

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zdravotnická technika a informatika (MZTI)

Studijní obor: Specializace ve zdravotnictví



Marie Plačková

Stanovení koncentrace alfa-1-antitrypsinu ve stolici imunoanalytickou metodou

Determination of the concentration of alpha-1-antitrypsin in the stool
by immunoassay method

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Petr Kocna, Csc.

Konzultant: MUDr. Zdislava Vaníčková

Pracoviště: Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN

Praha, 2011

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze,

Marie Plačková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, MUDr. Petru Kocnovi, Csc. za cenné rady a připomínky při zpracování mé práce.

Dále děkuji MUDr. Zdislavě Vaníčkové za vedení během pokusu a neocenitelné rady při psaní mé diplomové práce.

ABSTRAKT

Stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici je diagnostickým ukazatelem zánětlivých onemocnění tenkého a tlustého střeva, zejména malabsorpčního syndromu.

α_1 – antitrypsin patří mezi skupinu plazmatických bílkovin s antiproteinázovým účinkem. Je syntetizován především v játrech, v malém množství v makrofázích jako antiproteáza fyziologicky inhibuje serinové proteázy neutrofilů. Z jater je uvolňován do krevního řečiště. α_1 – antitrypsin je reaktant akutní fáze. Při zánětlivé reakci je tvorba α_1 – antitrypsinu v játrech stimulována protizánětlivými cytokiny. Vzestup hladiny v časně fázi zánětu koreluje s CRP a dalšími pozitivními proteiny akutní fáze.

Jako spolehlivý senzitivní a specifický marker ztráty proteinů může být clearance α_1 – antitrypsinu ve stolici.

Stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici lze provádět technikami ELISA, což je nekompetitivní enzymoimunoanalýza sloužící k detekci protilátek, u níž je využita schopnost imunoglobulinů vázat se na povrch umělých hmot (např. polystyrenu) a schopnost vázat enzymy na těžké řetězce imunoglobulinových molekul.

Cílem práce bylo porovnat komerční sety pro imunoanalytické stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici metodou ELISA, a to sety firmy Immundiagnostik a Ridascreen. Dále pak zjistit stabilitu α_1 – antitrypsinu ve vzorku stolice a v extraktu připraveného ze vzorku stolice v závislosti na době a teplotě skladování a zavést metodu stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici do běžné laboratorní praxe.

Pro porovnání setů bylo vybráno 20 vzorků patientských stolic, u nichž byl předpoklad pozitivního α_1 – antitrypsinu ve stolici, tzn. u pacientů, kteří v době odběrů prodělali zánětlivé onemocnění tenkého nebo tlustého střeva. Naměřené hodnoty koncentrací α_1 – antitrypsinu byly následně vyhodnoceny a pomocí komerčního programu STATISTICA 9.1., byly zhotoveny grafy a vypočítán korelační koeficient (0,91), který naznačuje, že metody spolu dobře korelují.

Pro zjištění stability α_1 – antitrypsinu byly vybrány tři vzorky patientských stolic, u nichž byl předpoklad na pozitivitu α_1 – antitrypsinu. Z každého vzorku byly připraveny extrakty, které byly skladovány při teplotách $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu jednoho dne, osmi dnů a k porovnání extrakt připravený v den měření. Dále byly stejným způsobem skladovány vzorky stolic, z nichž byly v den měření připraveny extrakty, které byly tentýž den analyzovány.

Námi naměřené výsledky hodnot koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktech stolic naznačují, že nejvyšší hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu vykazují extrakty připravené den před analýzou, skladované v lednici. Tyto výsledky se jeví jako vhodnější varianta stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu, než dle doporučení výrobce připravovat extrakt vždy čerstvý v den analýzy.

Při přípravě extraktu ze stolic, které byly uchovávány různou dobu při různých teplotách vyplynulo, že skladováním stolic 1 den při laboratorní teplotě či v lednici, hodnotu koncentrace α_1 – antitrypsinu výrazně neovlivní. Zatímco skladování stolic 8 dní při laboratorní teplotě nebo v lednici, koncentraci α_1 – antitrypsinu snižuje.

Klíčová slova : α_1 – antitrypsin, stolice, zánětlivá onemocnění, ELISA

ABSTRACT

Determination of the concentration of α_1 – antitrypsin in the stool is a diagnostic indicator of inflammatory diseases of the small and the large intestine, especially malabsorption syndrome.

α_1 – antitrypsin belongs to the family of plasma proteins with antiproteinase effect. α_1 – antitrypsin is synthesized in liver, in small amount in macrophage and is a protease inhibitor of serine proteases secreted from neutrophils.

α_1 – antitrypsin is acute phase protein. Higher α_1 – antitrypsin values are in early phase of inflammation associated with raised CRP and other positive acute phase proteins. Fecal α_1 – antitrypsin clearance is a sensitive and specific marker of protein loss.

For α_1 – antitrypsin determination in stool samples ELISA method can be used. ELISA is noncompetitive immunoassay used to detect presence of antibody or an antigen in a sample.

The aim of this work was to compare two ELISA sets (Immundiagnostik and Ridascreen) used for determination α_1 – antitrypsin in the stool. Then examine stability of α_1 – antitrypsin in the stool and in extract prepared from stool in various storing conditions temperature and time. After this establish this method as routine in laboratory.

20 patient stool samples were examined to compare ELISA sets. Samples were suggested to be α_1 – antitrypsin positive, from patients suffering from inflammatory intestine diseases. Correlation between concentration of α_1 – antitrypsin measured by sets were determined by program STATISTICA 9.1. Correlational coefficient was 0.91.

For examination stability of α_1 – antitrypsin three stool samples suggested α_1 – antitrypsin positive were chosen. From each sample extracts was prepared and stored at -30 °C, 5 °C and 25 °C. One extract from each sample was measured immediately, one was stored for a day and one for eight days. At the same temperatures for the same period of time, stool samples were stored and after that extract were prepared right before measurement.

Values of α_1 – antitrypsin in stool extracts showed, that highest concentrations of α_1 – antitrypsin were in extracts prepared one day before measurement and stored in refrigerator. Results suggest that compare to producer instructions which suggest to prepare extract right before measurement, is better to prepare stool extracts one day before measurement and store them in refrigerator.

Results also show that storing stool samples for one or eight days in refrigerator doesn't affect α_1 – antitrypsin concentrations. When stool samples were stored for eight days in refrigerator or at room temperature α_1 – antitrypsin concentrations were lowered.

Key words : α_1 – antitrypsin, stool, inflammatory diseases, ELISA

1. ÚVOD

2. α_1 - ANTITRYPSIN, JEHO STANOVENÍ A VÝZNAM

- 2.1 α_1 – antitrypsin, struktura a vlastnosti
 - 2.1.1 Chemické vlastnosti
 - 2.1.2 Biochemické vlastnosti
 - 2.1.3 α_1 – antitrypsin a genetika
- 2.2 α_1 – antitrypsin, diagnostický význam
 - 2.2.1 Zánětlivá onemocnění tenkého a tlustého střeva
- 2.3. α_1 – antitrypsin a analytické metody detekce
 - 2.3.1 ELISA

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - METODIKA

- 3.1 Materiál a přístrojové vybavení
 - 3.1.1 Pacientské vzorky
 - 3.1.2 Přístrojové vybavení
 - 3.1.3 ELISA soupravy
- 3.2 Metodika měření
 - 3.2.1 Metoda ELISA (Immundiagnostik)
 - 3.2.2 Metoda ELISA (Ridascreen)
- 3.3 Vlastní experimentální měření
 - 3.3.1 Porovnání dvou metodik
 - 3.3.2 Stabilita α_1 – antitrypsinu
 - 3.3.3 Statistické zpracování výsledků

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - VÝSLEDKY

- 4.1 Vyhodnocení výsledku firmy Immundiagnostik
- 4.2 Vyhodnocení výsledků firmy Ridascreen
- 4.3 Srovnání dvou metodik (Immundiagnostik x Ridascreen) a jejich korelace
- 4.4 Vyhodnocení stability α_1 – antitrypsinu ve stolici a extraktu při různé teplotě

5. DISKUZE

6. ZÁVĚR

7. LITERATURA

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1. ÚVOD

Klinicko – diagnostický proces v oblasti zažívacího ústrojí je založen na řadě specializovaných vyšetření, ke kterým patří zejména moderní zobrazovací metody (endoskopie, sonografie, RTG, CT, NMR) poskytující morfologický obraz orgánů. Nedílnou součástí diagnostiky i přesto tvoří metody biochemické. Přínos biochemických testů pro klinicko-diagnostický proces je především v oblasti funkčních testů, screeningových programů a sledování dynamiky procesů v průběhu léčby resp. dlouhodobého sledování nemocného (follow-up). [7]

Stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici je diagnostickým ukazatelem zánětlivých onemocnění tenkého a tlustého, zejména malabsorpčního syndromu.

Malabsorpční syndrom je onemocnění charakteristické poruchou vstřebávání a v širším pojetí i trávení potravy v trávicím ústrojí, zejména ve střevě. Dále doprovází stavy, které v důsledku těchto poruch vznikají. Projevuje se převážně průjmy, hubnutím, slabostí, únavou, anemií, postižením kostí a nervů.

α_1 – antitrypsin lze v klinických laboratořích stanovit metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pomocí komerčně dostupných setů v provedení mikrotitračních destiček. V laboratoři ÚKBLD VFN a 1. LF UK v Praze (Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecné fakultní nemocnice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze) jsme ke stanovení α_1 – antitrypsinu použili sety firem Immundiagnostik a Ridascreen založené na sandwichové reakci dvou polyklonálních lidských protilátek s lidským α_1 – antitrypsinem.

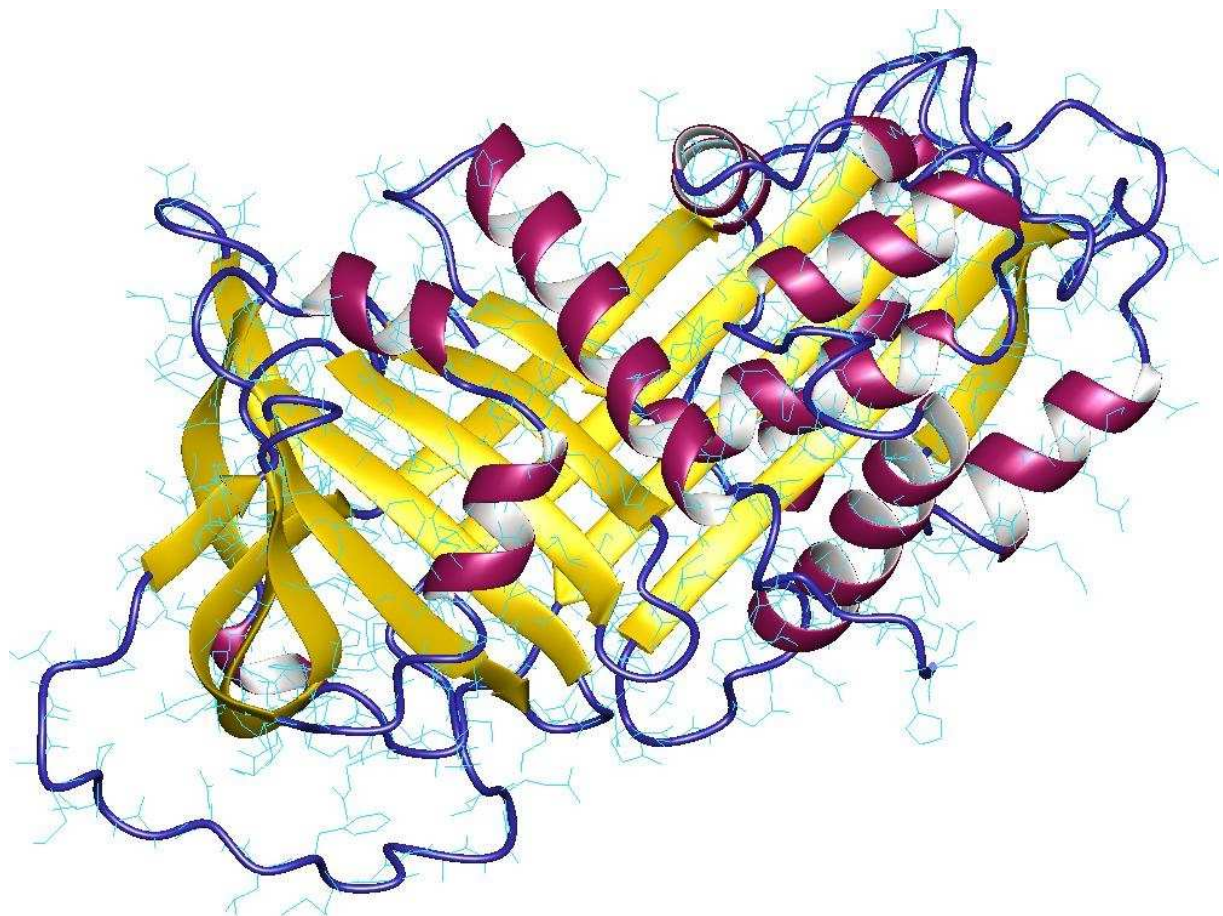
Cílem práce je porovnat ELISA sety výše zmíněných firem a zároveň ověřit stabilitu α_1 – antitrypsinu ve stolici či extraktu stolice. Tím zjistit robustnost metody a uvést jí do běžné laboratorní praxe.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. α_1 – antitrypsin, struktura a vlastnosti

