# 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)

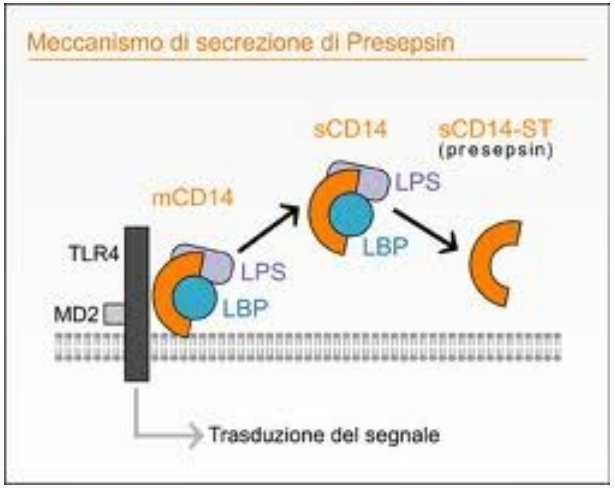
Materiál: **U,P,S**

# NGAL

Cut off - moč:132 ng/ml

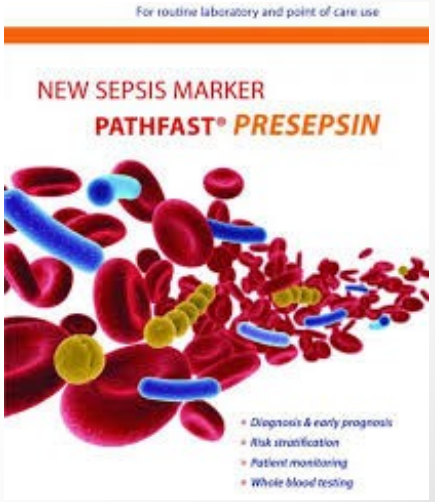
# Presepsin

- 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
- mechanizmus 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-$PLA_2$

**- fosfolipáza $A_2$ 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-$PLA_2$ poukazuje na **nestabilní atrosklerotický plát,** může vést k IM nebo CMP
- nízká hladina Lp-$PLA_2$ - **stabilní aterosklerotický plát**
  prokázána **negativní prediktivní hodnota**

