

UNIVERZITA KARLOVA

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA AUTOPROTI-
LÁTEK V RUTINNÍ LABORATOŘI**

MICHAELA SMOLÍKOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Konzultant: Mgr. Alena Mikšíková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. a Mgr. Aleně Mikšíkové za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady, připomínky a velkou trpělivost. Děkuji také všem pracovníkům celé imunologické laboratoře – RNDr. Ivaně Stachové, Ing. Kristýně Šišmové, Janě Jašinské, Marcele Hlinovské a Daně Klauzové. Zároveň chci poděkovat celé společnosti České Laboratorní s.r.o., která mi vypracování mé bakalářské práce umožnila.

Poděkování patří i mé rodině a příteli za velkou morální podporu a trpělivost.

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 24. 4. 2019

.....

Michaela Smolíková

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	10
2 Cíl práce.....	10
3 Funkce imunitního systému	10
4 Příčiny vzniku autoimunitních chorob.....	11
4.1 Příčiny vnitřní	12
4.2 Příčiny vnější.....	12
5 Charakteristika nejčastějších autoimunitních chorob	13
5.1 Systémová onemocnění.....	14
5.1.1 Systémový lupus erythematoses.....	14
5.1.2 Revmatoidní artritida	15
5.1.3 Sjögrenův syndrom.....	16
5.1.4 Systémová sklerodermie	17
5.1.5 Antifosfolipidový syndrom.....	17
5.1.6 ANCA asociující vaskulitidy	18
5.2 Orgánově specifická.....	19
5.2.1 Hashimotova tyroiditida	20
5.2.2 Graves-Basedowova choroba	20
5.3 Autoimunitní choroby orgánově lokalizované	21
5.3.1 Ulcerózní kolitida	21
5.3.2 Crohnova choroba	21
5.3.3 Celiakie.....	22
5.3.4 Autoimunitní hepatitidy	22
5.3.5 Primární biliární cirhóza.....	23
6 Laboratorní diagnostika autoprotilátek	24

6.1	Nepřímá fluorescence	24
6.2	ELISA.....	25
6.3	Imunoblotting	27
7	Vyšetření jednotlivých typů autoantilátěk	28
7.1	Antinukleární autoantilátky	28
7.2	Autoantilátky proti dsDNA.....	30
7.3	Autoantilátky proti cytoplazmě neutrofilů.....	31
7.4	Hepatální autoantilátky	32
7.5	Antiendomyziální autoantilátky	34
7.6	Antifosfolipidové autoantilátky.....	34
7.7	Stanovení revmatoidního faktoru	35
8	Atlas fluorescenčních obrazů laboratorního stanovení autoantilátěk	36
8.1	NIF detekce ANA autoantilátěk	36
8.2	NIF detekce ANCA autoantilátěk	37
8.3	NIF detekce dsDNA autoantilátěk	38
8.4	NIF detekce hepatálních autoantilátěk.....	39
8.5	NIF detekce antiendomyziálních autoantilátěk.....	39
9	Význam laboratorního vyšetření autoantilátěk pro klinickou praxi	40
10	Diskuze	41
11	Závěr	42
12	Seznam obrázků	43
13	Seznam tabulek.....	43
14	Literatura	44

Abstrakt

Autor: **Michaela Smolíková**

Název: **Laboratorní diagnostika autoprotilátek v rutinní laboratoři**

Bakalářská práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní program: **Zdravotnická bioanalytika**

Autoimunitní onemocnění jsou způsobená poruchou regulace imunitní reakce. Tento proces vzniká v případě, kdy imunitní systém není schopen rozlišit cizí od vlastních struktur. Autoimunitní reakce jsou namířené proti určitému druhu buněk, celému orgánu nebo reagují na více orgánových systémů najednou. A proto lze autoimunitní choroby dělit na systémové, orgánově specifické a orgánově lokalizované.

Kompletní diagnostika autoimunitních chorob se skládá z klinických příznaků, anamnézy pacienta, objektivního a laboratorního nálezu. V imunologické laboratoři je laboratorní diagnostika těchto chorob zaměřená na detekci autoprotilátek. V bakalářské práci je popis těch nejčastějších, které se u nás rutinně stanovují. K jejich detekci využíváme kombinaci metod nepřímé fluorescence, ELISA metody a imunoblotové techniky. Interpretace laboratorního průkazu autoprotilátek je spojována s celou řadou úskalí. Jejich detekci velmi často využíváme jako marker autoimunitních onemocnění, například k odhadu aktivity autoimunitního procesu a prognózy onemocnění. Autoprotilátky mohou být přítomné před klinickou manifestací autoimunitního onemocnění, v průběhu manifestace choroby nebo mohou přetrvávat po klinicky manifestním období onemocnění.

Klíčová slova: autoprotilátky, autoimunitní onemocnění, nepřímá fluorescence, ELISA, imunoblot

Abstract

Author: **Michaela Smolíková**

Title: **Laboratory diagnostics of autoantibodies in routine laboratory**

Bachelor thesis

Charles university, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: **Medical bioanalytics**

Autoimmune diseases are caused by impaired regulation of the immune response. This process arises when the immune system is unable to distinguish foreign from its own structures. Autoimmune responses are directed against a particular cell type, whole organ, or react to multiple organ systems at the same time. Therefore, autoimmune diseases can be classified as systemic, organ-specific and organ-localized.

Complete diagnosis of autoimmune diseases consists of clinical signs, patient history, objective and laboratory findings. In the immunology laboratory, laboratory diagnostics of these diseases is focused on the detection of autoantibodies. The bachelor thesis describes the most common which are routinely determined. We use a combination of indirect immunofluorescence, ELISA and immunoblot techniques to detect them. The interpretation of detected autoantibodies is associated with a number of pitfalls. We often use their detection as a marker of autoimmune diseases, for example to estimate the activity of the autoimmune process and prognosis of the disease. Autoantibodies may be present before the clinical manifestation of autoimmune disease, during disease manifestation, or may persist after a clinically manifesting period of disease.

Keywords: autoantibodies, autoimmune diseases, indirect immunofluorescence, ELISA, immunoblot

Seznam zkratk

AAV	ANCA asociující vaskulitidy
AIH	autoimunitní hepatitida
AMA	antimitochondriální autoprotilátka
ANA	antinukleární autoprotilátka
ANCA	autoprotilátka proti cytoplazmatickým antigenům neutrofilů
ASCA	protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisce</i>
ASMA	autoprotilátka proti hladkému svalu
APS	antifosfolipidový syndrom
CCP	cyklický citrulinovaný peptid
CD	Crohnova choroba
dsDNA	dvouvláknová DNA
EGPA	alergická granulomatózní angiitida
EIA	enzymimunoanalýza
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	antiendomyziální autoprotilátka
ENA	extrahovatelné nukleární antigeny
GPA	chronická granulomatózní polyangiitida
gp210	nukleosporin
Jo-1	nukleární antigen typu Jo-1 - histidyl-tRNA syntetáza
LC1	cytosolový jaterní antigen
LKM	mikrozomy jater a ledvin
MPO	myeloperoxidáza
NIF	nepřímá imunofluorescence
nRNP/Sm	nukleární antigen typu nRNP/Sm, ribonukleový protein
PBC	primární biliární cirhóza
PCNA	proliferační antigen buněčného jádra
PM-Scl	komplex polypeptidů převážně jadéřkové lokalizace
PR3	proteináza 3
RA	revmatoidní artritida
RF	revmatoidní faktor
Ro-52	Robertův antigen, nukleární antigen typu Ro
Scl-70	nukleární antigen typu Scl-70, enzymová topoizomeráza

SS	Sjögrenův syndrom
SS-A	nukleární antigen typu SS-A
SS-B	nukleární antigen typu SS-B
SSc	systemová sklerodermie
SLA	solubilní jaterní antigen
SLE	systemový lupus erythematoses
Sm	Smithův antigen, nukleární antigen typu Sm
sp100	nukleární tělískový protein

1 Úvod

Autoprotilátky jsou v malé míře přítomné v každém organismu. Velmi záleží na jejich původu, zda se jedná o autoprotilátky fyziologické či patologické (7).

Patologické autoprotilátky vznikají v důsledku imunopatologických reakcí vlivem poškozené autotolerance. Jedná se o stav, při kterém selhává funkce tolerance vůči tkáním, které jsou tělu vlastní. Tento proces vede k rozvoji autoimunitního onemocnění. Ty rozdělujeme do třech základních skupin – systémová autoimunitní onemocnění, orgánově specifická a orgánově lokalizovaná (12).

Laboratorně jsme dnes schopni stanovit široké spektrum autoprotilátek na základě imunologického principu reakce antigenu a protilátky. V laboratoři imunologie využíváme nejčastěji kombinaci metod nepřímé imunofluorescence, ELISA metod a imunoblotu (2).

Stanovení autoprotilátek má velký význam ve zpřesnění diagnózy, odhadu aktivity a prognózy onemocnění. Interpretace výsledků je značně komplikovaná s řadou úskalí (14).

2 Cíl práce

Cílem práce je shrnutí aktuálních informací z dostupných literárních zdrojů na téma nejčastějších autoimunitních onemocnění, příčin jejich vzniku a klinických projevů. Práce je také zaměřena na možnosti stanovení autoprotilátek v běžné rutinní imunologické laboratoři.

3 Funkce imunitního systému

V imunitním systému (IS) každého jedince se stále odehrává velké množství rozpoznávacích reakcí. Výsledkem je tolerance vlastních struktur a likvidace struktur cizích. „Tuto základní úlohu imunitního systému udržují mnohé regulační mechanismy, které jsou součástí nejen imunitního, ale též hormonál-

ního a nervového systému“ (7). Porušené regulační mechanismy vyvolávají i poruchu v rozpoznání, co je v organismu vlastní a co nevlastní (7). Tento proces může vést ke vzniku imunopatologických reakcí, které poškozují vlastní tkáň, buňky a jejich struktury (7).

Imunitní systém se také vyznačuje svou specifíčností, pamětí a rozmanitostí reakcí. Specifíčnost je dána tím, že IS reaguje na malé části antigenu, na antigenní determinanty – epitopy. Zajišťuje také imunitní dohled, kterým je schopný rozeznávat patogeny nebo nádorově změněné buňky (7).

„Podmínkou vzniku autoimunitních onemocnění je prolomení autotolerance, tedy mechanismů udržujících reakci vůči vlastním tkáním ve fyziologických mezích“ (12). Stav autoimunity rozdělujeme na autoreaktivní a autoagresivní. Autoreaktivita je považována za stav fyziologický. Autoagresivita je stav imunopatologický a je vždy doprovázen poškozujícím zánětem (7).

Autoimunitní reakce organismu je dvojího typu. Jedná se buď o reakci humorální, nebo buněčnou. Humorální typ autoimunitní reakce je charakteristický tvorbou autoprotilátek, ty poškozují tkáň zejména cytotoxickými mechanismy nebo ukládáním imunokomplexů. U buněčného typu agresivně reagují T-lymfocyty, které produkcí cytokinů a aktivací makrofágů poškozují tkáň (12).

Autoimunitní reakce řadíme do reakcí cytotoxických, imunokomplexových a také do opožděných přecitlivělostí. U formy cytotoxické (II typ) a imunokomplexové (III.typ) dochází k reakci autoprotilátek tříd IgG a IgM, které mají vysokou afinitu k příslušným antigenům. U opožděné přecitlivělosti (IV.typ) reagují Tc-lymfocyty a Th1-lymfocyty (7).

4 Příčiny vzniku autoimunitních chorob

Ke vzniku autoimunitních onemocnění obvykle dochází spolupůsobením několika faktorů. „Jedná se o kombinaci faktorů vnitřních (genetických) a faktorů zevního prostředí (vnějších)“ (12).

4.1 Příčiny vnitřní

Až desetkrát častěji se můžeme setkat s vyšší incidencí autoimunitních onemocnění u žen než u mužů. „Výsledkem je, že ženský imunitní systém je efektivnější než mužský. Žena je v tomto ohledu vůči infekcím odolnější než muž a její imunitní systém je robustnější“ (23) Jedná se například o systémový lupus erythematosus, systémovou sklerodermii nebo Sjögrenův syndrom (23).