α_1 – antitrypsin patří mezi skupinu plazmatických bílkovin s antiproteinázovým účinkem. Je syntetizován především v játrech, v malém množství v makrofázích jako antiproteáza fyziologicky inhibuje serinové proteázy neutrofilů. Z jater je uvolňován do krevního řečiště. [2]

α_1 – antitrypsin patří mezi reaktanty akutní fáze. Je to proteázový inhibitor, který inaktivuje řadu enzymů. Jedním z nich je elastáza neutrofilů v plicní tkáni, která je fyziologickou součástí ochrany organismu při poranění a zánětu, ale zároveň je svou proteolytickou aktivitou nebezpečná pro plicní tkáň. [4]



Obr. 1. Chemická struktura α_1 – antitrypsinu (internetový zdroj, <http://bioch.szote.u-szeged.hu/>)

2.1.1 Chemické a biochemické vlastnosti

Hlavní funkcí α_1 – antitrypsinu je jeho schopnost inaktivovat proteinázy uvolněné z lysozomů při rozpadu buněk do extracelulární tekutiny. Je důležitým inaktivátorem elastázy uvolněné z granul neutrofilních leukocytů. [2]

α_1 – antitrypsin chrání tkáň před destrukčním působením proteáz neutrofilů. Uplatňuje se inaktivující vazbou serinových proteáz neutrofilů, jako je neutrofilní elastáza kathepsin G a proteáza 3. [4]

Elastáza neutrofilů je 29 kDa protein, tvořený prekurzory buněk myeloidní řady pod vlivem růstových faktorů bílé krevní řady, např. granulocyto-makrofágové kolonie stimulujícího faktoru (GM-CSF), a deponovaný v cytoplasmatických granulích. Zralý granulocyt již není schopný tvorby elastázy. Uvolnění tohoto enzymu v průběhu zánětu vede k degradaci extracelulárních strukturálních proteinů a tím k lokální destrukci tkáň. [4]

Velikost α_1 – antitrypsinu (52 kDa) zhoršuje jeho průnik do tkání, kde je jeho koncentrace i při zánětu relativně nízká. Neutrofilly samy ale tvoří omezené množství α_1 – antitrypsinu, kterým autokrinně modulují aktivitu elastázy.

Do spektra účinku α_1 – antitrypsinu patří i inaktivující vazba dalších proteáz – kolagenózy, reninu aj.

α_1 – antitrypsin potencuje proliferaci a diferenciaci B lymfocytů navozenou vytokány. α_1 – antitrypsin kostimulačním efektem potencuje produkci IgE a IgG lymfocyty B, stimulovanými běžnými induktory, např. IL-4. [4]

2.1.2 α_1 – antitrypsin a genetika

α_1 – antitrypsin je archetypálním proteinem ze skupiny SERPIN. Geny pro SERPIN jsou v těsné vazbě na chromozomu 14q32. [4]

SERPIN vykazují více než 30 % sekvenční homologii polypeptidového řetězce a podobnou molekulární architekturu 9 α -helixů. SERPIN slouží jako pseudosubstrát proteázy inhibující její funkci. Tvorbou komplexu je proteáza inaktivována a odstraněna z cirkulace. [4]

Geneticky podmíněné varianty α_1 – antitrypsinu

α_1 – antitrypsin, jinak také nazývaný α_1 – proteázový inhibitor, je 52 kDa glykoproteid. Vyskytuje se ve více než v 70 geneticky podmíněných variantách, které jsou determinovány autozomálně – kodominantními alelami lokusu označovaného Pi, z nichž některé jsou odpovědné za sníženou hladinu α_1 – antitrypsinu v plazmě. Jejich alely se v genetickém lokusu označují Pi^M, Pi^S a Pi^Z. Lze je detekovat podle odlišné elektroforetické pohyblivosti. Pi ZZ genotyp (homozygot) má pouze 10-15 % koncentrace α_1 – antitrypsinu v plazmě, heterozygoti Pi ZM 50-60 % a Pi ZS méně než 40 %. [4]

Varianta S se odlišuje bodovou mutací α_1 – antitrypsinu (²⁶⁴GluVal) a vyskytuje např. u 28% obyvatel jižní Evropy. I když jsou hladiny α_1 – antitrypsinu u homozygotů SS proti homozygotům MM o 40% nižší, nejsou doprovázeny žádnými klinickými abnormalitami. [4]

Z-mutace α_1 – antitrypsinu se nachází na pozici P₁₇ (³⁴²GluLys), tj. 17 aminokyselin před aktivním centrem P₁. Z varianta vede k závažnějšímu deficitu. U homozygotů je charakterizován hladinami α_1 – antitrypsinu pod 10 % fyziologické hodnoty. U heterozygotů MZ je hladina snížena na 60 % (tj. 50 % α_1 – antitrypsinu je kódováno alelou M a 10 % alelou Z). Mutace Z sice umožňuje normální syntézu polypeptidového řetězce, ten ale zůstává uzavřen v endoplazmatickém retikulu hepatocytu. [4]

Homozygocie Pi ZZ se vyskytuje asi u 1/7000 až 1/2000 novorozenců a stává se tak jednou z nejčastějších genových abnormalit. 90 % homozygocí Pi ZZ ale zůstává latentních. 5 až 10 % populace je nositel rizikové alely Pi Z. [4]

Onemocnění ovlivněná genetickou predispozicí α_1 – antitrypsinu

Vysoký výskyt alel S a M v evropské populaci naznačuje, že jejich výskyt a relativní snížení plasmatické hladiny α_1 – antitrypsinu nemusí mít pro nositele pouze negativní dopad. Bylo prokázáno, že heterozygoti Pi ZM a Pi SM jsou lépe chráněni před plicní tuberkulózou. Nižší hladina α_1 – antitrypsinu má lepší prognózu u pacientů s cystickou fibrózou, menší rozsah plicního poškození a riziko sekundárních infekčních komplikací. [4]

Akutní zánět či jiný podnět reakce akutní fáze může zvýšit syntézu α_1 – antitrypsinu a ten se může dostat až do normálního rozmezí. Nikoliv však výrazně nad horní hranici.

Homozygotní nosiči Pi SS vykazují 50 % normální koncentrace, heterozygoti Pi SM asi

80 %. Snížená koncentrace se vyskytuje u jedinců s variantou Pi^1 . Úplně chybí u tzv. „nulové“ varianty Pi^- . [2]

Asi 1-2 % pacientů s plicním emfyzémem trpí geneticky podmíněným deficitem α_1 – antitrypsinu, především homozygocí ZZ. Nízké hladiny α_1 – antitrypsinu narušují rovnováhu proteolytických enzymů a jejich inhibitorů a predisponují k časnému nástupu panlobulárního emfyzému, bronchiektáziím a k vaskulitidě. Pacienti trpí progredující dušností a úbytkem hmotnosti. Později se může rozvíjet polyglobulie a cor pulmonale. [4]

Akumulace α_1 – antitrypsinu v endoplazmatickém retikulu jaterních buněk usnadňuje vznik juvenilní hepatitidy, cirhózy a hepatocelulárního karcinomu. U 90 % homozygotů ZZ jsou abnormální jaterní funkce prokazovány už v 1. roce života, ale jen 10-15 % z nich progreduje. [4]

Varianta Z je nestabilnější než varianta M a za fyziologických podmínek při teplotě 37 °C snadněji vytváří polymery. Tvorba polymerů je u geneticky predisponovaných jedinců urychlována během zánětu, kdy se α_1 – antitrypsin chová jako reaktant akutní fáze. Protože tvorba polymerů je závislá na kapacitě jejich degradačních mechanismů, je zánětové období obdobím zvýšené tvorby polymerů α_1 – antitrypsinu, ukládání depozit α_1 – antitrypsinu v jaterních buňkách a progresu jaterního poškození. [4]

Emfyzém při α_1 – antitrypsin deficitu je důsledkem snížených plasmatických hladin tohoto inhibitoru proteáz. Z antitrypsin je méně efektivní v ochraně před tkáňovým poškozením než M varianta. Stejně tak M antitrypsin může být inaktivován oxidací klíčového P_1 methioninu. [4]

K polymeraci defektního α_1 – antitrypsinu může docházet i v plicích. Tím se zablokuje vazebné místo pro elastázu a α_1 – antitrypsin se stává nefunkčním. Tkáň se tak stává citlivější vůči proteolytickému působení. V plicích se nachází zvýšené množství neutrofilů. [4]

2.2 α_1 – antitrypsin, diagnostický význam

Zánět je fylogeneticky nejstarším typem obranné reakce organismu na různá poškození, který má za cíl odstranění příčiny, lokalizaci poškozených tkání s následnou regenerací či reparací tkání. Provázené obnovením jejich funkcí. [6]

Podnět vyvolávající zánětlivou reakci organismu může být povahy biologické (bakterie, plísňe, viry, parazité), fyzikální (záření, trauma), imunologické (autoimunitní choroby), chemické nebo metabolické (hypoxie, poruchy metabolismu). [6]

Příčinami nejčastějších zánětů však bývají mikroorganismy nebo vyšší organizmy. Vyvolávají složitou odpověď organismu, na které se podílí i imunitní systém. Mikroorganismům podmínky v těle často vyhovují. Rychle se množí a svými toxiny působí jak v bezprostředním okolí, tak jimi zaplavují organismus.

Akutní záněty trvají krátce a jejich projevy začínají již v rozmezí několika vteřin po působení noxy, která zánět vyvolala.

Chronické záněty probíhají dlouho. Jsou charakterizované přítomností lymfocytů, plazmatických buněk, mikrofágů, fibroblastů, proliferací krevních kapilár a tvorbou vaziva. Tekutá složka exsudátu má vyšší obsah bílkovin a specifickou hmotnost nad 1020. [11]

α_1 – antitrypsin se využívá jako endogenní marker ztrát proteinů při exsudativní enteropatii. [4] Do trávicí trubice se dostává podobně jako jiné bílkoviny ze sliznice změněné zánětem. Vzhledem k tomu, že je rezistentní na působení enzymů, odráží věrně aktivitu zánětlivých změn. Za velmi přesný ukazatel se považuje zejména clearance (exkrece stolicí/koncentrace v séru). [3] Stanovení množství α_1 – antitrypsinu ve stolici přispívá ke stanovení diagnózy a rozsahu některých střevních onemocnění (Crohnova choroba, colitis ulcerosa). [4]

Různá elektroforetická pohyblivost variant α_1 – antitrypsinu (M, S, Z) umožňuje základní screening u diferenciální diagnostiky plicního emfyzému a novorozeneckých hepatopatií. [4]

α_1 – antitrypsin je reaktant akutní fáze. Při zánětlivé reakci je tvorba α_1 – antitrypsinu v játrech stimulována protizánětlivými výtoky. Vzestup hladiny v časně fázi zánětu koreluje s CRP a dalšími pozitivními proteiny akutní fáze. [4]

Mezi příčiny zvýšení α_1 – antitrypsinu patří :

- Akutní záněty – vzestup v plazmě během 12 – 24 hodin, maxima dosahuje 4. – 5. den
- Nádory
- Hepatopatie – akutní i chronická hepatitida, alkoholová cirhóza

- Progresivní polyartritida

Snížená koncentrace je spojena s výskytem primárního plicního emfyzému, neonatální hepatitidy, glomerulonefritidy nebo revmatoidní artritidy. [3]

Fyziologické rozmezí α_1 – antitrypsinu v séru :

Novorozenci 1,45 – 2,70 g/l.

Dospělí 0,78 – 2,00 g/l.