# Stanovení Lp-$PLA_2$ - PLAC test

- ELISA
- Fotometrická metoda

# Cut off

Hodnoty Lp-$PLA_2$ menší než 200ng/ml - nízké riziko

Hodnoty Lp-$PLA_2$ v rozmezí 200-235ng/ml – hraniční riziko

Hodnoty Lp-$PLA_2$ větší než 235ng/ml - považovány za vysoké riziko

# Predikční markery preeklampsie, Roche

**PlGF - placentární růstový faktor**

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

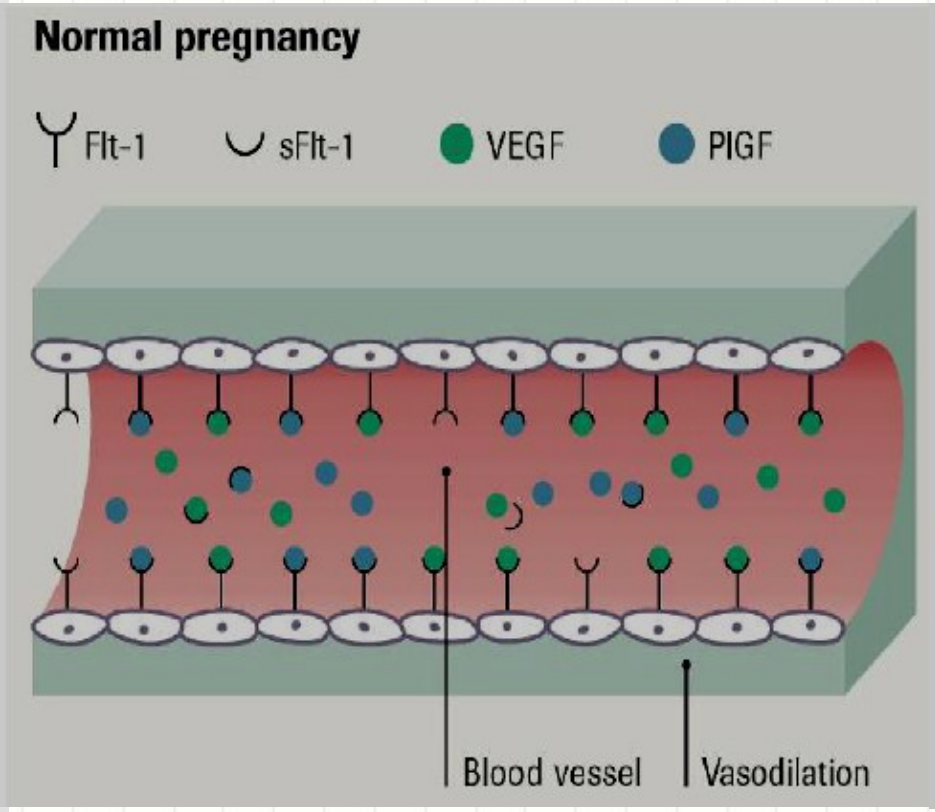
**sFlt-1 - rozpustná tyrozinkináza-1**

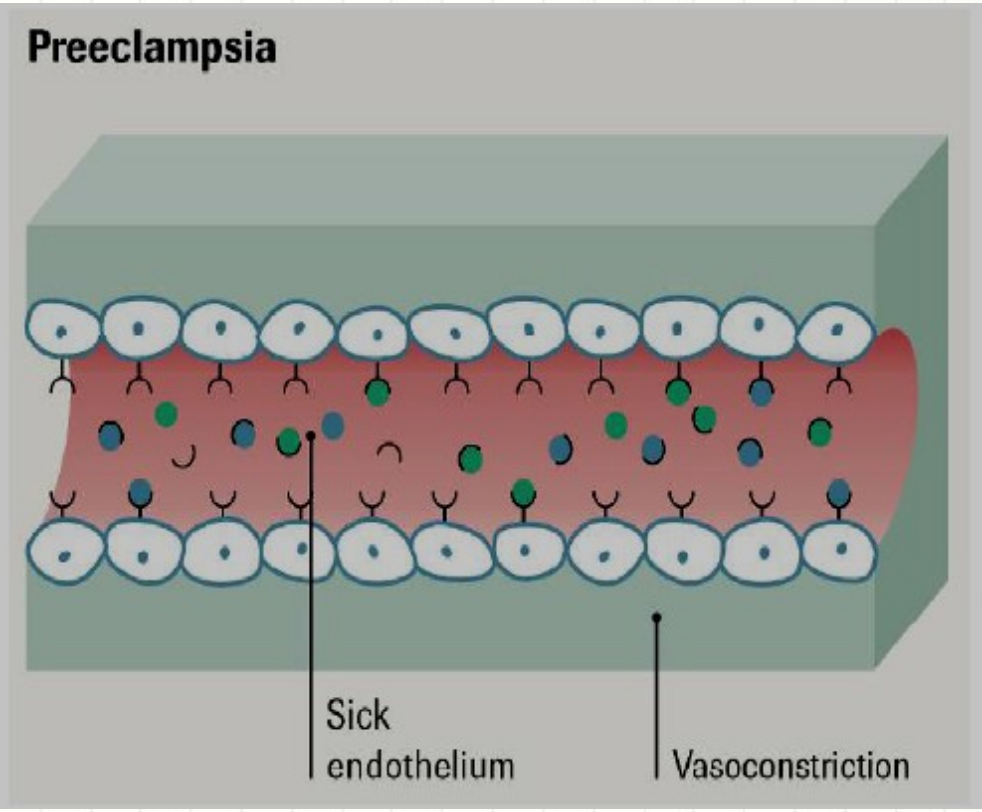
- **má vliv na ukončení těhotenství**
- hladina zůstává stabilní v prvních dvou trimestrech, pak narůstá až do porodu
- **u preeklampsie** se sFlt-1 **zvyšuje** již v časných fázích gravidity
- zvýšení je spojeno s ischémií a hypoxií