Autoimunitní procesy může ovlivnit hormonální nerovnováha u žen zejména v období puberty, těhotenství, poporodním období nebo při užívání antikoncepčních pilulek (23).

„U některých autoimunitních chorob není závislost na pohlaví tak výrazná. Je to například diabetes I. typu, který postihuje ženy i muže, chlapce i dívky, přibližně ve stejné míře. Druhým extrémem v asociaci s pohlavím je Bechtěrevova choroba. Onemocnění zase naopak postihuje téměř v 90% muže“ (23).

Genetická predispozice může výrazně přispět k rozvoji autoimunitního onemocnění. Hovoříme například o asociaci s MHC a jednou z těch nejznámějších je HLA-B27 s výše zmíněnou Bechtěrevovou chorobou či reaktivní artritidou (23).

Zvláštní pozornost by měla být věnována lidem s imunodeficiencemi. Zde je vlivem porušené imunity vyšší riziko výskytu autoimunitních onemocnění. Velice závažná může být asociace s imunodeficity, například IgA nebo deficit složek komplementu C2 a C4, u nichž dochází k nedostatečnému odstranění imunokomplexů (12).

4.2 Příčiny vnější

„Není pochyb, že spouštěcím mechanismem autoimunitních chorob je nějaký zevní (environmentální) faktor, který je zodpovědný za vznik choroby v určitém časovém okamžiku, za typ onemocnění a dokonce za jeho klinické projevy“ (23).

Zevním faktorem může být infekce, stres, UV záření, léky a jiné chemikálie nebo geografické vlivy (12, 23).

Infekčními původci mohou být viry, bakterie i paraziti (23). „Z virů je spouštěčem autoimunity například virus hepatitidy C. Infekce tímto virem je asociovaná s celou řadou autoimunitních chorob“ (23). Virus hepatitidy B může vyvolat onemocnění, zvané polyarteritis nodosa (23).

Revmatická horečka je dalším onemocněním, které nepochybně indukuje autoimunitní onemocnění. Výskyt bývá u streptokokových infekcí, při kterých vzniklé protilátky reagují s vlastními tkáněmi, což vede k deformacím srdečních chlopní a zánětu kloubů (23).

„Také některé chemické látky mohou zapříčinit autoimunitní onemocnění. Typickým příkladem je choroba nazývaná systémová sklerodermie“ (23). Onemocnění je poměrně závažné, jehož konkrétní příčina zůstává neobjasněna (23).

„Obecně se dá říci, že téměř každý lék může potenciálně zapříčinit autoimunitní chorobu, proto by se měl každý praktický lékař u svého pacienta zajímat, pokud začne mít podezření na autoimunitní onemocnění, i o léky, které mu předepsali specialisté“ (23).

Stres se může podílet na vzniku autoimunitního onemocnění, a zároveň se velmi často podílí i na zhoršení nebo opětovném vzplanutí choroby (23).

Vliv jednotlivých faktorů nebyl prozatím jednoznačně prokázán, nejspíš se jedná o kombinaci vlivů zevních, hormonálních a genetických, spojených s poruchou imunity (23).

5 Charakteristika nejčastějších autoimunitních chorob

„Hranice mezi těmito chorobami není ostrá. Na rozhraní stojí choroby s převažující manifestací v určitém orgánu, ale doprovázené výskytem autoprotilátek proti orgánově nespecifickým antigenům (orgánově lokalizovaná onemocnění)“ (12).

5.1 Systémová onemocnění

Autoimunitní reakce u systémových onemocnění je namířena proti jaderným strukturám. Nejčastěji se vyskytující typ poškozování tkání je imunokomplexový (12).

Systémová onemocnění jsou velmi závažná až životu ohrožující, a proto by tyto choroby mezi lékaři neměly být opomíjeny.

5.1.1 Systémový lupus erythematoses

Systemový lupus erythematoses (SLE) je velmi závažné systémové onemocnění. SLE je onemocnění, které je schopno multiorgánového poškození. Je charakteristický svým rozmanitým klinickým obrazem (4).

Až 65% pacientů má diagnostikováno SLE ve věku mezi 16-55-ti lety. Ženy jsou postiženy až devětkrát častěji než muži. V posledních letech se incidence výrazně zvýšila, nejspíše z důvodu lepší diagnostiky (4).

Klinický obraz této choroby je velmi rozmanitý. Kožní projevy této choroby mohou být různého charakteru. Můžeme se setkat s klasickou vyrážkou motýlího vzhledu, lézemi doprovázené jizvami a atrofií, vředy či jizevnatou alopecíí a vaskulitidami kůže (1).

Pacienti bývají velmi náchylní k fotosensitivitě. Po expozici slunečního či fluorescenčního záření se u nich může vyskytnout vyrážka. Někteří pacienti mohou mít vyrážku i po záření UVA, což je záření například ze žárovky. Fotosensitivních pacientů je kolem 60-100% (4).

Bývá zde také přítomnost postižení kloubů formou artritid či jiných arthropatií. Artralgie a artritidy postihují primárně malé klouby rukou zápěstí a kolen. Typicky je přítomná bolest a ztuhlost. Dalším postižením pohybového aparátu může být například myositida a generalizovaná myalgie se svalovou citlivostí. Často je doprovázena exacerbací (opětovné vzplanutí) onemocnění (4).

Velmi častým projevem je postižení ledvin. Je to jeden z nejčastějších důvodů přijetí pacientů k hospitalizaci. Vyskytuje se téměř u 40-70-ti % pacientů s SLE. Ledviny jsou poškozeny ukládajícími se komplexy v glomerulech, což způsobí zánět. V moči je přítomná mikroskopická hematurie a proteinurie (4).

Z kardiologických příznaků se můžou objevit perikarditidy nebo méně časté infekce myokardu. U pacientů s SLE se zvyšuje riziko morbidity a úmrtnosti na kardiovaskulární choroby jako je například ateroskleróza nebo onemocnění chlopní srdce (4).

Hematologickými abnormalitami zde bývají různé druhy anémií, leukopenie, trombocytopenie a antifosfolipidový syndrom (4).

Vyskytovat se můžou také gastrointestinální projevy. Takovými projevy může být dyspepsie (porucha trávení), žaludeční vředy, nauzea, zvracení nebo různé zánětlivé projevy střev či pankreatu (4).

Neurologické příznaky se projevují bolestí hlavy, mániemi, psychózami, deliriem, záchvaty, depresi, úzkosti a periferní neuropatií (4).

5.1.2 Revmatoidní artritida

„Revmatoidní artritida je chronické zánětlivé onemocnění, charakterizované infiltrací kloubního prostředí zánětlivými buňkami a hypertrofií synoviální membrány, progresivními erozemi kostí a chrupavky a systémovými rysy, zahrnujícími výraznou tvorbu proteinů akutní fáze a produkci autoprotilátek“ (3).

Revmatoidní artritida (RA) se může vyskytnout v jakémkoliv věku. Onemocnění je 2-3 krát častější u žen než mužů (3).

Klinický obraz je charakterizován symetrickým postižením kloubů, zvláště končetin (3). „Současně může docházet i k rozvoji mimokloubních příznaků. Postupně dochází ke zhoršování funkce kloubu, neschopnosti a posléze invalidizaci nemocného“ (3).

Cílem poškození je synoviální tkáň. V této souvislosti dochází i k patologickým změnám v kloubní tekutině, chrupavce, kosti a periartikulárních strukturách. „V kloubu postiženém revmatoidní artritidou dochází zprvu ke kumulaci zánětlivých buněk. Synoviální tkáň je infiltrována T a B lymfocyty, plazmocyty, žírnými buňkami a makrofágy“ (3). „Většina infiltrujiících buněk produkuje cytokiny, dochází k indukci syntézy IL 1 a 2. Výrazný stimulační účinek má faktor nekrotizující nádory (TNF alfa a beta), TNF alfa je především protizánětlivým mediátorem. Cytokiny TGF beta jsou zodpovědné za tkáňovou reparaci a fibrózu, mají jak stimulační, tak i inhibiční vlastnosti. Významnou roli hraje i

faktor stimulující kolonie granulocytů-makrofágů (GM-CSF), interferon gama a další“ (3).

Po prodromální fázi, která trvá různě dlouhou dobu, začíná období mnohočetného postižení kloubů. Nejčastěji zde můžeme pozorovat symetrickou polyartritidu, která nejčastěji poškozuje malé klouby rukou a nohou. A takto postupně může RA poškodit jakýkoliv kloub (3).

Nespecifickými příznaky zde může být nechutenství, teplota, únava a úbytek na váze. V místě poškození kloubu se projevuje zduření s výpotkem a bolestivostí. Postupně dochází k deformitám a omezení hybnosti. Pro RA je také charakteristická ranní ztuhlost (3).

Z mimokloubního hlediska se mohou revmatoidní uzly tvořit i v jiných tkáních. Nejčastěji se tyto útvary velikosti hrášku vytvoří v podkoží a ve vnitřních orgánech. Typickými orgány, které RA může zasáhnout a vyvolat zánět je endokarditida, myokarditida, perikarditida nebo vaskulitida. Také se může objevit anémie, trombocytóza a svalová atrofie (3).

5.1.3 Sjögrenův syndrom

Sjögrenův syndrom (SS) je systémové onemocnění, které poškozuje exokrinní žlázy. Postihuje zejména slinné žlázy a exokrinní část pankreatu, může však zasáhnout i jiné orgány (1).

Vyskytuje se více u žen než u mužů ve středním věku (1).

„Jedná se o další klasické autoimunitní onemocnění, které se může vyskytnout samostatně nebo provází jiná autoimunitní onemocnění (lupus erythematodes, revmatoidní artritida, primární biliární cirhóza, aj.)“ (23).

Typickými příznaky Sjögrenova syndromu jsou xerostomie (vyschlost úst) a xeroftalmie (vyschlost očí) (16). Těmito příznaky trpí až 95% nemocných (1). V souvislosti s xerostomií dochází ke špatnému polykání, mluvení, nekvalitnímu spánku, tvorbě vředů a ulpívání jídla na sliznicích úst. Xeroftalmie často způsobuje fotosensitivitu, bolest a únavu očí, opakující se infekce. Tyto doprovodnými jevy mohou vést k podráždění, snížené zrakové ostrosti a destrukci zrakového epitelu (1).

Pacient může rovněž trpět artralgií (bolestí kloubů) a artritidou. Onemocnění je velmi často doprovázeno Raynaudovým fenoménem, což je záchvatovi-

té běláni až promodrávání kůže. V případě zasažení plic pacienty trápí přetrvávající kašel a dušnost. Pokud SS postihne ledviny, je v moči přítomná hematurie, pyurie, proteinurie. Onemocnění může také postihnout pankreas, což způsobuje zvýšené hladiny jejích enzymů a obtížné trávení (16, 1). Může zde i dojít k autoimunitní tyroiditidě, při které se mění funkce štítné žlázy a vyskytují se antithyroidální protilátky (16).

5.1.4 Systémová sklerodermie

Systémová sklerodermie (SSc) je onemocnění pojivové tkáně neznámé etiologie. Je charakteristické vyvoláváním zánětů, vaskulopatií (poškození krevních cév) a fibrózou (11, 25).

Onemocnění je častější u žen než u mužů. Výskyt stoupá s věkem (23). Riziko výskytu této nemoci je zvýšeno rodinnou predispozicí, infekcí CMV či vystavení různým lékům a chemikáliím, jako je například oxid křemičitý, vinylchlorid nebo organická rozpouštědla (11, 25).

Systémová sklerodermie (11) může zasáhnout gastrointestinální trakt, plíce, srdce nebo ledviny (21). Nejčastěji je zasažena kůže, způsobuje její tvrdé a hrubé změny extracelulární matrix (1).

5.1.5 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom (APS) je charakterizován přítomností antifosfolipidových protilátek, které způsobují arteriální nebo venózní trombózy. Za trombofilní stavy může podpora inhibice antikoagulačních faktorů, poškození fibrinolýzy a následné tvorby trombů (1).