2.2.1 Zánětlivá onemocnění tenkého a tlustého střeva

Trávicí ústrojí zajišťuje tělu přívod vody a živin včetně vitamínů a minerálů, nutných pro funkci organismu, zajišťuje energetické zdroje i stavební látky. Prostřednictvím gastrontestinálního traktu (GIT) se z organismu vylučují nejen nevstřebané látky, ale i jiné odpadní látky, přicházející do GIT cestou žluči, např. žlučová barviva. [21]

Hlavní funkcí trávicí soustavy je: [21]

1. *trávení (digesce)* – štěpení živin na vstřebatelné látky
2. *vstřebávání (absorpce)* – zajišťuje jejich přechod do krve či lymfy
3. *intraluminální transport* – umožňuje průběh výše uvedených dějů

Potrava je v dutině ústní rozžvýkána a smíchána se slinami. Přitom se štěpí škroby ptyalinem. Sliny mají antibakteriální účinek. Podráždění kořene jazyka a předních patrových oblouků potravou vyvolá polykací reflex a sousto se posune do hltanu a jícnu. V jícnu se potrava opět peristaltickým pohybem posunuje do žaludku. Tam se vrství. V žaludku se postupně objevují peristaltické vlny, které potravu promísí s žaludečními šťávami a částečným natrávením se obsah mění v chymus. Žaludeční šťáva obsahuje kyselinu chlorovodíkovou. Ta je velmi kyselá ($\text{pH}_{\text{HCl}} = 1,7$). Hlavním žaludečním enzymem je pepsin, který v kyselém prostředí působí nejintenzivněji. Sliznice žaludeční je před samonatravením

chráněná vrstvou mucinu. Žaludeční šťávy způsobují denaturaci bílkovin a usnadňují jejich trávení. [11]

Tenké střevo je trubice přibližně 3 m dlouhá navazující na žaludek na jednom konci a na tlusté střevo na druhém konci. V tenkém střevě se dokončuje trávení a probíhá vstřebávání. Živiny se vstřebávají buď přímo do řečiště vrátnicového oběhu, nebo nepřímo přes mizní cévy. V mizních cévách smícháním mízy a živin vzniká chylus. [11]

Kývavé pohyby střeva zajistí promísení obsahu a ten se peristaltickými pohyby posouvá dále. Jakmile dojde ke zrychlení peristaltických pohybů tenkého i tlustého střeva, dochází k průjmu. Při zpomalení peristaltiky vzniká naopak zácpa.

Vzhled stolice je velmi dobrým ukazatelem činnosti zažívacího systému, zvláště u malých dětí. [11]

Rozeznáváme několik druhů stolic :

- **Mazlavá stolice** – obsahuje větší množství tuků. Bývá způsobena nedostatkem pankreatických enzymů, které tuky štěpí.
- **Průjmová stolice** – velmi řídká až vodnatá stolice. Vyskytuje se u nejrůznějších zánětů střev, nejčastěji alergického původu.
- **Hlenovitá stolice** – přítomnost hlenu ve vločkách. Objevuje se např. u bacilární dyzentérie.
- **Krvavá stolice** – ve stolici je přítomná tmavočervená krev. Krev se dostává do stolice v dolních etážích tlustého střeva, např. z prasklých hemeroidů v konečníku.
- **Meléna** – tmavá až černá stolice. Objevuje se při krvácení z jícnu, žaludku a počátečních částí tenkého střeva

Idiopatická zánětlivá onemocnění

Do této skupiny onemocnění řadíme i poměrně často se vyskytující zánětlivé onemocnění Crohnovu chorobu, u níž v současné době neexistuje léčba vedoucí k odstranění relapsů u všech pacientů, přesto existují léky prodlužující remise a oddalující relapsy. [14]

Je to chronické onemocnění neznámé etiologie. Na jeho vzniku se pravděpodobně podílí genetická predispozice, imunologické a mikrobiální faktory. I když samotné mikroby onemocnění nevyvolávají, pravděpodobně slouží jako spouštěcí mechanismus.

Onemocnění se může vyskytovat v kterékoliv věkové kategorii. Nejčastěji ovšem přichází ve druhé a třetí dekádě života. Často je doprovázeno komplikujícími se onemocněními, např. záněty oka, kloubů, intrahepatickou pericholangitidou a sklerozující cholangitidou. I proto se na onemocnění pohlíží jako na systémové zánětlivé onemocnění s převážným postižením gastrointestinálního traktu. [11]

Může se vyskytovat v celé zažívací trubici od dutiny ústní až po anus jako segmentální postižení zažívací trubice. Nejčastěji je však postiženo terminální ileum a tlusté střevo. Stěna střeva bývá výrazně ztluštělá, sliznice je makroskopicky hrboilatá. Ztluštění střevní stěny je vyvoláno fibrotizací. Dále se na sliznici nacházejí ulcerace, hluboké fisury a píštěle. Může být přítomno i několik zánětlivě změněných ložisek, která jsou od sebe oddělena normální střevní sliznicí. [11]

Ve 40 – 60 % případů nacházíme granulomy tvořené epiteloïdními buňkami a ojedinělými velkými mnohояdernými buňkami. Na seróze má tuková tkáň tendenci obalovat povrch střeva. Dochází k peritoneálním adhezím. Granulomatózní zánětlivé změny postihují všechny vrstvy stěny střeva. Lumen střeva bývá zúžené. [11]

Je známa existence indikátorů aktivního zánětu, či imunitní odpovědi ve střevě. Zvýšené riziko klinického relapsu může být indikováno zvýšenou hladinou TNF- α a interleukinu (IL)-1 β nebo procentuelním vzestupem receptoru IL-2 pozitivních mononukleárů. Jako další indikátory klinického relapsu mohou být nespecifické laboratorní parametry, jako je sedimentace erytrocytů, C-reaktivní protein (CRP), počet trombocytů či leukocytů.

Jako spolehlivý senzitivní a specifický marker ztráty proteinů může být α_1 – antitrypsinu ve stolici. Clearance α_1 – antitrypsinu ve stolici může být užitečná v predikci relapsu Crohnovy choroby, neboť byly pozorovány zvýšené hodnoty exkrece ve stolici u

aktivní Crohnovy choroby a u pooperační rekonvalescence. Dále jsou popsány zvýšené hodnoty současně se zvýšenými hodnotami CRP. [14]

Dalším onemocněním patřícím do skupiny idiopatických zánětlivých onemocnění je enteropatie se ztrátou bílkovin (protein – losing enteropathy, PLE).

PLE je vzácná komplikace různých intestinálních onemocnění, charakterizována nadměrnou ztrátou bílkovin do gastrointestinálního traktu. Je způsobená zhoršenou integritou sliznice. Klinický obraz pacientů s PLE je vysoce proměnlivý, závislý na základní příčině, ale většinou sestává z edému v důsledku hypoproteinémie. Diagnóza je potvrzena zvýšenými koncentracemi α_1 – antitrypsinu ve stolici. α_1 – antitrypsin je senzitivní marker, protože má podobnou velikost jako albumin (50 kDa). Clearance α_1 – antitrypsinu vyžaduje obojí. Vzorek krve ke stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu v plazmě a 24 hod. sběr stolice ke změřené objemu a hodnoty α_1 – antitrypsinu. Normální α_1 – antitrypsin clearance je < 24 ml/24 hod., zvýšená na > 56 ml/24 hod. u pacientů s průjmem. [20]

Zdraví novorozenci mají nadměrně zvýšený α_1 – antitrypsin ve stolici. Během prvních čtyř dnů je α_1 – antitrypsin ve stolici u zdravých novorozenců daleko více zvýšený než u dětských a dospělých pacientů s Crohnovou chorobou a PLE. Žádné z dětí v německé studii z roku 1997 nevykazovalo klinické známky cystické fibrózy nebo nekrotizující enterokolitidy, obojí spojované se zvýšeným α_1 – antitrypsinem ve stolici. α_1 – antitrypsin byl měřen metodou radiální imunodifúze. Původ zvýšených hodnot α_1 – antitrypsinu ve stolici novorozenců nekoreluje se zvýšenými sérovými hodnotami α_1 – antitrypsinu. Množství α_1 – antitrypsinu v meconiu může být výsledkem akumulace α_1 – antitrypsinu ve střevě ze spolknuté plodové vody, nebo sekrece ze žlučníku, pankreatu nebo duodena. [24]

V Thajské studii z roku 2007 je popsáno porovnání nefelometrie s radiální imunodifúzi při stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici u zdravých dětí a dětí postižených intestinálními poruchami. Metody jsou popsány jako neinvazivní a jednoduchý test, podporující diagnostiku PLE, přičemž je popsáno, že obě metody spolu dobře korelují. [25]

Exsudativní gastroenteropatie je způsobená nadměrnou ztrátou proteinů postiženými částmi gastrointestinálního traktu. Měření α_1 -antitrypsinu ve stolici není spolehlivé při měření ztráty proteinů žaludkem, neboť žaludeční šťávy, jejichž hodnoty pH jsou nižší než 3 rychle deaktivují α_1 -antitrypsin. V japonské studii je popsána metoda měření α_1 -antitrypsinu ve stolici, při níž je pacientům podáván Lansoprazol, inhibitor protonové

pumpy, ke zvýšení intragastrického pH a tím zachování aktivity intragastrického α_1 -antitrypsinu. [15]

Střevní ztráta proteinů exkrecí stolicí nezávisí pouze na zánětu sliznice, ale může být ovlivněna dalšími faktory jako je předchozí resekce, komplikace jako stenóza, rozsah a lokalizace choroby nebo další faktory jako přemnožení bakterií a další neznámé příčiny. Po mnoho let byla ztráta proteinů do gastrointestinálního traktu stanovována pouze použitím značených proteinů jako ^{51}Cr -albumin.

V německé studii z roku 1987 byla porovnávána exkrece α_1 – antitrypsinu ve stolici a clearance α_1 – antitrypsinu, jako parametry intestinální ztráty proteinů s exkrecí ve stolici ^{111}In značených granulocytů jako parametr střevního zánětu u pacientů s chronickým zánětlivým střevním onemocněním. Určení zánětlivé aktivity nemůže být u každého pacienta (plošně) založeno pouze na koncentraci α_1 – antitrypsinu ve stolici a clearanci α_1 – antitrypsinu. [22]

V japonské studii je uvedeno měření koncentrací α_1 – antitrypsinu ve stolici po Fontanově operaci (korekce vrozené srdeční vady dvojitoková levá komora) jako možnou detekci postoperativní ztráty proteinů a dlouhodobé monitorování pacientů po operaci v souvislosti se ztrátou proteinů. [23]

Malabsorpční syndrom

Malabsorpční syndrom je příznakový soubor, který se vyskytuje pravidelně nebo příležitostně u chorob, v jejichž průběhu dochází v trávicí trubici (zejména v tenkém střevě) k poruše jedné nebo několika jejich funkcí, tj. trávení, vstřebávání, sekrece a motility. Tento syndrom se může objevit také při nedostatečném přívodu živin. [1]

Malabsorpční syndrom zahrnuje celou škálu různých klinických příznaků. Ty se projevují např. u dětí snížením hmotnosti, zpomalením růstu, bledostí, průjmy apod.

Malabsorpce může být důsledkem primárního postižení sliznice střevního epitelu. Může se objevovat i u řady dalších forem střevního onemocnění nebo onemocnění, která primárně střevo nepostihují. [11]

Malabsorpční syndrom provází etiologicky velmi rozdílné choroby trávicího ústrojí i jiných orgánů. Patofyziologické mechanismy při vzniku malabsorpčního syndromu se často kombinují, neboť asimilační funkce jsou časově i prostorově úzce spjaty. [1]

Klasifikace malabsorpčních syndromů

Pro běžnou praxi se osvědčuje jednoduché dělení na primární a sekundární malabsorpční syndromy.

Mezi primární malabsorpční syndromy patří enzymatické defekty buněk sliznice tenkého střeva. [11] Porucha může být vrozená nebo získaná. Chybění disacharidáz v kartáčovém lemu enterocytů způsobuje, že se příslušný disacharid neštěpí a nevstřebává. Podobně chybění enteropeptidázy neumožňuje aktivaci trypsinogenu, proteiny se neštěpí a nevstřebávají. [11]

Dalším onemocněním je gluténová enteropatie (celiakie). Lepek (glutén) je součástí obilí. Na jeho složku gliadin reagují vnímaví jedinci. Projevuje se jako jistá forma alergie na rostlinnou bílkovinu. Postiženy mohou být děti, ale i dospělí. [11]

Gluténová enteropatie se projevuje průjmami, anémií, hubnutím a svalovou slabostí. Nejčastěji bývá postižená orální část tenkého střeva. Morfologicky se snižuje výška slizničních klků. U těžkých případů mohou klky vymizet a povrch sliznice tenkého střeva připomíná střevo tlusté – totální atrofie. Pod povrchovým epitelem je výrazná chronická zánětlivá celulizace. Kromě defektní enzymatické výbavy enterocytů je snižená i vstřebávací plocha enterocytů. Změny jsou pouze přechodného rázu. Po vynechání lepku z potravy se stav upravuje. [11]

Patologické změny objevující se na střevní sliznici se dělí podle „Marshovy klasifikace“ (Obr. 2):

