací vzniká precipitační linie**

## Jednoduchá jednorozměrná imunodifúze ~ dle OUDINA

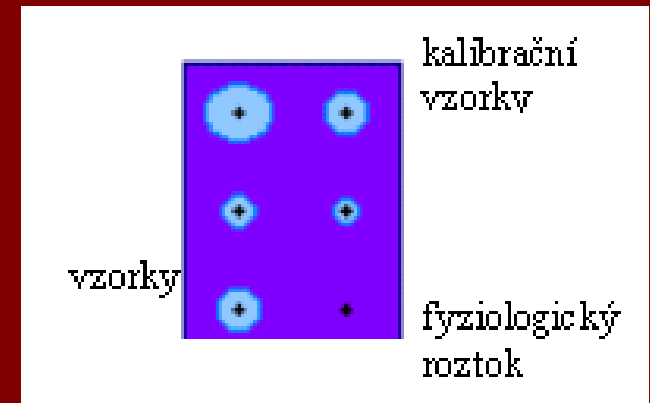
- - ve spodní části zkumavky agarózový gel s Ab, převrstveno roztokem s Ag - zalito parafínovým olejem – zábrana odpařování
- - čím je Ag koncentrovanější, tím dále od roztoku s Ag vznikají precipitační linie /odečitatelnější/
- - **využití:** ■ detekce počtu Ag párů



# Imunodifúze

## Jednoduchá radiální /dvojrozměrná/ imunodifúze dle MANCINIOVÉ

- - na skleněnou destičku se nalije gel, který obsahuje Ab
- inkubace ve vlhké komůrce ve vodorovné poloze → difúze všemi směry (radiální)
- po obarvení - modré precipitační prstence
- **průměr** je vzorek koncentrovanější – větší průměr prstence
- → změření druhé mocniny průměrů prstenců – vynesení kalibrační křivky a odečet koncentrace neznámého vzorku-
- využití:
- ke kvantitativnímu stanovení Ag
- klinická praxe: stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD, složek komplementu a proteinů akutní fáze



### jamky - vzorky:

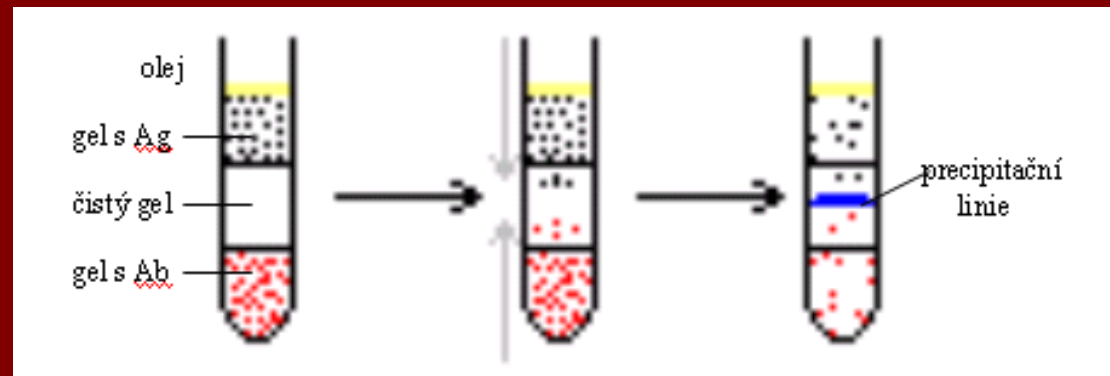
-gel s Ab

fyziologický roztok –blank

vzorky o neznámé koncentraci

vzorky o známé koncentraci (kalibrační)

