

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Adéla Brzáková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**VÝZNAM STANOVENÍ DFS-70 VE SKUPINĚ
ANTINUKLEÁRNÍCH PROTILÁTEK (ANA)**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. et Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adéla BRZÁKOVÁ**
Osobní číslo: **Z18B0125P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Význam stanovení DFS-70 ve skupině antinukleárních protilátek (ANA)**
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- SHOENFELD, Yehuda, Terezie FUČÍKOVÁ a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Autoimunita: onitřní nepřítel*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-2044-9.
- LUKEŠOVÁ, Šárka. Imunologie, autoimunitní onemocnění. *Medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o. 2016, 13(4), 171-174.
- HRDÁ, Pavlína, Ivan ŠTERZL. Vyšetření autoprotilátek – současné možnosti. *Interní medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o. 2003, 5(8), 410-413.
- ARAGÓN, Cristian-Camilo, et al. *Anti-DFS70 antibodies: A new useful antibody in the exclusion of auto-immune diseases*. *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)* [online]. 2018, 25(2), 104-111 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/j.rcreue.2018.01.002. ISSN 24444405. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2444440519300020>

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Bc. Tomáš Vlas**
Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



PhDr. Lukáš Štich, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 29. ledna 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 27. 3. 2021.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Brzáková Adéla

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Význam stanovení DFS-70 ve skupině antinukleárních protilátek (ANA)

Vedoucí práce: Ing. et Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 42

Počet stran – nečíslované: 20

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 18

Klíčová slova: DFS-70, protilátky, ELISA, imunoblot, nepřímá imunofluorescence

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá významem stanovení protilátek proti antigenu DFS-70 u pacientů, u nichž byla metodou nepřímé imunofluorescence prokázána přítomnost antinukleárních protilátek. Protilátky anti-DFS70 reprezentují potenciálně důležitý biomarker, který může být klinicky využit k vyloučení diagnózy systémového onemocnění pojiva. Nevýhodou nepřímé imunofluorescence je však její nízká specifita pro tento typ onemocnění, což limituje přesnou diagnózu. Je tedy doporučováno potvrdit přítomnost protilátek anti-DFS70 dalšími metodami. V této práci jsem provedla stanovení protilátek anti-DFS70 metodou ELISA a imunoblot. Vzájemný vztah těchto metod jsem zhodnotila na základě korelace naměřených výsledků. Následně jsem porovнала počty pozitivit získaných těmito metodami s počtem pozitivních výsledků získaných prostřednictvím nepřímé imunofluorescence. Mezi metodami ELISA a imunoblot byla prokázána velmi silná kladná korelace. Dále bylo zjištěno, že četnost pozitivit získaných metodou ELISA je ve velmi těsné shodě s počtem pozitivit získaných nepřímou imunofluorescencí. Pro potvrzení přítomnosti protilátek anti-DFS70 bych se tedy přikláběla k testování metodou ELISA.

Abstract

Surname and name: Brzáková Adéla

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: The significance of determination of DFS-70 in a group of antinuclear antibodies (ANA)

Consultant: Ing. et Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 42

Number of pages – unnumbered: 20

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 18

Keywords: DFS-70, antibodies, ELISA, immunoblot, indirect immunofluorescence

Summary:

This bachelor thesis deals with the significance of determination of anti-DFS70 antibodies in ANA-positive patients captured by IIF testing. Anti-DFS70 antibodies represent a potentially important biomarker that can be used to exclude the diagnosis of systemic autoimmune rheumatic diseases. However, the disadvantage of IIF is its low specificity for this type of disease, which limits the accurate diagnosis. Therefore, it is recommended to confirm the presence of these antibodies by other methods. In this work, I performed the determination of anti-DFS70 antibodies by ELISA and immunoblot. I evaluated the conformity of these methods based on the correlation of the measured results. Subsequently, I compared the number of positives obtained by these methods with the number of positives obtained through the IIF. Between ELISA and immunoblot was found a very strong positive correlation. Also, it was found that the frequency of positives obtained by ELISA is in very close conformity with the number of positives obtained by IIF. Therefore to confirm the presence of anti-DFS70 antibodies, I would be inclined to ELISA.

Předmluva

Protilátky anti-DFS70 nabývají v posledních letech čím dál většího významu, a to zejména z hlediska klinické relevance. K tomu vedlo především zjištění, že tyto protilátky mohou sloužit jako potenciálně důležitý biomarker pro vyloučení diagnózy systémového onemocnění pojiva. Nepřímá imunofluorescence má však pro tento typ onemocnění nízkou specifitu, což limituje přesnou diagnózu především u ANA-pozitivních pacientů s nespecifickou symptomatologií. Je tedy doporučováno potvrdit přítomnost protilátek anti-DFS70 pomocí dalších specifických metod. Cílem této bakalářské práce je zjistit zastoupení positivity znaku DFS-70 metodami ELISA a imunoblot u pacientů, u nichž byla nepřímou imunofluorescencí zjištěna pozitivita antinukleárních protilátek společně se specifickým typem fluorescenčního obrazu a z naměřených hodnot následně vyhodnotit, zda se výsledky získané jednotlivými metodami shodují.

Poděkování

Děkuji Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 AUTOIMUNITA	17
1.1 Autoimunitní onemocnění	17
1.1.1 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění	18
1.1.2 Systémová autoimunitní onemocnění.....	20
1.2 Autoprotilátky a autoantigeny.....	22
2 ANTINUKLEÁRNÍ PROTILÁTKY	23
2.1 Anti-ENA protilátky	24
3 DFS-70.....	26
3.1 Struktura antigenu DFS-70	27
3.2 Protilátky anti-DFS70	28
4 METODY DETEKCE	31
4.1 Nepřímá imunofluorescence	31
4.2 ELISA	33
4.3 Imunoblot.....	34
PRAKTICKÁ ČÁST	35
5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	35
5.1 Hlavní cíl.....	35
5.2 Dílčí cíle.....	35
6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	36
7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	37
8 METODIKA PRÁCE	38
8.1 Test nepřímé imunofluorescence: ANA Mosaic 1 EUROPattern	38
8.1.1 Hodnocení nepřímé imunofluorescence	40
8.2 Anti-DFS70 ELISA (IgG)	41
8.2.1 Hodnocení testu Anti-DFS70 ELISA (IgG)	43
8.3 ANA+DFS-70 IgG Immunodot	43
8.3.1 Hodnocení testu ANA+DFS-70 IgG Immunodot.....	45
9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	49
9.1 Porovnání výsledků metody ELISA a imunoblot.....	50

9.2	Porovnání metody ELISA a NIF	52
9.3	Porovnání metody imunoblot a NIF	53
	DISKUZE	54
	ZÁVĚR.....	57
	SEZNAM LITERATURY.....	58
	SEZNAM PŘÍLOH	61
	PŘÍLOHY	62
	Příloha A – Souhlas s poskytováním informací	62

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků u metody ELISA a IB.....	50
Graf 2: Korelační graf znázorňující závislost mezi metodami ELISA a IB	51
Graf 3: Porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků u metody ELISA a NIF ...	52
Graf 4: Porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků u metody IB a NIF.....	53

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura antigenu DFS-70/LEDGFp75	27
Obrázek 2: Schéma fluorescenčního mikroskopu	32
Obrázek 3: Znáornění průběhu reakce při nepřímém uspořádání metody ELISA	33
Obrázek 4: Podložní sklíčko s biočipy pokrytými HEp-2 buňkami	38
Obrázek 5: Schéma provedení testu nepřímé imunofluorescence	40
Obrázek 6: Fluorescenční obraz charakteristický pro pozitivitu DFS-70	41
Obrázek 7: Mikrotitrační destička připravená k fotometrickému měření	43
Obrázek 8: Rozmístění jednotlivých antigenů na testovacím stripu	46
Obrázek 9: Přístroj BlueDiver s vloženými testovacími stripy a reagenčními kartridžemi	47
Obrázek 10: Testovací stripy po provedení imunodotové metody	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Orgánově specifická autoimunitní onemocnění	19
Tabulka 2: Systémová autoimunitní onemocnění	21
Tabulka 3: Výskyt specifických anti-ENA protilátek u autoimunitních chorob	25
Tabulka 4: Prevalence protilátek anti-DFS70 v sérech pacientů a u zdravých kontrol.....	30

SEZNAM ZKRATEK

AARD	Z angl. Associated Autoimmune Rheumatic Diseases
ACLA.....	Protilátky proti kardiolipidům
AIDS	Z angl. Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANA.....	Antinukleární protilátky
ANCA	Protilátky proti cytoplazmě neutrofilů
ATP	Adenosintrifosfát
DFS	Z angl. Dense Fine Speckled
EDTA.....	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EIA.....	Z angl. Enzyme Immunoassay
ELISA	Z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENA	Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům
FITC.....	Fluorescein isothiokyanát
HEp-2.....	Z angl. Human Epithelial type 2
IB	Imunoblot
IgA	Imunoglobulin izotypu A
IgG	Imunoglobulin izotypu G
IgM.....	Imunoglobulin izotypu M
IIF.....	Z angl. Indirect Immunofluorescence
LED.....	Z angl. Light-Emitting Diode
LEDGF.....	Z angl. Lens Epithelium-Derived Growth Factor
MCTD.....	Z angl. Mixed Connective Tissue Diseases

NIF Nepřímá imunofluorescence

PBS Z angl. Phosphate Buffered Saline

RA Revmatoidní artritida

SARD..... Z angl. Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases

SID Sekundární imunodeficiencie

SLE Systémový lupus erythematosus

SS Sjögrenův syndrom

SSc Systémová sklerodermie

TSH..... Thyreotropní hormon

UV Z angl. ultraviolet

ÚVOD

Antinukleární protilátky (ANA) představují klíčový sérologický znak systémových onemocnění pojiva (SARD), mezi která patří například systémový lupus erythematoses (SLE), systémová sklerodermie (SSc), smíšené onemocnění pojivové tkáně (MCTD) nebo Sjögrenův syndrom (SS). Nejběžněji využívanou metodou screeningového vyšetření ANA je nepřímá imunofluorescence (NIF). Úskalím této metody je ovšem její nízká diagnostická specifita pro SARD. V tomto ohledu nabyly významu protilátky proti antigenu DFS-70, jejichž přítomnost byla prokázána u ANA-pozitivních zdravých jedinců, u kterých v rámci následujících několika let od testování nedošlo k rozvoji žádného autoimunitního onemocnění. Z tohoto důvodu by mohla přítomnost protilátek anti-DFS70 sloužit jako vylučovací kritérium pro diagnózu SARD. Vzhledem k nízké specifitě NIF pro SARD a subjektivitě hodnocení fluorescenčních vzorů je však doporučováno, potvrdit nález těchto protilátek dalšími specifickými metodami.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit protilátky anti-DFS70 u ANA-pozitivních pacientů pomocí metody ELISA a imunoblot a následně zhodnotit, zda se jejich výsledky shodují. Dalším úkolem bylo porovnat hodnoty naměřené těmito metodami s četností pozitivit získaných nepřímou imunofluorescencí a na základě toho rozhodnout, zda by tyto metody mohly sloužit jako kontrolní test pro stanovení protilátek anti-DFS70.

V teoretické části této práce jsem se nejprve věnovala samotné autoimunitě a chorobám, které jsou s ní spojeny. Druhá kapitola je zaměřená na antinukleární protilátky, do kterých spadá i námi zkoumaná protilátka anti-DFS70. Antigen DFS-70 a protilátkám proti němu namířeným byla pak věnována kapitola třetí. Závěrečná pasáž teoretické části této práce obsahuje obecné principy metod, které byly využity ke stanovení protilátek anti-DFS70.

Praktická část této práce obsahuje jednotlivé podrobné postupy použitých metod, zpracování dat, které jsme pomocí nich získali a na závěr i hodnocení výsledků a shrnutí, zda by mohly být testované metody využívány pro kontrolní stanovení protilátek anti-DFS70.

TEORETICKÁ ČÁST

1 AUTOIMUNITA

Imunitní systém je jedním ze základních řídicích prvků našeho těla a spolu se systémem nervovým a endokrinním se podílí na udržování homeostázy. Jedním z jeho hlavních úkolů je rozeznávat škodlivé od neškodného, čímž chrání náš organismus před různými exogenními či endogenními škodlivinami. Další důležitou funkcí imunitního systému je autotolerance. Ta zajišťuje, že imunitní systém správně rozpoznává vlastní struktury a neútočí na ně. Je-li tato funkce porušena, imunitní systém se začne k vlastním tkáním a orgánům chovat jako k nepřátelským, bude na ně chybně reagovat a tím je poškozovat. O tomto stavu hovoříme jako o tzv. autoimunitě. Ta může být fyziologická (odstraňování starých a poškozených buněk) nebo poškozující, kdy hrozí riziko vzniku autoimunitního onemocnění. (Hořejší et al. 2017)

1.1 Autoimunitní onemocnění

Jako autoimunitní onemocnění označujeme stav, kdy došlo k porušení autotolerance, fyziologická autoimunita se změnila v patologickou a imunitní systém abnormálně reaguje na antigeny tělu vlastní (tzv. autoantigeny). Autoimunitní reakce může být jak humorálního, tak i buněčného typu. V případě humorální reakce dochází k produkci protilátek namířených proti vlastním tkáním (hovoříme o tzv. autoprotilátkách). Pro tyto autoprotilátky je charakteristické, že se vyskytují ve vysokém titru, mají vysokou afinitu a většinou jsou izotypu IgG. Autoprotilátky mohou poškozovat tkáň pomocí cytotoxických mechanismů, tvorbou a ukládáním imunokomplexů nebo vyvoláním funkčních změn u buněk či proteinů, na které jsou navázány. Během reakce buněčného typu jsou buňky tělu vlastní napadány autoreaktivními T-lymfocyty. V obou případech dochází k rozvoji zánětlivého procesu, který narušuje normální funkci příslušné tkáně. (Hořejší et al. 2017)

Na vzniku autoimunitních chorob se podílí řada vnějších i vnitřních faktorů. Můžeme tedy říct, že autoimunita má multifaktoriální charakter (tzv. mozaika autoimunity). Hlavním vnitřním faktorem je genetická predispozice, z čehož vyplývá, že mnoho autoimunitních chorob je dědičných. Zda se onemocnění projeví, závisí pak na dalších faktorech, mezi které patří například věk pacienta, hormonální regulace, přidružené choroby, bakteriální infekce nebo UV záření. (Hořejší et al. 2017)