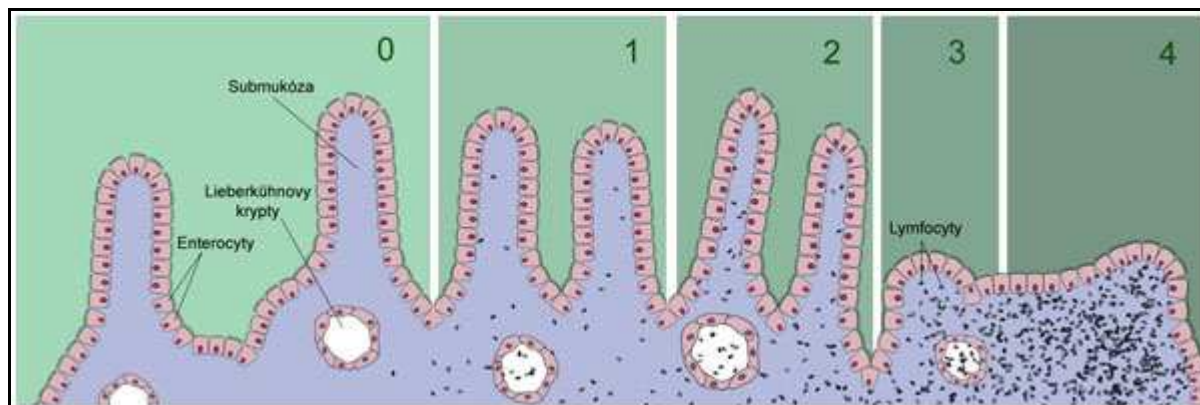
Stupeň 0: normální sliznice

Stupeň 1: zvyšující se počet submukózních lymfocytů

Stupeň 2: proliferace lymfocytů do Lieberkühnových krypt

Stupeň 3: částečná nebo úplná atrofie klků

Stupeň 4: zploštění povrchu střevní sliznice (Marsh M.N., 1992)



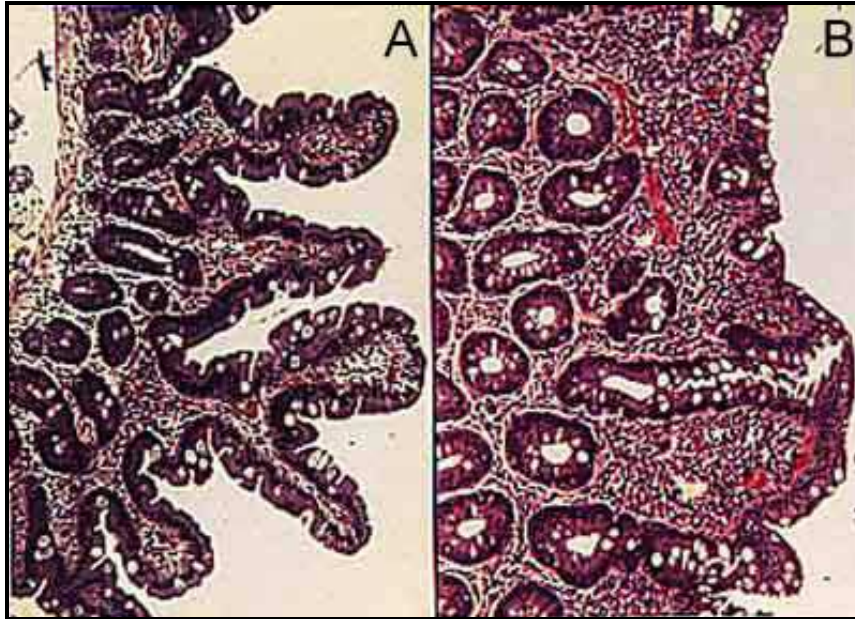
Obr.4 Marshova klasifikace míry poškození střevní sliznice (Wikipedie, <http://cs.wikipedia.org/wiki/Celiakie>) Stupeň 0 (normální sliznice), Stupeň 1 (zvyšující se počet submukózních lymfocytů), Stupeň 2 (proliferace lymfocytů do Lieberkühnových krypt), Stupeň 3 (částečná nebo úplná atrofie klků), Stupeň 4 (zploštění povrchu střevní sliznice)

Do sekundárních poruch řadíme všechny ostatní choroby, u kterých se můžeme setkat s poruchami malabsorpce. Příčinou mohou být choroby slinivky břišní, hepatobiliárního systému, endokrinní, kardiovaskulární a kožní choroby, ale také systémové choroby s postižením tenkého střeva, parazitózy tenkého střeva . Některé chemické látky (včetně léků) a ionizující záření. Malabsorpční syndrom se může také rozvinout v důsledku chirurgických výkonů na žaludku, tenkém střevě, slinivce břišní a vegetativním nervovém systému. [1]

Tropická sprue je sekundární malabsorpční syndrom, který se vyskytuje endemicky ve střední Americe, Africe a ve východní Asii. Onemocnět mohou také turisté z mírného klimatického pásma, kteří navštívili endemické oblasti anebo přesídlili z mírných podnebných pásem. Dochází k obdobným změnám na střevě jako u gluténové enteropatie. Dochází k atrofii slizničních klků. [11]

Na vzniku onemocnění se nejspíš podílí nedostatek potravy, mikrobiální infekce a toxiny z těchto mikrobů nebo toxiny, které se dostávají do organismu potravou.

Na přiloženém obrázku je patrný rozdíl mezi normální a atrofovanou sliznicí tenkého střeva (Obr. 3).



Obr. 3 Ukázka zdravé (A) a atrofované střevní sliznice (B)
 (Topinková K., http://ukb.lfl.cuni.cz/diplomky/dp_topin09.pdf)

Klinický obraz a diagnostika malabsorpčních syndromů

Objektivní nález se liší podle povahy základního onemocnění. Nejčastěji převládá průjem, chudokrevnost, celková slabost a úbytek na váze.

Průjem patří mezi charakteristické příznaky poruch dolního úseku trávicího ústrojí. [16] Průjem je časté vyprazdňování řídké neformované stolice. [12]

Je to porucha v normálním vyměšování nevstřebaných nebo odpadových látek střevem a je velmi úzce spjat s pohybem vody a elektrolytů v trávicím ústrojí. Tento pohyb má dva protichůdné směry:

1. sekrece tekutin všemi žlázami a žlázkami trávicího systému spolu se sekrecí žluče a pankreatické šťávy a k tomu přistupující příjem tekutin potravou.
2. zpětné vstřebávání vody a solutů (elektrolytů a jiných rozpuštěných a vstřebatelných látek) ve střevě. [16]

Základní příčinou průjmu (eventuálně zácpy) je proto porucha vyváženosti příjmu, vylučování a zpětného vstřebávání vody a elektrolytů. Transport vody střevní stěnou je pasivní a sleduje osmotický gradient. Absorpce vody je proto závislá na aktivních transportních systémech

iontů a organických solutů (Na^+ , glukózy, oligopeptidů a aminokyselin v tenkém střevě a Na^+ v tlustém střevě). [16]

U dospělého jedince se za normálních okolností v tlustém střevě vstřebá za 24 hodin 1 350 ml vody, 200 mmol Na^+ , 150 mmol Cl^- a 60 mmol HCO_3^- .

Jak roste objem stolice při průjmu, blíží se složením tekutiny stolice hodnotám v tekutině ileu. Je to způsobeno rychlou pasáží tlustým střevem, a tím nemožností plnit svou funkci. Ztráty Na^+ jsou proto přímo úměrné objemu vyloučené stolice, zatímco ztráty K^+ stoupají pomaleji, než roste objem stolice. [16]

Mezi příčinami průjmu jsou i vlivy neuropsychické, pooperační, záněty střev s poruchami chemického zpracování i resorpce, vrozený nebo získaný nedostatek střevních enzymů, nemoci žaludku, nemoci pankreatu, nemoci žlučových cest, zvýšený obsah nevstřebatelných látek v potravě, otravy aj. Vzniká akutně, většinou jako následek dietní chyby nebo působení infekčních či toxických vlivů. [12]

Průjem se může vyskytovat i v chronické formě. Těžké průjmy mohou být příčinou dehydratace.

Průjem specifický pro malabsorpční syndrom se projevuje rozložením v průběhu celého dne, trvání i při vynechání příjmu potravy, noční výskyt a známky steatorey (penetrantní zápach, světlá barva, zvýšený lesk, mastný vzhled). [1]

Z laboratorního vyšetření můžeme zjistit anemii různého druhu, snížení hladiny protrombinu, hyperproteinémii, snížení koncentrace cholesterolu a triacylglycerolu, β -karotenu, vápníku a železa. [1]

Testem s nejširší validitou je stanovení stupně steatorey. Tento příznak se vyskytuje prakticky u všech forem generalizovaných poruch, a to jak maldigesce, tak vlastní malabsorpce. Zátěžový test s monosacharidem xylosou je patologický při poruchách absorpce (úbytek absorpční plochy). [16]

2.3 α_1 – antitrypsin a analytické metody detekce

Stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici lze provést ELISA technikami, což je nekompetitivní enzymoimunoanalýza, sloužící k detekci protilátek. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Za prvé je to schopnost imunoglobulinů vázat se na

povrch umělých hmot (např. polystyrenu) a v druhé řadě pak schopnost vázat enzymy na těžké řetězce imunoglobulinových molekul. [18]

Enzymoimunoanalýza (EIA)

Jsou to analytické metody, které pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňují stanovit v neznámém vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky, obecně analytu. Indikátorem imunoanalytické metody je enzymový konjugát. Podle povahy substrátu je reakci možno detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky. [5]

EIA metody dělíme na heterogenní a homogenní.

Heterogenní enzymoimunoanalýzy vyžadují separaci volné protilátky a vázané frakce analytu, zatímco homogenní enzymoimunoanalýzy tuto separaci nevyžadují.

Heterogenní EIA navíc rozdělujeme na kompetitivní – v reakci je značena buďto protilátka nebo antigen, nebo na nekompetitivní imunoanalýzu, kde značená je pouze protilátka. [5]

Historie imunochemických metod

Historicky nejstarší jsou radioizotopové metody. Stanovoval se antigen pomocí značené protilátky radioaktivním prvkem. Po vzniku precipitátu se promytím odstranily nadbytečné volné protilátky. V sedimentu zůstaly komplexy antigen – protilátka – izotop. Detekce se prováděla na měřiči příslušného gama nebo beta záření. Výhodou těchto metod je jejich vysoká citlivost a reprodukovatelnost. Nevýhodou a důvodem, proč začaly být nahrazovány, je nutnost protilátky značené radioizotopem. Což vyžaduje izotopové pracoviště, proškolené osoby, speciální měřicí techniku a v neposlední řadě produkce izotopového odpadu. [5]

V roce 1971 nastal zvrát v laboratorní diagnostice, objevem možnosti navázat k molekule specifické protilátky enzym. První pokusy byly prováděny s křenovou peroxidázou a posléze s alkalickou fosfatázou. Důležité faktory pro reakci jsou velikost molekuly enzymu a možnost pevné vazby se specifickým místem na molekule protilátky. Křenová peroxidáza byl snadno dostupný enzym, avšak ve srovnání s protilátkou typu IgG,

měl příliš velkou molekulu. Proto se začala používat molekulárně menší alkalická fosfatáza. [5]

V současné době se díky technologickým postupům podařilo vytvořit vazby mezi specifickou protilátkou a enzymem natolik pevné, že křenová peroxidáza ovládla prakticky většinu běžných firemních souprav. [5]

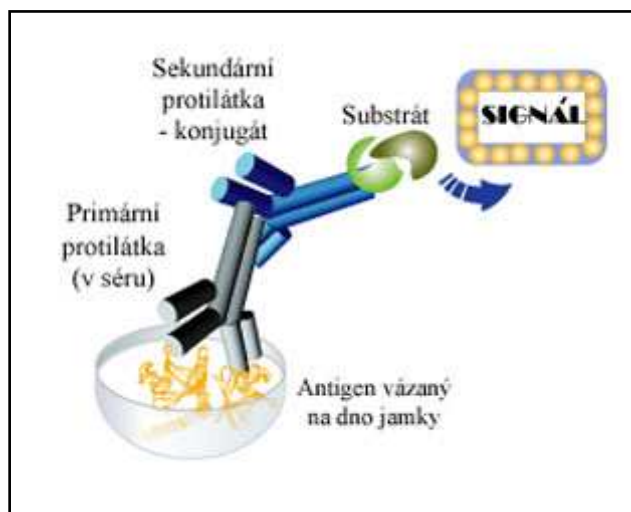
2.3.1 ELISA

ELISA z anglického názvu Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay je jednou z nejpoužívanějších imunochemických metod sloužících k detekci protilátek.

Podstatou metody je reakce antigen – protilátka. V první fázi reakce se tvoří imunokomplexy jako východisko k vysoce senzitivním reakcím s použitím značených antigenů nebo protilátek. [5]

ELISA je speciálním druhem EIA. Může být heterogenní nekompetitivní EIA (tzv.sandwich), nebo kompetitivní heterogenní EIA. V současné době se nejvíce využívá principu heterogenní kompetitivní EIA se značenou protilátkou. [5]

Samotná reakce probíhá tak, že protilátka je navázána na pevnou fázi a po kompetitivní reakci s antigenem se v neznámém vzorku ustaví rovnováha. Konjugát (tj. sekundární protilátka značená enzymem), který se nenavázal, je z reakční směsi odstraněn promytím a konjugát navázaný na pevnou fázi je inkubován s enzymovým substrátem a změřen (Obr. 4). [5]



Obr. 4 Vazba nepřímé ELISA metody (ELISA Technology, internetový zdroj)

Antigen je vázáný na dno mikrotitrační destičky, přidá se sérum obsahující primární protilátku, která se naváže na antigen. Přidaný konjugát (sekundární protilátka) se váže na primární protilátku. Přidáním chromogenního substrátu se posléze detekuje signál

V praxi se používá polystyrénová mikrotitrační destička o 96 jamkách. Na stěnách jamek je navázána protilátka proti vyšetřovanému antigenu. Ta může být navázána pouhou absorpcí. Většinou však se využívá různých chemických vazeb (např. kovalentních). Místa na polystyrenu, která nejsou obsazená, se blokují inertní bílkovinou (např. albuminem).