U žen APS může způsobit komplikace během těhotenství či po porodu (5).

Rozlišujeme primární APS, které je přítomno nezávisle na jiném onemocnění a sekundární APS, který se vyskytuje u SLE či jiných autoimunitních onemocnění jako je SS či RA (5).

Cílovými strukturami u APS jsou proteiny vázající fosfolipidy, beta-2-glykoprotein a protrombin. Vyskytují se v membránách různých buněčných typů.

Protilátka s cílovým antigenem vytvoří komplex, který složitým procesem vyvolá následnou tvorbu trombů (1).

APS je často doprovázen mírnou až středně těžkou trombocytopenií, zvýšenými titry antifosfolipidových protilátek nebo kardiolipinovými protilátkami (5).

Nejčastějšími příznaky bývá hluboká žilní trombóza, mrtvice a povrchová tromboflebitida (5).

U žen s APS bývají komplikace v rané fázi těhotenství, při které může docházet k opakujícím ztrátám plodu, ale také může vyvolat ztrátu plodu v pokročilejší fázi těhotenství či předčasný porod (5). Vše se odehrává na základě reakce mezi annexinem V a protilátkami ve třídě IgG proti beta-2-glykoproteinu. Fyziologicky annexin V brání koagulačním procesům, je součástí buněk cév a placenty. Z hlediska patologického účinku dochází k vytvoření vazby s protilátkami, které vyvolávají koagulaci a následnou ztrátu plodu. Riziko je spojováno i s výskytem poporodních trombotických komplikací (23).

5.1.6 ANCA asociující vaskulitidy

Mezi ANCA asociující vaskulitidy (AAV), se kterými bychom se nejčastěji v imunologické laboratoři mohli setkat patří granulomatóza s polyangiitidou, mikroskopická polyangiitida a syndrom Churg-Straussové. Všechny jsou velmi závažné a obzvláště nebezpečné.

5.1.6.1 Granulomatóza s polyangiitidou

Chronická granulomatózní polyangiitida (GPA) je systémové zánětlivé onemocnění. Je charakteristické nekrotizující granulomatózní vaskulitidou malých a středně velkých cév. Typický je zde i nález protilátek proti cytoplazmě neutrofilů (10).

Choroba postihuje nejčastěji dýchací systém a ledviny. Má velmi bohatý klinický obraz. Většina pacientů před poškozením ledvin trpí nespecifickými projevy jako je malátnost, horečka či ztráta hmotnosti. Dále se zde mohou projevit běžné respirační příznaky až po velmi závažné neurologické či srdeční komplikace (10).

Mírnější formy onemocnění se projevují například postižením nosních dutin, jako je perforace nosního septa či tvorba orbitálních lézí, závažnější formy krvácením do plicních alveolů a postižením ledvin. Až u 80 -ti% pacientů s diagnózou GPA se objeví nekrotizující glomerulonefritida (10).

GPA se velmi špatně rozlišuje od běžného infekčního onemocnění, a proto by měl lékař v těchto situacích brát možnost této choroby na vědomí. Lékaře může navést zejména to, že pacient nereaguje na antibiotika a infekce jsou vleklé a opakující se. Pacienti často přicházejí v souvislosti s problémy horních cest dýchacích. Zásadním klinickým významem pro určení GPA je perforace nosního septa (10).

5.1.6.2 Mikroskopická polyangiitida

Jedná se o typ vaskulitidy, při které nedochází k tvorbě granulomů. Postihuje malé cévy vážnou nekrotizující vaskulitidou. Choroba zasahuje ledviny formou glomerulonefritidy a plíce plicní kapilaritidou. Poškození plic může pacienty ohrožovat plicním krvácením. Další symptomy jsou stejné jako u GPA (1).

5.1.6.3 Syndrom Churg-Straussové

Klinickými projevy syndromu Churg-Straussové, tzv. alergické granulomatózní angiitidy (EGPA) zahrnuje astma, sinusové infekty, eozinofilii, alergickou rýmu a ekzém (9, 23). Významným klinickým projevem je výskyt plicních infiltrátů obsahující eozinofily, které způsobují vaskulitidu plicních cév (23).

5.2 Orgánově specifická

Orgánově specifické choroby převážně poškozují jeden orgán a jsou velmi často doprovázeny řadou systémových příznaků a výskytem orgánově specifických autoprotilátek (12).

Jedny z nejčastějších orgánově specifických chorob jsou autoimunitní onemocnění štítné žlázy. Postihují 2 - 5% populace, jak muže, tak ženy, ty jsou však postihovány častěji. Jedná se zejména o onemocnění Hashimotovu tyroiditidu a Graves-Basedowovu chorobu. Štítná žláza je u obou chorob poškozována vlivem buněčné a humorální imunitní odpovědi proti antigenům štítné žlázy. T- a B- lymfocyty infiltrují dovnitř orgánu, vyvolají zde zánětlivou reakci, po-

škozují tkáň a způsobí změnu jeho funkce. B-lymfocyty působí zejména svou tvorbou autoprotilátek (1).

5.2.1 Hashimotova tyroiditida

Hashimotova tyroiditida je chronická autoimunitní tyreoiditida. V tomto případě se jedná o hypofunkci štítné žlázy (1).

Výskyt tohoto onemocnění je 1/1000 lidí. Výskyt se zvyšuje s věkem. Postihuje i muže, ale častěji ženy. Až 40% starších žen trpí tímto onemocněním. V důsledku choroby může dojít k selhání štítné žlázy, což postihne až 10% populace (1).

Toto onemocnění je známé tím, že dochází k postupné ztrátě funkce štítné žlázy vlivem její destrukce. Vlivem snížených hormonů dochází ke zpomalení rychlosti metabolismu (1).

Nejčastějšími příznaky je únava, ztráta vlasů, deprese, spavost, křehké nehty, zhrubnutí kůže nebo bradykardie. Možný je i výskyt artritidy či nárůstu hmotnosti. Z hlediska gastrointestinálních obtíží je možný výskyt dyspepsie, zácpy. U žen může být přítomnost poruchy menstruačního cyklu, jako je například oligomenorrhea. Možný je také i výskyt strumy v oblasti krku, která způsobuje dysfonii, dysfagii či dyspnoe (1).

5.2.2 Graves-Basedowova choroba

Graves-Basedowova choroba je onemocnění, které je charakteristické hyperfunkcí štítné žlázy (1).

Nejvyšší frekvence choroby je v rozmezí 40-ti až 60-ti let věku. Desetkrát více postihuje ženy, než muže (1).

Onemocnění je vyvoláno přítomností tyreoidálních protilátek, které váží a aktivují TSH receptor. Folikuly štítné žlázy hypertrofují a dochází zde také k hyperplazii. Vlivem tohoto procesu dochází k nadměrné syntéze hormonů (1).

Klinickými projevy jsou zejména zvětšení štítné žlázy, periorbitální edém, který je doprovázen podrážením očí, rozmazané vidění, diplopie, někdy také bolestí očí. Častými projevy jsou výskyt třesu, nespavosti, průjmu, tachykardie, svalové slabosti, ztráty hmotnosti či u žen nepravidelná menstruace (1).

5.3 Autoimunitní choroby orgánově lokalizované

Vznikají na základě tkáňového poškození, které vyvolávají autoreaktivní T- lymfocyty (Th1, Tc) nebo autoprotílátky, které tkáň poškodí svým cytotoxickým účinkem či ovlivnění její funkci (12).

5.3.1 Ulcerózní kolitida

„Ulcerózní kolitida je nespecifický hemoragicko-katarální nebo ulcerózní zánět sliznice konečníku a přilehlé části nebo celého tračníku s nárazovým nebo chronicky exacerbuujícím průběhem“ (8).

„Celosvětově incidence ulcerózní kolitidy kolísá od 0,5 do 24,5/100 000 obyvatel. V České republice je incidence 3–5/100 000“ (8).

Klinický obraz koreluje se závažností choroby. Významnými klinickými projevy je průjem, přítomnost krve a hlenu ve stolici a bolesti břicha. Může se také objevit pocit nedostatečného vyprázdnění, bolestivé pocity na stolici s defekací malého množství stolice nebo hlenu. Může se také objevit zácpa. V případě kolitidy většího rozsahu je typická přítomnost tachykardie a úbytku hmotnosti (8).

„Průběh nemoci je charakterizován epizodami relapsů a remisí“ (8).

5.3.2 Crohnova choroba

„Crohnova choroba (CD) je chronické zánětlivé onemocnění zažívacího traktu nejasné příčiny. Pro onemocnění je typické střídání období klidu (remise) a zvýšené aktivity (exacerbace). Nejčastější lokalitou manifestace onemocnění je terminální ileum, ale postižena může být kterákoliv část trávicí trubice“ (13)

„Mezi hlavní klinické projevy akutní fáze onemocnění patří průjmy bez příměsí krve nebo s její příměsí, bolesti břicha, dehydratace a hmotnostní úbytek s průvodním metabolickým rozvratem (sideropenie, hypokalémie, hypomagnezémie, hypofosfatémie, alterace lipidového a proteinového metabolismu, deficit vitamínů a stopových prvků)“ (13).

5.3.3 Celiakie

„Celiakie je permanentní nesnášenlivost lepku obsaženého v obilí, která se projevuje u vnímavých osob typickým postižením sliznice tenkého střeva. Jedná se o onemocnění, které je typickou autoimunitní chorobou“ (17).

Součástí lepku je alfa-gliadin, proti kterému u této choroby imunitní systém reaguje. „Alfa-gliadin je v žaludku, duodenu a tenkém střevě enzymaticky štěpen na menší peptidy, které se potom vážou na povrchové glykoproteiny HLA-DQ2 a HLA-DQ8 pozitivních imunokompetentních buněk, které spouštějí ve sliznici tenkého střeva imunitní odpověď, a to jak buněčnou, tak humorální – dochází ke vzniku autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze“ (17). Na podkladě této reakce dochází k poškození enterocytů, a tím dochází k výskytu typického histologického obrazu poškozené sliznice. Změny mírnější formy mohou být patrné pouze na úrovni kartáčového lemu enterocytů nebo výraznějšího charakteru, které vedou k totální atrofii klků, hypertrofii Lieberkühnových krypt a infiltraci submukózy lymfocyty (17).

Výskyt choroby v České republice se odhaduje na 1/200–250. „Předpokládá se, že touto chorobou trpí okolo 40–50 tisíc osob. V současné době je sledována pouze asi desetina, to znamená okolo 4000 pacientů“ (17).

Klinické projevy se liší v závislosti na věku. V období dětských let se projevuje celiakie formou mastných objemných průjmů, nafouklým bříškem a neprospíváním. Neprospívání charakterizuje snížená hmotnost a zpomalení růstu (17).

V období dospělosti mohou pacienti typicky trpět objemnými mastnými stolicemi, hubnutím a bolestí břicha (17), ale častěji než v dětském věku se vyskytují netypické projevy jako například zácpa, anémie, občasné pobolívání břicha, únavový syndrom, epilepsie, neplodnost nebo plešatost (17).

5.3.4 Autoimunitní hepatitidy

Autoimunitní hepatitida (AIH) je chronické onemocnění jater s neznámou etiologií. AIH je charakterizována chronickým zánětem a může končit jaterní cirhózou, fibrózou až jaterním selháním (6, 23).

Klinické projevy z počátku nemusí být žádné. Velmi často je zjištěna hypergamaglobulinemie se zvýšeným imunoglobulinem ve třídě IgG. Charakteristickým nálezem bez jakýchkoliv příznaků bývají zvýšené jaterní testy, zejména transaminázy (6).

Po delší době asymptomatické AIH může nastat stav symptomů, podobný těžké akutní virové či toxické hepatitidě. Velmi často může být tato choroba klinickými symptomy podobná primární biliární cirhóze (6).

V souvislosti s výskytem AIH může být přítomna i další autoimunitní poškození, a to například štítné žlázy (6).