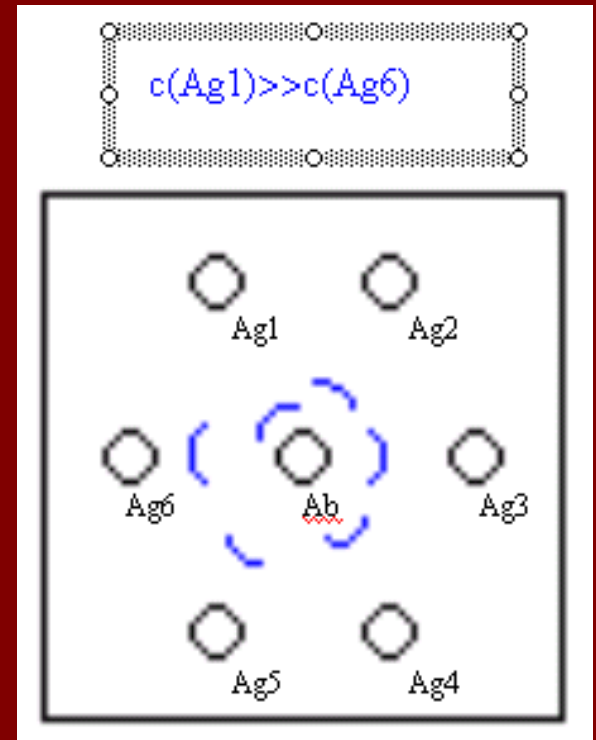
# Imunodifúze



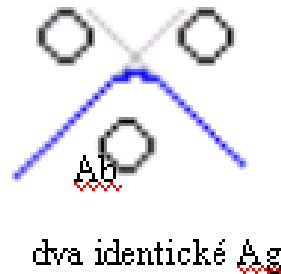
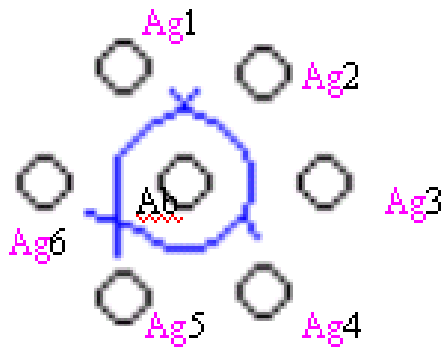
- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují obě složky*
- - *koncentrace Ag a Ab musí být vzájemně ekvivalentní*  
– proti překrývání linií
- **Dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce *agarózový gel s Ab* a *agarózový gel s Ag*
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací se vytvoří **precipitační linie**-
- **využití:** ■ **kvalitativní důkaz Ag**  
■ **určení imunochemické příbuznosti či odlišnosti Ag**

# Imunodifúze

- **Dvojitá radiální imunodifúze** **dle OUCHTERLONYHO**
- na *skleněné desky* nanesen **čistý gel**
- menší jamky – *různé Ag* či *různé koncentrace* jednoho Ag
- větší prostřední jamka – Ab
- koncentrovanější Ag → **precipitační obloučky** blíže jamky s Ab
- inkubace ve vlhké komůrce
- počet precipitačních linií odpovídá počtu odpovídajících si párů Ag a Ab
- **Využití** – průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. ***Toxoplasma gondii***



# Imunodifúze



- 1 a 2 částečně identické /některé determinanty navíc/
- 2 a 3 identické
- 3 některé determinanty navíc než 4
- 5 a 6 si neodpovídají

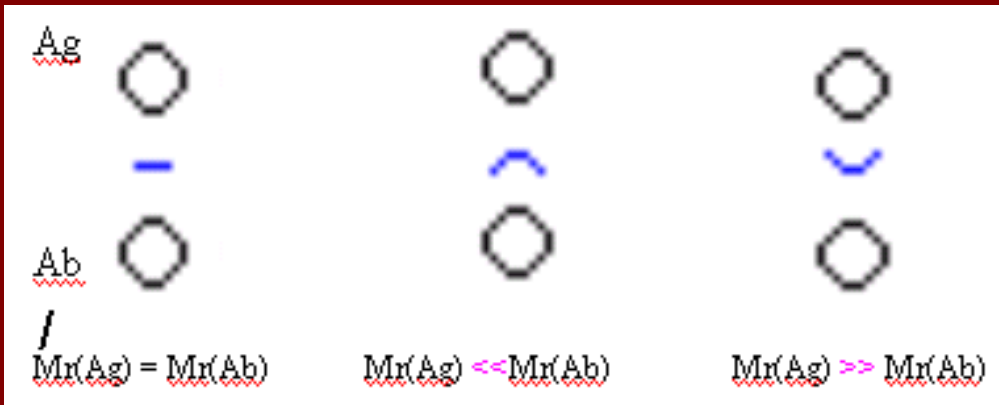
• - využití: Ag

titrace Ag –  
**koncentrace Ag**  
 určuje *umístění precipitační linie*

důkaz **přítomnosti Ab**

porovnávání **identity a neidentity Ag směsí**  
 určuje *místění precipitační linie*

porovnání  $M_r(\text{Ag})$  a  $M_r(\text{Ab})$  určuje  *tvar precipitační linie*