Do jamky se přidá naředěný vzorek obsahující antigen a inkubuje se určitou dobu. Poté se nenavázané složky odmyjí a přidá se tzv. druhá protilátka s navázaným enzymem (konjugát). Po opětovné inkubaci a promytí se reakce vizualizuje přidáním substrátu, který je štěpen enzymem navázaným na druhou protilátku. Vzniklá barevná reakce se měří fotometricky. [5]

Výhodou ELISA metody je dostatečná citlivost, specifičnost a reprodukovatelnost. Odpadá nutnost izotopových pracovišť a komplikovaná měřící technika. Současné systémy umožňují automatizaci. [5]

Uplatnění ELISA metod

Metody ELISA se v klinických laboratořích používají zejména ke stanovení proteinů, které se v séru vyskytují v nízkých koncentracích. Taktéž se používají pro stanovení autoprotilátek o známé specifitě, specifických protilátek proti očkovacím antigenům a proti infekčním činitelům mikrobiálním, parazitárním či virovým. Také ke stanovení cytokinů a řady dalších látek. [5]



Obr. 5 Klasická 96-ti jamková destička pro metodu ELISA
(Wikipedie, <http://cs.wikipedia.org/wiki/ELISA>)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - METODIKA

3.1. Materiál a přístrojové vybavení

3.1.1 Pacientské vzorky

Pro analýzu bylo vybráno 20 vzorků stolic, u nichž byl předpoklad pozitivního α_1 – antitrypsinu ve stolici, tzn. u pacientů, kteří v době odběrů prodělali zánětlivé onemocnění tenkého nebo tlustého střeva. Vzorky byly dodány z Pediatrické kliniky Fakultní nemocnice Motol, 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a z gastroenterologické laboratoře Ústavu klinické biochemie a lékařské diagnostiky, 1. lékařské fakulty Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Po odběru byly vzorky skladovány zamražením na teplotu $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a doba skladování byla maximálně jeden rok. Ve skupině byly 4 dívky ve věku od 1 do 12 let a 16 chlapců ve věku od 1 do 18 let.

3.1.2 Přístrojové vybavení

K měření byly použity tyto přístroje :

1. Fotometr pro měření absorbance na mikrotitračních destičkách
Tecan Spektra II Microplate Reader, Luminometr
Firma: SLT Labinstruments
Detekce: absorbance
Čtení: Endpoint, kinetika, skenování jamky
Formát destičky: 96 jamek
Zdroj světla: wolfram halogenová lampa
Nastavení vlnových délek: filtry
Rozsah vlnových délek: 380 – 900 nm

Pásmo propustnosti: 10 nm

Dynamický rozsah: 0 – 4,0 OD

Rozlišení: 0,001 OD

Kapacita filtrů: 6

Přesnost : < 1 % pro 2.5 OD, < 2 % pro 3.5 OD

Linearita: < 1 % pro 2.5 OD

Opakovatelnost: < 0.5 % pro 2.5 OD, < 1.5 % pro 3.5 OD

Rychlost čtení: 8 s

(Obr. 6)



Obr. 6 Tecan Spectra II Microplate Reader

(<http://www.labequip.com/tecan-spectra-ii-microplate-reader.html>)

2. Automatická promývačka na mikrotitrační destičky

ELx50 Microplate Strip Washer

Firma: BioTek

Formát destičky: 96/384/stripy

Rychlost promývání: 105 s (3 cykly)

Objem: 25 – 3 000 µl/jamku

Přesnost dávkování: < 3% CV

Zbytkový objem: < 2 µl/jamku

(Obr. 7)



Obr. 7 ELx50 Microplate Strip Washer
(Gastroenterologická laboratoř, VFN, 1. LF UK)

3. Analytické váhy

H 10

Firma: METTLER TOLEDO

4. Multikanálová pipeta

Pipetman Neo 8 x 200

Firma: PIPETMAN NEO (Gilson)

Objem : nastavitelný 20 – 200 µl

5. Uživatelský software KIM pro vyhodnocení mikrotitračních destiček, verze 2.13

Plně české prostředí

Kompatibilní s Windows XP, VISTA, WINDOWS 7

Schopnosti: definice destičky, měření kvality a kvantity, výpočty, měření v režimu end – point, export dat, tisk

3.1.3 ELISA soupravy

K pokusu byly použity tyto komerční ELISA sety:

1. Immundiagnostik AG:

- K 6760 alpha – 1 – Antitrypsin ELISA (Tab. I.)

Tab. I. Obsah ELISA setu firmy Immundiagnostik pro in vitro stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici

Složky	Množství
1. Mikrotitrační destičky potažené antigenem	12 x 8 jamek
2. ELISA promývací roztok, 10x koncentrovaný	2 x 100 ml
3. Konjugát, (ovčí α_1 – antitrypsin, značený peroxidázou)	200 μ l
4. Kalibrátor, připraven k použití	1 lahvička
5. Kontrola 1: Low-Nízká koncentrace, připraveno k použití	1 lahvička
6. Kontrola 2: High-Vysoká koncentrace, připraveno k použití	1 lahvička
7. TBM substrát (Tetramethylbenzidin), připraven k použití	1 x 15 ml
8. ELISA stopovací roztok, připraven k použití	1x 15 ml

2. R – Biopharm AG

- RIDASCREEN α_1 – antitrypsin G 09034 (Tab. II.)

Tab. II. Obsah ELISA setu firmy R – Biopharm pro in vitro stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici

Složky	Množství
1. Mikrotitrační destičky potažené polyklonální králičí protilátkou proti lidskému α_1 – antitrypsinu	12 x 8 jamek
2. Extrakt - ředící pufr (0,1 % NaN ₃) 10x koncentrovaný	100 ml
3. Diluent 3 - ředící pufr (0,1 % NaN ₃) připraven k použití	100 ml

4. Promývací pufr (0,1 % thimerosal) 10x koncentrovaný	100 ml
5. Kalibrátor, přípraven k použití	1 ml
6. Pozitivní kontrola, připravena k použití	1 ml
7. Nízká-Pozitivní kontrola, připravena k použití	1 ml
8. Konjugát (králičí α_1 – antitrypsin, značený peroxidázou)	12 ml
9. SeroSC (Močovina/TBM), připraven k použití	12 ml
10. SeroStop (1 M kyselina sírová), připraveno k použití	12 ml

3.2 Metodika měření

Všechny testované vzorky byly analyzovány pomocí dvou souprav (Immundiagnostik a Ridascreen) a výsledky na nich naměřené vzájemně porovnány. Byla provedena vzájemná korelace naměřených dat pomocí programu STATISTICA 9.1.

Dále byla ověřována stabilita α_1 – antitrypsinu ve stolici u vybraných vzorků (A, B, C). Stolice a z nich připravené extrakty byly skladovány osm dní a jeden den při laboratorní teplotě, v lednici a v mrazáku. V porovnání s těmito předpřipravenými vzorky byl analyzován extrakt čerstvý (připravený v den analýzy), dle doporučení výrobce. Analýza byla provedena pomocí komerční soupravy ELISA firmy Immundiagnostik.

3.2.1 Metoda ELISA (Immundiagnostik)

Pro stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici byl použit komerční ELISA set firmy Immundiagnostik. Je založen na principu nekompetitivní nepřímé imunoanalýzy. Veškerá stanovení byla provedena v dubletech. Na jedné desce lze stanovit 40 patientských vzorků. Pro naše účely bylo stanoveno vzorků pouze 20.

Metoda využívá tzv. sandwichové techniky se dvěma vybranými polyklonálními protilátkami vázanými na lidský α_1 – antitrypsin. Jamky jsou potažené vysoko afinitní

polyklonální lidskou α_1 – antitrypsin protilátkou. V průběhu první inkubace se α_1 – antitrypsin přítomný ve vzorcích a kalibrátorech naváže na imobilizovanou protilátku. Dále se do každé jamky přidá peroxidázový konjugát, který naváže již zakotvené protilátky. Vzniká tzv. sandwich. Přebytek je vymyt. Poté je přidán tetramethylbenzidinový substrát. Nakonec se přidá stopovací roztok, čímž se reakce ukončí. Dochází ke změně z modré barvy na žlutou. Intenzita žlutého zabarvení je přímo úměrná koncentraci α_1 – antitrypsinu ve vzorku. Optická hustota se měří při 450 nm s použitím 620 nm filtru jako referenční vlnové délky.

Pracovní postup

1. Navážit 50 mg stolice
2. Přidat 2,5 ml naředěného promývacího pufru.
3. Vortexovat a centrifugovat 10 min/3 000 g.
4. 40 μ l supernatantu naředit s 960 μ l ředícího pufru. Dobře promíchat.
5. 100 μ l z předešlého ředění smíchat s 900 μ l ředícího pufru. Dobře promíchat.
6. Do příslušných jamek mikrotitrační destičky napipetovat 100 μ l blanku, kalibrátoru, kontrolních vzorků a předředěných patientských vzorků.
7. Inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
8. Promýt 5x 250 μ l promývacího roztoku. Provádělo se na automatické promývače.
9. Přidat do všech jamek 100 μ l konjugátu.
10. Inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
11. Promýt 5x 250 μ l promývacím roztokem. Provádělo se na automatické promývače.
12. Přidat do všech jamek 100 μ l substrátu.
13. Inkubovat 10 – 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
14. Reakci ukončit přidáním 50 μ l Stop roztoku do každé jamky.
15. Odečíst absorbanci při vlnové délce 450 nm. Referenční vlnová délka je 620 nm.

Zpracování a vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem KIM verze 2.13. Vzorky byly pipetovány vždy v dubletech po 20 patientských vzorcích podle tohoto modelu (Tab. III.):

Tab. III. Model pipetování mikrotitračních destiček (Immundiagnostik).

IMMUNDIAGNOSTIK

	1	2	3	4	5	6
A	BLANK	BLANK	vz. 5	Vz. 5	vz. 13	vz. 13
B	CAL	CAL	vz. 6	Vz. 6	vz. 14	vz. 14
C	CT 1	CT 1	vz. 7	Vz. 7	vz. 15	vz. 15
D	CT 2	CT 2	vz. 8	Vz. 8	vz. 16	vz. 16
E	Vz. 1	Vz. 1	vz. 9	Vz. 9	vz. 17	vz. 17
F	Vz. 2	Vz. 2	vz. 10	Vz. 10	vz. 18	vz. 18
G	Vz. 3	vz. 3	vz. 11	Vz. 11	vz. 19	vz. 19
H	Vz. 4	vz. 4	vz. 12	Vz. 12	vz. 20	vz. 20

BLANK-pufr na ředění vzorků, CAL-kalibrátor, CT 1-nízká kontrola, CT 2-vysoká kontrola, vz.1-20 patientské vzorky

3.2.2 Metoda ELISA (Ridascreen)

Pro stanovení α_1 – antitrypsinu ve stolici byl použit komerční ELISA set firmy Ridascreen. Veškerá stanovení byla prováděna v dubletech. Na jedné desce bylo stanoveno 20 patientských vzorků.

Na dně jamek mikrotitračních destiček je vázána protilátka proti epitopům lidského α_1 – antitrypsinu. Během první inkubace se α_1 – antitrypsin přítomný ve vzorcích a kalibrátorech naváže na tuto protilátku. Následuje promytí a druhá inkubace s přidáním peroxidázovým konjugátem, který naváže již zakotvené protilátky. Přítomný α_1 – antitrypsin antigen tvoří s konjugovanou protilátkou tzv. sandwich – komplex. Přebytek je vymyt. Po přidání tetramethylbenzidinového substrátu se bezbarvé pozitivní vzorky změní na modré. Přidáním stopovacího činidla se původní modrá změní na barvu žlutou. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná koncentraci α_1 – antitrypsinu ve vzorku.

Pracovní postup

1. Navážit 50 mg stolice.
2. Ke každému vzorku přidat 2,5 ml ředícího pufru.
3. Dobře promíchat a centrifugovat 10 min/3 000 g.
4. 50 µl supernatantu ředit s 950 µl ředícího pufru. Dobře promíchat.
5. 50 µl vzorku z předešlého ředění ředit s 950 µl ředícího pufru. Dobře promíchat.
6. Do příslušných jamek mikrotitrační destičky nepipetovat 100 µl kalibrátoru, kontrolních vzorků a předředěných patientských vzorků.
7. Inkubovat 60 minut při laboratorní teplotě.
8. Promýt 5x 300 µl promývacím roztokem. Provádělo se na automatické promývače.
9. Přidat 100 µl konjugátu do všech jamek.
10. Inkubovat 60 minut při laboratorní teplotě.
11. Promýt 5x 300 µl promývacím roztokem. Provádělo se na automatické promývače.
12. Do všech jamek přidat 100 µl substrátu.
13. Inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
14. Reakci ukončit přidáním 50 µl stopovacího činidla do každé jamy.
15. Odečíst absorbanci při vlnové délce 450 nm. Referenční vlnová délka je 620 nm.