5.3.5 Primární biliární cirhóza

„Primární biliární cirhóza (PBC) je definována jako nepurulentní destruktivní zánětlivé onemocnění interlobulárních a septálních intrahepatálních žlučodů“ (19). K poškození žlučodů dochází vlivem granulomatózního typu reakce, která vede k perzistující cholestáze. Postupem času choroba postupuje do stavu progresivní fibrózy až jaterní cirhózy s jaterním selháním (19).

Etiologie tohoto onemocnění není známa. Velmi často doprovází další autoimunitní onemocnění, jako je například revmatoidní artritida (19). „Ve více než 90 % jsou postiženy ženy středního věku“ (19). Incidence v populaci je cca 3,5/100 000 obyvatel, u žen nad 40 let 10/100 000 obyvatel (19).

„Choroba bývala diagnostikována u žen s ikterem, xantomy, pruritem a hyperbilirubinemií. Nyní je většinou zachycena dříve u nemocných, které jsou vyšetřovány pro zvýšení obstrukčních enzymů bez klinických známek a nálezu zvýšeného bilirubinu. Diagnózu potvrdí pozitivní nález protilátek proti mitochondriím (AMA) či pozitivní histologický nález při jaterní biopsii“ (19).

„Prognóza choroby závisí na době záchyty. U neléčených asymptomatických nemocných je průměrné přežití cca 16 let, u symptomatických forem cca polovina. Ačkoliv víme, že zhruba 50% asymptomatických pacientů se v průběhu 10 let stane symptomatickými, průběh je velmi individuální“ (19).

6 Laboratorní diagnostika autoprotilátek

V imunologické laboratoři stanovujeme autoprotilátky převážně pomocí nepřímé imunofluorescence (NIF), ELISA metodami a imunoblotem. ELISA a imunoblot jsou oproti NIF specifitější a citlivější. A proto je využíváme pro bližší určení autoprotilátek, proti jakému cílovému antigenu jsou namířeny (2).

6.1 Nepřímá fluorescence

Imunofluorescenční metody jsou hojně využívány pro detekci specifických molekul proteinů, lipidů, oligosacharidů i polysacharidů (20). Nepřímá fluorescence je považována za zlatý standard při stanovování autoprotilátek. Je to metoda, která je značně zatížená velkou subjektivitou odečítajícího pracovníka, a proto je doplňována ELISA metodami či imunoblotem (2).

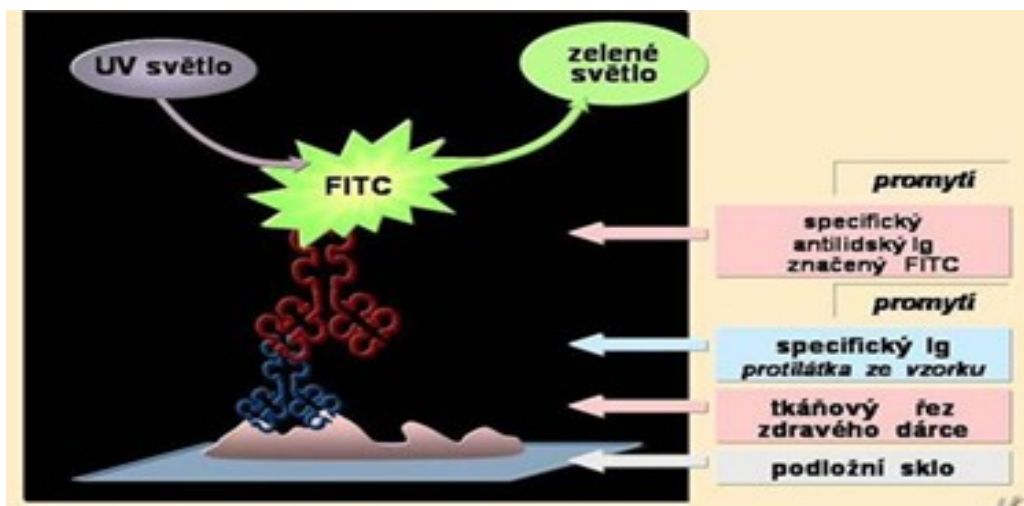
Základem metody je vizualizace vzniklého komplexu antigenu a protilátky (2). Využíváme zde fluorescence, která nastane vlivem intermolekulární změny pomocí absorbovaného záření. Látky, jež mohou absorbovat záření, se nazývají fluorofory. Ty jsou schopny pohltit záření o kratší vlnové délce, čímž vyzáří záření o delší vlnové délce jiné barvy (20).

„Fluorochromy značené struktury je možno detekovat pomocí fluorescenčního mikroskopu – přístroje, který je podobný klasickému světelnému mikroskopu – odlišnost spočívá v doplnění o velice silný zdroj světla a dva typy filtrů. První sada filtrů je umístěna mezi zdroj světla a vzorek (umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory světlem o vybraných vlnových délkách), druhá pak vpouští do objektivu světlo, které bylo emitováno příslušným fluoroforem. Mezi nejužívanější fluorofory v klinických laboratořích patří fluorescein, rhodamin a phycoerythrin. Fluorescein izothiokyanát (FITC) je chemická forma fluoresceinu, která je nejčastěji užívána ke konjugaci s proteiny“ (20).

Pro stanovení autoprotilátek je důležité mít substrát, na kterém proběhne vyšetření. Substráty se dle jednotlivých autoprotilátek liší (2). V naší laboratoři využíváme již komerčně vyrobené a zafixované na podložním skle.

Obecným postupem zpracování vzorků pro stanovení pomocí metody NIF se skládá z několika kroků, viz obr. č. 1. V prvním z nich aplikujeme zředěný vzorek na substrát. Vzorek ředíme nejčastěji PBS pufrem, který využíváme i

na promytí mezi jednotlivými inkubacemi. PBS (Phosphate Buffered Saline) je fosfátový roztok. V době první inkubace dochází v případě positivity k navázání příslušných autoprotilátek. Po inkubaci substrát promyjeme promývacím roztokem, aby se všechny nenavázané složky odstranily. Následuje krok, ve kterém aplikujeme sekundární protilátku. „Druhá (sekundární) protilátka je obvykle zvířecí (králíčí, kozí nebo myší) protilátka proti lidské Fc-části imunoglobulinové molekuly“ (2). Sekundární protilátka je značená fluorescenční látkou (2). Po inkubaci s konjugátem substrát opět promyjeme, a následně zamontujeme montovacím médiem a přikryjeme krycím sklíčkem. Takto zpracovaný preparát pozorujeme pod fluorescenčním mikroskopem.



Obrázek 1 Obecný princip zpracování preparátu pro NIF

(Zdroj: <<https://docplayer.cz/47807208-Metody-vysetreni-imunity.html>>)

„Výsledkem imunofluorescence je kvalitativní rozhodnutí odečítajícího laboratorního pracovníka (zatížené subjektivitou), zda a jak preparát svítí“ (2). Případnou pozitivitu ředíme geometrickou řadou. Výsledkem je takové ředění, ve kterém byla ještě pozitivita odečtena.

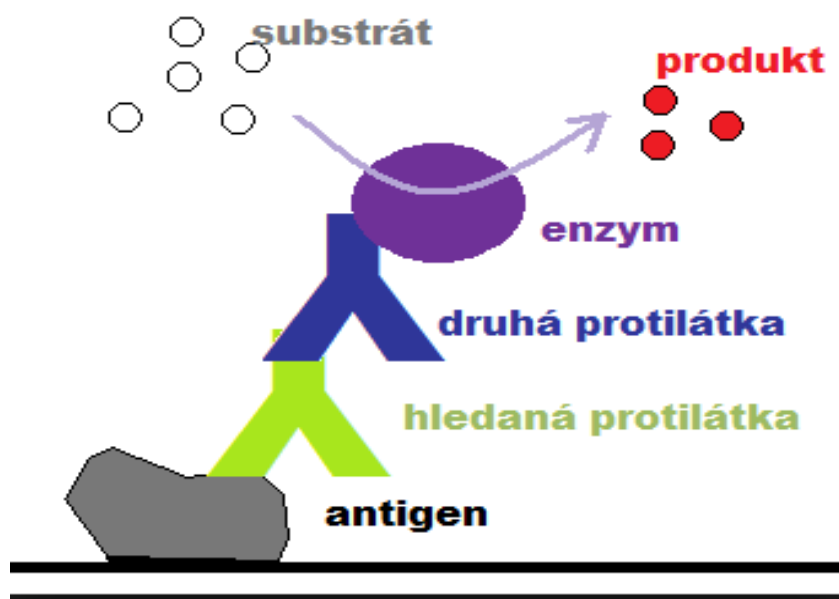
6.2 ELISA

„Enzymová imunoanalýza je vysoce citlivá, specifická a dostatečně reprodukovatelná imunochemická metoda (2). ELISA (Enzyme-Linked Immuno-

Sorbent Assay) je typ heterogenní EIA, což znamená, že na pevné fázi je nespecificky adsorbován v nadbytku buď antigen nebo protilátka (20).

Využíváme zde ke značení antigenu nebo protilátky enzymy (20). Příkladem vhodných enzymů je například křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza z telecích střev, beta galaktosidáza z *E.coli* nebo glukózooxidáza z *Aspergilla niger* (20).

Obecný princip ELISA metody můžeme vidět na obr. č. 2. Spočívá v reakci mezi antigenem a protilátkou na dně jamky mikrotitrační destičky. Během první inkubace vznikne komplex antigen-protilátka. Přebytek nenavázaných složek odmyjeme a přidáme sekundární protilátku – konjugát, což je zvířecí protilátka namířené proti lidské protilátce s navázaným enzymem. Přebytek konjugátu po inkubaci opět odmyjeme a následně vizualizujeme vytvořený komplex přidáním substrátu. Substrát je štěpen enzymem navázaným na sekundární protilátce. Reakci zastavujeme např. roztokem kyseliny a výsledný barevný produkt fotometricky měříme (2).



Obrázek 2 Nejčastěji využívaný princip ELISA metody v praxi

(Zdroj: <<https://www.wikiskripta.eu/w/ELISA>>)

Z hlediska diagnostiky autoprotilátek máme na dně jamek nativní nebo uměle purifikované antigeny, na které se autoprotilátky namířené proti cílovým antigenům specificky naváží. ELISA metodou lze stanovit široké spektrum au-

toprotilátek, jejichž výsledek je kvantitativní (jednotky/ml) nebo semikvantitativní (IP – index positivity).

6.3 Imunoblotting

Imunoblotting je analytická metoda, která je založena na přenosu molekul z pohyblivé fáze v gelu po elektroforetickém rozdělení na pevnou fázi. Hojně využíváme gel polyakrylamidový nebo agarózový. Jako pevnou fázi nejčastěji využíváme nitrocelulóзовou membránu. Přenos můžeme uskutečnit difúzí nebo pomocí použití jednosměrného elektrického proudu – electroblotting (20).

Metodu využíváme pro přenos DNA, RNA či proteinů. Molekuly lze přenést až po předchozí separaci pomocí elektroforézy nebo po použití isoelektrické fokusace na gelových nosičích (20).

Velkého významu nabývají multiplexové metody, kterými jsme schopni stanovit široké spektrum protilátek. Jedná se o line assay nebo imunodotovou metodu. Metody slouží pro kvalitativní analýzu protilátek proti vybraným antigenům (20).

Mezi imunoblotem a imunodotem je značný rozdíl. Spočívá v tom, že na dotu máme vysoce purifikované antigeny rovnoměrně vzdálené a rovnou nanesené na membránu. Zatímco u imunoblotu jej rozdělíme z hlediska jejich migrace, tudíž jejich vzdálenost není rovnoměrná a téměř nikdy stejná.

Tento proces nám provádí výrobce komerčních souprav. V laboratoři již pracujeme s kompletně vytvořenými imunoblotty či imunodoty.

Jednotlivé proužky umístíme do žlábků ve vaničce. Pro zahájení první inkubace nanese příslušné množství naředěného vzorku a necháme mírně houpat. Po uplynulé době inkubace promyjeme a přidáme konjugát. I zde se jedná o zvířecí protilátku namířenou proti lidské, označenou enzymem. Po inkubaci s konjugátem jednotlivé proužky promyjeme. V dalším kroku přidáme substrát. Ten nám v případě positivity vizuálně znázorní místa, ve kterých došlo k navázání protilátek. Po tomto kroku následně katalytickou reakci substrátu a enzymu stopujeme přidáním vody. Proužky posléze osušíme a odečítáme dle přiložených šablon (24).