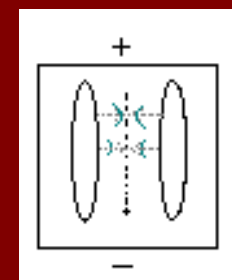
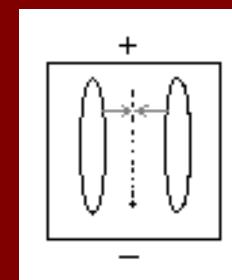
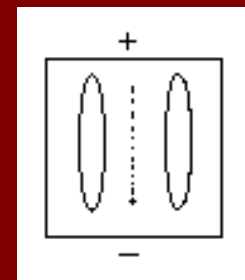
- *menší molekula se dostane dále do gelu*

# Souhrn využití ID

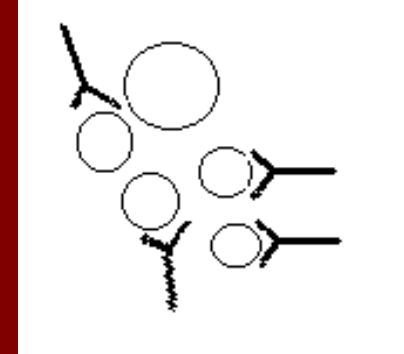
- Kvalitativní i kvantitativní stanovení Ag, a Ab, porovnání Ag směsí
- stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, *IgD*, složek komplementu a proteinů akutní fáze
- průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*
- *Nefelometrie, turbidimetrie*

# Imunoelektroforetické metody

- kombinace metod elektroforetických a imunodifúzních
- Bílkoviny se dělí v závislosti na molekulové váze a elektrické náboji jednotlivých molekul. Při běžné elfo se sérum dělí na zónu albuminu,  $\alpha - 1$ ,  $\alpha - 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  globulinů. Stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít význam při hodnocení stádia zánětlivého procesu. Při akutních zánětech stoupá zastoupení  $\alpha - 1$ , později i  $\alpha - 2$ , při chronických zánětech dochází ke zvýšení zastoupení  $\gamma$  globulinů a poklesu albuminu.
- imunoelektroforéza **podle WILLIAMSE a GRABARA**
- **RAKETOVÁ** imunoelektroforéza
- **PROTISMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **DVOJROZMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **Př. imunoelektroforéza podle WILLIAMSE a GRABARA:**
- - 1953 Williams a Grabar
- - 2 stupně: 1. **nalití destičky** ( agarózní gel s pufrům )
- vytvoření 2 žlábků a nanesení Ag mezi ně
- po rozdělení elektroforézou se do žlábků 2. napipetují **protilátky**
- inkubace 48 hodin v lednici ████████ dochází **k DIFUZI**
- ████████ místě ekvivalence se vytváří **PRECIPITAČNÍ obloučky**