Pro diagnostiku autoimunitních chorob je klíčový rozbor anamnézy, klinických příznaků, objektivního nálezu a laboratorního vyšetření. Autoimunitní onemocnění se nejčastěji vyskytují u žen mladšího věku a celkově postihují 5-8 % populace, čímž představují poměrně závažný medicínský problém. (Kondelíková 2008)

Podle Wittebského kritérií se jedná o autoimunitní onemocnění v případě, kdy je možné charakterizovat autoantigen a zároveň jsme schopni poškozující reakci reprodukovat *in vitro* nebo *in vivo* (přenosem sérových faktorů nebo buněk na zvíře). Tato kritéria však splňuje pouze několik onemocnění, neboť u řady chorob není charakterizován autoantigen nebo se dané onemocnění nedaří reprodukovat experimentálně. (Hořejší et al. 2017)

Autoimunitní onemocnění se dělí na orgánově specifická a systémová. Pro systémová autoimunitní onemocnění je typická tvorba autoprotilátek proti orgánově nespecifickým antigenům. U orgánově specifických autoimunitních chorob dochází k autoreaktivitě vůči antigenům, které jsou exprimovány určitým typem orgánu, nebo tkáně. I tento typ onemocnění je doprovázen přítomností autoprotilátek nebo orgánově specifických autoreaktivních T-lymfocytů. Mezi orgánově specifickými a systémovými autoimunitními chorobami neexistuje ostrá hranice a na jejich pomezí se nachází ještě skupina třetí. Do ní spadají imunopatologické choroby, které jsou charakteristické postižením převážně jednoho orgánového systému, vyskytují se u nich autoprotilátky proti orgánově nespecifickým antigenům a jsou provázeny celou řadou systémových příznaků. Tento typ označujeme jako orgánově lokalizovaná onemocnění. (Lukešová 2016)

1.1.1 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění

U této skupiny chorob se autoimunitní reakce zaměřuje na struktury specifické pro určitý orgán. V séru pacienta můžeme nalézt autoprotilátky proti cílovým autoantigenům daných tkání. Kromě protilátek se na poškozování příslušného orgánu či tkáně, v rámci cytotoxické reakce, podílejí také autoreaktivní T-lymfocyty. (Lukešová 2016)

Přehled orgánově specifických autoimunitních onemocnění je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Orgánově specifická autoimunitní onemocnění

Skupina	Onemocnění	Zaměření autoprotilátek nebo autoreaktivních lymfocytů
Autoimunitní endokrinopatie	Hashimotova tyreoiditida	Tyreoglobulin a mikrozomy tyreocytů
	Gravesova-Basedowova choroba, tyreotoxikóza	Receptor pro TSH
	Juvenilní diabetes mellitus	Antigeny β -buněk pankreatu
	Addisonova choroba	Antigeny kůry nadledvin
	Atrofická gastritida a perniciózní anémie	Žaludeční H ⁺ /K ⁺ ATP-áza
	Autoimunitní poruchy reprodukce a syndrom předčasného ovariálního selhání	Různé antigeny gonád, zejména enzym účastnící se steroidogeneze
	Autoimunitní polyglandulární syndromy	Kombinace různých předchozích protilátek
Autoimunitní neurologická onemocnění	Myasthenia gravis	Acetylcholinový receptor
	Periferní demyelinizační neuropatie, syndrom Guillaina-Barrého	Gangliosidy
	Roztroušená skleróza	Bazický myelinový protein
Autoimunitní cytopenie	Hemolytická anémie	Membránové erytrocytární antigeny
	Trombocytopenie	Trombocytární antigeny
	Neutropenie	Membránové antigeny neutrofilů
Autoimunitní kožní onemocnění	Pemphigus	Bazální vrstva epidermis
	Psoriáza	Dosud neznámý autoantigen (nejspíše cytokeratin)
	Vitiligo	Kožní melanocyty
Autoimunitní oční onemocnění	Uveitis	Retinální antigen S

Zdroj: Shoenfeld et al. 2007 (přepřacováno)

1.1.2 Systémová autoimunitní onemocnění

Pro tuto skupinu chorob je typické, že autoantigeny můžeme nalézt téměř ve všech typech buněk v těle a proto zpravidla dochází k postižení více orgánů či tkání. Jejich projev je silně ovlivněn genetickou predispozicí, životním prostředím, hormonální regulací nebo epigenetickými faktory. Během tohoto typu onemocnění dochází k tvorbě orgánově nespecifických autoprotilátek, které mohou být namířeny například proti jaderným strukturám. (Lukešová 2016)

Mezi tento typ chorob patří například systémová onemocnění pojiva (SARD). Jedná se o skupinu chronických zánětlivých onemocnění, která mohou kromě pohybového aparátu (klouby, šlachy a svaly) napadat i řadu dalších orgánů (například srdce, kůži nebo plíce). Tyto zánětlivé stavy způsobují nejen postižení či selhání orgánů, ale v některých případech mohou vést až k předčasnému úmrtí. Patří mezi ně například systémový lupus erythematosus, systémová sklerodermie, zánětlivé myopatie (například polymyositis a dermatomyositis) nebo Sjögrenův syndrom. Léčba těchto onemocnění spočívá v dlouhodobé farmakoterapii, přičemž v akutní fázi onemocnění se jedná především o glukokortikoidy. Kvůli vedlejším účinkům těchto léčiv však není doporučováno jejich dlouhodobé užívání, a tak se často přechází na léčbu antimalariky či imunosupresivy. (Haag 2018)

Přehled systémových autoimunitních onemocnění je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Systémová autoimunitní onemocnění

Onemocnění	Typický klinický obraz	Zaměření autoprotilátek
Systémový lupus erythematoses	Multiorgánové systémové onemocnění, bolesti kloubů, postižení kůže, ledvin a CNS	Jaderné antigeny (ANA, anti ds-DNA, anti-Sm), krevní elementy
Revmatoidní artritida	Zánětlivé postižení kloubů, bolestivost a ranní ztuhlost kloubů	Fc části imunoglobulinů (revmatoidní faktor)
Dermatopolymyozitida	Svalová slabost a bolestivost, typický ekzém nad klouby ruky, ve výstřihu a obličeji, nafialovělé otoky víček	Extrahovatelné jaderné antigeny Jo-1, PM/ScI
Sjögrenova choroba	Suchost sliznic, bolesti kloubů, nebezpečí vzniku srdeční poruchy u plodu těhotných žen	Extrahovatelné jaderné antigeny (SS-A, SS-B)
Systémová sklerodermie	Raynaudův syndrom, progredující tuhnutí - fibróza kůže a orgánů	Extrahovatelné jaderné antigeny (ScI-70)
Antifosfolipidový syndrom	Opakované trombózy, potraty	Fosfolipidy (kardiolipiny - ACLA)
Bechtěrevova choroba	Bolesti a záněty kloubů zejména v sakroiliakální oblasti, záněty vaziva kolem páteře vedoucí až k obrazu tzv. "bambusové tyče" spojené s tuhnutím páteře	Autoprotilátky většinou nedetekovatelné
Některé vaskulitidy	Multiorgánové postižení	Cytoplazmatické antigeny neutrofilů (ANCA)

Zdroj: Shoenfeld et al. 2007 (přepřacováno)

1.2 Autoprotilátky a autoantigeny

Jako autoprotilátky označujeme protilátky, které reagují s vlastními antigeny. Těmito antigeny mohou být například proteiny, glykoproteiny, fosfolipidy, glykofosfolipidy nebo nukleové kyseliny. K jejich detekci dochází především v séru, ale můžeme je nalézt i v dalších tělních tekutinách, jako je mozkomíšní mok nebo synoviální tekutina. (Hrdá 2003)

Autoprotilátky můžeme rozdělit do dvou základních skupin - orgánově specifické a orgánově nespecifické. Orgánově specifické autoprotilátky jsou přítomny u orgánově specifických autoimunitních onemocnění, navazují se přímo na cílový orgán a poškozují ho. Orgánově nespecifické autoprotilátky se vyskytují u systémových autoimunitních chorob, reagují s volnými molekulami, čímž vytváří patogenní imunokomplexy antigen-protilátka. (Hrdá 2003)

I přes to, že je přítomnost autoprotilátek typická pro pacienty s autoimunitním onemocněním, existují případy, kdy je můžeme nalézt i u zdravých jedinců. Jejich tvorba je totiž v jisté míře fyziologická. Takové autoprotilátky označujeme jako přirozené. Jsou především IgM izotypu, jsou kódovány nemutovanými V(D)J geny a k vlastním antigenům vykazují pouze velmi mírnou afinitu. Mají významnou roli během fyziologické autoreaktivity, slouží jako první linie obrany organismu proti infekcím a přispívají k udržování homeostázy imunitního systému. Na rozdíl od toho, somaticky mutované IgG autoprotilátky mají vysokou afinitu k vlastním antigenům a poukazují na patologický proces, při kterém jsou narušeny homeostatické cesty. Hovoříme o nich jako o tzv. patogenních autoprotilátkách. U některých autoimunitních onemocnění se mohou autoprotilátky objevit ještě před rozvojem samotného onemocnění, čímž poskytují možnost včasné diagnostiky a terapeutického zásahu. (Elkon 2008)

2 ANTINUKLEÁRNÍ PROTILÁTKY

Antinukleární protilátky (ANA) představují širokou skupinu orgánově nespecifických autoprotilátek. Jak už vyplývá z jejich názvu, jedná se o protilátky namířené především proti jaderným antigenům. V buňce tedy mohou mít za cíl například chromatin, jadernou membránu, jádérko, ale i různé součásti cytoplazmy, jako jsou enzymy, ribozomy nebo mitochondrie. (Hrdá 2003)

Vysoké množství antinukleárních protilátek u pacienta může poukazovat na přítomnost systémového imunopatologického procesu. Dále je také výskyt těchto protilátek spojen se širokým spektrem ANA-asociovaných autoimunitních revmatických chorob (AARD, jinak také SARD), u kterých je nejčastěji postižena pojivová tkáň (chrupavka, kloubní výstelka, kůže). V malém množství se ANA mohou vyskytovat i u jinak zcela zdravých jedinců, zejména ve vyšším věku. V těchto případech se většinou jedná o nízké hladiny autoprotilátek izotypu IgM, pro které je charakteristická malá afinita. (Aragón 2018)

Antinukleární protilátky můžeme rozdělit do třech podtypů, které se v systémové cirkulaci vyskytují v různých titrech. První skupinou jsou přirozené antinukleární protilátky, které se v nízkých titrech nachází běžně v populaci. Jsou produkovány především B1 lymfocyty, avšak specifický antigenní stimul, který spouští jejich syntézu, není doposud přesně znám. Pro tyto protilátky je charakteristická polyreaktivita, nízká avidita a nedostatek přímé asociace s klinickými projevy sekundární imunodeficience. Druhou skupinu tvoří protilátky, které souvisejí se zánětlivými procesy. Na rozdíl od první skupiny, vykazují tyto protilátky vysokou aviditu a jejich titer se po vymizení vnějšího antigenního stimulu snižuje. Stejně jako první skupina nejsou nijak spojeny s klinickými projevy autoimunity. Do třetí skupiny řadíme autoprotilátky přítomné při autoimunitních chorobách. Tyto autoprotilátky mají multifaktoriální původ. Mohou být spojeny se ztrátou imunitní tolerance, genetickými predispozicemi, hormonálními změnami, interakcí s vnějším prostředím nebo epigenetickými změnami. Mají vysokou aviditu a jejich titry kolísají v průběhu onemocnění. Tento typ protilátek může být asociován s klinickými projevy autoimunity. (Aragón 2018)

Stanovení antinukleárních protilátek je považováno za screeningový test u pacientů s podezřením na autoimunitní onemocnění, přičemž velký význam má především pro dia-

agnostiku systémových autoimunitních chorob. K jejich detekci se nejčastěji využívá metoda nepřímé imunofluorescence (NIF). Při jejich pozitivitě je vzhledem ke klinickému kontextu doporučováno další podrobnější vyšetření autoprotilátek, především anti-ENA. (Aragón 2018)

2.1 Anti-ENA protilátky

Protilátky anti-ENA představují samostatnou podskupinu antinukleárních protilátek. Jedná se o protilátky proti extrahovatelným jaderným antigenům. Mezi extrahovatelné jaderné antigeny spadají všechny ribonukleoproteiny a nehistonové proteiny, které mohou být z jader buněk vymyty pomocí neutrálního roztoku pufru. Patří mezi ně více než 100 známých antigenů, z nichž jsou v současnosti nejvíce studované anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Scl-70 a anti-Jo-1. (Hrdá 2003)

Anti-ENA protilátky představují charakteristický nález především u revmatických onemocnění jako je Sharpův syndrom (smíšené onemocnění pojivových tkání - MCTD), systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, Sjögrenův syndrom nebo systémová sklerodermie. Pro některá onemocnění existuje charakteristická spojitost s přítomností jedné, nebo více anti-ENA protilátek. Tato spojitost může významně pomoci při diagnóze autoimunitních onemocnění a dále také může sloužit k rozlišení mezi jednotlivými autoimunitními chorobami a k monitoraci progresu onemocnění. (Hrdá 2003)

Pokud se neindikují ANA společně s anti-ENA, nemusí dojít ke správné a spolehlivé diagnóze. V případě, že je ANA test negativní, je velmi nepravděpodobné, že by test na specifické antinukleární protilátky vyšel pozitivní. Nicméně existují zdraví jedinci, kteří mají vysoké titry ANA, bez ENA specifity a vyžadují tak další vyšetření k určení potenciální progresu v autoimunitní onemocnění. V tomto případě nabyla významu detekce protilátek anti-DFS70. (Aragón 2018)

Výskyt specifických anti-ENA protilátek u konkrétních autoimunitních onemocnění je znázorněn v Tabulce 3.