**Poměr sFlt-1/PlGF**

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

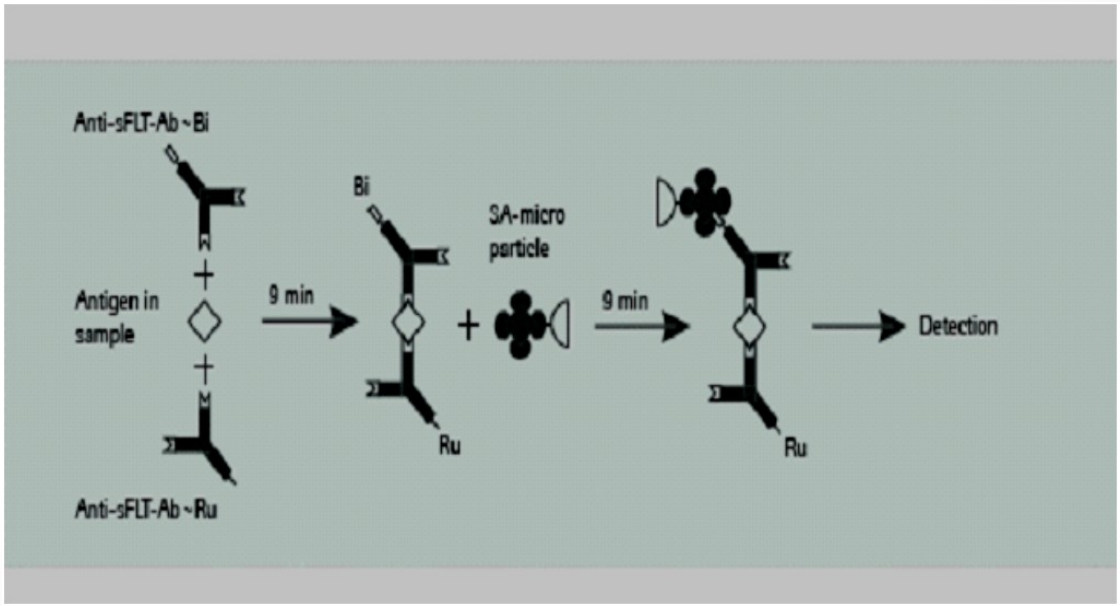
# Aktivita sFlt-1 a PlGF na endotelu cév během normálního těhotenství a při preeklampsii