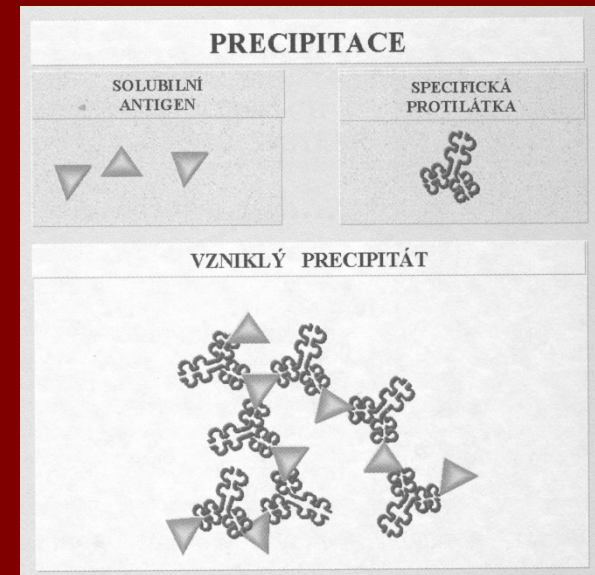
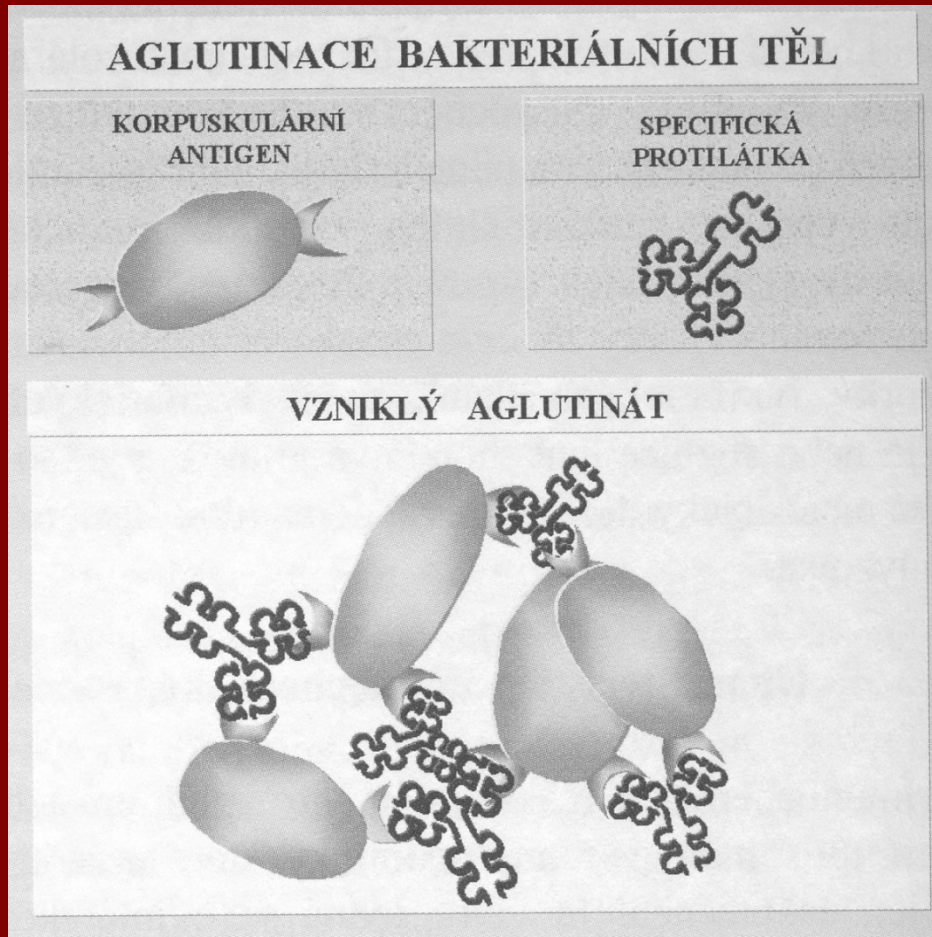
# Aglutinační metody



- Ag + Ab → Ag-Ab
- *aglutinogen* + *aglutinin* → *aglutinát*

- **princíp** : KORPUSKULÁRNÍ / částicový / Ag,
- solubilní je vázán částice
- při reakci dochází ke shlukování Ag a Ab na základě vytváření můstků - Ab mezi buňkami za vzniku shluků
- **přímá** – použití bakterií, buněk
- **nepřímá, pasivní** – na jejich povrch je Ag uměle navázán, př. latex-fixační test, HIT
- **Předpoklady ke vzniku vazeb:**
  1. dostatek Ab,
  2. přítomnost Ab proti různým epitopům
  3. vzdálenost mezi částicemi co největší
  4. Ab funkčně jednovazebné nevytváří aglutinaci (IgA mono, IgE, IgG) – inkompletní Ab viz hemaglutinace