Tabulka 3: Výskyt specifických anti-ENA protilátek u autoimunitních chorob

Specifita autoprotiilátky	Onemocnění s autoprotiilátkou spojené	Výskyt v %
RNP	MCTD	95 - 100
	SLE	15 - 40
	Systémová sklerodermie	2 - 12
	Dermatomyositis, polymyositis	12 - 16
Sm	SLE	5 - 40
SS-A/Ro	Sjögrenův syndrom	40 - 95
	SLE	20 - 60
	Neonatální lupus	95 - 100
Scl-70	Systémová sklerodermie (difúzní forma)	40 - 65
	Systémová sklerodermie (omezená forma)	5 - 15
Jo-1	Dermatomyositis, polymyositis	25 - 35
dsDNA	SLE	70

Zdroj: https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_13425-L0000006.htm

3 DFS-70

DFS-70 je autoantigen, který byl poprvé popsán v roce 1994 během sledování anti-nukleárních protilátek u pacientů s intersticiální cystitidou. Později se prokázala jeho spojitost i s dalšími onemocněními jako jsou například některá chronická zánětlivá onemocnění (astma, psoriáza, atopická dermatitida) a jiné nezánnětlivé stavy (chronický únavový syndrom, některé novotvary, jako je například rakovina prsu či prostaty). (Aragón 2018)

Název DFS vznikl z anglického *Dense Fine Speckled*, což v překladu znamená *hustý jemně zrnitý* - pomocí fluorescenční mikroskopie mohou být totiž protilátky proti tomuto antigenu vizualizovány na HEp-2 buňkách jako hustý jemně zrnitý typ fluorescence v jádrech buněk, které jsou v interfázi, typicky bez barvení jadérek a zároveň lze také pozorovat zvýšenou intenzitu fluorescence kondenzovaných mitotických chromozomů (metafázní destičky). Číslo 70 je pak v názvu z toho důvodu, že při využití metody imunoblot se dané protilátky váží na protein v oblasti 70-75 kDa. (Aragón 2018)

Antigen DFS-70, jinak také známý pod názvy PC4 a SFRS1 interagující protein (PSIP1), LEDGFp75 (růstový faktor odvozený od epitelu oční čočky) nebo TCp75 (transkripční koaktivátor p75), je protein, který je u lidí kódován genem PSIP1. Porozumění jeho funkci a struktuře se od 90. let, kdy byl objeven, výrazně zvýšilo. Byla zjištěna jeho funkce jakožto transkripčního koaktivátoru stresové reakce, což má rostoucí význam pro lidská onemocnění, jako je syndrom získané imunodeficiency (AIDS), rakovina a různé zánětlivé stavy. Navzdory rostoucím znalostem o DFS-70 není však stále zcela jasné, proč dochází k relativně časté odpovědi autoprottilátek na tento protein u pacientů s pozitivními ANA, kteří nemají klinické důkazy o AARD. (Basu 2015)

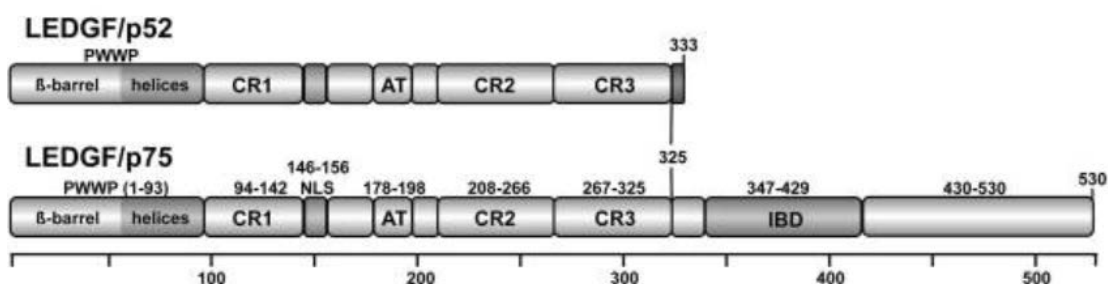
Během zkoumání tohoto proteinu bylo zjištěno, že vyřazení genu PSIP1/LEDGF u myši je spojeno s kraniofaciálními a skeletálními abnormalitami, které vedou k předčasné smrti většiny mláďat krátce po narození kvůli jejich neschopnosti se krmit, čichové dysfunkci nebo motorickým abnormalitám. Myši, kterým byl gen PSIP1/LEDGF vyřazen a dožily se dospělosti, vykazovaly motorické a behaviorální vady, kraniofaciální abnormality a často také zánět očních víček. Tyto abnormality byly spojeny s dysregulací genů Hox, z nichž mnohé byly ztrátou genu PSIP1/LEDGF významně zvýšeně regulovány. Zajímavé je, že gen PSIP1/LEDGF byl mapován do oblasti chromozomu 9p22.2, sousedící s lokusem, který je spojován se syndromem delece 9p, což je vzácná lidská chromozomální

abnormalita charakterizovaná atypickými kraniofaciálními rysy, neschopností se krmit a dýchat, očními chorobami a několika dalšími anomáliemi. Prozatím však ještě nebylo zjištěno, zda ztráta DFS-70 je u tohoto syndromu běžnou genetickou abnormalitou. (Basu 2015)

3.1 Struktura antigenu DFS-70

DFS-70 je multifunkční protein o molekulové hmotnosti 60 kDa. Skládá se z 530 aminokyselin a má dobře definované domény. Jeho N-koncová část se skládá z prvků vázajících chromatin jako je doména prolin - tryptofan - tryptofan - prolin (PWWP), dále také z nabitých částí (CR), dvou kopií AT- hook a nukleární lokalizační sekvence (NLS). Všechny tyto sekvence spolupracují na usnadnění vazby DFS-70 na aktivní transkripční místa v chromatinu, kde dochází k interakci s transkripčními komplexy RNA polymerázy-II za účelem regulace exprese stresového genu. C-koncový autoepitop, který je cílený autoprotilátkami anti-DFS70, zahrnuje vysoce konzervovanou konformační a funkční doménu, což je v souladu s obecnou představou, že epitopy pojící se s ANA typicky obsahují vysoce konzervovaná, na konformaci závislá, funkční místa. Mezi funkce spojené s C-terminální částí DFS-70, které byly zatím zjištěny, patří transkripční aktivita a aktivita přežívání stresu. Struktura antigenu DFS-70 je znázorněna na Obrázku 1. (Basu 2015)

Obrázek 1: Struktura antigenu DFS-70/LEDGFp75



Zdroj: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18264802/>

DFS-70/LEDGFp75 má krátkou sestřihovou variantu označovanou jako LEDGFp52, která odpovídá jeho N-terminální zbytkům 1-325 aminokyselin a osmi jedinečným zbytkům odvozeným od intronu 326-333. LEDGFp52 není typicky cílený autoprotilátkami a hraje roli v transkripci a mRNA sestřihu. Bylo vyzorováno, že když je nadměrně exprimován v rakoviných buňkách, tak indukuje apoptózu a antagonizuje transkripční aktivitu DFS-70/LEDGFp75. Schopnost DFS-70 zachovat strukturální integritu životně důleži-

tých buněčných organel, jako je lysozom, poukazuje na významnou roli tohoto proteinu při rozhodování o životě a smrti buňky v reakci na stres. (Basu 2015)

3.2 Protilátky anti-DFS70

Anti-DFS70 se uvádí jako nový typ antinukleárních protilátek, které jsou převážně IgG izotypu. Jejich přesný klinický a biologický význam není stále zcela objasněn. Navzdory jejich relativně časté přítomnosti a možnosti dosahování i vysokých titrů postrádají specifitu pro určitou chorobu a mohou tak být nalezeny jak u zdravých jedinců, tak u pacientů s různými zánětlivými stavy. (Aragón 2018)

V dnešní době existuje již několik studií, které pojednávají o možném klinickém významu této protilátky ve spojitosti s různými chorobami, jako je intersticiální cystitida, atopická dermatitida, alopecia areata, astma, chronický únavový syndrom nebo rakovina prostaty. Nicméně tyto asociace nejsou prozatím dostatečně přesvědčivé, aby byly protilátky anti-DFS70 zahrnuty jako součást rutinní diagnózy těchto nemocí. Mezi další onemocnění spojené s touto protilátkou patří i onemocnění očí, jako je katarakta (šedý zákal) nebo atypická retinální degenerace. Souvislost tohoto typu onemocnění s přítomností protilátky anti-DFS70 může být vysvětlena funkcí, která je antigenu DFS-70 připisována a tou je ochrana pigmentových epitelálních buněk sítnice a čočky před stresovými faktory nebo mutovanými formami rhodopsinu. Asociaci anti-DFS70 s tímto typem chorob také posiluje fakt, že u některých onemocnění s očními projevy, jako je například Vogt-Koyanagi-Harada syndrom, se vyskytují vysoké koncentrace zmiňované protilátky. Jako v předchozích případech musí být tato spojitost ještě potvrzena více studiemi. (Singh 2000)

Protilátku anti-DFS70 můžeme nalézt i u různých autoimunitních a zánětlivých nemocí, které ovšem zpravidla nesouvisí se systémovým onemocněním pojiva (SARD). Přítomnost této protilátky je s výskytem SARD spojována negativně. Z provedených studií vyplývá, že u pacientů s tímto onemocněním se protilátky anti-DFS70 vyskytují pouze velmi ojediněle, zatímco u zjevně zdravých jedinců je jejich prevalence vyšší. Při pozitivitě u pacientů se SARD je tato protilátka obvykle doprovázena jinými autoprotiilátkami specifickými pro tento typ onemocnění. Je-li ovšem anti-DFS70 přítomna jako jediná autoprotiilátka, obvykle se diagnóza SARD vylučuje. Díky tomuto zjištění bylo navrženo, že by protilátka anti-DFS70 mohla sloužit jako pomocný ukazatel v interpretaci pozitivního ANA výsledku u pacientů s nespecifickou symptomatologií. Byla by tak možnost rozlišit ANA

pozitivní zdravé jedince od pacientů s časným/nediagnostikovaným SARD, což je velmi důležité pro správný přístup k pacientovi a jeho případné léčbě. (Gundín 2016)

Jako názorný příklad lze uvést dvě onemocnění spadající do SARD, u kterých byl lépe demonstrován význam této protilátky pro jejich diagnostický proces. Prvním z nich je SLE. Řadí se mezi sekundární imunodeficiencie a je pro něj typická široká škála klinických projevů, což mnohdy komplikuje diagnostiku tohoto onemocnění v raném stádiu. Mnohé z příznaků jsou totiž nespecifické a nevyskytují se u všech pacientů s tímto onemocněním. Následkem pak často může být špatná diagnóza. Pacienti s pozitivitou ANA a s příznaky, které by naznačovaly SLE, ale nebyly pro diagnostiku tohoto onemocnění rozhodující, by kvůli tomu museli podstoupit zbytečnou léčbu, která by mohla vést k nepříznivým následkům. Bylo vyzorováno, že přítomnost protilátek anti-DFS70 u pacientů se SLE je vzácná v porovnání s výskytem této protilátky u zdravých jedinců. Proto by protilátka anti-DFS70, při absenci protilátek specifických pro SLE nebo orgánově nespecifických protilátek, mohla sloužit jako vylučovací kritérium pro diagnózu SLE, což by z klinického hlediska pomohlo redukovat náklady na následné testování a zaměřit se na pacienty s pozitivitou ANA a nespecifickými klinickými symptomy jako je artralgie (bolest kloubů), myalgie (bolest svalů), únava nebo vyrážka. (Aragón 2018)

Dalším onemocněním, které se řadí mezi SARD, je systémová sklerodermie. Jedná se o heterogenní onemocnění pojivové tkáně a mikrocirkulace, charakterizované fibrózou a vaskulopatií, které může ovlivnit kůži, intestinální trakt, plíce a ledviny. Hlavním projevem je skleroderma (dermatofibróza) různé intenzity a rozšíření či alternativy mikrocirkulace, hlavně v prstech rukou a nohou. I přes to, že to není součástí diagnostických kritérií, je běžné žádat o testování ANA, abychom zajistili správný počáteční přístup k pacientům s časnou systémovou sklerodermií nebo k pacientům bez kožních projevů. Pozitivita ANA je totiž silným indikátorem pro hledání přítomnosti specifických protilátek tohoto onemocnění. Stejně jako u SLE je i u tohoto onemocnění frekvence protilátek anti-DFS70 přítomna pouze ve velmi malých proporcích. Proto by bylo možné použít anti-DFS70 jako vylučovací kritérium, protože při pozitivě anti-DFS70 za současné nepřítomnosti orgánově nespecifických protilátek pro systémovou sklerodermii, je rozvoj tohoto onemocnění nepravděpodobný. (Aragón 2018)

V rámci ANA reprezentují izolované protilátky anti-DFS70 potenciálně důležitý biomarker, který může být klinicky použit k rozlišení SARD od ne-SARD pacientů z ANA

pozitivních jedinců. Jejich přítomnost by tak mohla zabránit zbytečnému následnému testování a doporučení terciární péče. U anti-DFS70 pozitivních pacientů, klasifikovaných jako SARD-negativních v době ANA testování, k rozvoji tohoto onemocnění pravděpodobně nedojde, podle studií, které ukázaly, že protilátky anti-DFS70 byly více prevalentní u zdravých jedinců než u pacientů s touto diagnózou, a že u anti-DFS70 pozitivních jedinců se toto onemocnění nevyvinulo během klinického sledování po dobu 4 let. Na základě těchto poznatků bylo navrženo, že přítomnost izolované protilátky anti-DFS70 by mohla být použita jako biomarker k vyloučení diagnózy systémového onemocnění pojiva. (Aragón 2018)

Tabulka 4: Prevalence protilátek anti-DFS70 v sérech pacientů a u zdravých kontrol

Stav/onemocnění	Prevalence
Syndrom Vogt-Koyanagi-Harada	66,70 %
Atopická dermatitida	30 %
Sjögrenův syndrom	11 %
Zdraví jedinci	11 %
Nediferencované onemocnění pojivových tkání	8 %
Systémový lupus erythematoses	2 %
Systémová sklerodermie	0,60 %

Zdroj: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2444440519300020>

Několik studií prokázalo prevalenci anti-DFS70 až kolem 66,7 % u pacientů s Vogt-Koyanagi-Harada syndromem a kolem 30 % u atopické dermatitidy. U zdravých jedinců se prevalence pohybuje kolem 11 %, zatímco u pacientů se sekundární imunodeficiencí je hodnota relativně nízká, kolem 2-3 %. Jak si také můžeme v tabulce povšimnout, prevalence protilátek anti-DFS70 u pacientů se SLE je v porovnání se zdravými jedinci relativně nízká. (Aragón 2018)