Zpracování a vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem KIM verze 2.13. Patientské vzorky byly vždy pipetovány dubletech po 20 vzorcích podle tohoto modelu (Tab. IV).

Pro srovnání byly do mikrotitrační destičky použity i blank, kalibrátory a kontrolní vzorky z předešlého komerčního ELISA kitu firmy Immundiagnostik.

Tab. IV Model pipetování mikrotitračních destiček (Ridascreen).

RIDASCREEN

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	BLANK	BLANK	vz. 5	Vz. 5	vz. 13	vz. 13	SBLK	SBLK
B	CAL	CAL	vz. 6	Vz. 6	vz. 14	Vz.14	NC	NC

C	CT +	CT +	vz. 7	Vz. 7	vz. 15	vz. 15	NC 1	NC 1
	LOW	LOW						
D	CT+	CT+	vz. 8	Vz. 8	vz. 16	vz. 16	NC 2	NC 2
E	Vz. 1	vz. 1	vz. 9	vz. 9	vz. 17	vz. 17	SC	SC
F	Vz. 2	vz. 2	vz. 10	vz. 10	vz. 18	vz. 18	SC 1	SC 1
G	Vz. 3	vz. 3	vz. 11	vz. 11	vz. 19	vz. 19	CT +	CT +
							LOW	LOW
H	Vz. 4	vz. 4	vz. 12	vz. 12	vz. 20	vz. 20	CT+	CT+

BLANK-pufr pro ředění vzorků, CAL-kalibrátor, CT + - pozitivní kontrola, LOW CT+ - nízká pozitivní kontrola, SBLK-blank-pufr pro ředění vzorků z kitu firmy Immundiagnostik, NC, SC-kalibrátory z kitů firmy Immundiagnostik, NC 1, NC 2, SC 1- kontrolní vzorky z kitů firmy Immundiagnostik, vz. 1-20-pacientské vzorky

3.3 Vlastní experimentální měření

Vlastní experimentální měření se skládalo ze dvou částí. V první části jsme porovnávali dva komerční sety pro imunoanalytické stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici metodou ELISA, a to set firmy Immundiagnostik a Ridascreen.

Druhá část měření byla založena na ověření stability α_1 – antitrypsinu ve stolici u vybraných vzorků (A, B, C). Stolice a z nich připravené extrakty byly skladovány osm dní a jeden den při laboratorní teplotě, v lednici a v mrazáku. V porovnání s těmito předpřipravenými vzorky byl analyzován extrakt čerstvý (připravený v den analýzy), dle doporučení výrobce. Analýza byla provedena pomocí komerční soupravy ELISA firmy Immundiagnostik. Na mikrotitrační destičce byly také použity dvě různé kalibrační křivky. První kalibrační řada byla zhotovena z kalibrátoru používaného setu firmy Immundiagnostik. Druhá byla zhotovena z kalibrátoru výrobce Ridascreen. Pro náš experiment byly použity i kontrolní vzorky z obou komerčních setů.

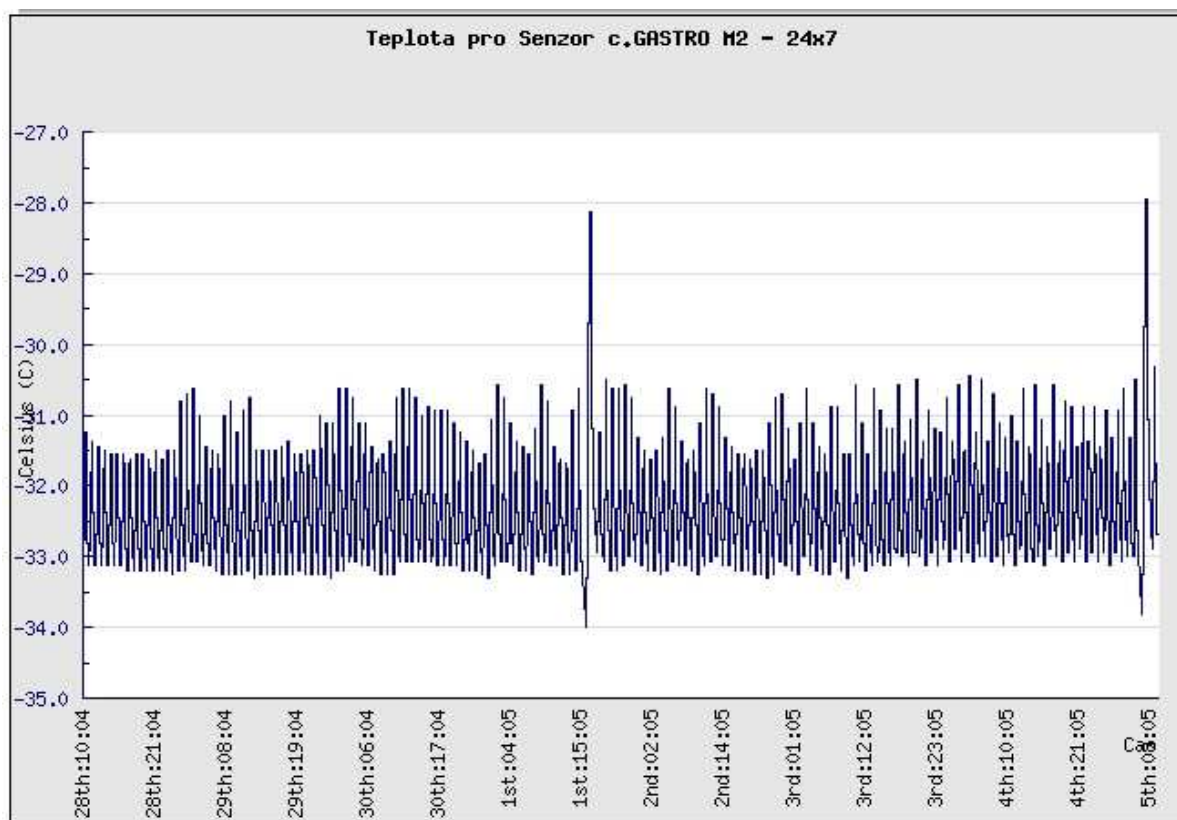
3.3.1 Porovnání dvou komerčních setů

Na ELISA destičkách obou firem (Immundiagnostik a Ridascreen) bylo změřeno 20 vzorků patientských stolic. Příprava extraktů ze vzorků stolic a analýza těchto předpřipravených vzorků, byly vždy provedeny v den analýzy dle doporučení výrobce. Výsledky obou setů pak byly statisticky vyhodnoceny. Byla provedena vzájemná korelace naměřených dat.

3.3.2 Stabilita α_1 – antitrypsinu ve stolici

Stolice a z nich připravené extrakty byly postupně připravovány a skladovány po dobu osmi dní a jeden den při laboratorní teplotě (+25 °C), v lednici (+5 °C) a v mrazáku (-30 °C). V porovnání s těmito předpřipravenými vzorky byl analyzován extrakt čerstvý (připravený v den analýzy), dle doporučení výrobce.

Stabilita jednotlivých teplot byla zajištěna pomocí speciálních teplotních senzorů umístěných v jednotlivých zařízeních (mrazák, lednice, laboratoř). V gastroenterologické laboratoři ÚKBLD VFN v Praze tento monitoring zajišťuje komerční webová aplikace Temp_Mon. Sensory v pravidelných časových intervalech zaznamenávají teplotu každého jednotlivého teplotního čidla. Tyto informace jsou poté ukládány do databáze. Ve webovém prohlížeči domovské stránky Temp_Mon pak lze najít minimální a maximální a průměrnou teplotu všech čidel za 1 hodinu a 24 hodin nebo, zda nebyla překročena limitní teplotní hodnota (Obr. 7).



Obr. 7 Grafické znázornění průběhu teplot při 24 hodinovém monitoringu

Pracovní postup – vzorky připravené v den analýzy

1. Navážit 3x 50 mg stolice ze třech vybraných vzorků stolic (A, B, C).
2. Přidat 2,5 ml ředícího pufru, dobře promíchat.

Pracovní postup – vzorky připravené jeden den před analýzou

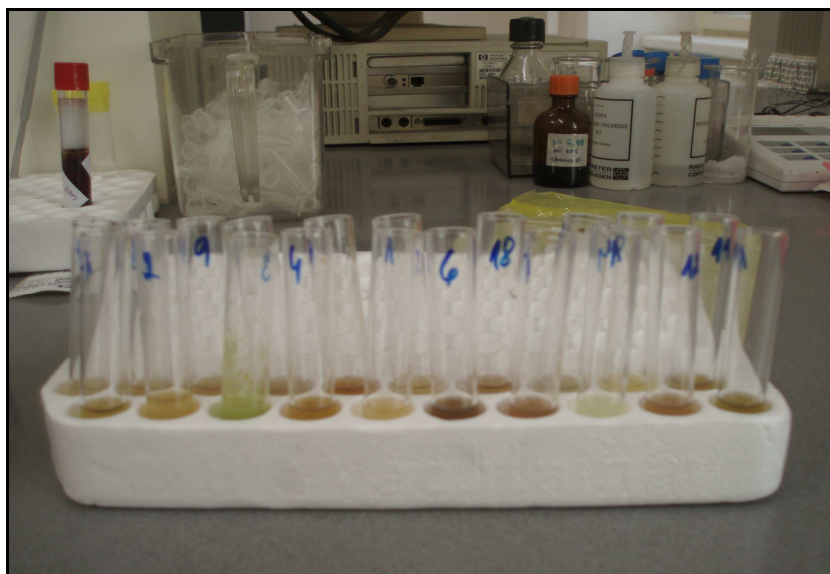
1. Navážit 5x 50 mg stolice ze třech vybraných vzorků stolic (A, B, C).
2. Vzorky, u kterých byla sledováno, jak ovlivní stabilitu α_1 – antitrypsinu změny teplot přímo ve stolici, nechat stát při laboratorní teplotě a v lednici
3. K ostatním vzorkům stolic přidat 2,5 ml ředícího pufru, dobře promíchat.
4. Extrakty uschovat při laboratorní teplotě, v lednici a v mrazáku.

Pracovní postup – vzorky připravené osm dní před analýzou

1. Navážít 5x 50 mg stolice ze třech vybraných vzorků stolic (A, B, C).
2. Vzorky, u kterých budeme sledovat stabilitu α_1 – antitrypsinu ve přímo ve stolici, nechat stát při laboratorní teplotě a v lednici.
3. K ostatním vzorkům přidat 2,5 ml ředícího pufru a dobře promíchat
4. Extrakty uschovat při laboratorní teplotě, v lednici a v mrazáku.

Vlastní analýza

1. Ke všem vzorkům stolice (8 dní, 1 den) přidat 2,5 ml ředícího pufru, dobře promíchat.
2. Extrakty (8 dní, 1 den) znova vortexovat.
3. Všechny vzorky centrifugovat 10 min/ 3 000 g.
4. 40 μ l supernatantu naředit s 960 μ l ředícího pufru. Dobře promíchat.
5. 100 μ l z předešlého ředění smíchat s 900 μ l ředícího pufru. Dobře promíchat.
6. Do příslušných jamek mikrotitrační destičky napipetovat 100 μ l blanku, kalibrátoru, kontrolních vzorků a předředěných patientských vzorků.
7. Inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
8. Promýt 5x 250 μ l promývacím roztokem. Provádělo se na automatické promývače.
9. Přidat do všech jamek 100 μ l konjugátu.
10. Inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
11. Promýt 5x 250 μ l promývacím roztokem. Provádělo se na automatické promývače.
12. Přidat do všech jamek 100 μ l substrátu.
13. Inkubovat 10 – 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
14. Reakci ukončit přidáním 50 μ l Stop roztoku do každé jamky.
15. Odečíst absorbanci při vlnové délce 450 nm. Referenční vlnová délka je 620 nm.



Obr. 9 Extrakty připravené ze vzorků stolic
(Gastroenterologická laboratoř, VFN a 1. LF UK)

Zpracování a vyhodnocení výsledků obou experimentálních částí bylo provedeno programem KIM verze 2.13. Model pipetování mikrotitračních destiček první experimentální části je uveden v tabulkách III. a IV. Model pipetování mikrotitračních destiček druhé části je uveden v tabulce V. Vzorky byly pipetovány v dubletech po 33 patientských vzorcích.