# Rozdíl mezi aglutinací a precipitací



**Hodnocení aglutinace:**  
kvalitativně - odečtení  
okem

**kvantitativně :**

a) zjištěním ***množství aglutinátu***

b) zjištěním ***množství Ag***  
v aglutinátu či  
supernatantu



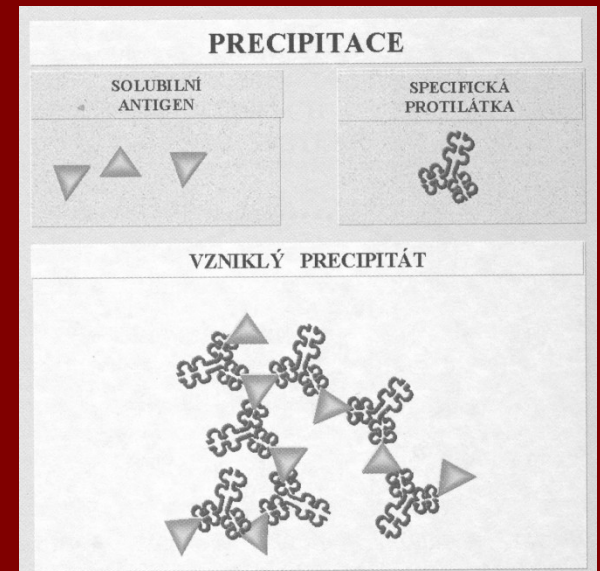
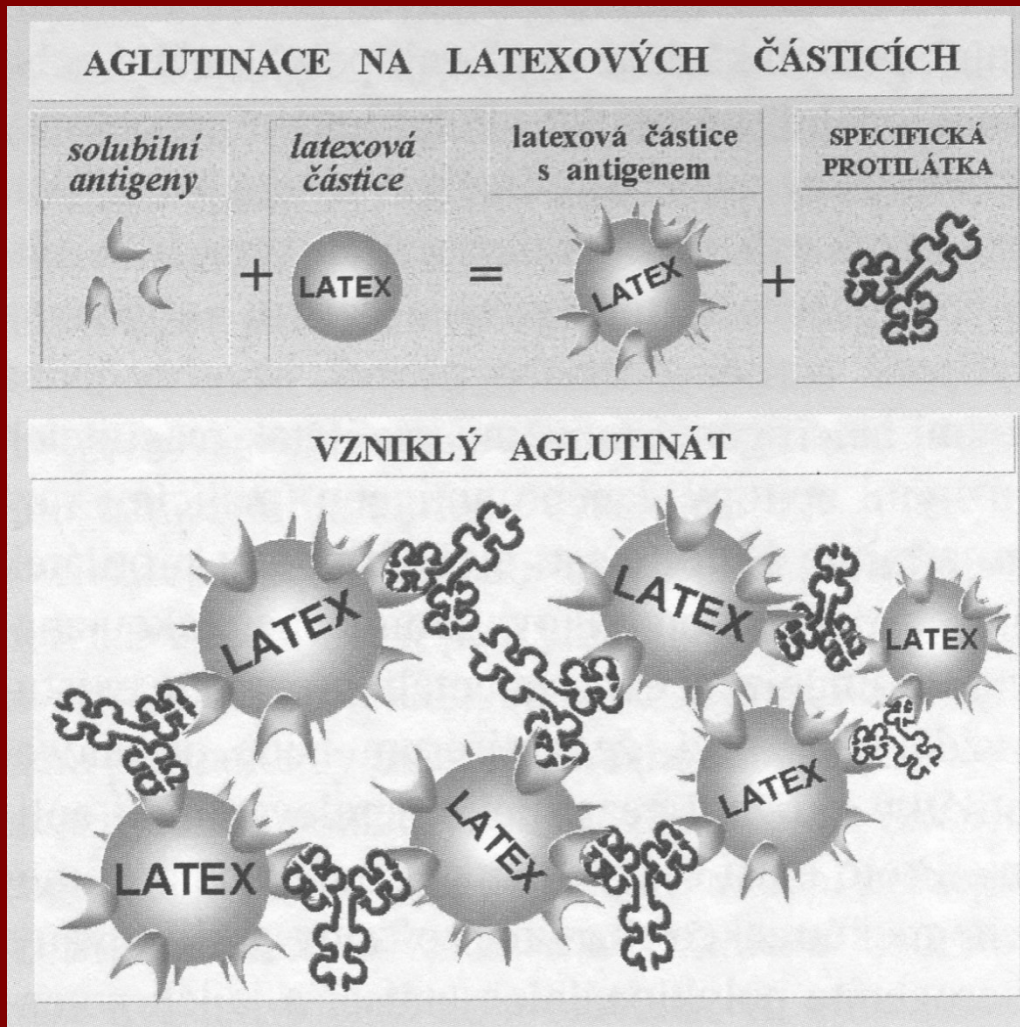
# Aglutinace