4 METODY DETEKCE

Přítomnost ANA namířených proti intracelulárním antigenům je spojována se širokou škálou poruch, včetně AARD. Nejběžněji používanou metodou pro detekci ANA je nepřímá imunofluorescence na HEp-2 buňkách. Od roku 1958, kdy byl tento test poprvé popsán, došlo v diagnóze AARD k revoluci, obzvláště u diagnózy SLE a systémové sklerodermie. Význam tohoto testu byl zesílen doporučením od *American College of Rheumatology*, které indikuje, že metoda nepřímé imunofluorescence ANA na HEp-2 buňkách by měla zůstat první volbou při screeningovém testování. (Aragón 2018)

Nevýhodou tohoto testu je ovšem jeho nízká specifita pro AARD, což je velkým nedostatkem při použití u populace s nízkou prevalencí tohoto onemocnění. Dále také testování ANA metodou NIF komplikuje fakt, že rozpoznávání protilátek anti-DFS70 od jiných běžných ANA může být mnohdy výzvou. V případě, že výsledek v HEp-2 substrátu hodnotí neodborník, mohou být DFS-70 zaměněny za jiné jaderné vzory NIF. Záměna NIF vzoru DFS-70 s jiným vzorem ANA může vést k nepřesné imunodiagnóze SARD s následujícím negativním následkem pro jedince s pozitivními protilátkami. Je tedy navrhováno, aby patientská séra, u kterých se pomocí NIF zjistí pozitivita fluorescenčního vzoru DFS-70, byla dále testována na protilátky anti-DFS70 pomocí specifických imunotestů. Pro potvrzení DFS70-NIF vzoru může být využito například metody imunoblot nebo ELISA. (Aragón 2018)

4.1 Nepřímá imunofluorescence

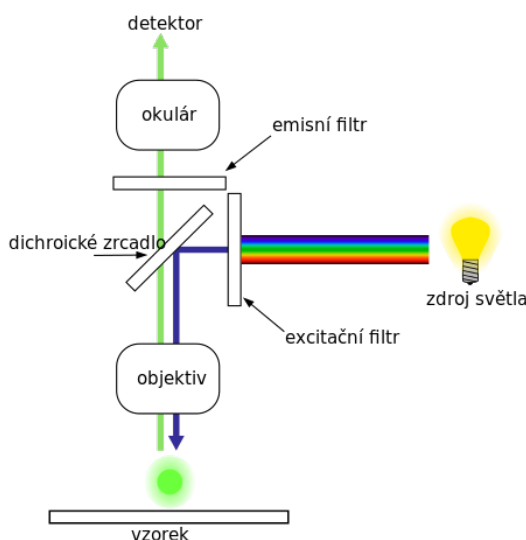
Nepřímá imunofluorescence je nejvíce využívanou metodou detekce ANA. Metoda nepřímé imunofluorescence je založena na principu vizualizace reakce antigen-protilátka. Obecně se imunofluorescence dělí na dva základní typy - přímou a nepřímou imunofluorescenci. U přímé imunofluorescence dochází k detekci antigenu a konjugát se váže přímo na antigen. Oproti tomu u nepřímé imunofluorescence dochází k detekci protilátek, která probíhá ve dvou krocích. Nejprve se protilátky z testovaného séra navážou na antigenní substrát a poté se na tyto protilátky váže konjugát (specifický k lidským imunoglobulinům). Konjugát je protilátka s navázaným fluorescenčním barvivem (fluorochromem). Nejčastěji používaný fluorochrom je fluorescein isothiokyanát (FITC), který má excitační/emisní vlnovou délku 495/520 nm a emituje zelené světlo. Jako substrát se u NIF nejčastěji používají HEp-2 buňky (*Human Epithelial*). Jedná se o rychle se dělící buňky, u

kterých je v mitóze pozorovatelná chromatinová destička, která je důležitým znakem pro odlišení jednotlivých typů ANA. (Bejdák 2016)

Tato metoda je vysoce senzitivní pro diagnózu sekundárních imunodeficiencí a detekci ANA. Dále je také nákladově nenáročná a lehká na provedení, díky čemuž se stala součástí diagnostických kritérií pro některá autoimunitní onemocnění jako je například SLE. Metoda nepřímé imunofluorescence má nicméně i své nevýhody. Mezi hlavní z nich patří její nízká specifita ANA v kontextu SID, což limituje přesnou diagnózu u jedinců s pozitivními ANA a nespecifickými symptomy SID. Jedná se o velké omezení, obzvláště vezmeme-li v úvahu, že některá onemocnění, jako je například SLE, mohou začínat nespecifickými symptomy, což by v případě pozitivních titrů ANA mohlo vést k chybné diagnóze této choroby. Tato metoda je dále také zatížena velkou subjektivitou. Záleží na kvalitativním rozhodnutí odečítajícího laboratorního pracovníka, zda a jak preparát svítí a odečítající musí dobře znát histologii příslušných tkání a buněk, aby se dokázal orientovat v jejich strukturách. (Ugarte-Gil 2016)

Z přístrojového vybavení je k nepřímé imunofluorescenci nezbytný fluorescenční mikroskop. Mezi jeho hlavní součásti patří zdroj světla, kterým může být rtuťová výbojka, nebo LED dioda. Dalšími součástmi jsou excitační filtr, který propouští pouze část spektra potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu záření v oblasti emisní vlnové délky, které by vytvářelo pozadí a emisní (bariérový) filtr, který propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního záření. (Bejdák 2016)

Obrázek 2: Schéma fluorescenčního mikroskopu



Zdroj: <https://is.muni.cz/el/1411/podzim2016/BLKIM051c/um/imunofluorescence.pdf>

4.2 ELISA

ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) patří do skupiny tzv. EIA testů (enzymoimunoanalýza). Jedná se o analytickou metodu, která umožňuje stanovení koncentrace antigenu nebo protilátky v neznámém vzorku. Principem těchto metod je imunochemická reakce s enzymatickou detekcí. Metoda má řadu různých uspořádání, přičemž všechny z nich jsou založeny na principu vysoce specifické interakce antigenu a protilátky, kdy na jednoho z partnerů této reakce je kovalentně navázán enzym (nejčastěji se jedná o peroxidázu nebo alkalickou fosfatázu). Enzym následně katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na barevný produkt, který je možné měřit spektrofotometricky. Intenzita zbarvení koreluje s koncentrací detekovaného antigenu nebo protilátky. (Bartůňková 2011)

Při stanovení protilátek proti antigenu DFS-70 v séru pacientů se využívá nepřímé uspořádání metody ELISA. Při tomto uspořádání je na dně mikrotitračních jamek ukotven daný antigen. V případě přítomnosti protilátek proti tomuto antigenu v séru pacienta, dojde k jejich navázání na daný antigen. Promýváním se odstraní nenavázané protilátky. Navázané protilátky jsou detekovány přidáním sekundárních protilátek označených enzymovým konjugátem, namířených proti primárním protilátkám, které reagují se specifickým substrátem, čímž dojde ke změně zbarvení. Po přidání zastavovacího roztoku je test následně vyhodnocen spektrofotometricky. (EUROIMMUN 2018)

Obrázek 3: Znárodnění průběhu reakce při nepřímém uspořádání metody ELISA



Zdroj: <https://www.bio-rad-antibodies.com/>

Na Obrázku 3 je znázorněn průběh imunochemické reakce při nepřímém uspořádání metody ELISA. V první jamce vidíme na dně ukotvený antigen. Druhá jamka znázorňuje přidání patientského vzorku a následné navázání specifické protilátky na ukotvený antigen. Třetím krokem je přidání sekundárních protilátek označených enzymovým konjugátem, které se vážou na již přítomný komplex antigen-protilátka. Poslední jamka znázorňuje reakci enzymu se specifickým substrátem, kdy vzniká barevný produkt. (Bartůňková 2011)

4.3 Imunoblot

Imunoblot (IB), jinak také označovaný jako western blot, je analytická metoda sloužící k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny. V zásadě se jedná o kombinaci elektroforézy a imunochemické reakce (například EIA) s mezistupněm, který se nazývá *blotting* (česky otisk). Nejprve je elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu rozdělena směs bílkovin. Bílkoviny jsou seřazeny podle elektroforetické pohyblivosti, která závisí na molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů. Následujícím krokem je blotování, při kterém jsou separované bílkoviny přeneseny na nitrocelulózovou membránu, kde jsou fixovány. Přenos probíhá buď prostou difúzí, nebo pomocí elektrického proudu. (Bartůňková 2011, Fialová 2013)

V dnešní době je běžné, že výrobce zajistí přípravu materiálu elektroforézou nebo izoelektrickou fokusací antigenu, který je otisknut na pevný nosič. Laboratoře tak pracují s již hotovým nosičem antigenu, který stačí inkubovat s vyšetřovaným biologickým materiálem a následně vizualizovat navázané protilátky. (Bartůňková 2011)

Při detekci protilátek anti-DFS70 se využívá zjednodušená modifikace této metody zvaná imunodot. Rozdíl mezi western blotem a touto metodou spočívá v tom, že u dot blotu není potřeba elektroforetické separace. Antigeny jsou na membránu nanášeny přímo ve formě proužků nebo skvrn. K provedení této metody jsou využívány silně vyčištěné nativní antigeny, nebo uměle připravené rekombinantní antigeny, které jsou imobilizovány na membráně. Mezi výhody imunodotu patří vysoká citlivost, snazší hodnocení výsledků a možnost detekovat současně hned několik protilátek proti specifickým antigenům v jednom vzorku. Nevýhodou oproti western blotu je pak vyšší finanční nákladnost. (Bartůňková 2011, Fialová 2013)

PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část mé bakalářské práce je věnována postupu stanovení protilátek proti antigenu DFS-70 u pacientů s pozitivitou antinukleárních protilátek, pomocí metody Anti-DFS70 ELISA (IgG) od německé firmy EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, IIFT: ANA Mosaic 1 EUROPattern od téže společnosti a ANA+DFS-70 IgG od belgické firmy D-tek s.a. Součástí je také porovnání četností pozitivních výsledků mezi všemi třemi metodami a jejich zhodnocení.

5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zjistit zastoupení positivity znaku DFS-70 u pacientů s pozitivitou antinukleárních protilátek společně se specifickým typem fluorescenčního nálezu.

5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo ověřit, zda metoda Anti-DFS70 ELISA (IgG) a metoda ANA+DFS-70 IgG imunoblot poskytují shodné výsledky, které zároveň odpovídají specifickému typu fluorescence, charakteristickému pro pozitivitu DFS-70, který byl zjištěn v rámci vyšetření metodou nepřímé imunofluorescence a na základě zjištěných dat sestavit postup, kterým nejlépe provést vyšetření antigenu DFS-70.

5.2 Dílčí cíle

1. Porovnání výsledků metody ELISA s výsledky metody imunoblot
2. Porovnání výsledků metody ELISA s výsledky nepřímé imunofluorescence
3. Porovnání výsledků metody imunoblot s výsledky nepřímé imunofluorescence

6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

Výzkumná otázka č. 1: Je četnost výskytu pozitivity DFS-70 shodná mezi výsledky získanými metodou ELISA a metodou imunoblot?

Výzkumná otázka č. 2: Odpovídají výsledky zjištěné metodou ELISA s nálezy získanými při vyšetření nepřímou imunofluorescencí?

Výzkumná otázka č. 3: Odpovídají výsledky zjištěné metodou imunoblot s nálezy získanými při vyšetření přímou imunofluorescencí?

Výzkumná otázka č. 4: Jaký je ideální postup pro vyšetření antigenu DFS-70?

7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

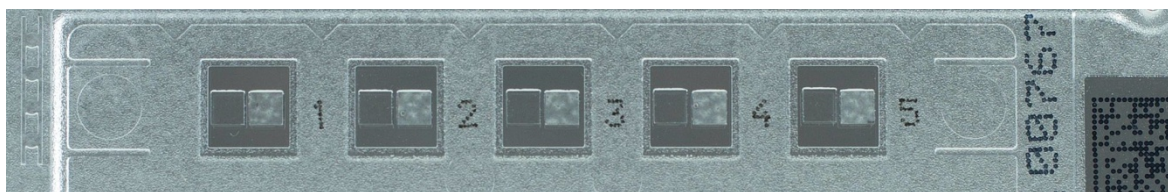
K vypracování této bakalářské práce bylo využito 60 anonymizovaných výsledků a vzorků krevních sér pacientů z Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň, u kterých byla pomocí nepřímé imunofluorescence zjištěna pozitivita antinukleárních protilátek společně se specifickým fluorescenčním vzorem. U vzorků bylo dále provedeno stanovení protilátek anti-DFS70 metodou Anti-DFS70 ELISA (IgG) a ANA+DFS-70 IgG imunoblot.

8 METODIKA PRÁCE

8.1 Test nepřímé imunofluorescence: ANA Mosaic 1 EUROPattern

Tento test nepřímé imunofluorescence poskytuje kvalitativní nebo semikvantitativní *in vitro* stanovení lidských protilátek (především izotypu IgG) namířených proti strukturám buněčných jader v pacientských vzorcích. Tato testovací sada slouží k podpoření či vyloučení diagnózy mnoha autoimunitních chorob, zejména těch revmatických. Princip testu spočívá v inkubaci testovacích polí se zředěnými pacientskými vzorky. V případě pozitivní reakce se specifické protilátky třídy IgA, IgG a IgM, přítomné v pacientském vzorku, připojí na antigeny v testovacích polích. Následně se navázané protilátky obarví FITC-značenými protilátkami proti lidským protilátkám, které mohou být poté zviditelněny fluorescenčním mikroskopem.

Obrázek 4: Podložní skříčko s biočipy pokrytými HEp-2 buňkami



Zdroj: <https://www.euroimmun.com/>

K vyšetření se používá sérum nebo plazma žilní či kapilární krve odebrané do zkumavky s EDTA, heparinem nebo citrátem. Pacientské vzorky, které mají být vyšetřovány, lze obvykle skladovat až 14 dní při teplotě mezi +2°C až +8°C. Zředěné vzorky musí být inkubovány do jednoho pracovního dne.

Test se provádí pomocí komerčně vyráběného kitu IIFT: ANA Mosaic 1 EUROPattern. Jedna testovací sada obsahuje 10 podložních skříček, přičemž na každém skříčku je 5 x 2 biočipů pokrytých HEp-2 buňkami a buňkami pocházejícími z jater primátů. Jedna sada by tedy měla vystačit až na 50 stanovení. Dále sada obsahuje konjugát, který představují protilátky proti lidským imunoglobulinům označené FITC (fluorescein isothiokyanát) a propidium jodid, což je fluorescenční interkalační činidlo používané k barvení buněk a nukleových kyselin. Mezi další součásti testovací soupravy patří pozitivní kontrola (auto-protilátky proti buněčným jádrům - ANA), negativní kontrola (negativní autoprottilátky), sůl pro PBS (*Phosphate Buffered Saline* - fosfátový roztok s NaCl), Polysorbát 20 (Tween 20), montážní médium (glycerol) a 12 kusů krycích skříček.