Tab. V Model pipetování mikrotitračních destiček

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	1F	1F	2C	2C	2K	2K	3H	3H	CAL B	CAL B
B	CAL A	CAL A	1G	1G	2D	2D	3A	3A	3I	3I	CAL C	CAL C
C	CT	CT	1H	1H	2E	2E	3B	3B	3J	3J	CAL D	CAL D
D	1A	1A	1I	1I	2F	2F	3C	3C	3K	3K	CAL E	CAL E

E	1B	1B	1J	1J	2G	2G	3D	3D	CT +	CT +	CAL F	CAL F
F	1C	1C	1K	1K	2H	2H	3E	3E	LOW CT+	LOW CT+	CAL V	CAL V
G	1D	1D	2A	2A	2I	2I	3F	3F	CAL T	CAL T	CAL X	CAL X
H	1E	1E	2B	2B	2J	2J	3G	3G	CAL U	CAL U	CAL Y	CAL Y

BLK-pufr pro ředění vzorků, CAL A-kalibrátor dodaný výrobcem Immundiagnostik, CAL B-F-ředící řada kalibrátoru A (Immundiagnostik), CAL T-Y-ředící řada kalibrátoru firmy Ridascreen, CT-kontrolní vzorek, CT+, LOW CT+ - kontrolní vzorky firmy Ridascreen, A-čerstvý extrakt, B-extrakt 1 den skladovaný při pokojové teplotě, C-extrakt 1 den skladovaný v lednici, D-extrakt 1 den skladovaný v mrazáku, E-extrakt 8 dní skladovaný při pokojové teplotě, F-extrakt 8 dní skladovaný v lednici, G-extrakt 8 dní skladovaný v mrazáku, H- stolice 1 den skladovaná při pokojové teplotě, I- stolice 1 den skladovaná v lednici, J- stolice 8 dní skladovaná při pokojové teplotě, K- stolice 8 dní skladovaná v lednici

Výsledné hodnoty koncentrací vzorků v jednotkách ($\mu\text{g/l}$) byly získány z první kalibrační křivky (kalibrátor dodaný stejným výrobcem jako použitý set - Immundiagnostik). Zpracované výsledky byly přímo prezentovány programem KIM verze 2.13.

3.3.3 Statistické zpracování výsledků

Všechny výsledné hodnoty koncentrací byly statisticky zpracovány v komerčním programu STATISTICA 9.1, zakoupeném 1. Lékařskou fakultou v Praze a v programu Microsoft Excel.

Podle nastavených cut off hodnot obou firem, byla posouzená pozitivita či negativita vzorků.

Cut off hodnota je arbitrárně stanovena k rozlišení „normálního“ a „patologického“ nálezu. Určuje se podle charakteru choroby. Pokud se jedná o vysoce závažnou chorobu, pro

kterou existuje účinná léčba, volí se cut off hodnota tak, aby zachytila všechny nemocné. Průvodním jevem je určitý počet falešně pozitivních nálezů, tj. vyslovení podezření na závažnou chorobu u zdravých osob (negativní působí na psychiku a nutnost podstoupit další, někdy komplikované diagnostické postupy k vyloučení nebo potvrzení přítomnosti choroby).
[19]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - VÝSLEDKY

Na ELISA destičkách obou firem (Immundiagnostik a Ridascreen) byla změřena testovací skupina 20 vzorků patientských stolic. Výsledky byly vzájemně porovnány a byla provedena korelace dat. Výsledky jednotlivých měření jsou shrnuty v tabulkách VI a VII. Korelace dat obou metod je znázorněna v grafech 1. a 2.

Druhá část experimentu byla analyzována ELISA setem firmy Immundiagnostik. Byly naměřeny hodnoty α_1 – antitrypsinu ve vzorcích (A, B, C) stolic a extraktů z nich připravených. Stolice i extrakty byly skladovány osm dní a jeden den před analýzou při laboratorní teplotě, v lednici a v mrazáku. V porovnání s těmito předpřipravenými vzorky byly analyzovány extrakty ze vzorků A, B a C připravené v den analýzy, dle doporučení výrobce.

4.1 Vyhodnocení výsledků firmy Immundiagnostik

Naměřené hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici byly posuzovány dle pozitivita či negativita vzorku. Pozitivita byla určena dle cut off hodnoty výrobce. Ta je pro ELISA set firmy Immundiagnostik udávána jako koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici $> 26,8$ mg/dl. Hodnoty nižší než 26,8 mg/dl jsou považovány za negativní. Výsledky jsou shrnuty v tabulce VI.

Tab. VI

METODA 1 Immundiagnostik			
Vzorek	OD	C ($\mu\text{g/l}$)	c (mg/dl)
CAL	0,46	30	37,5
CT 1	0,1	6,52	8,15
CT 2	0,41	26,74	33,43
1	0,22	14,35	17,94
2	1,69	110,72	138,40
3	0,49	31,96	39,95
4	0,81	52,83	66,04
5	0,08	5,22	6,53
6	1,65	107,61	134,51
7	0,78	50,87	63,59
8	1,55	101,09	126,36
9	1,45	94,57	118,21

10	1,45	94,57	118,21
11	0,05	3,26	4,08
12	0,94	61,3	76,63
13	1,11	72,39	90,49
14	0,27	17,61	22,01
15	0,44	28,7	35,88
16	0,39	25,43	31,79
17	0,39	25,43	31,79
18	0,82	53,48	66,85
19	0,21	13,7	17,13
20	0,77	50,22	62,78

Z výsledků uvedených v Tab. VI je zřejmé, že 15 pacientů z 20 analyzovaných pacientů je dle cut off hodnoty uváděné výrobcem pozitivní na přítomnost α_1 – antitrypsinu ve stolici, tzn. jejich hodnota koncentrace α_1 – antitrypsinu je $> 26,8$ mg/dl. 5 pacientů je negativních na přítomnost α_1 – antitrypsinu ve stolici.

Ve spolupráci s Pediatrikou klinikou Fakultní nemocnice Motol, 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, ze které byly vzorky patientských stolic dodány, bylo zjištěno, že většina pozitivních pacientů byla léčena na různá zánětlivá onemocnění trávicího systému. Shodou okolností pacienti, jejichž hodnota koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici se pohybovala > 100 mg/dl, byli diagnostikováni na přítomnost gluténové enteropatie (celiakie). Zvýšené hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici byly také zjištěny u pacientů se zánětlivým onemocněním plic. Jednalo se o chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a cystickou fibrózu.

4.2 Vyhodnocení výsledků firmy Ridascreen

Naměřené hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici byly posuzovány dle pozitivivity či negativity vzorku. Pozitivita byla určena dle cut off hodnoty výrobce. Ta je pro ELISA set firmy Ridascreen udávána jako koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici > 400 $\mu\text{g/g}$. Hodnoty < 400 $\mu\text{g/g}$ jsou považovány za negativní. Výsledky jsou shrnuty v tabulce VII.

Tab. VII

METODA 2 RIDASCREEN		
vzorek	OD	c (µg/g)
CAL	0,98	500
CT +	0,75	382,65
LOW CT+	0,47	239,8
1	0,76	387,76
2	2,53	1290,82
3	1,5	765,31
4	1,51	770,41
5	0,156	79,59
6	2,4	1224,49
7	1,76	897,96
8	2,19	1117,35
9	2,33	1188,78
10	2,49	1270,41
11	0	0
12	1,39	709,18
13	1,16	591,84
14	0,43	219,39
15	1,26	642,86
16	0,95	484,69
17	0,27	137,76
18	1,81	923,47
19	0,55	280,61
20	0,71	362,24

Z výsledků uvedených v Tab. VII je zřejmé, že 13 pacientů z 20 analyzovaných pacientů je dle cut off hodnoty uváděné výrobcem pozitivní na přítomnost α_1 – antitrypsinu ve stolici, tzn. jejich hodnota koncentrace α_1 – antitrypsinu je $> 400 \mu\text{g/g}$. Pět pacientů vykazuje negativitu na přítomnost α_1 – antitrypsinu ve stolici.

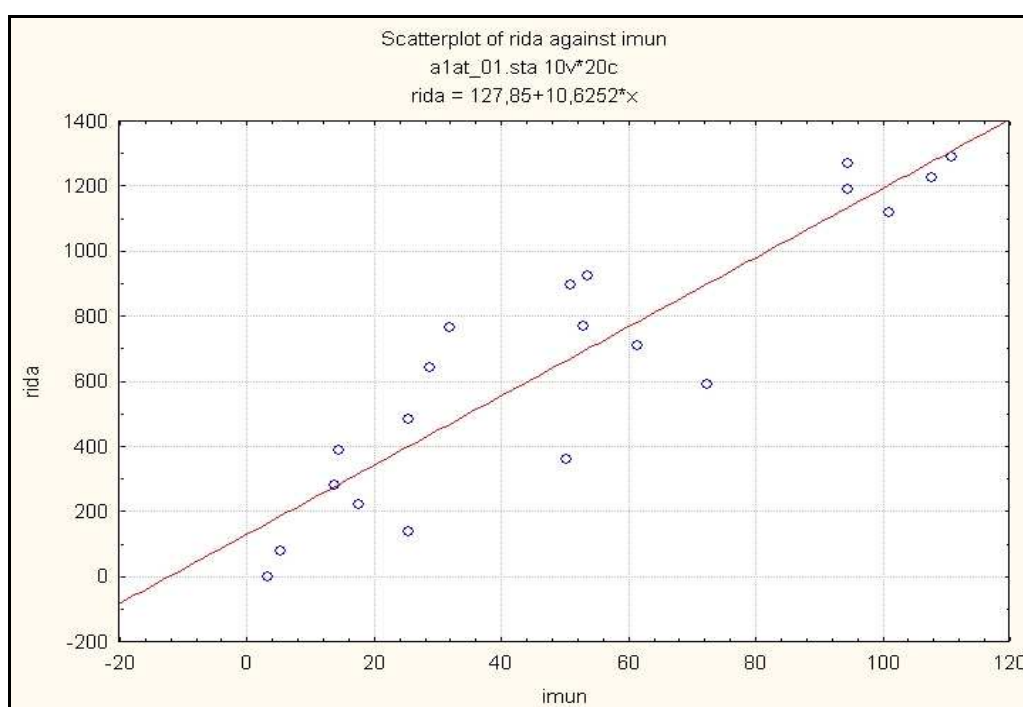
Jelikož analýze byli podrobena stejní pacienti z Pediatrické kliniky Fakultní nemocnice Motol, 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, jako u předchozího měření (Tab. VI), dalo se očekávat, že výsledky budou velmi podobné. Většina pozitivních pacientů byla léčena na různá zánětlivá onemocnění trávicího systému. Pacienti, jejichž hodnota koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici přesáhla hodnotu $> 1000 \mu\text{g/g}$ byla léčena na různá zánětlivá onemocnění trávicího systému. Nejčastěji na celiakii. Zvýšené hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici byly zjištěny taktéž u pacientů se zánětlivým onemocněním plic. Jednalo se o chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a cystickou fibrózu.

4.3 Srovnání dvou metodik (Immundiagnostik x Ridascreen) a jejich korelace

Vzájemná korelace hodnot α_1 -antitrypsinu naměřených na setech dodávaných oběma výrobcem (Immundiagnostik, Ridascreen) jsou znázorněny v grafu 1 a 2.

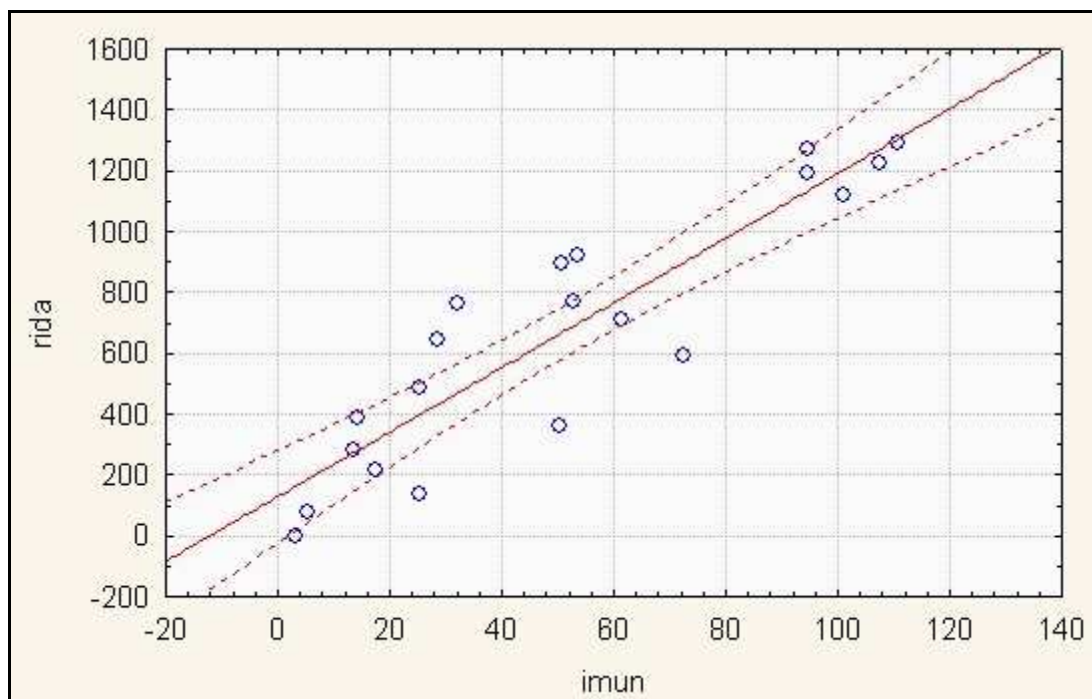
Na ose x jsou vyneseny hodnoty koncentrace α_1 -antitrypsinu [mg/dl] firmy Immundiagnostik, na ose y hodnoty koncentrace α_1 -antitrypsinu [$\mu\text{g/g}$] firmy Ridascreen.