V naší laboratoři využíváme jak imunoblotty, tak imunodoty. Dotovou metodou jsme schopni prokázat široké spektrum autoprotilátek ve třídách IgG, popřípadě IgM.

7 Vyšetření jednotlivých typů autoprotilátek

7.1 Antinukleární autoprotilátky

Detekce antinukleárních autoprotilátek (ANA) se provádí na substrátu Hep-2 buněk. Jedná se o buňky z buněčné linie lidského nazofaryngeálního karcinomu (2). Základní ředění pro vyšetření ANA autoprotilátek používáme 1:80.

Pozitivita ANA autoprotilátek je považována za nespecifický nález, jelikož zde může být jejich zaměření na různé komplexy nukleárních antigenů. Cílovými strukturami může být chromatin, jaderná membrána, jadérko, ribonukleové kyseliny, jaderná matrix a její tekutina nebo cytoplazma (14).

Rozlišujeme několik typů ANA pozitivit. Ty nejzákladnější z nich jsou popsány v tab.č 1. Pozitivní nález těchto autoprotilátek nám jednoznačně neurčuje přítomnost jednotlivých onemocnění. Ovšem jsou zde jisté spojitosti s typem positivity a cílové struktury, na kterou mohou být autoprotilátky namířeny (14).

Pozitivita ANA autoprotilátek může být nalezena i u chorob jako jsou například autoimunitní hepatitidy či zdraví jedinci, u kterých se výskyt ANA autoprotilátek zvyšuje s věkem. Zvýšená pozornost by měla být věnována lidem, kteří jsou pozitivní 1:640 a více bez výrazného klinického obrazu. V těchto případech by měl být pacient lékařem pravidelně kontrolován pro případný výskyt autoimunitní choroby v budoucnosti, jelikož se autoprotilátky mohou vyskytovat i několik let před manifestací choroby (2).

Tabulka 1 Základní typy ANA pozitivit, cílové antigeny a asociace s jednotlivými chorobami

Typ	Popis fluorescence na Hep-2 buňkách	Cílové antigeny	Nejčastější onemocnění
homogenní	difúzní jaderná pozitivita, chromatin v metafázi	dsDNA	SLE
jemně zrnitá	jemně stejnoměrně zrnitá jaderná pozitivita bez přítomného chromatinu	Ro/SS-A, La/SS-B	SS, SLE, RA
hrubě zrnitá	kondenzace všech struktur kromě jádra	U1-RNP, Sm	SSc, SLE
nukleolární	pozitivita jadérek	Scl-70, PM-Scl	SLE, SSc
centromera	drobná zrna v buňkách, záleží na fázi buněčného cyklu	CENP-B	SSc, PBC
pleomorfní heterogenní	spojení různých výše zmíněných typů	PCNA	SLE

(Zdroj: 2, 22)

Vyšetření ANA NIF u nás v laboratoři slouží jako screeningová metoda. Pozitivní ANA NIF může být doplněna metodou ELISA, formou ENA screeningových autoprotilátek ve třídě IgG.

Naše laboratoř pro toto stanovení používá soupravu, kterou lze najednou stanovit protilátky proti nRNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, Ro-52, Scl-70, Jo-1, PCNA, PM-Scl, ribozomální P proteiny a centromery. Anti-nRNP/Sm, anti-Sm jsou autoprotilátky proti malým jaderným ribonukleoproteinům (snRNP). Anti-Ro/SSA je autoprotilátka proti malým cytoplazmatickým RNA vázajícím proteiny Ro60 a Ro52. Anti-La/SSB je namířena proti fosfoproteinu účastnícímu se transkripce do RNA. Autoprotilátka anti-Scl-70 je proti topoizomeráze, což je enzym, který se podílí na vinutí DNA. Anti-Jo-1 je zaměřená proti histidyl-tRNA syntetáze. Anti-PCNA je autoprotilátka proti přidruženému proteinu DNA polymerázy. Autoprotilátka anti-PM-Scl míří zejména proti jaderným polypeptidům. Jamka je v tomto případě potažena mixem těchto antigenů. Sama o sobě nám tato metoda pozitivitu konkrétních autoprotilátek vůči zmíněným antigenům neprokáže, a proto slouží pro obecné určení výskytu ENA autoprotilátek a ověření pozitivního nálezu NIF.

Pro stanovení jednotlivých antigenů můžeme využít metodu ELISA, např. pro stanovení 6 nejčastějších antigenů (nRNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-

1, nukleozomů a histonů. Zde zjistíme jednotlivé hladiny nejčastěji se vyskytujících autoprotilátek.

Blotovou technikou jsme schopni zachytit autoprotilátky ve velmi nízké koncentraci. U nás pracujeme se soupravou, kde na jednom blotu můžeme detekovat jednotlivé protilátky proti nRNP/Sm, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, centromerovému proteinu typu B, PCNA, dsDNA, nukleozomy, histony, ribosomální P-proteiny, AMA-M2.

7.2 Autoprotilátky proti dsDNA

Autoprotilátky dsDNA stanovujeme na substrátu, kterým je prvok, zvaný *Crithidium lucilliae*. Obsahuje kinetoplast, ve kterém se nachází koncentrovaná dvojšroubovice DNA (2). Pro tuto detekci využíváme základní ředění 1:10.

Charakteristickou pozitivitou dsDNA autoprotilátek je jeho svítící kinetoplast. Zároveň s kinetoplastem může svítit i jádro bičíkovce nebo se může objevit obraz pouze svítícího jádra. Obraz svítícího jádra je charakteristický pro autoprotilátky, které jsou namířené proti jiným jaderným antigenům (2).

Pozitivní protilátky proti dsDNA jsou na substrátu Hep-2 buněk pozorovány jako homogenní typ fluorescence (14).

Tento typ autoprotilátek se nejčastěji vyskytuje u systémového lupusu, autoimunitních hepatitid, Sjögrenova syndromu či tyreoiditid (2).

U nás v laboratoři můžeme stanovení dsDNA autoprotilátek doplnit o detekci autoprotilátek proti nukleozomům a histonům. Vyšetřujeme je jak ELISA metodou, tak i pomocí imunoblotu. Hojně je využívána zejména detekce hladin, tedy metoda ELISA. Tyto druhy vyšetření jsou velmi často doporučovány v případě positivity NIF pro ověření výsledku.

Autoprotilátky proti nukleozomům jsou přítomné ještě dříve než samotné dsDNA. Titr těchto autoprotilátek koreluje s aktivitou systémového lupusu a lupusem způsobenou nefritidou. Tento marker je mnohem citlivější než samotné stanovení dsDNA. Histonové autoprotilátky jsou hojně přítomné u lupusové nefritidy či polékového lupusu. S jejich vysazením autoprotilátky vymizí (18).

7.3 Autoprotilátky proti cytoplasmě neutrofilů

„ANCA je obecný termín pro všechny autoprotiátky namířené proti cytoplasmatickým antigenům neutrofilů“ (14). Cílovými antigeny jsou zde nejčastěji myeloperoxidáza, proteináza 3, elastáza, katepsin G, lactoferin a BPI. Myeloperoxidáza (MPO) se podílí na tvorbě kyslíkových radikálů, proteináza 3 je neutrální serinová proteáza, která rozkládá extracelulární matrix. Elastáza a katepsin jsou též proteázy, které rozkládají pojivovou tkáň. Elastáza je zejména enzym pankreatické tekutiny. Laktoferin váže železo, a tím působí bakteriostatickým účinkem. BPI je membránový protein zvyšující bakteriální permeabilitu u gram negativních bakterií.

Jako substrát používáme etanolem fixované lidské neutrofilly nebo formalinem fixované lidské neutrofilly. Základním ředěním vzorku je ředění 1:20. Rozlišujeme několik typů ANCA autoprotiátek. Jednotlivé typy jsou popsány v tab. č. 2.

Tabulka 2 Typy pozitivních ANCA nálezů

Typ	Popis fluorescence	Fluorescence etanol	Fluorescence formalin	Cílové antigeny
pANCA	perinukleární	zrnitá perinukleární pozitivita	zrnitá pozitivita cytoplazmy	myeloperoxidáza
cANCA	cytoplasmatická	zrnitá pozitivita cytoplazmy	zrnitá pozitivita cytoplazmy	proteináza 3
aANCA	atypická	zrnitá perinukleární pozitivita/cytoplazmy	negativní	katepsin G, BPI, elastáza, laktoferin

(Zdroj: 18)

V naší laboratoři provádíme vyšetření těchto autoprotiátek na etanolem fixovaném substrátu. Pouze na základě tohoto vyšetření však nejsme schopni rozlišit zda se jedná o pANCA autoprotiátky, ANA autoprotiátky, případně aANCA autoprotiátky. Antinukleární autoprotiátky nám zde diagnostiku znesnadňují. S použitím formalinového substrátu se to dá ale velmi dobře rozeznat, jestli se jedná o pANCA či aANCA. Zároveň je vhodné doplnit toto vyšetření o ANA NIF.

V případě jakékoliv positivity ANCA NIF u nás vyšetřujeme dále metodou ELISA koncentrace MPO a PR3. Důvodem je velká závažnost z hlediska možného výskytu vaskulitid. Hladina MPO a PR3 je u vaskulitid velmi důležitá, jelikož koreluje s klinickým stavem pacienta. Ostatní antigeny vyšetřujeme až na základě požadavku lékaře. I zde je možnost vyšetření jednotlivých antigenů (enzymů) metodou ELISA.

Imunologické laboratoře jsou převážně rutinního provozu. Některé však právě z důvodu závažnosti chorob mohou mít tato vyšetření možnost statimového vyšetření, nebo po dohodě s indikujícím lékařem možnost provést analýzu vzorku ve zrychleném režimu.

Pokud je pacient u nás v laboratoři vyšetřen a má vysokou hladinu MPO či PR3, výsledek při prvním pozitivním nálezu podléhá hlášení ošetřujícímu lékaři.

Výskyt autoprotilátek pANCA bývá nejčastěji asociován s mikroskopickou polyangiitidou a eozinofilní granulomatózní polyangiitidou. Zde je cílovým antigenem myeloperoxidáza.

CANCA autoprotilátky bývají přítomny u granulomatózy s polyangiitidou, a to hlavně autoprotilátky proti proteináze 3.

AANCA bývá u chorob jako je systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, autoimunitní hepatitidy, primární biliární cirhóza či nespecifické střevní záněty – ulcerózní kolitida a Crohnova choroba.

Pro podrobnější diagnostiku z hlediska střevních onemocnění může být laboratorní obraz doplněn o vyšetření ASCA protilátek ve třídě IgA a IgG. ASCA protilátky zde reagují s mannanem, který je obsažen v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Tato metoda je vhodná pro diferenciální diagnostiku Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy. U Crohnovy choroby je zde nález pozitivní, zároveň je metoda vhodná pro její monitoraci. Vlivem úspěšné léčby klesá hladina protilátek ASCA (18).

7.4 Hepatální autoprotilátky

Pro stanovení těchto autoprotilátek využíváme NIF a imublotovou metodu, případně EIA metody (14).

V případě NIF máme jako substrát krysí řezy- kombinaci krysích jater, žaludku a ledvin. Základním ředěním vzorku je 1:20. Pozitivitu AMA (antimitochondriálních autoprotilátek) autoprotilátek můžeme zachytit i na Hep-2 buňkách, tedy na substrátu pro detekci ANA autoprotilátek. Na Hep-2 buňkách jej vidíme jako pozitivitu zrnité cytoplazmy.

NIF AMA slouží zejména pro screeningovou detekci autoprotilátek proti mitochondriím, jednotlivé typy zde nejsme schopni rozlišit (14). Případnou pozitivitu nalezneme na všech třech typech řezů. Nalezneme zde pozitivní zrnitou fluorescenci na proximálních a distálních tubulech ledvin, hepatocytů a parietálních buňkách (15).