Sklička s biočipy, sekundární protilátky označené FITC, pozitivní i negativní kontroly a montážní médium jsou ihned připraveny k použití. Nutná je příprava roztoku PBS-Tween, který získáme rozpuštěním 1 balení soli pro PBS, které je součástí kitu, v 1 litru destilované vody a přimícháním Tween 20 (promícháváme přibližně 20 minut, než dojde ke vzniku homogenní směsi). Připravený PBS-Tween může být skladován až 1 týden v teplotním rozmezí 2°C - 8°C.

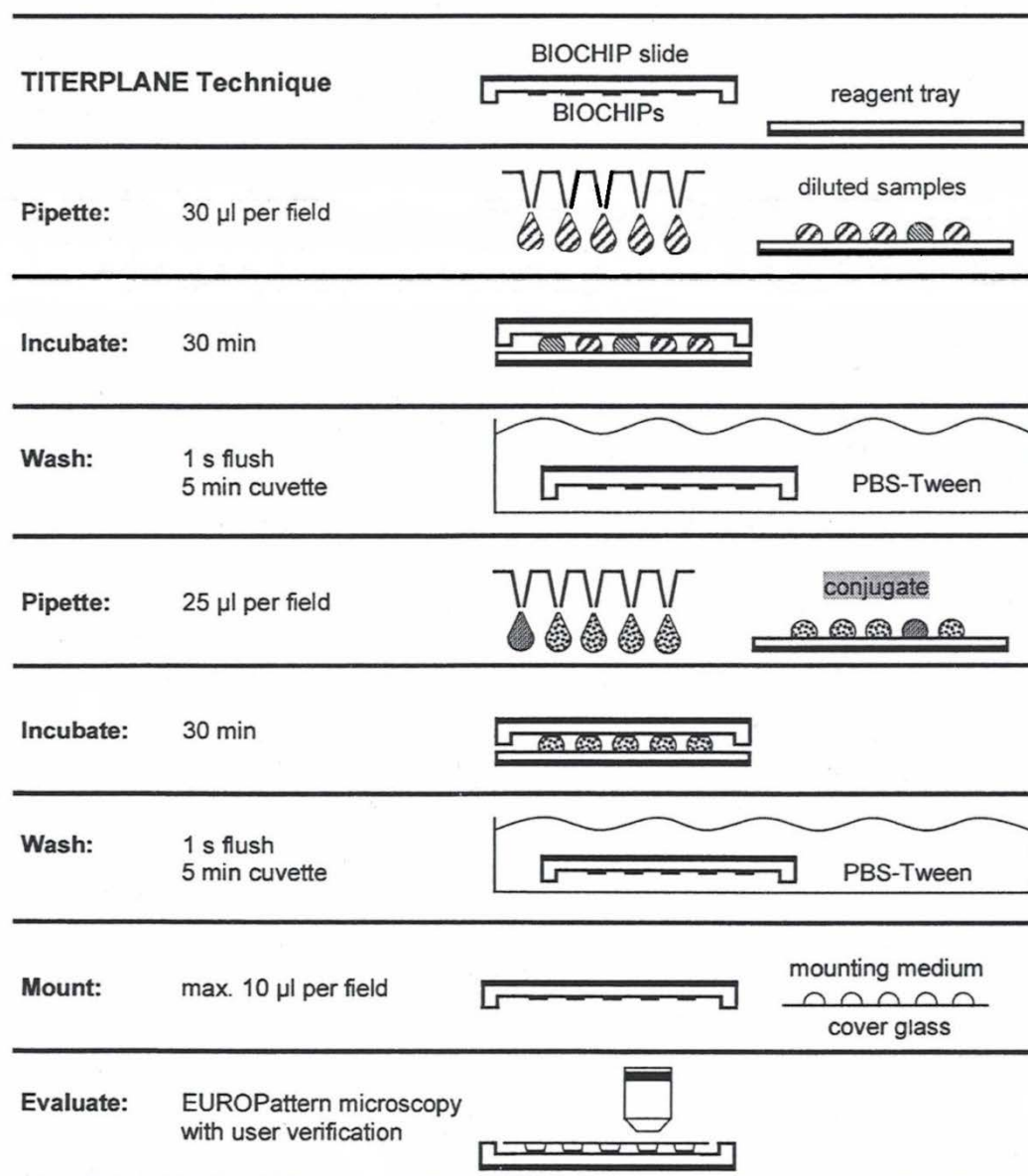
Dále je před provedením samotného testu potřeba zředit patientské vzorky. Pro kvalitativní hodnocení je doporučeno ředění vzorku 1:100 s PBS-Tween, tedy například k 10.1 µl vzorku přidáme 1000 µl PBS-Tween a důkladně promícháme. Pro semikvantitativní hodnocení se doporučuje opět ředění vzorku pomocí PBS-Tween. V tomto případě se ovšem do každé zkumavky přidává 100 µl PBS-Tween, který je následně promíchán s 11.1 µl vzorku o nejvyšší koncentraci. Například máme-li ředění 1:10 přidáme ke 100 µl PBS-Tween 11.1 µl nezředěného vzorku. Poté by následovalo ředění 1:100, kdy bychom k 100 µl PBS-Tween přidali 11.1 µl vzorku zředěného 1:10 a tak dále.

Máme-li všechny reagentie a vzorky připraveny, můžeme se pustit do samotného provedení testu. Prvním krokem je napipetování 30 µl zředěného vzorku do každého z reakčních polí na reagenční destičce, přičemž se snažíme zamezit vzniku bublin. Reakci zahájíme nasazením skliček s biočipy do příslušných výřezů v reagenční destičce. Ujistíme se, že každý vzorek je v kontaktu s příslušným biočipem a že jednotlivé vzorky spolu nepřichází do kontaktu. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě (+18°C až +25°C). Poté pomocí kádinky s PBS-Tween opláchneme sklička s biočipy a následně je ihned ponoříme do kyvety s PBS-Tween nejméně na 5 minut.

Dalším krokem je přidání 25 µl konjugátu do každého reakčního pole na čisté reagenční destičce. Z kyvety vyjmeme sklička s biočipy, jemně osušíme jejich zadní stranu a ihned je vložíme do výřezů v reagenční destičce. Opět zkontrolujeme, zda jsou biočipy s tekutinou v kontaktu a chráníme je před přímým slunečním světlem. Inkubujeme po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následuje opět promývání pomocí PBS-Tween.

Na závěr přidáme montážní médium na krycí skličko (maximálně 10 µl na každé reakční pole). Vyjmeme skličko s biočipy z kyvety s PBS-Tween, opatrně ho ze zadní strany a ze všech bočních stran osušíme a poté ho s biočipy směřujícími dolů přiložíme na připravená krycí sklička. Zkontrolujeme, zda jsou krycí sklička správně nasazena a případně jejich nasazení dle potřeby upravíme. Takto jsou sklička připravena k vyhodnocení.

Obrázek 5: Schéma provedení testu nepřímé imunofluorescence



Zdroj: <https://www.euroimmun.com/>

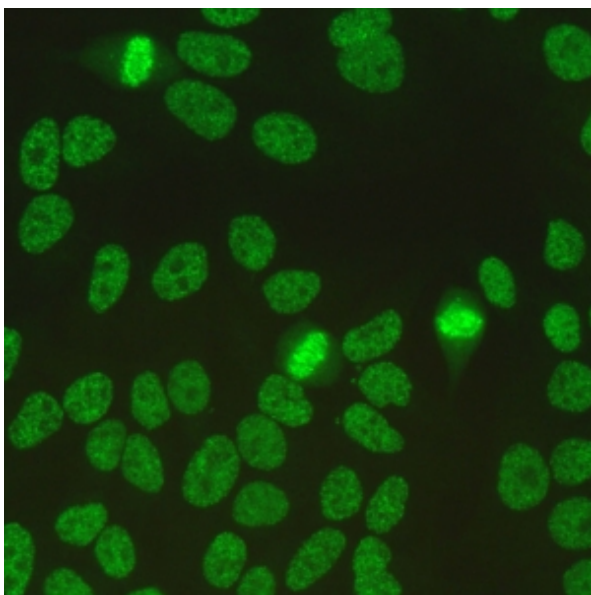
Na Obrázku 5 vidíme schematicky znázorněný postup provedení nepřímé imunofluorescence.

8.1.1 Hodnocení nepřímé imunofluorescence

Vyhodnocení fluorescenčního obrazu na HEp-2 buňkách se provádí po automatickém záznamu obrazu buďto vizuálně na obrazovce počítače nebo plně automaticky za použití EUROPattern. Jakýkoli výsledek navržený softwarem musí být vždy potvrzen řádně vyškoleným laboratorním pracovníkem. Při pozitivitě ANA vykazují buněčná jádra výraznou fluorescenci, která je charakterizována určitými vzory. V případě, že je vzorek negativní, jádra nevykazují žádnou specifickou fluorescenci.

Pro pozitivitu DFS-70 je charakteristická hustá jemně zrnitá fluorescence v jádrech buněk, které jsou v interfázi, typicky bez barvení jaderka. Zároveň lze také pozorovat zvýšenou intenzitu fluorescence metafázní destičky.

Obrázek 6: Fluorescenční obraz charakteristický pro pozitivitu DFS-70



Zdroj: <https://www.anapatterns.org/index.php>

8.2 Anti-DFS70 ELISA (IgG)

Tato testovací sada poskytuje semikvantitativní *in vitro* stanovení autoprotilátek třídy IgG, namířených proti antigenu DFS-70 v lidském séru nebo plazmě. Principem testu je inkubace zředěných patientských vzorků v mikrotitračních jamkách pokrytých antigenem DFS-70. V případě positivity protilátek proti tomuto antigenu v séru pacienta, dojde k jejich navázání na daný antigen. K detekci navázaných protilátek jsou přidány enzymem označené IgG protilátky proti lidským imunoglobulinům (enzymový konjugát), které katalyzují a barevně znázorní reakci.

K vyšetření se používá sérum nebo plazma žilní či kapilární krve odebrané do zkumavky s EDTA, heparinem nebo citrátem. Patientské vzorky určené k vyšetření se mohou skladovat při +2°C až +8°C po dobu maximálně 14 dnů. Zředěné vzorky by měly být zpracovány v rámci jednoho pracovního dne.

Testovací souprava Anti-DFS70 ELISA (IgG) obsahuje 12 mikrotitračních stripů, přičemž každý z nich obsahuje 8 odlamovacích reagenčních jamek, pokrytých antigenem DFS-70. Dále sada obsahuje kalibrátor, pozitivní a negativní kontrolu (lidské protilátky

izotypu IgG), enzymový konjugát (peroxidázou označené králičí IgG protilátky proti lidským imunoglobulinům), *sample buffer* (roztok k ředění vzorků), *wash buffer* (promývací roztok), roztok chromogen/substrát (TMB/H₂O₂ - tetramethylbenzidin/peroxid vodíku) a *stop solution* (zastavovací roztok - 0.5 M H₂SO₄).

Kalibrátor i kontroly jsou již předředené a společně s enzymovým konjugátem, roztokem k ředění vzorků, roztokem chromogen/substrát a zastavovacím roztokem jsou po 30 minutách v pokojové teplotě (+18°C až +25°C) a důkladném promíchání připraveny k použití. Pacientské vzorky určené k vyšetření se musí zředit v poměru 1:201 s roztokem k ředění vzorků. Například tedy k 10 µl vzorku přidáme 2 ml roztoku a důkladně promícháme. Dále musíme zředit promývací roztok. Roztok ředíme 10x za využití destilované vody, tedy v poměru 1 díl činidla na 9 dílů destilované vody (například k 5 ml koncentrátu přidáme 45 ml destilované vody).

Prvním krokem je přidání 100 µl kalibrátoru, pozitivní a negativní kontroly a zředěných patientských vzorků do jednotlivých mikrotitračních jamek podle pipetovacího protokolu. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě. Následuje promývání, kdy nejprve vyprázdníme jamky a následně 3x promyjeme použitím 300 µl promývacího roztoku. V každém promývacím cyklu necháme roztok v jamkách přibližně 30 až 60 vteřin a poté jamky opět vyprázdníme. Po promytí důkladně mikrotitrační destičku osušíme a zbavíme veškeré přebytečné tekutiny vyklepáním na suchou buničinu.

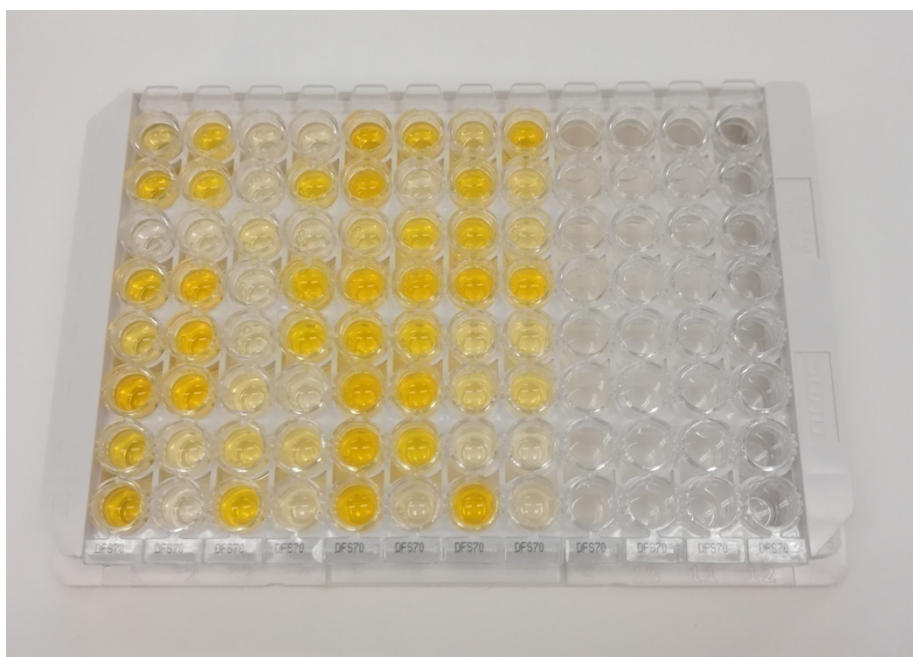
Poté napipetujeme 100 µl enzymového konjugátu (peroxidázou označené IgG protilátky proti lidským imunoglobulinům) do každé mikrotitrační jamky. Opět inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě a následně promýváme stejným způsobem jako v předchozím kroku.