# Princip stanovení sFlt-1, PlGF

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

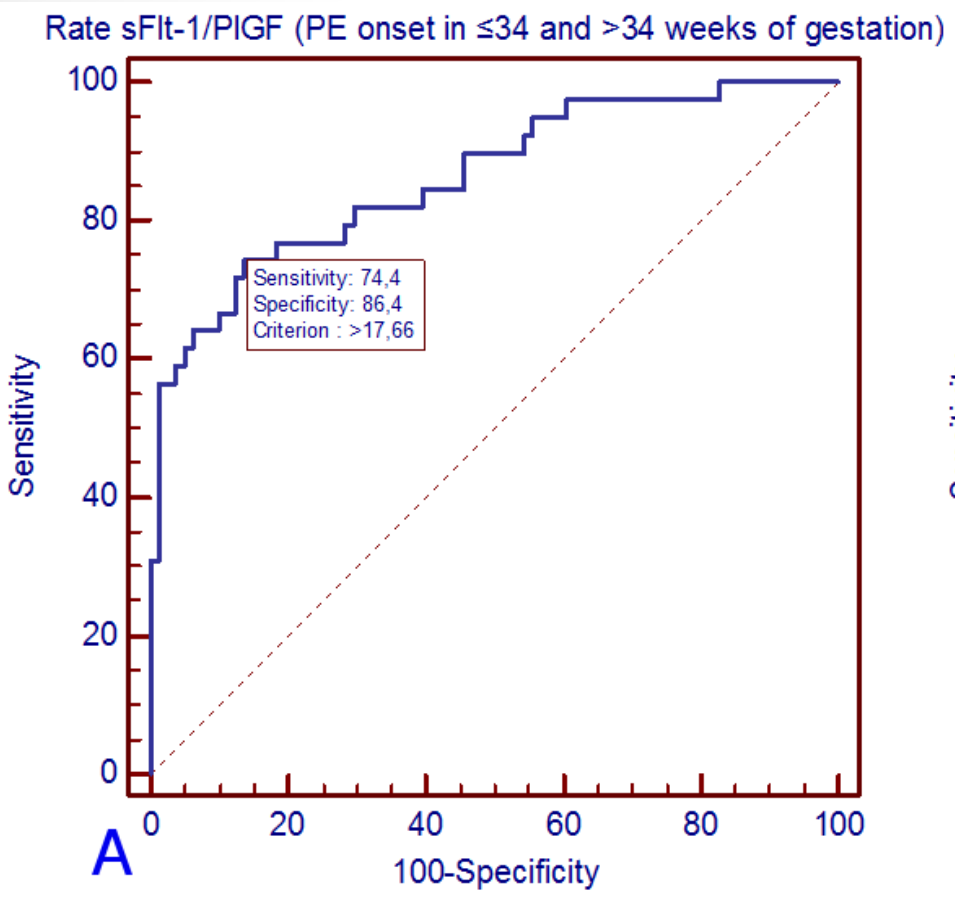



**Princip stanovení sFlt-1**

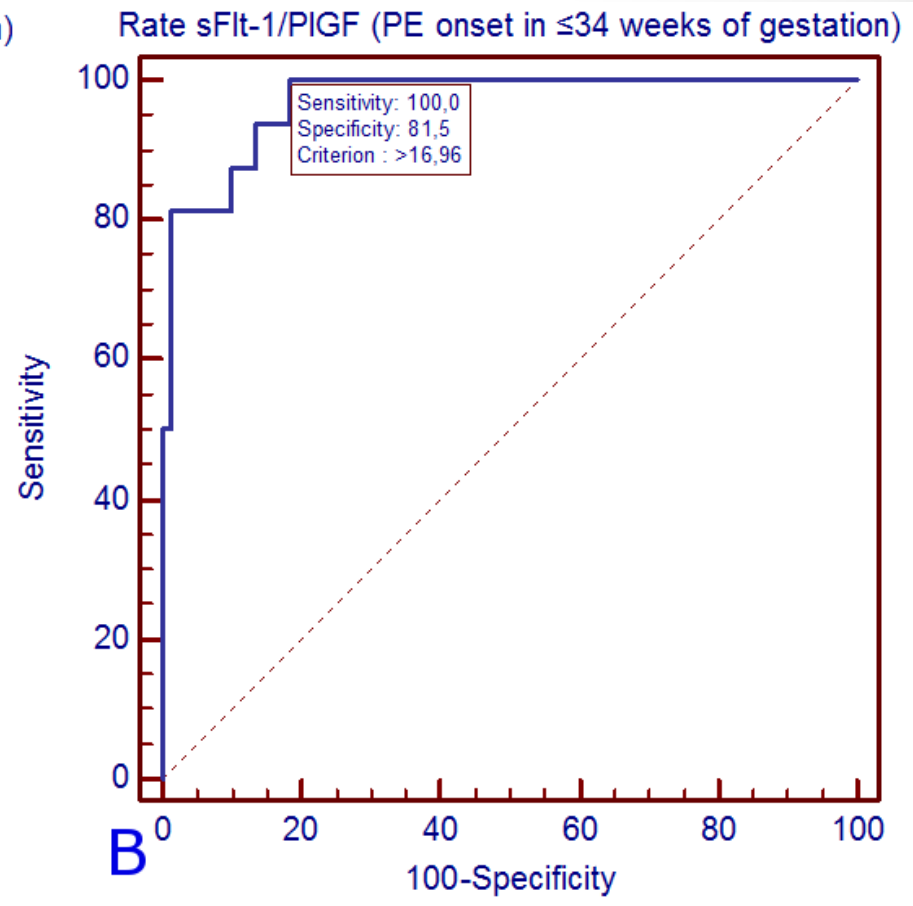
# ROC křivka pro poměr sFlt-1/PlGF – 16.-20. týden gravidity

**Časná PE**

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




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



# 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-a-hydroxysteroiddehydrogenasa** (3-a-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 µmol/l |
| Těhotné: | | do 11 µmol/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)**<br>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)<br>při hodnotách kolem 150 pg/ml je téměř 100% jistota existence tumoru<br>při hodnotách > 200 pg/ml se v 99% případů jedná právě o SCLC |

# Metody stanovení

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

# AMH
# (Anti- Műllerianní hormon)

- **Műllerian 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 vitaminu B12 způsobuje únavu, perniciózní anémii, zhoršení neurologických funkcí
- Příčinou deficience vitaminu 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 deficience vitaminu 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 imunochemickch metod firmy Roche

# GDF-15 (Growth diferentiation 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 imunochemickch metod firmy Roche