- **využití** : ke stanovení **Ag, Ab, H** (viz precipitační metody)
  1. K určování izolovaných bakteriálních kmenů
  2. K průkazu Ab proti patogenům – **Widalova reakce** – průkaz **tyfu** (*Salmonella typhi*), **paratyfu** (*Salmonella paratyphi*) A, B, C, **Weil-Felixova** – skvrnitého tyfu (*Rickettsia prowazekii*) *Proteus vulgaris*, Ab proti *Francisella tularensis*,
  3. K průkazu *Treponema* p., EBV – mononukleóza, brucelózy, listeriózy
  4. Nepřímá - k průkazu auto Ab proti štítné žláze, Ab proti autoAg

## **Latexová aglutinace, latex-fixační test**

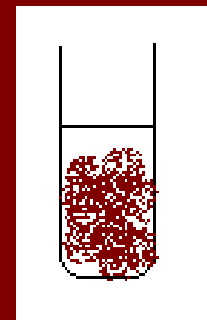
- **rychlé kvalitativní stanovení**
- **Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách**
- **Stanovení Ab proti IgG – revmatoidní faktor**
- **Průkaz patogenních Antigenů (*Helicobacter pylori*, Adeno a Rotavirus)**

# Latexová aglutinace, latex-fixační test



- *Tyfus* - *Salmonella typhi*
- *Paratyfus* - *Salmonella paratyphi A,B,C*  
podobné příznaky jako tyfus
- *Skvrnitý tyfus*, blechy, veš šatní, klíště -  
*Rickettsia prowazekii* - *Proteus vulgaris*,  
horečka, třesavka, vyrážka
- *Adenovirus, Rotavirus* *gastrointestinální*  
*infekce*

# Hemaglutinační



- Ag + Ab → Ag-Ab
- hemaglutinogen hemaglutin hemaglutinát
- - savčí krvinky (i části)
- - dochází ke **shlukování krvinek**, vlivem komplementu či virové částice pak dochází k **LYZI**.

Ke zviditelnění aglutinačních reakcí při použití inkompletních Ab je možno použít

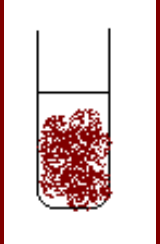
- a) aglutinaci v bílkovinném prostředí
- b) v prostředí s proteolytickými enzymy
- c) použitím antiglobulinového Coombsova séra - králičí ab proti lidským Ig

# Hemaglutinace

- **využití:** K zjišťování krevních skupin a průkaz Ab proti krevním elementům. **Přímý Coombsův test** – k průkazu navázaných antierytrocytárních Ab, reakce pacientových ery s Coombsovým antisérem, přítomnost navázaných Ab se projeví hemaglutinátem
- **Nepřímý Coombsův test** – k průkazu cirkulujících antierytrocytárních Ab
  - 1. fáze, pacientovo sérum s ery od dárce, navázání Ab pokud jsou přítomny, vmytí, přidání Coomsova séra, které způsobí aglutinaci
  - při 2 reakcích:
  - **KFR** – *komplement fixační reakce*
  - **HIT** – *hemaglutinačně inhibiční test* :

# HIT

- Patří také mezi metody serologické, založené na inhibici biologických účinků antigenů
- HIT – pasivní hemaglutinace
- Vycházíme ze skutečnosti, že viry (některé bakterie atd) mají schopnost se spontánně absorbovat na červené krvinky (rozpuštěný Ag).
- Ery pak aglutinují – shlukují se jen v přítomnosti specifické Ab



■ **odpovídá-li** protilátka Ag, po přidání obalených ERY Ag se Ag vyváže a vznikne **HEMAGLUTINÁT**