Třetím krokem je napipetování 100 µl roztoku chromogen/substrát do každé mikrotitrační jamky a následná inkubace 15 minut při pokojové teplotě na místě bez přístupu přímého světla. Po inkubaci reakci zastavíme přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky ve stejném pořadí a stejnou rychlostí, jako jsme přidávali roztok chromogen/substrát. Takto je test připraven k fotometrickému měření barevné intenzity při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce mezi 620-650 nm. Měření by mělo být provedeno nejdéle do 30 minut od přidání zastavovacího roztoku.

8.2.1 Hodnocení testu Anti-DFS70 ELISA (IgG)

Protože neexistuje žádné mezinárodní referenční sérum pro protilátky proti DFS-70, jsou výsledky poskytovány ve formě poměru, což je relativní míra pro koncentraci protilátky v patientských vzorcích. Výsledky mohou být tedy vyhodnoceny semikvantitativně výpočtem poměru hodnoty extinkce (absorbance) kontrolního nebo patientského vzorku k hodnotě extinkce kalibrátoru. Interpretace výsledků je doporučována následovně: vyjde-li poměr menší než 1.0 je výsledek považován za negativní, vyjde-li poměr větší nebo roven 1.0 výsledek je vyhodnocován jako pozitivní.

Obrázek 7: Mikrotitrační destička připravená k fotometrickému měření



Zdroj: vlastní

8.3 ANA+DFS-70 IgG Immunodot

K provedení tohoto testu byla využita sada BlueDiver Dot ANA+DFS-70 IgG Immunodot, která slouží k detekci IgG autoprotilátek proti antigenům Sm, U1-RNP, Sm/RNP, SSA/Ro60kD, SSB, Scl-70, PM-Scl 100, Ku, CENP-A/B, PCNA, Mi a DFS-70. Test je založen na principu *Enzyme Immunoassay*. Testovací stripy se skládají z membrány připevněné na specifickou plastovou podpěru a během automatizovaného testu přístroj BlueDiver postupně inkubuje stripy v jamkách kartridží s reagensy. Stripy jsou nejprve inkubovány ve zředěných patientských vzorcích. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky, dojde k jejich navázání na odpovídající specifický antigen na membráně. Nenavázané nebo přebytečné protilátky jsou odstraněny promytím. Po další inkubaci s protilátkami

konjugovanými s alkalickou fosfatázou, které jsou namířené proti lidským IgG, se enzymové konjugáty napojí na komplexy antigen-protilátka. Po odstranění přebytečného konjugátu promytím jsou stripy inkubovány v substrátovém roztoku. Pokud je přítomna enzymová aktivita, projeví se jako fialová tečka na membránové podložce. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství protilátky ve vzorku.

K vyšetření se používají vzorky krevního séra či plazmy odebrané do zkumavek s EDTA, heparinem či citrátem. Při teplotě 2-8°C mohou být vzorky skladovány až 3 dny. Dlouhodobé skladování vyžaduje zmrazení vzorku na -20°C. Opakované zmrazování a rozmrazování není doporučováno. Po rozmrazení se musí vzorek vždy důkladně promíchat, aby byla zajištěna jeho homogenita.

Testovací sada obsahuje 3 balení testovacích stripů na plastových podpěrách, každé po 8 kusech. Na každém stripu se nachází tečka pro pozitivní kontrolu, negativní kontrolu a pro každý z 12 testovaných antigenů. Dále balení obsahuje 24 kartridží, přičemž každá z nich se skládá ze 7 dílů. V prvním z nich se nachází ředící roztok, který má žlutou barvu a skládá se z H₂O, TBS (*Tris-buffered saline* - solný pufovaný roztok s Tris), NaCl, Tween, konzervačního činidla MIT (methylisothiazolinon), barviva a odpěňovací emulze. Druhý, třetí, čtvrtý a šestý oddíl jsou bezbarvé promývací roztoky, které obsahují H₂O, TBS, NaCl, Tween, konzervační činidlo MIT a odpěňovací emulzi. Pátý díl slouží jako konjugát. Má červenou barvu a skládá se z H₂O, TBS, NaCl, KCl, MgCl₂, kozích protilátek konjugovaných s alkalickou fosfatázou proti lidským IgG, stabilizátor, konzervačního činidla MIT, barviva a odpěňovací emulze. Poslední, sedmý díl, slouží jako substrát. Má světle žluté zbarvení a obsahuje H₂O, NaN₃ (0.05 % azid sodný), MgCl₂, TBS, NTB (*nitroblue tetrazolium*), BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*), stabilizátor a odpěňovací emulzi.

Každá reakční (přední) strana testovacích stripů je pokryta antigeny, které jsou viditelné jako bledě modré tečky. Toto zbarvení nás ujišťuje, že všechny antigeny byly úspěšně umístěny na membránu. Na druhé (nereaktivní) straně je alfanumerický a čárový kód pro identifikaci stripu. Před zahájením automatizovaného procesu musí být stripy opatrně manuálně umístěny do příslušných svorek, přičemž se nesmíme dotknout membránové zóny stripů. Zadní strana reagenčních kartridží také obsahuje alfanumerický a čárový kód pro identifikaci. Po odstranění uzávěru je vkládáme do přístroje manuálně.

Před samotným provedením testu musí všechny komponenty dosáhnout pokojové teploty (+18°C až +25°C). Ujistíme se, že je přístroj zapojený a že držadlo na kartridže je pevně ukotveno na svém místě. Následně načteme čárové kódy z testovacích stripů i příslušných kartridží a vložíme je do přístroje.

Jako první přístroj zahájí první promývací cyklus, který trvá 1 minutu. Po dokončení tohoto procesu nás přístroj vyzve k osušení stripů. Z koncové části stripů, kde se nachází jamka na umístění vzorku, jemně a opatrně setřeme přebytečnou tekutinu.

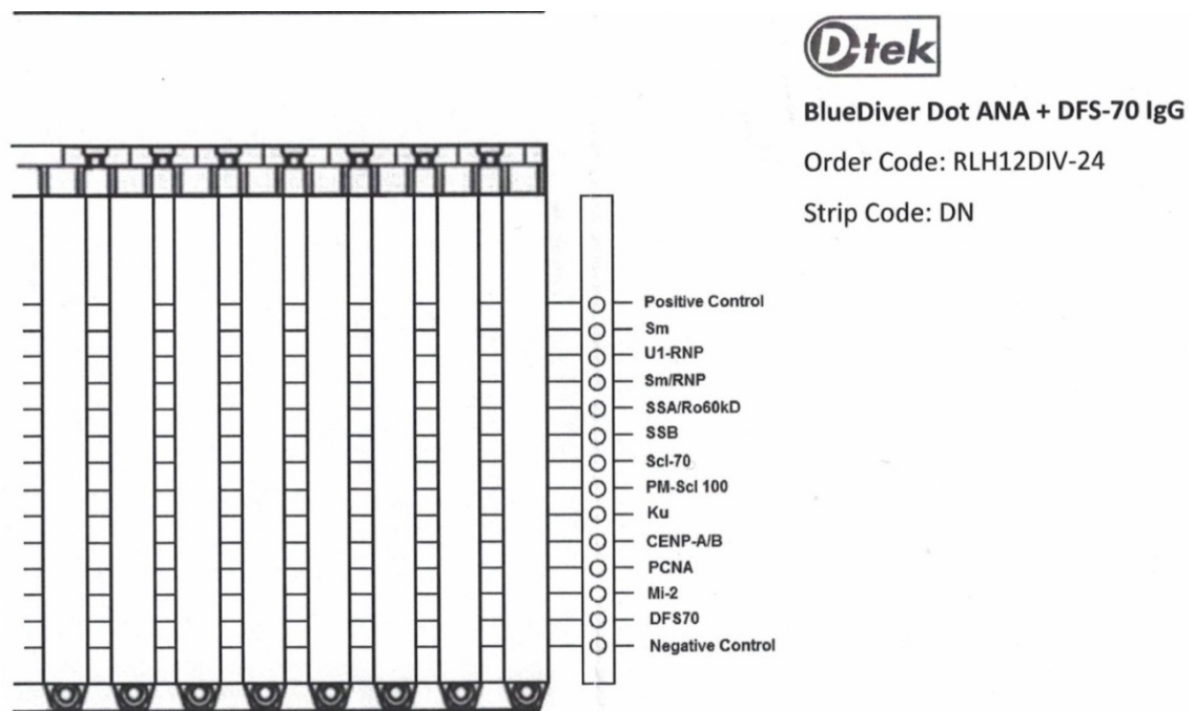
Následuje samotná aplikace vzorků, kdy pipetujeme 10 µl patientského séra nebo plazmy do jamky umístěné na koncové části testovacího stripu. Poté už si přístroj veškerou inkubaci a promývací cykly řídí automaticky sám, což zajišťuje účinnou cirkulaci tekutin přes testovací stripy díky neustálému promíchávání stripů v jamkách kartridží s reagensy. Celý proces trvá přibližně hodinu. Poté, co nám přístroj ohlásí dokončení testu, stripy opatrně vyndáme z přístroje i se svorkou a minimálně 30 minut necháme schnout.

8.3.1 Hodnocení testu ANA+DFS-70 IgG Immunodot

Výsledky metody mohou být hodnoceny vizuálně, nicméně pro více přesnou a semikvantitativní interpretaci je obecně doporučováno využití zařízení BlueScan společně se softwarovým a skenovacím systémem Dr DOT. Při vizuálním hodnocení považujeme vzorek za pozitivní na specifickou protilátku v případě, že barevná intenzita příslušné antigenové tečky je vyšší než intenzita tečky negativní kontroly. Naopak vzorek je negativní pro specifickou protilátku, pokud barevná intenzita příslušné antigenové tečky je nižší nebo rovna intenzitě tečky negativní kontroly.

Při interpretaci výsledků pomocí zařízení BlueScan testovací stripy vložíme do skeneru a následně zhodnotíme výsledky pomocí softwaru Dr DOT, kde se nám zobrazí jednotlivé hodnoty příslušných antigenů. Za negativní výsledek jsou považovány hodnoty menší než 5 AU (*arbitrary unit*) a za pozitivní výsledek hodnoty vyšší než 10 AU. Jelikož se nízké titry autoprotilátek mohou vyskytovat i fyziologicky u zdravých jedinců, jsou obvykle hodnoty mezi 5 až 10 AU považovány za validní, avšak nejednoznačné a je doporučováno opakovat test s novým vzorkem. Pokud i po druhé vyjde výsledná hodnota v tomto rozmezí, mělo by následovat vyšetření pacienta jinou metodou zjišťující pozitivitu těchto protilátek.

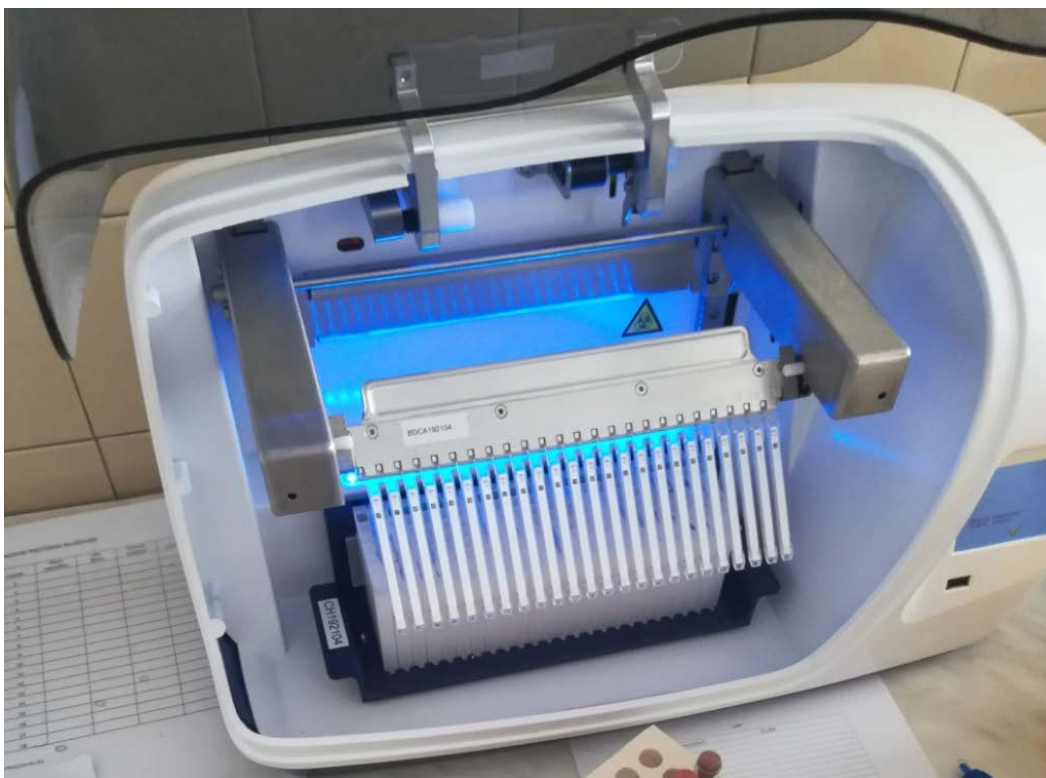
Obrázek 8: Rozmístění jednotlivých antigenů na testovacím stripu



Zdroj: <https://www.diagnostictechnology.com.au/>

Na Obrázku 8 vidíme rozmístění jednotlivých antigenů na testovacím stripu. Jak si můžeme všimnout, námi vyšetřovaný antigen DFS-70 se nachází téměř na konci stripu, před negativní kontrolou.

Obrázek 9: Přístroj BlueDiver s vloženými testovacími stripy a reagenčními kartridžemi



Zdroj: vlastní

Na Obrázku 9 vidíme přístroj BlueDiver, do kterého byly vloženy kartridže s reagenциemi a násada s testovacími stripy. Přístroj je takto připravený k aplikaci pacientských vzorků a následnému spuštění.