Na kombinaci substrátu můžeme diagnostikovat i ASMA (autoprotilátek proti hladkému svalu), které cíleně hledáme na tkáni krysího žaludku. Zde vznikne případná homogenní fluorescence na svalových buňkách slizničního vaziva, svalovou vrstvou sliznice a svalovými vlákny cév. Stejný typ positivity však vidíme i na řezu jater a ledvin, ve kterých je patrná pozitivita i mesangiálních buněk (15).

Autoprotilátky proti LKM (proti mikrozomům jater a ledvin) lze také detekovat na příslušné trojkombinaci substrátu – zejména na krysích ledvinách v proximálních tubulech jako zrnitou fluorescenci (14,15). Pozitivitu lze nalézt i na řezu krysích jater v podobě výskytu cytoplazmatické homogenní fluorescence (15). Cílovými antigeny mohou mít LKM 1, 2 a 3. Opět se jedná pouze o screeningový výskyt anti-LKM (14).

AIH rozlišujeme několik typů. AIH typu I je charakteristická pro svou pozitivitu AMA a ASMA, ANA a pANCA. AIH typu II je charakteristická pro výskyt autoprotilátek anti-LKM 1 (cytochrom P450), a anti-LC-1 (cytosolový jaterní antigen). U typu AIH III je častá přítomnost positivity anti-SLA (solubilní jaterní antigen) a někdy je zde i pozitivita ANA a ASMA (18).

U PBC je nejčastější výskyt autoprotilátek AMA, ANA a ASMA. Bývají přítomné již několik let před jakýmkoliv výskytem příznaků (19).

Jakoukoliv zjištěnou pozitivitu je vhodné confirmovat metodou imunoblotu, kterým rozlišíme konkrétní zaměření autoprotilátek. Naše laboratoř touto metodou je schopna detekovat AMA-M2, LKM 1, SLA, LC1, gp210, sp100 a aktin. Pozitivitu aktinu můžeme nalézt v NIF jako výskyt ASMA autoprotilátek.

Antigeny gp210 (nukleosporin) a sp100 (nukleární tělískový protein) jsou asociovány s PBC, jejich hladina koreluje s progresí choroby (18).

Stanovení hepatálního souboru se provádí na základě podezření výskytu onemocnění jater a žlučových cest. Mezi nejčastější autoimunitní hepatopatie patří PBC či AIH.

7.5 Antiendomyziální autoprotiátky

Detekce antiendomyziálních autoprotiátek (EMA) se provádí na opičím jícnu. Cílovou strukturou je zde síťovitá struktura mezibuněčné hmoty mezi sliznicí a svalovinou (endomyzium) (2). Základním ředěním vzorku pro provedení vyšetření užíváme 1:5.

Hlavním antigenem EMA autoprotiátek je zde tkáňová transglutamináza (tTG), což je enzym, který je tvořen v enterocytech (17).

EMA NIF slouží čistě jako screeningová metoda. Nelze z ní přímo stanovit diagnózu. Vyšetření je také vhodné provádět u nemocných, u kterých již diagnóza celiakie byla potvrzena. V těchto případech zde slouží pro ověření, zda pacient dodržuje bezlepkovou dietu (17).

Autoprotiátky detekujeme obvykle ve třídě IgA. Až 10 % pacientů trpí sníženou hladinou IgA, proto je vhodné vyšetření EMA a tTG doplňovat stanovením celkové hladiny IgA. V případě, že se potvrdí snížená hladina imunoglobulinu, vyšetřujeme autoprotiátky v příslušných metodách i ve třídě IgG (17). Pro vyšetření tTG v obou třídách využíváme metodu ELISA.

7.6 Antifosfolipidové autoprotiátky

Antifosfolipidové autoprotiátky jsou namířené proti neutrálně či záporně nabitým fosfolipidům. Jedná se například o kardiolipinové protiátky, fosfatidylcholinové protiátky, fosfatidyletanolaminové protiátky, fosfatidylinositolové protiátky, fosfatidylserinové protiátky. Mohou doprovázet infekce či autoimunitní onemocnění jako je systémový lupus erythematosus (14). Také lze diagnostikovat autoprotiátky proti anexinu V a beta-2-glykoproteinu.

Běžně využíváme detekci anti-kardiolipinových protilátek a protilátek proti beta-2-glykoproteinu. Mohou být případy, kdy pacienti trpí klinickými projevy, ale testy mají negativní. Zde je vhodné laboratorní testy rozšířit o stanovení fosfatidylcholinových, fosfatidyletanolaminových, fosfatidylinositolových, fosfatidylserinových protilátek a annexinu V. Detekci provádíme metodou ELISA ve třídách IgG i IgM (1).

Stanovení antifosfolipidových autoprottilátek je při podezření na APS jakékoliv formy nesmírně důležité. Tuto diagnózu lékaři skládají z klinických projevů, které jsou zde zásadní a doplněné příslušnými laboratorními testy. Pro potvrzení diagnózy by měla být přítomna pozitivita alespoň jednoho laboratorního stanovení antifosfolipidových autoprottilátek (1).

Antifosfolipidové autoprottilátky se mohou vytvořit i u infekčních onemocnění. Výskyt je převážně přechodný. Klinické projevy se objevují velmi vzácně. Takovým onemocněním může být například hepatitida typu C, virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) a zejména syfilis (1).

7.7 Stanovení revmatoidního faktoru

Významnou imunologickou metodou je stanovení revmatoidního faktoru (RF). Jedná se o autoprottilátku, která je namířená proti Fc-části fragmentu prottilátky ve třídě IgG (1, 23).

Metodou ELISA ji stanovujeme ve třídách IgA, IgG a IgM. Izotyp IgG bývá asociován s přítomností vaskulitid. Izotyp IgA je pozitivní při postižení kostí erozemi. RF autoprottilátky nemusíme nutně detekovat pouze u lidí s RA, ale i u pacientů s chronickými bakteriálními infekcemi jako je syfilis či tuberkulóza. Dále u parazitárních infekcí či jaterních onemocnění. Přechodně se mohou objevit po očkování nebo akutních infekcí (3). Pokud laboratorně nalezneme pozitivitu RF bez klinického obrazu, je zde riziko, že se RA s odstupem času objeví (1). A proto lze stanovením RF přispět k diagnóze RA pouze nespecificky (23).

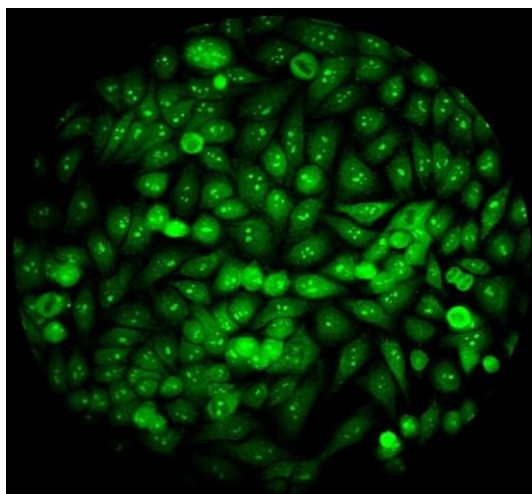
„Identickou aktivitu mají antifilagrinové prottilátky, které se nyní rutinně určují jako prottilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP)“ (3).

Jako u předchozích detekcí autoprottilátek je i zde ideální kombinace obou metod.

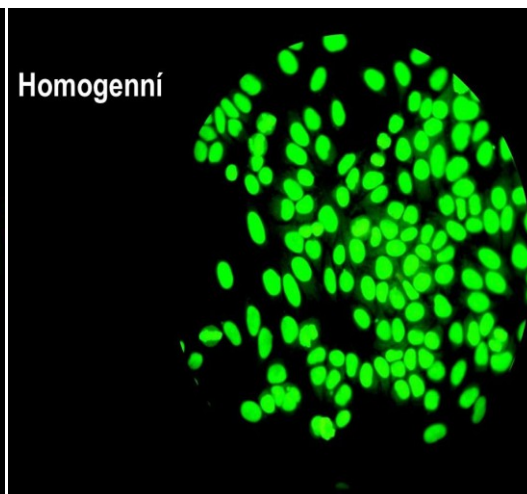
8 Atlas fluorescenčních obrazů laboratorního stanovení auto- protilátek

8.1 NIF detekce ANA autoprottilátek

Substrát - Hep2 buňky

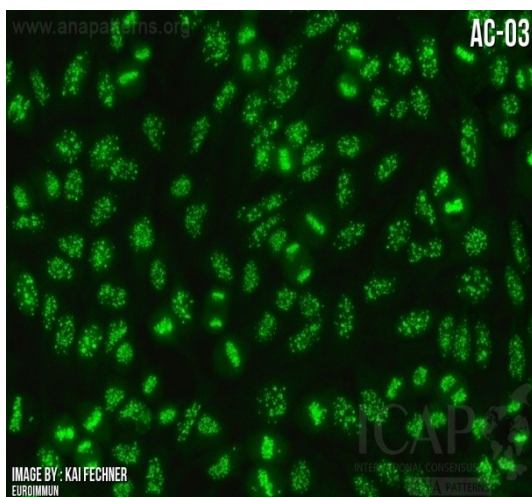


Obrázek 3 Nukleolární typ ANA

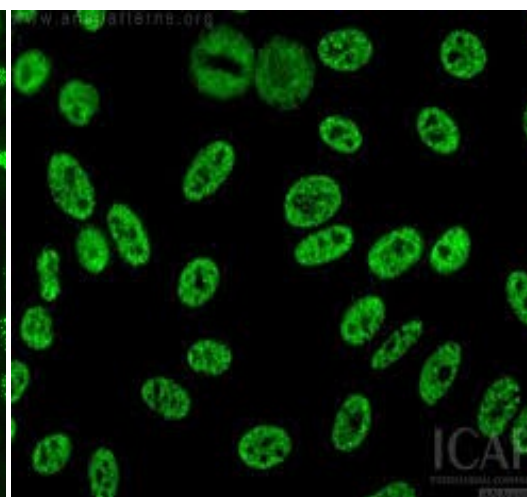


Obrázek 4 Homogenní typ ANA

(Zdroj: <<https://slideplayer.cz/slide/3753885/>>)