Ab + Ag - Ery ■ **hemaglutinát, proběhne hemaglutinace**



# HIT

*neodpovídá-li* protilátka virovému Ag, **nedojde k hemaglutinaci**

- situace, kdy přidáme stejný Ag do reakce
- $Ab + Ag - Ery \rightarrow$  **hemaglutinát** + stejný Ag  $\rightarrow$  **inhibice hemaglutinace**
- *Metodou inhibice pasivní hemaglutinace lze dokázat velmi malé mn. rozpustného Ag nebo H (metoda je velmi citlivá)*

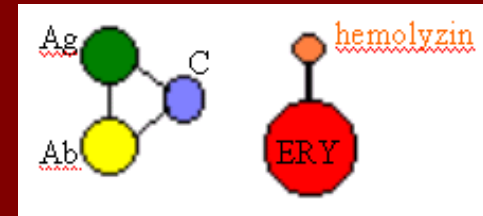
*pro vyhodnocení můžeme použít i optické metody*

**Využití:** Průkaz Ab proti patogen. Ag jako *Candida Albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Treponema pallidum*



# Komplementové metody

metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem  
– antigen-protilátka, KFR



- složky reakce: Ab, Ag, C, ERY, hemolyzin

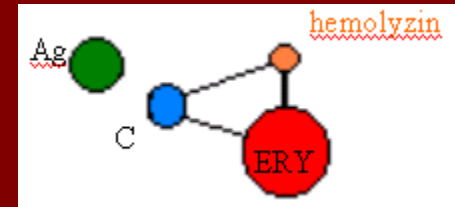
Ab- vyšetřované sérum

- chceme v něm **prokázat protilátku** / komplement  
v séru je tepelně inaktivován /

známý specifický Ag

- jsou-li v séru Ab, vytvoří se **imunokomplex IK**

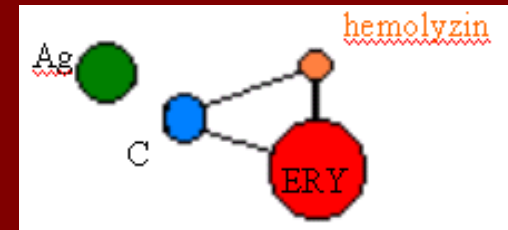
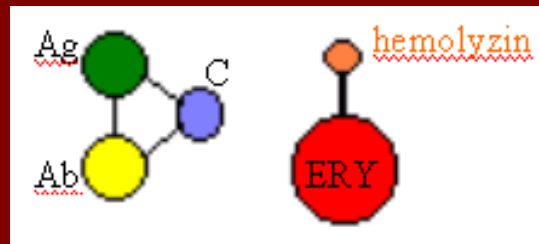
**KOMPLEMENT** - zdrojem nejčastěji sérum  
morčete (**váže se na IK a aktivuje protilátku**)



**hemolytický komplex: komplex Ag /beraní ERY/  
a protilátky AMBOCEPTORu /hemolyzinu/,  
získaného imunizací králičího séra beraními  
erythrocyty**

- aby došlo k hemolýze je nutná **spoluúčast  
KOMPLEMENTU** a inkubace 30 minut při 30 °C

# KFR



- průběh reakce:
- \* **POZITIVNÍ** ve vyšetřovaném séru *je Ab*
- protilátka v séru vytvoří **komplex s Ag** – na něj se **naváže komplement**. Po přidání hemolytického systému **nezbývá** již komplement **do 2. části reakce**
- **hemolýze NEDOJDE:**
- \* **NEGATIVNÍ** ve vyšetřovaném séru *není Ab*
- - v 1. fázi reakce se **nevytvoří IK** – **komplement se nevyváže** a zbývá do 2. fáze reakce, kdy **aktivuje hemolyzin**
- **OJDE** k hemolýze:
- - velmi **záleží na množství komplementu** – **každý vzorek se musí titrovat**, aby bylo množství komplementu konstantní

# KFR - využití

- **použití:**

- **diagnostika nemocí** příjice /*syphilis*/, Stanovení

Ab proti patogenním Ag bakterie (Bordetella, Brucella, Borrelie, Campilobacter,...), viry (Adenov. Cytomegalov., EBV...), prvoci (Toxoplazma...)