Obrázek 10: Testovací stripy po provedení imunodotové metody



Zdroj: vlastní

Na Obrázku 10 vidíme testovací stripy po provedení imunodotové metody. Tečka v horní části proužku, viditelná u všech stripů, je pozitivní kontrola, která nám potvrzuje, že test proběhl u všech stripů správně. Námí vyšetřovaný antigen DFS-70 se nachází jako druhý od konce.

9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Zhodnocení vzájemného vztahu mezi testovanými metodami Anti-DFS70 ELISA (IgG) a ANA+DFS-70 IgG imunoblot jsem provedla na základě korelace naměřených výsledků. Dále jsem s těmito metodami porovnávala četnost pozitivních a negativních výsledků získaných metodou nepřímé imunofluorescence.

Pro testování na přítomnost protilátek proti antigenu DFS-70 bylo vybráno 60 vzorků krevních sér, získaných od pacientů FN Plzeň, u kterých byla pomocí nepřímé imunofluorescence zjištěna pozitivita antinukleárních protilátek.

Za pozitivní výsledek u nepřímé imunofluorescence považujeme nález charakteristického fluorescenčního obrazu - hustá jemně zrnitá fluorescence v jádrech buněk, které jsou v interfázi, typicky bez barvení jádérka. Zároveň lze také pozorovat zvýšenou intenzitu fluorescence metafázní destičky.

U metody ELISA dostáváme po spektrofotometrickém měření výsledky ve formě poměru, což je relativní míra pro koncentraci protilátky v patientských vzorcích. Výsledky jsem vyhodnotila semikvantitativně výpočtem poměru hodnoty extinkce (absorbance) kontrolního nebo patientského vzorku k hodnotě extinkce kalibrátoru. Výsledky jsem interpretovala dle doporučení společnosti EUROIMMUN, od které testovací sada pochází. Jako pozitivní jsem vyhodnotila všechny vzorky, u kterých vyšel poměr vyšší nebo roven 1.0.

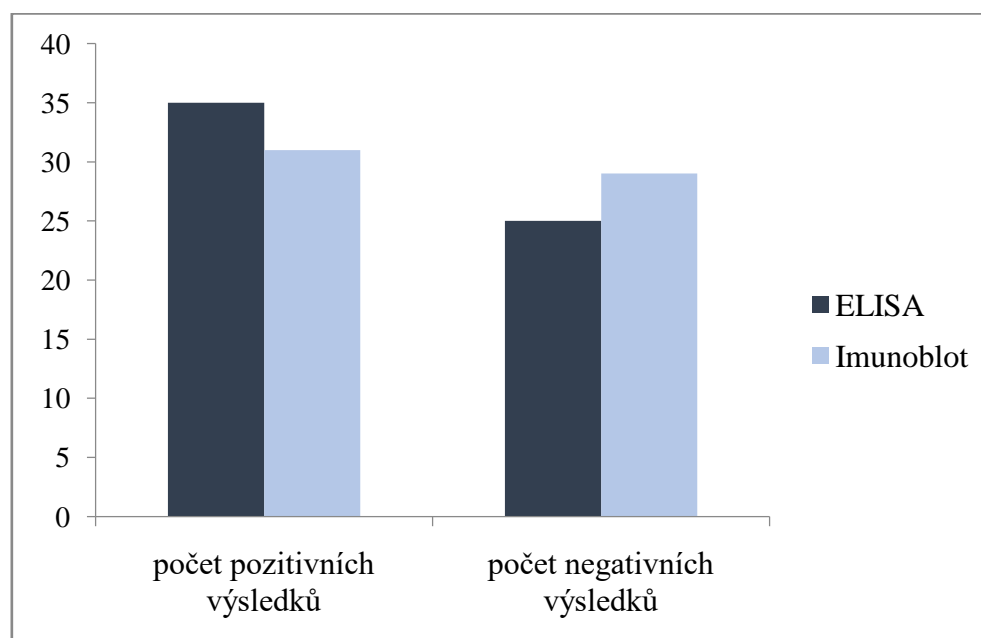
Výsledky metody imunoblot jsem vyhodnocovala pomocí zařízení BlueScan a softwaru Dr DOT. Pomocí tohoto zařízení jsou vzorky vyhodnocovány jako pozitivní v případě, že je naměřena hodnota vyšší než 10 AU a jako negativní při naměření hodnoty nižší než 5 AU. Hodnoty mezi 5 až 10 AU jsou považovány za validní, avšak ne zcela jednoznačné a je doporučováno další testování. Pro účely mého testování jsem jako pozitivní vyhodnotila výsledky vyšší nebo rovny 7 AU.

9.1 Porovnání výsledků metody ELISA a imunoblot

Porovnání vzájemného vztahu mezi metodami Anti-DFS70 ELISA (IgG) a ANA+DFS-70 IgG imunoblot jsem provedla pomocí korelace získaných výsledků. Korelace je statistická závislost, která popisuje vliv změny úrovně jednoho kvantitativního (měřeno) znaku na změnu úrovně znaku druhého. Kladná korelace znamená, že se zvyšováním hodnot jednoho znaku zvyšují i hodnoty znaku druhého. Záporná korelace pak naopak vypovídá o tom, že se zvyšováním hodnot jednoho znaku zmenšují hodnoty druhého znaku.

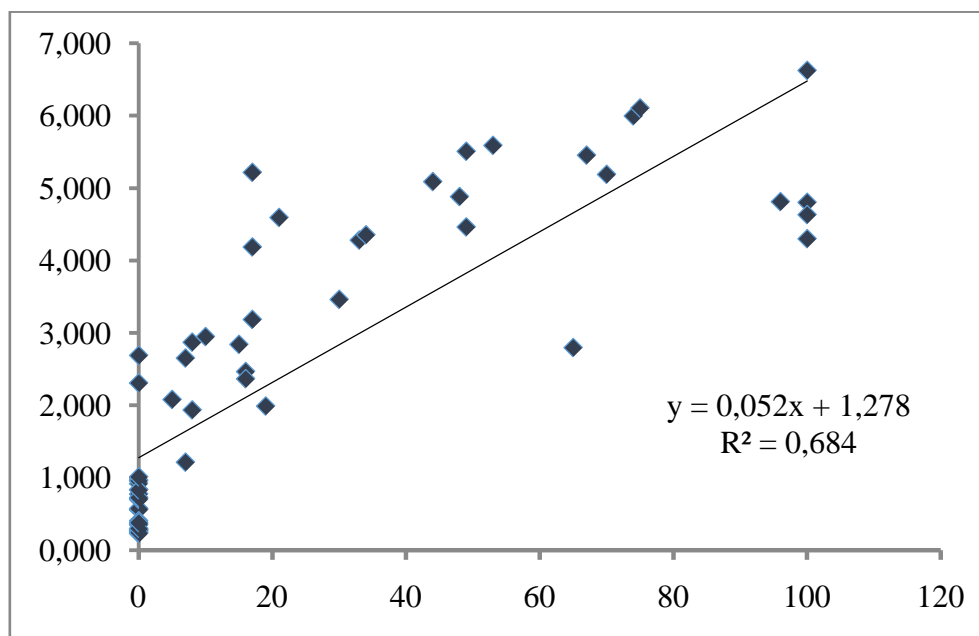
Z 60 patientských vzorků testovaných na přítomnost protilátek proti antigenu DFS-70 metodou Anti-DFS70 ELISA (IgG) vyšlo 35 vzorků pozitivních a 25 negativních. Vyšetřením pomocí metody ANA+DFS-70 IgG imunoblot jsme zjistili pozitivitu u 31 vzorků a zbylých 29 vzorků vyšlo negativních.

Graf 1: Porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků u metody ELISA a IB



Zdroj: vlastní

Graf 2: Korelační graf znázorňující závislost mezi metodami ELISA a IB



Zdroj: vlastní

Korelační Graf 2 znázorňuje závislost mezi výsledky získanými metodou Anti-DFS70 ELISA (IgG) a ANA+DFS-70 IgG imunoblot. Z grafu můžeme vyčíst, že se jedná o přímkovou (lineární) korelaci, kdy grafickým obrazem závislosti je přímka (lineární trend). U grafu jsem dále použila metodu lineární regrese a proložila soubor bodů přímkou. Podstatou lineární regrese je nalezení přímky, která nejlépe vystihuje vztah mezi proměnnými. Rovnice lineární přímky vyšla $y = 0,052x + 1,278$ a koeficient determinace $R^2 = 0,684$. Koeficient determinace udává míru kvality regresního modelu, která vyjadřuje, jaký podíl variability závisle proměnné model vysvětluje. Tento koeficient může nabývat maximální hodnoty $R^2 = 1$ (tedy 100 %), což by vyjadřovalo dokonalou predikci hodnot závisle proměnné. Naopak hodnota $R^2 = 0$ (0 %) znamená, že model nepřináší pro poznání závisle proměnné žádnou informaci. Odmocněním determinačního koeficientu získáme tzv. Pearsonův korelační koeficient, který se značí malým r . Tento koeficient vyjadřuje sílu lineárního vztahu mezi dvěma veličinami. Pearsonův koeficient může nabývat hodnot -1 až $+1$. Kladné hodnoty koeficientu značí kladnou lineární korelaci a záporné hodnoty naopak lineární korelaci zápornou. Rovná-li se Pearsonův koeficient 0, tak mezi proměnnými neexistuje lineární korelace. Čím více se hodnota blíží k $+1$ či -1 , tím silnější korelace je.

V našem případě, po odmocnění koeficientu R^2 , získáme Pearsonův koeficient $r = 0,827$. Hodnota se blíží $+1$ a jedná se tedy o velmi silnou kladnou korelaci. Z toho vyplý-

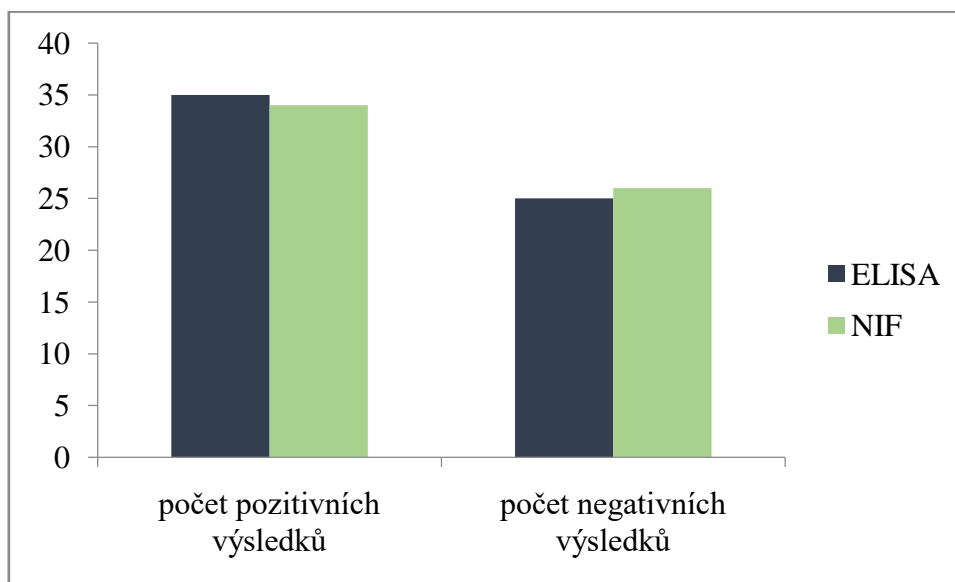
vá, že výsledky testovaných metod Anti-DFS70 ELISA (IgG) a ANA+DFS-70 IgG imunoblot jsou ve velmi těsném vzájemném vztahu.

9.2 Porovnání metody ELISA a NIF

Zhodnocení shody mezi metodou Anti-DFS70 ELISA (IgG) a testem nepřímé imunofluorescence IIF: ANA Mosaic 1 EUROPattern jsem provedla na základě porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků získaných těmito metodami.

Z 60 patientských vzorků testovaných na přítomnost protilátky proti antigenu DFS-70 metodou Anti-DFS70 ELISA (IgG) vyšlo 35 vzorků pozitivních a 25 negativních. Z výsledků získaných pomocí nepřímé imunofluorescence byl fluorescenční obraz typický pro DFS-70 (hustá jemně zrnitá fluorescence v jádrech buněk, které jsou v interfázi, typicky bez barvení jádérka a zvýšenou intenzitou fluorescence metafázní destičky) nalezen u 34 vzorků a zbylých 26, u kterých byl nalezen jiný fluorescenční obraz, bylo označeno jako negativních.

Graf 3: Porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků u metody ELISA a NIF



Zdroj: vlastní

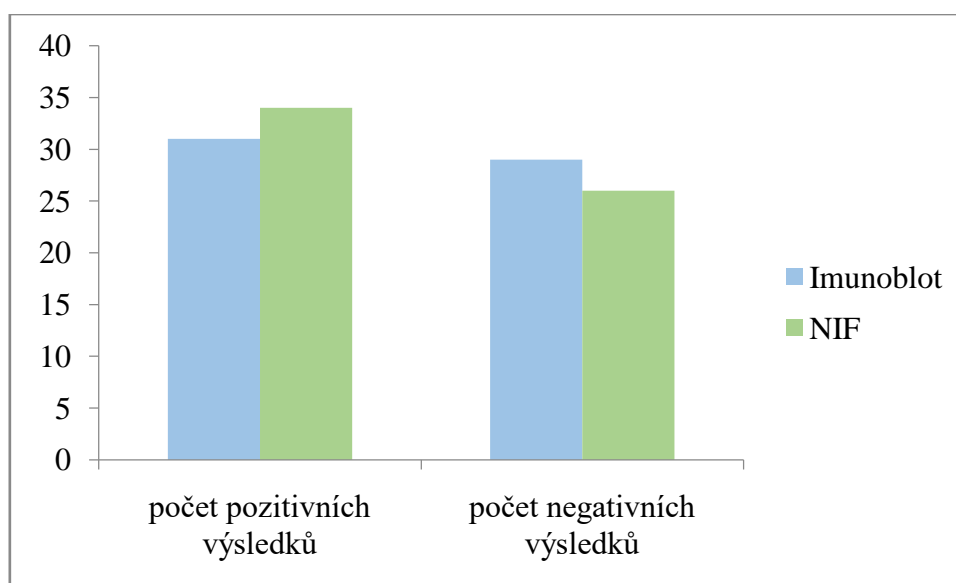
Jak si můžeme všimnout v Grafu 3, jedná se o velmi těsnou shodu pozitivních a negativních výsledků. Při srovnání těchto dvou metod si můžeme všimnout, že testováním metodou ELISA bylo zjištěno o něco více pozitivních výsledků než u testování metodou NIF.