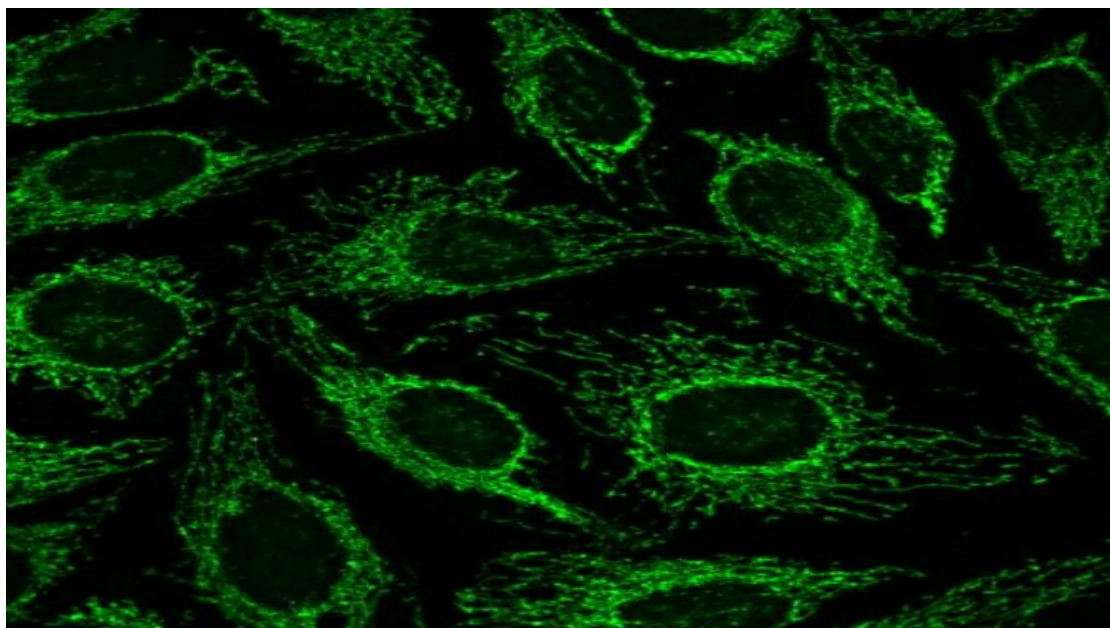


Obrázek 5 Centromerový typ ANA



Obrázek 6 Zrnitý typ ANA

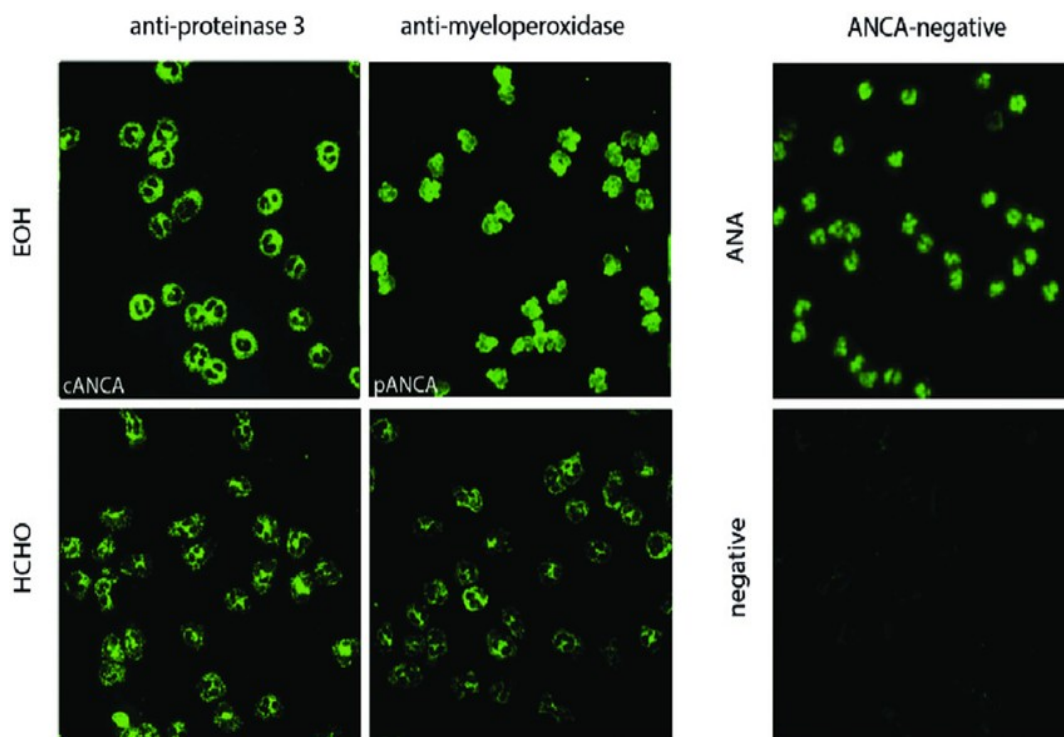
(Zdroj: <<https://is.muni.cz/el/1411/jaro2018/BLIM0411c/imunofluorescence.pdf>>)



Obrázek 7 Pozitivita cytoplazmy u antimitochondriálních autoantiláték
 (Zdroj: <<https://is.muni.cz/el/1411/jaro2018/BLIM0411c/imunofluorescence.pdf>>)

8.2 NIF detekce ANCA autoantiláték

Substrát - lidské neutrofilly fixované etanolem/formalinem

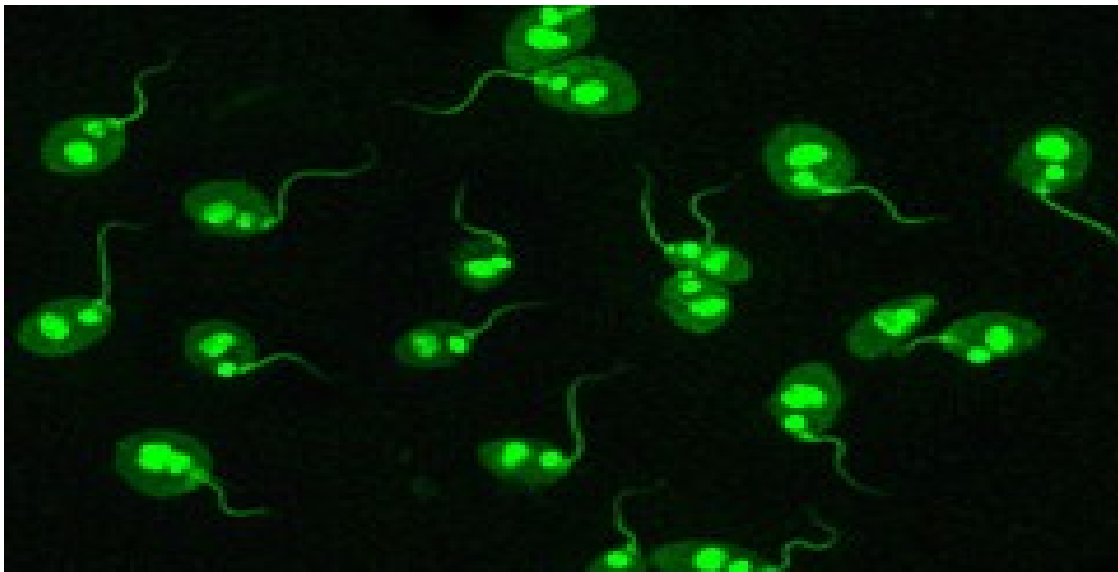


Obrázek 8 ANCA pozitivní nálezy se srovnáním positivity ANA
 (Zdroj: <https://www.researchgate.net/figure/ANCA-immunofluorescence-patterns-recognized-by-the-EUROPattern-Suite-Patterns-of_fig3_274086902>)

Horní snímky EOH je fluorescence na etanolovém substrátu v podobě cANCA (PR3) a pANCA (MPO). Na etanolu můžeme nalézt i pozitivitu ANA stejné formy jako pANCA. V dolní části na formalinovém (HCHO) substrátu jsme schopni rozlišit jednotlivé positivity. Pozitivita pANCA je na formalinovém substrátu potvrzena formou obrazu charakteristický jako cANCA (obrácený typ fluorescence než na etanolu). CANCA v tomto případě svůj obraz nemění, tudíž tento typ pozitivit se na formalinový substrát dále nedává. Důvodem proč se dělá s formalinovými typy skel je právě pozitivita ANA autoprotilátek versus pANCA. Důležité kritérium rozlišení mezi těmito typy pozitivit je negativní nález na formalinovém substrátu bez přítomnosti ANCA autoprotilátek.

8.3 NIF detekce dsDNA autoprotilátek

Substrát – *Crithidium lucillae*

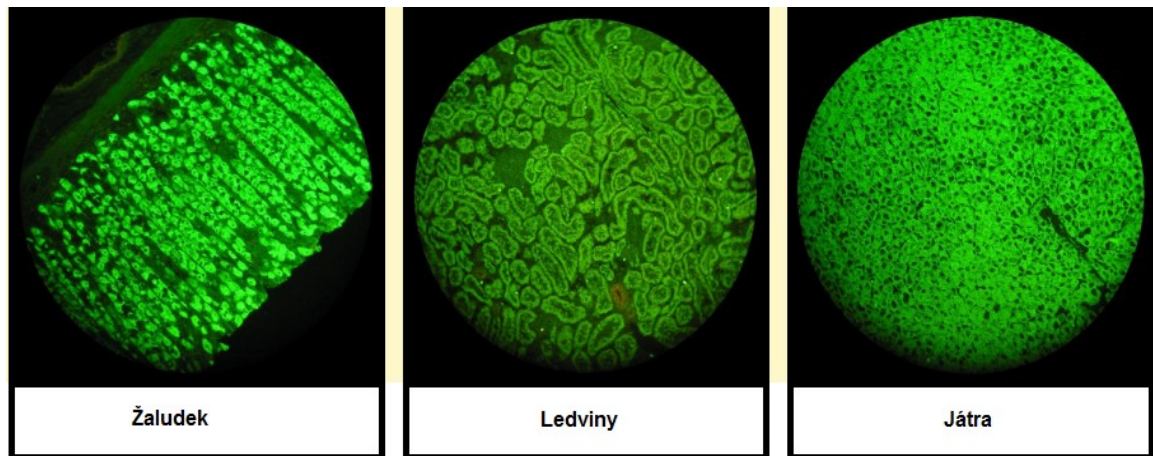


Obrázek 9 Pozitivita dsDNA, pozitivita svítícího kinetoplastu – útvar blíže k ukotvení bičíku

(Zdroj:< <https://www.euroimmun.com/products/indications/autoantikrper-diagnostik/rheumatology/sle/aak-gegen-dsdns.html>>)

8.4 NIF detekce hepatálních autoprotilátek

Substrát - krysí žaludek, ledviny a játra

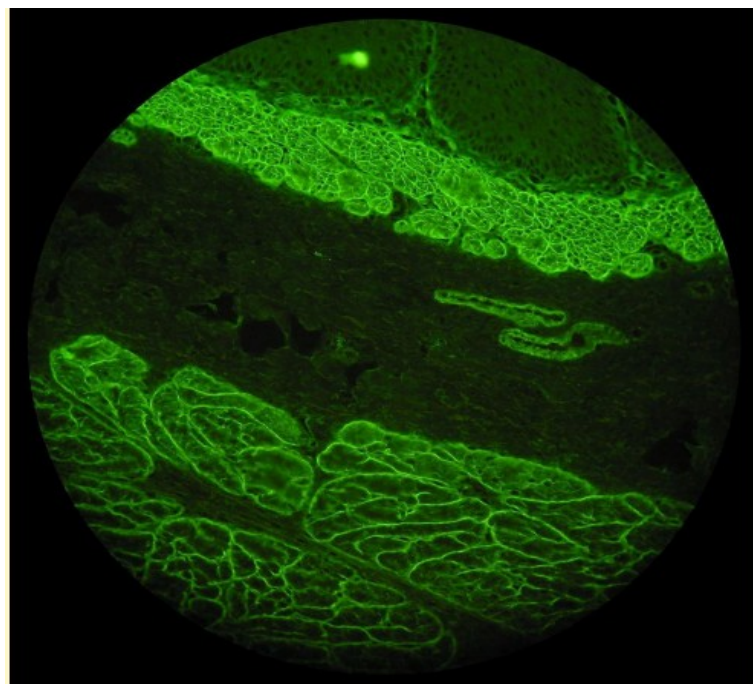


Obrázek 10 Zrnitá pozitivita autoprotilátek proti mitochondriím

(Zdroj: <<https://is.muni.cz/el/1411/jaro2018/BLIM0411c/imunofluorescence.pdf>>)

8.5 NIF detekce antiendomyziálních autoprotilátek

Substrát - opičí jícn



Obrázek 11 Pozitivita EMA autoprotilátek

(Zdroj: <<https://is.muni.cz/el/1411/jaro2018/BLIM0411c/imunofluorescence.pdf>>)

9 Význam laboratorního vyšetření autoprotilátek pro klinickou praxi

V rámci oddělení klinické imunologie se u nás zaměřujeme na laboratorní diagnostiku autoprotilátek zejména u systémových a orgánově lokalizovaných onemocnění.

Diagnostiku patologických autoprotilátek nám výslednou interpretaci může znesnadnit přítomnost protilátek fyziologických. Tyto dva typy autoprotilátek se liší svou afinitou ke tkáni a koncentrací, patologických je více a jsou silně afinní. Převážně se výskyt patologických autoprotilátek objevuje ve třídě IgG (2). „Koncentrace fyziologických autoprotilátek stoupá s věkem, proto lze nález autoprotilátek ve vyšším věku považovat za nález víceméně fyziologický. Naopak u dětí je třeba přítomnosti autoprotilátek věnovat více pozornosti“ (2).

„Jen malý podíl autoprotilátek je součástí diagnostických kritérií nebo jsou vysloveně specifické pro určitá onemocnění. Jejich přítomnost v séru nebo jiných tělních tekutinách je v takovém případě velmi silnou indikací určitého onemocnění“ (26).