- **ve virologii** průkaz protilátek téměř všech virových nákaz

- **typizace neznámých Ag** nově izolovaných virů

- **průkaz protiorgánových Ab**

# Vyšetření komplementového systému

- Stanovují se

- a) hladiny jednotlivých složek K v séru –  
za pomoci antisér, většinou proti C3, C4, C1q

- b) celková aktivita komplementové kaskády-

Se provádí testem CH50 – (50% hemolýza způsobená komplementem), stupeň hemolýzy závisí na množství přidaného K, nepřímá úměra

**Využití:** K detekci poruch nedostatečného mn. Nebo defektů složek K systému

Reakční směs:

2% nálev krvinek, Ab(hemolyzin), C komerční (vyšetřované sérum)

Výsledek: lýze buněk, vyčteření

# *Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK*

- Principy metodik
  - Ag+Ag=IK, CIK, DIK
1. Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

# Vyšetření CIK

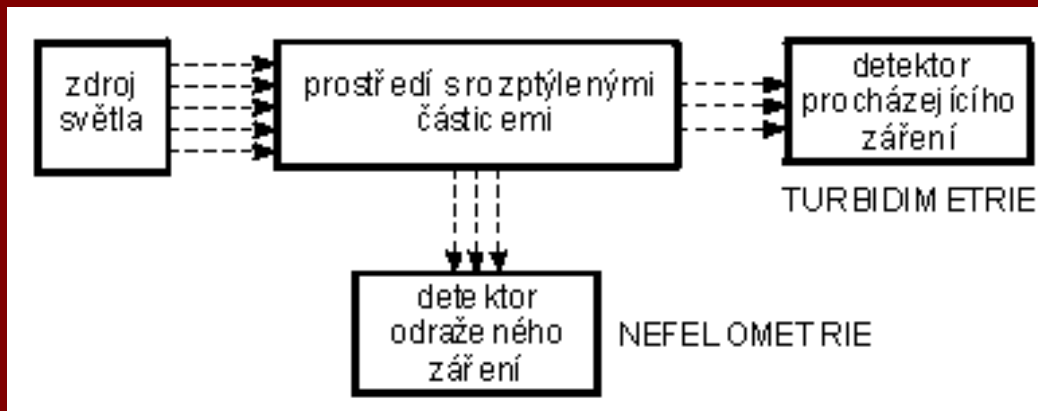
- 2. CIK na sebe váží C1 – C3 složky K. V první fázi se odstraní nenavázaný C1q. V druhé fázi se stanoví koncentrace C1q, jež odráží i hladinu CIK (totéž pro C3,C4)
- 3. průkaz vazbou na buňky, které exprimují receptor pro Fc fragment IgG. Lze využít trombocyty, žírné, fagocyty
- **Využití:** Pro monitoring jakýchkoliv zánětlivých procesů. Pro diagnostiku imunokomplexových chorob je důležitější průkaz IK deponovaných v tkáních. To se provádí po bioptickém odběru vzorku z tkáně (kůže, svaly, ledviny) pomocí přímé fluorescence se prokazuje uložení IgG

# Zákalové reakce

metoda probíhající v roztoku

**Princip:** při reakci Ag a Ab vzniká zákal-precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství mn. Ab úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag

**\*NEFELOMETRIE** – rozptyl monochrom. světla měřeného pod úhlem, měří se intenzita záblesků světla odraženého od IK (Tyndal. efekt), výbojka nebo laser



**TURBIDIMETRIE** – úbytek monochrom. světla o 320nm při průchodu vzorkem v kyvetě měřeného ve stejné rovině  
Výhoda: možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena, dioda, méně přesná

**Využití:** Stanovení c Ig, hlavních sérových proteinů, stanovení sérových bílk.(složky C, proteiny akut. fáze (CRP – stand. 2mg/l, transferin, alfa2 – makroglobulin)

**Úskalí:** V prec. křivce je třeba vymezit oblasti:

a) zóna využitelná pro měření, tj oblast nadbytku Ab

b) **Kritický bod, oblast ekvivalence**, zde leží nejvyšší konc. Ag, kterou lze ještě měřit

c) **oblast za krit. bodem**, zde nelze měřit

Dva režimy stanovení

a) **End point** – měří se v prostředí polyetylenglykolu

b) **Rate kynetický systém** – měří se kineticky , v krátkých časových intervalech