9.3 Porovnání metody imunoblot a NIF

Zhodnocení shody mezi metodou ANA+DFS-70 IgG imunoblot a testem nepřímé imunofluorescence IIF: ANA Mosaic 1 EUROPattern jsem opět provedla na základě porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků získaných těmito metodami.

V tomto případě z 60 patientských vzorků testovaných na přítomnost protilátek proti antigenu DFS-70 metodou ANA+DFS-70 IgG imunoblot vyšlo 31 vzorků pozitivních a 29 negativních. Z výsledků získaných pomocí nepřímé imunofluorescence byl fluorescenční obraz typický pro DFS-70 nalezen u 34 vzorků a zbylých 26, u kterých byl nalezen jiný fluorescenční obraz, bylo označeno jako negativních.

Graf 4: Porovnání četnosti pozitivních a negativních výsledků u metody IB a NIF



Zdroj: vlastní

V Grafu 4 je znázorněno srovnání pozitivních a negativních výsledků získaných metodami IB a NIF, ze kterého můžeme vyčíst, že se opět jedná o velmi těsnou shodu. Můžeme si všimnout, že testováním metodou NIF bylo zjištěno o něco více pozitivních výsledků než u testování metodou imunoblot.

DISKUZE

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo zjistit zastoupení pozitivitu protilátek proti antigenu DFS-70 ve vzorcích pacientů, u kterých byla v rámci vyšetření nepřímou imunofluorescencí zjištěna přítomnost antinukleárních protilátek. Izolovaný nález protilátek anti-DFS70 by pro ANA-pozitivní pacienty s nescifickou symptomatologií mohl znamenat vyloučení diagnózy SARD, což by vedlo především ke zlepšení přístupu k pacientovi a k upravení jeho případné léčby. Dále by se tím také redukovaly náklady na následné testování těchto pacientů. Otázkou ovšem zůstává, zda je metoda nepřímé imunofluorescence dostatečně spolehlivá pro odhalení pozitivitu DFS-70. Dalším z cílů bylo tedy porovnat různé metody stanovení tohoto antigenu a rozhodnout, zda poskytují shodné výsledky. Z těchto cílů jsem následně odvodila celkem čtyři výzkumné otázky.

První výzkumná otázka se věnuje srovnání četnosti pozitivit znaku DFS-70 mezi metodami ELISA a imunoblot. Výsledky naměřené těmito metodami byly porovnány na základě korelace dat. Z 60 testovaných patientských vzorků vyšlo pomocí metody ELISA 35 z nich pozitivních na přítomnost protilátek proti antigenu DFS-70. Metodou imunoblot vyšlo pozitivních 31 vzorků. Četnost pozitivních výsledků se tak liší pouze u čtyř měření, přičemž vyšší množství pozitivit bylo zjištěno metodou ELISA. Po sestavení korelačního bodového grafu a po vypočítání Pearsonova korelačního koeficientu ($r = 0,827$), bylo zjištěno, že se jedná o velmi silnou kladnou korelaci. Z toho vyplývá, že naměřené výsledky, získané těmito metodami, jsou vzájemně ve velmi těsném vztahu.

Druhá výzkumná otázka je zaměřena na porovnání výsledků získaných metodou ELISA, s nálezy získanými pomocí vyšetření nepřímou imunofluorescencí. Jak už bylo výše zmíněno, z 60 testovaných vzorků bylo metodou ELISA zjištěno 35 pozitivních výsledků. U interpretace výsledků nepřímé imunofluorescence byly jako pozitivní označeny všechny vzorky, u kterých byl nalezen specifický fluorescenční obraz charakteristický pro DFS-70 (hustá jemně zrnitá fluorescence v jádrech buněk, typicky bez barvení jádérka a zároveň zvýšená intenzita fluorescence metafázní destičky). Tento fluorescenční obraz byl nalezen u 34 vzorků. S metodou ELISA se počet pozitivit zjištěných pomocí nepřímé imunofluorescence liší pouze v jednom měření. Jedná se tedy o velmi těsnou shodu, ze které můžeme odvodit, že tyto dvě metody poskytují srovnatelné výsledky.

Třetí výzkumná otázka je věnována porovnání výsledků získaných metodou imunoblot s nálezy získanými během nepřímé imunofluorescence. Z 60 testovaných vzorků bylo metodou imunoblot zjištěno 31 pozitivních výsledků. Charakteristický fluorescenční vzor pro DFS-70 byl nalezen u 34 vzorků. Počet zjištěných pozitivit se tedy liší ve třech měřeních, z čehož vyplývá, že v tomto případě je shoda s výsledky získanými nepřímou imunofluorescencí menší, než v případě metody ELISA.

Poslední výzkumná otázka se zabývá ideálním postupem stanovení protilátek proti antigenu DFS-70. Nejběžněji používanou metodou pro detekci ANA je nepřímá imunofluorescence, která je v tomto ohledu stále považována za „zlatý standard“. I dle doporučení od *American College of Rheumatology* by tato metoda měla zůstat první volbou při screeningovém testování. Její nevýhodou je ovšem nízká specifita pro SARD. Mezi další úskalí nepřímé imunofluorescence patří také fakt, že rozpoznání specifického vzoru protilátek anti-DFS70 od jiných běžných ANA, může být mnohdy výzvou, obzvláště hodnotí-li výsledky neoborník. Případná záměna za jiné jaderné vzory by mohla vést k nepřesné diagnóze SARD, což by mělo negativní následky pro jedince s pozitivitou protilátek proti DFS-70. Lze tedy souhlasit s východiskem, které ve své práci publikoval Aragón (2018), aby patientská séra, u kterých se pomocí nepřímé imunofluorescence zjistí pozitivita fluorescenčního vzoru DFS-70, byla testována na protilátky proti tomuto antigenu pomocí dalších specifických testů a výsledek tak byl případně potvrzen. Významu by v tomto ohledu mohla nabýt právě výše zmiňovaná ELISA, jejíž výsledky nám vyšly v těsné shodě s výsledky získanými pomocí nepřímé imunofluorescence.

Ke stejnému názoru jako Aragón (2018) se hlásí i Mahler (2012). Ve své práci vychází ze skutečnosti, že přítomnost ANA je považována za spolehlivý screeningový biomarker pro diagnózu SARD a zároveň je zahrnuta i mezi klasifikační kritéria pro SLE. Testováním ANA na HEp-2 substrátech mimo vhodný klinický rámec dostaneme ovšem značnou část ANA-pozitivních jedinců bez konzistentních důkazů o SARD. To může u pacientů i jejich lékařů vyvolat obavy či úzkostlivé stavy, obzvláště vezmeme-li v potaz, že tyto autoprottilátky mohou předcházet samotnému rozvoji onemocnění o mnoho let. Jak už bylo výše zmíněno, v tomto ohledu nabývá významu protilátka anti-DFS70, jejíž izolovaný nález by mohl u pacientů diagnózu SARD vyloučit. Mahler (2012) v práci zdůrazňuje především význam lepšího porozumění protilátkám anti-DFS70 a přichází s návrhem zvážit jejich zařazení mezi diagnostické algoritmy. Dále také prosazuje názor, že by patientské vzorky, u kterých byl pomocí nepřímé imunofluorescence zjištěn fluorescenční vzor typic-

ký pro anti-DFS70, měly být dále testovány na přítomnost této protilátky pomocí specifických imunotestů a získané výsledky by měly být lékařům důkladně vysvětleny.

Má bakalářská práce tedy prokázala, že výsledky stanovení protilátek proti antigenu DFS-70, poskytované testovanými metodami ELISA, NIF a imunoblot, jsou mezi sebou v těsné shodě. Dále se také přikláním k tvrzení výše zmíněných studií (Aragón 2018, Mahler 2012), že by bylo vhodné u ANA-pozitivních pacientů, u kterých byl pomocí nepřímé imunofluorescence zjištěn fluorescenční vzor charakteristický pro DFS-70, provést následné testování na pozitivitu tohoto znaku pomocí jiné specifické metody. Došlo by tak k redukci falešně pozitivních výsledků. Zároveň by se také zvýšila přesnost diagnózy SARD a snížil by se počet pacientů se špatnou diagnózou tohoto onemocnění.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala významem stanovení protilátek proti antigenu DFS-70 u pacientů, jimž byla v rámci nepřímé imunofluorescence prokázána pozitivita antinukleárních protilátek. Protilátky anti-DFS70 mohou sloužit jako vylučovací biomarker pro diagnózu systémového onemocnění pojiva. U ANA-pozitivních jedinců, u kterých byla přítomnost protilátek anti-DFS70 prokázána, by se tak zamezilo špatné diagnóze a případně i léčbě, která by mohla mít pro pacienta negativní dopad. Cílem bylo srovnat výsledky stanovení této protilátky, získané pomocí třech různých metod a zhodnotit zda jsou ve vzájemné shodě.

Mým úkolem bylo otestovat ANA-pozitivní vzorky na přítomnost protilátek anti-DFS70 pomocí metody ELISA a imunoblot, zhodnotit zda poskytují shodné výsledky a ty následně porovnat s nálezy fluorescenčních obrazů získaných během nepřímé imunofluorescence. Z 60 testovaných vzorků bylo metodou imunoblot zjištěno 31 pozitivních výsledků, nepřímou imunofluorescencí 34 pozitivních výsledků a metodou ELISA 35 pozitivních výsledků. Nejvíce se tedy nepřímé imunofluorescenci četností pozitivit blíží metoda ELISA. Z toho vyplývá, že by tato metoda mohla nabýt značného významu při doporučovaném potvrzujícím testování pacientů, u nichž byla v rámci nepřímé imunofluorescence zjištěna pozitivita protilátek anti-DFS70.

SEZNAM LITERATURY

Anti-DFS70 ELISA (IgG) Test instruction. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, 2018. Informační list EA_159zG_A_UK_C04.doc

ARAGÓN, Cristian-Camilo, et al. *Anti-DFS70 antibodies: A new useful antibody in the exclusion of auto-immune diseases*. Revista Colombiana de Reumatología (English Edition) [online]. 2018, 25(2), 104-111 [cit. 13. 5. 2020]. DOI: 10.1016/j.rcreue.2018.01.002. ISSN 24444405. Dostupné z: <https://www.elsevier.es/en-revista-revista-colombiana-reumatologia-english-edition--474-articulo-anti-dfs70-antibodies-a-new-useful-S2444440519300020>

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK, et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3533-7

BASU, Anamika, et al. *DFS70/LEDGFp75: An enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer*. Frontiers in Immunology [online]. 2015, 6(116) [cit. 19. 12. 2020]. DOI:10.3389/fimmu.2015.00116. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367441/>

BEJDÁK, Petr. *Imunofluorescence* [online]. Ústav klinické imunologie a alergologie. Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta MU. 2016, [cit. 28. 12. 2020]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1411/podzim2016/BLKIM051c/um/imunofluorescence.pdf>

ELKON, Keith, Paolo CASALI. *Nature and function of autoantibodies*. Nature Clinical Practice Rheumatology [online]. 2008, 4(9), 491-498 [cit. 4. 2. 2021]. DOI: 10.1038/ncprheum0895. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/ncprheum0895>

FIALOVÁ, Lenka. *Vybrané imunochemické metody* [online]. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK. 2013, [cit. 5. 2. 2021]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1153/Imunochemie%20201314teorie.pdf>

GUNDÍN, Simón, et al. *Measurement of anti-DFS70 antibodies in patients with ANA-associated autoimmune rheumatic diseases suspicion is cost-effective*. Autoimmunity Highlights [online]. 2016, 7(1), 10 [cit. 4. 2. 2021]. DOI:10.1007/s13317-016-0082-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4967047/>

HAAG, Hans, Tim LIANG, et al. *How do patients with systemic autoimmune rheumatic disease perceive the use of their medications: a systematic review and thematic synthesis of qualitative research*. BMC Rheumatology [online]. 2018, 2(9) [cit. 13. 2. 2021]. DOI: 10.1186/s41927-018-0017-8. Dostupné z: <https://bmcrheumatol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41927-018-0017-8>

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

HRDÁ, Pavlína, Ivan ŠTERZL. Vyšetření autoprotilátek - současné možnosti. *Interní medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o. 2003, 5(8), 410-413. ISSN 1212-7299

KONDELÍKOVÁ, Eva, 2008. *Test antinukleárních protilátek (ANA)*. Hradec Králové. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biologických a lékařských věd. Vedoucí práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc. Odborný školitel: MUDr. Markéta Haschová.

LUKEŠOVÁ, Šárka. Imunologie, autoimunitní onemocnění. *Medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o. 2016, 13(4), 171-174. ISSN 1214-8687.

MAHLER, Michael, et al. *Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases*. Autoimmunity Reviews [online]. 2012, 11(9), 642-645 [cit. 11. 3. 2021]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.005>. ISSN 1568-9972. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997211002588>

SHOENFELD, Yehuda, Terezie FUČÍKOVÁ a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-2044-9.

SINGH, D.P., N. OHGURO, T. KIKUCHI, T. SUENO, V.N. REDDY, K. YUGE, et al. *Lens epithelium growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts*. Biochemical and Biophysical Research Communications [online]. 2000, 267(1), 373-381 [cit. 7. 10. 2020]. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1979.

SVOBODOVÁ, Radka. Systémová onemocnění pojiva a jejich komplikace. *Interní medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, s.r.o. 2012, 14(11), 443-446. ISSN: 1212-7299

UGARTE-GIL, Manuel F., Graciela S. ALARCÓN. *Incomplete systemic lupus erythematosus: early diagnosis or overdiagnosis?* Arthritis Care and Research [online]. 2016; 68(3), 285-287 [cit. 9. 9. 2020]. DOI: 10.1002/acr.22663.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Souhlas s poskytováním informací

PŘÍLOHY

Příloha A – Souhlas s poskytováním informací



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Adéla Brzáková

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Význam stanovení DFS70 ve skupině antinukleárních protilátek*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní sestra ÚIA souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené odborné praxe na ÚIA a **pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je Ing. Bc. Tomáš Vlas, odborný pracovník v laboratorních metodách ÚIA FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovass@fnplzen.cz

4. 3. 2020