„V klinické rozvaze se uplatňují autoprotilátky při diferenciální diagnóze možného systémového nebo orgánově specifického onemocnění, při zpřesnění diagnózy, odhadu aktivity autoimunitního procesu a případně prognózy onemocnění. Autoprotilátky mohou předcházet klinické manifestaci autoimunitního onemocnění, provázet klinickou manifestaci, přetrvávat po klinicky manifestním onemocnění nebo mohou existovat bez onemocnění. Autoprotilátky pravděpodobně nejsou většinou bezprostřední příčinou onemocnění. Spíše slouží jako marker autoimunitního onemocnění“ (14).

Laboratorní detekce autoprotilátek je dnes na velmi dobré úrovni. Přesto se však můžeme setkat s celou řadou problémů, které znesnadňují již tak obtížnou interpretaci výsledků. Důvodem může být například reakce s různými epitopy v rámci jednoho antigenu, odlišná afinita autoprotilátek mezi pacienty či jakékoliv nespecifické reakce. Vzhledem k těmto problémům může dojít k nedokonalému určení autoprotilátek. Tento problém může být eliminován tím, že v diagnostice používáme kombinace metod, kterými lze přítomnost autoprotilátek potvrdit nebo vyloučit. Pro nás, laboratorní pracovníky, je ke správnému

interpretování výsledků kombinace metod obzvláště důležitá (26). Pokud by byla použita pouze jedna detekční metoda, tak nelze nikdy zcela vyloučit falešnou pozitivitu či negativitu (14).

V rukou lékaře je následné spojení laboratorní nálezu a klinického obrazu pacienta. Jedině tak lékař určí co nejpřesněji jakoukoliv autoimunitní chorobu a na tomto základě následně volí vhodnou léčbu (26).

10 Diskuze

Autoimunitní onemocnění je stav, při kterém organismus reaguje autoreaktivně T- i B- lymfocyty či autoprotilátkami proti tkáním organismu vlastním (7). Proč tento stav nastává není zcela objasněno, nicméně se předpokládá, že vzniká na podkladě kombinací vnitřních a vnějších vlivů (23).

Je však prokázáno, že vzhledem k efektivnějšímu imunitnímu systému žen trpí na určitá onemocnění ženské pohlaví častěji. Zároveň u žen k autoreaktivitám může dojít i vlivem hormonálních změn během života. Z chorob se může jednat o systémový lupus erytematodes či Sjögrenův syndrom (23).

Obzvláště nebezpečná a závažná jsou zejména onemocnění systémového původu, jelikož u nich dochází k autoreaktivitě vůči jaderným strukturám. Z tohoto vyplývá, že tedy mohou zasáhnout jakoukoliv tkáň a způsobit velmi rozsáhlá a závažná poškození v organismu (12).

Laboratorní diagnostika autoprotilátek v imunologické laboratoři je poměrně jednoduchá. Obtížná je ovšem interpretace výsledků s celou řadou úskalí. Zvláštní pozornosti se dostává zejména u případných pozitivních nálezů dětských pacientů (2).

Nejčastěji využíváme kombinaci metod nepřímé fluorescence, ELISA metod a metody blotové. Kombinování metod je důležité pro ověření výsledků, jelikož z jedné použité metody nelze stanovit jasný laboratorní nález. Toto se děje z důvodu odlišné citlivosti a specifčnosti jednotlivých metod (14). Jejich stanovení přispívá k diagnóze autoimunitních onemocnění a případnému posouzení aktivity choroby. Lze je využít jako marker autoimunitních onemocnění. Jako přímá příčina vzniku autoimunitních onemocnění nebyly autoprotilátky

zcela prokázány, jelikož se objevují před, v průběhu či po manifestním období onemocnění (14).

Laboratorní diagnostika autoprotilátek bývá hojně požadována také u pacientů s jakýmkoliv druhem imunodeficiency, i zde je z nedostatečné funkce imunitního systému určité riziko propuknutí autoreaktivních reakcí (12). Monitorování jsou také pacienti s již jednou diagnostikovaným autoimunitním onemocněním nejen pro konkrétní onemocnění, ale i z hlediska možného vývoje dalšího onemocnění. Prolomení autotolerance by totiž mohlo vést k dalšímu poškození organismu.

Pro správně stanovenou diagnózu se skládá kompletní diagnostika autoimunitních chorob z klinických příznaků, anamnézy pacienta, objektivního a laboratorního nálezu (14). Všechny oblasti spojuje dohromady výhradně lékař, který po určení diagnózy rozhoduje o dalším postupu.

11 Závěr

Porušení funkce tolerance vlastních tkání postupem času vede k rozvoji autoimunitních onemocnění. Příčin, které k tomuto stavu můžou přispět je celá řada (12).

Běžně se v rutinních laboratořích využívá k detekci autoprotilátek kombinace metod nepřímé imunofluorescence, ELISA metod a blotových metod. Nepřímá fluorescence je metoda, jejíž výsledek je titr, ve kterém byla ještě pozitivita zachycena. ELISA metodami získáme kvantitativní údaj o směsích či jednotlivě stanovených autoprotilátek. A metodami blotovými získáme výsledek kvalitativní (2).

Laboratorní diagnostika autoprotilátek je nesmírně důležitá, přestože jejich stanovení slouží spíše jako marker autoimunitních onemocnění (14). Vzhledem k závažnosti autoimunitních chorob je stanovení autoprotilátek mezi lékaři hojně využíváno. Pomocí včasného zachytu onemocnění, vhodně zvolené léčby a pravidelné monitorace se zvyšují pacientům šance pro kvalitnější a plnohodnotnější život (23).

12 Seznam obrázků

Obrázek 1 Obecný princip zpracování preparátu pro NIF	25
Obrázek 2 Nejčastěji využívaný princip ELISA metody v praxi	26
Obrázek 3 Nukleolární typ ANA Obrázek 4 Homogenní typ ANA	36
Obrázek 5 Centromerový typ ANA Obrázek 6 Zrnitý typ ANA	36
Obrázek 7 Pozitivita cytoplazmy u antimitochondriálních autoantilátok	37
Obrázek 8 ANCA pozitivní nálezy se srovnáním positivity ANA.....	37
Obrázek 9 Pozitivita dsDNA, pozitivita svítícího kinetoplastu – útvar blíž k ukotvení bičíku	38
Obrázek 10 Zrnitá pozitivita autoantilátok proti mitochondriím.....	39
Obrázek 11 Pozitivita EMA autoantilátok	39

13 Seznam tabulek

Tabulka 1 Základní typy ANA pozitivit, cílové antigeny a asociace s jednotlivými chorobami	29
Tabulka 2 Typy pozitivních ANCA nálezů	31

14 Literatura

1. ANAYA, JM., SHOENFELD Y., ROJAS-VILLARRAGA, A. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*[online]. Bogota, Colombia: El Rosario University Press, 2013 [cit. 2018-07-29]. ISBN 9789587383768. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459447/?term=autoimmunity>>
2. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., A KOL. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Vyd 2. U průhonu 22, Praha 7: Grada publishing 2011. ISBN 987-80-247-3533-7.
3. BEČVÁŘ, R., PAVELKA K. Současné trendy v diagnostice a léčbě revmatoidní artritidy. *Interní medicína pro praxi*. 2009, 11(7 a 8), s. 340-344.
4. BERTSIAS, G., CERVERA, R., BOUMPAS, DT. *Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features* [online]. 2012, s 476-505 [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <https://www.eular.org/myUploadData/files/sample%20chapter20_mod%2017.pdf>
5. CERVERA, R., PIETTE J-CH., FONT, J., KHAMASHTA, MA., et al. Anti-phospholipid Syndrome: Clinical and Immunologic Manifestations and Patterns of Disease Expression in a Cohort of 1,000 Patients. *Arthritis & Rheumatism*. 2002, 46(4), s. 1019–1027. DOI: 10.1002/art.10187.
6. DONG, Y., POTTHOFF, A., KLINGER, CH., BARREIROS, AP., et al. Ultrasound findings in autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2018, 24(15), s 1583-1590. DOI: 10.3748/wjg.v24.i15.1583.
7. FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., a MAŤHA V. *Imunitní systém*. Vyd. 1. U průhonu 22, Praha 7: Grada publishing, 2005. ISBN 80-247-1196-6.
8. GABELEC, L. Ulcerózní kolitida – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní medicína pro praxi*. 2009, 11(6), s 276–281.
9. GROH, M., PAGNOUX, CH., BALDINI, CH., BEL, E., et al. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg–Strauss) (EGPA) Consensus Task Force recommendations for evaluation and management. *European Journal of Internal Medicine*. 2015, 26(7), s 545-553. DOI: 10.1016/j.ejim.2015.04.022.

10. GRYGIEL-GÓRNIAK, B., LIMPHAIBOOL N., PERKOWSKA K., PUSZCZEWICZ M. Clinical manifestations of granulomatosis with polyangiitis: key considerations and major features. *Postgraduate Medicine*. 2018, 130(7), s 581-596. DOI: 10.1080/00325481.2018.1503920.
11. HAUSTEIN, UF. Systemic sclerosis - scleroderma. *Dermatology Online Journal* [online]. 2002, 8(1):3 [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <<https://escholarship.org/uc/item/0vd8p0xw#main>>
12. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R. *Základy imunologie*. Vyd. 5. Vykáňská 5, Praha 10, 100 00: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
13. HRABOVSKÝ, V., ZADÁK Y., BLÁHA, V., HYŠPLER, R., et al. Metabolismus lipidů u Crohnovy choroby. *Klin. Biochem. Metab.* 2006, 14(35), s 228–231.
14. HRDÁ, P., ŠTERZL, I. Vyšetření autoprotilátek - současné možnosti. *Interní medicína pro praxi*. 2003, 8, s. 410-413.
15. Imunofluorescenční souprava k diagnostice autoimunitních onemocnění jater a žaludku, Testline : <https://www.testlinecd.cz/file/795/AMA_ASMA_CZ.pdf>
16. KASSAN, S., MOUTSOPOULOS H. Clinical Manifestations and Early Diagnosis of Sjögren Syndrome. *Arch Intern Med*. 2004, 164(12), s. 1275-1284. DOI: 10.1001/archinte.164.12.1275.
17. KOHOUT, P. Diagnostika a léčba celiakie. *Interní medicína pro praxi*. 2006, (7 a 8), s 324–326.
18. Laboratorní příručka, Česká Laboratorní s.r.o.: <<http://www.ceskalaboratorni.cz/download/61/laboratorni-prirucka-metody.pdf>>
19. LATA, J. Primární biliární cirhóza. *Interní medicína pro praxi*. 2006, 1, 6-8.
20. LOCHMANOVÁ, A. *Základy imunologie*. Vyd 1. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2014. ISBN 978-80-7464-570-9.
21. REIMER, G., STEEN, VD., PENNING, CA., MEDSGER, TA, et al. Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis and Rheumatism* [online]. 1998, 34(4), s. 525-532. DOI: 10.1002/art.1780310409.

22. SACK, U., CONRAD, K., CSERNOK, E., FRANK, I., et al. *Autoantibody Detection Using Indirect Immunofluorescence on HEp-2 Cells. Contemporary Challenges in Autoimmunity:: Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009, 1173, s 166–173. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04735.x.
23. SHOENFELD, Y. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. Vyd. 1. U průhonu 22, Praha 7: Grada publishing, 2007. ISBN 978-80-247-2044-9.
24. TOWBIN, H., STAHELIN, T. Immunoblotting in the Clinical Laboratory. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1989, 27(8), s 495-501. DOI: 10.1515/cclm.1989.27.8.49.
25. VARGA, J., ABRAHAM D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007, 117(3), s. 557-567. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI31139>.
26. VENCOVSKÝ, J. *Jak pomáhá vyšetřování autoprotilátek v diagnostice a hodnocení autoimunitních revmatických chorob?* [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <<https://docplayer.cz/17359263-Jak-pomaha-vysetoovani-autoprotilatek-v-diagnostice-a-hodnoceni-autoimunitnich-revmatickych-chorob.html>>