Grafy 1, 2 byly zhotoveny pomocí komerčního programu STATISTICA 9.1., pomocí něhož byl rovněž vypočítán korelační koeficient (0,91). Hodnota korelačního koeficientu naznačuje, že metody spolu dobře korelují.



Graf 1. Korelace naměřených hodnot v ELISA setech firem Immundiagnostik a Ridascreen.

Osa x – koncentrace α_1 -antitrypsinu v mg/dl (set Immundiagnostik), osa y - koncentrace α_1 -antitrypsinu v $\mu\text{g/g}$ (set Ridascreen).



Graf 2. Korelace naměřených hodnot v ELISA sotech firem Immundiagnostik a Ridascreen.

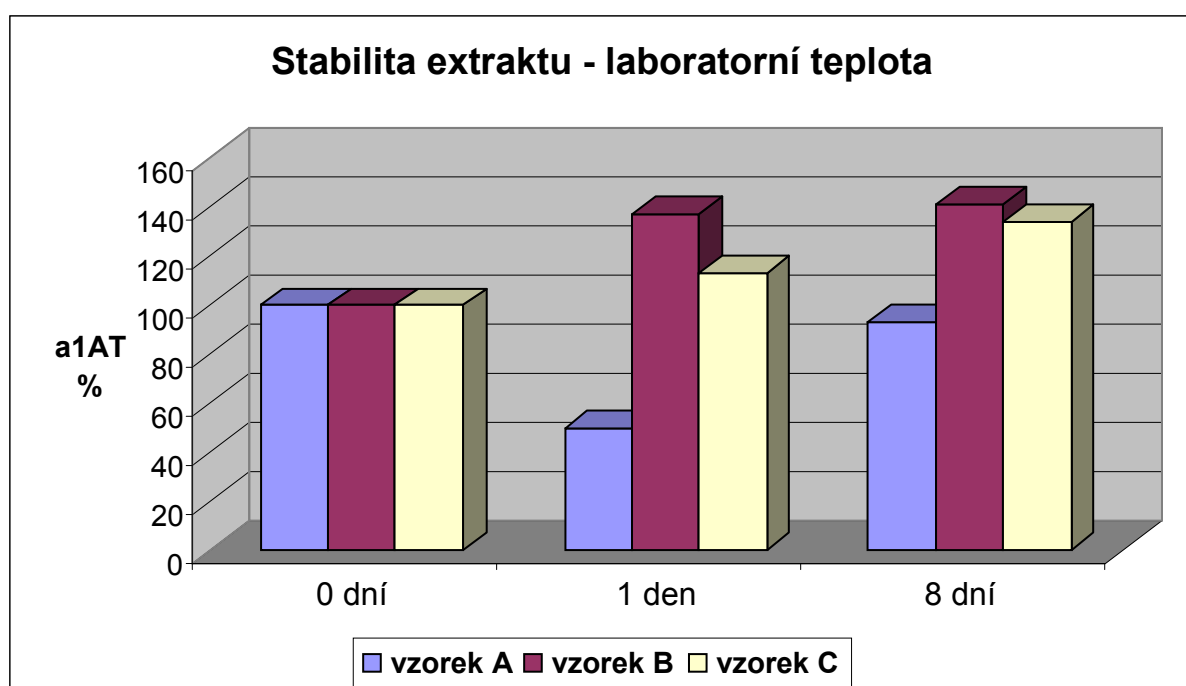
Osa x – koncentrace α_1 -antitrypsinu v mg/dl (set Immundiagnostik), osa y - koncentrace α_1 -antitrypsinu v $\mu\text{g/g}$ (set Ridascreen).

4. 4 Vyhodnocení stability α_1 – antitrypsinu ve stolici a extraktu při různé teplotě

Analýze byly podrobeny tři vzorky patientských stolic, u nichž byl předpoklad na pozitivitu α_1 - antitrypsinu, označené jako vzorek A, vzorek B a vzorek C. Z každého vzorku byly připraveny extrakty, které byly skladovány při různých teplotách po různou dobu. Měřené extrakty byly skladovány v lednici, mrazáku a při pokojové teplotě po dobu jednoho dne, osmi dnů a k porovnání extrakt připravený v den měření. Dále byly stejným způsobem skladovány vzorky stolic, z nichž byly v den měření připraveny extrakty a tentýž den změřeny.

Stabilita extraktu – laboratorní teplota

Graf 3. znázorňuje stabilitu α_1 -antitrypsinu v extraktu uchovávaném při laboratorní teplotě. Na ose x je vynesena doba skladování extraktu, osa y znázorňuje obsah α_1 - antitrypsinu v extraktu uvedený v procentech. Jako 100 % je uvedena hodnota extraktů připravených dle návodu výrobce, tj. extrakty ze stolic byly připraveny v den měření (den 0). Na sloupcích vyznačující hodnotu α_1 - antitrypsinu měřenou po různé době skladování extraktu je možno pozorovat procentuální odchylku od hodnoty uváděné výrobcem.



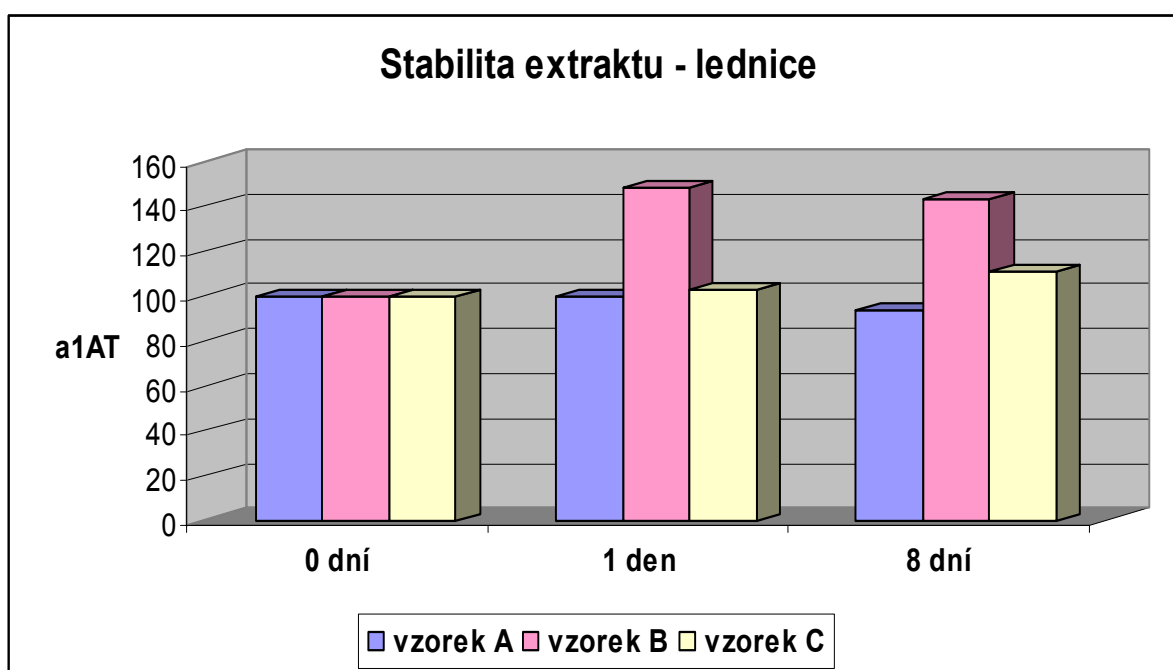
Graf 3. Stabilita extraktu – laboratorní teplota

Přestože u vzorků B a C se hodnoty koncentrací α_1 - antitrypsinu v extraktu skladovaném při pokojové teplotě zvyšují, vzorek A vykazuje snížení hodnot koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktu skladovaném 1 den a 8 dní před analýzou oproti vzorku extraktu zhotoveném v den analýzy (0 dní) dle doporučení výrobce.

Stabilita extraktu - lednice

Graf 4. znázorňuje stabilitu α_1 -antitrypsinu v extraktu připraveném 1 den před měřením a 8 dní před měřením. Extrakty byly uchovávány v lednici tj. $t = +5\text{ C}^0$.

Osa x znázorňuje dobu skladování extraktu, osa y znázorňuje množství α_1 - antitrypsinu v extraktu uvedený v procentech. Jako 100 % je uvedena hodnota extraktu připraveného dle návodu výrobce, tj. extrakt ze stolic byl připraven v den měření (den 0). Na sloupcích vyznačující hodnotu α_1 - antitrypsinu měřenou po různé době skladování extraktu je možno pozorovat procentuální odchylku od hodnoty uváděné výrobcem.



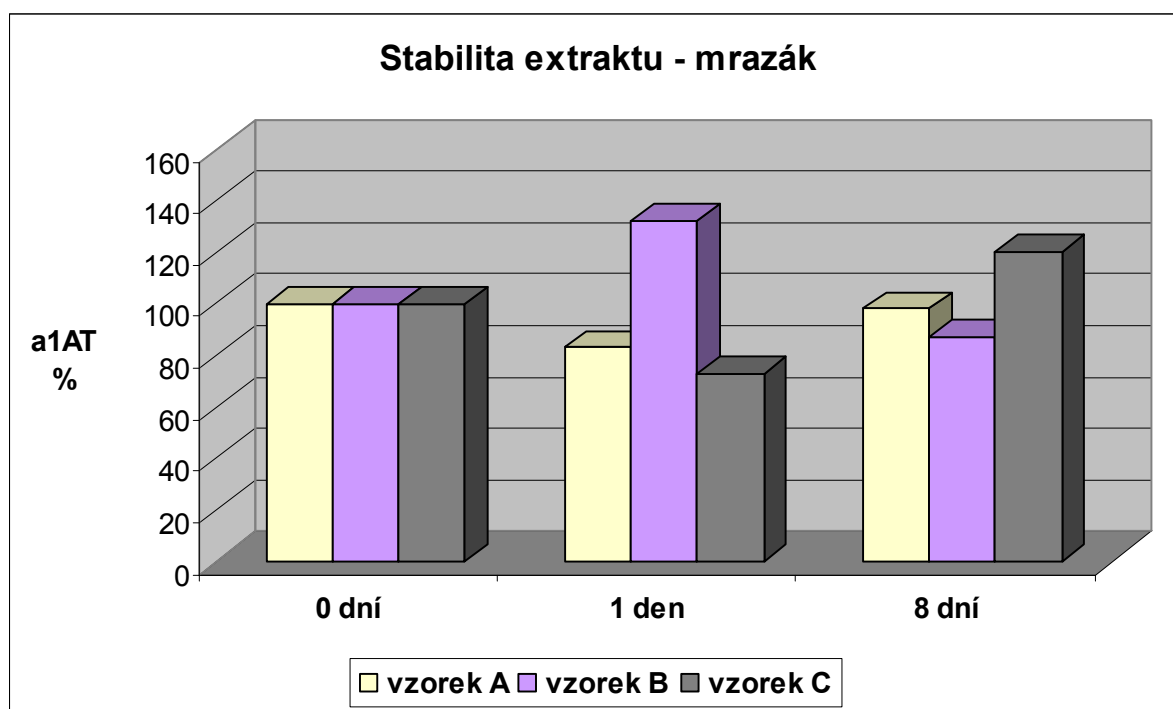
Graf 4. Stabilita extraktu - lednice

U vzorků B a C se hodnota koncentrace α_1 - antitrypsinu v extraktu skladovaném v lednici 1 den a 8 dní před měřením zvyšuje. Vzorek A vykazuje stabilitu hodnot koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktu zhotoveném 1 den před analýzou, 8 dní před analýzou i v extraktu připraveném v den analýzy (0 dní) dle doporučení výrobce.

Stabilita extraktu - mrazák

Graf 5. znázorňuje stabilitu α_1 -antitrypsinu v extraktu připraveném 1 den a 8 dní před měřením. Extrakty byly uchovávány v mrazáku tj. $t = -30\text{ C}^0$.

Osa x znázorňuje dobu skladování extraktu, osa y znázorňuje množství α_1 - antitrypsinu v extraktu uvedený v procentech. Jako 100 % je uvedena hodnota extraktu připraveného dle návodu výrobce, tj. extrakt ze stolic byl připraven v den měření (den 0). Na sloupcích vyznačující hodnotu α_1 - antitrypsinu měřenou po různé době skladování extraktu je možno pozorovat procentuální odchylku od hodnoty uváděné výrobcem.



Graf 5. Stabilita extraktu - mrazák

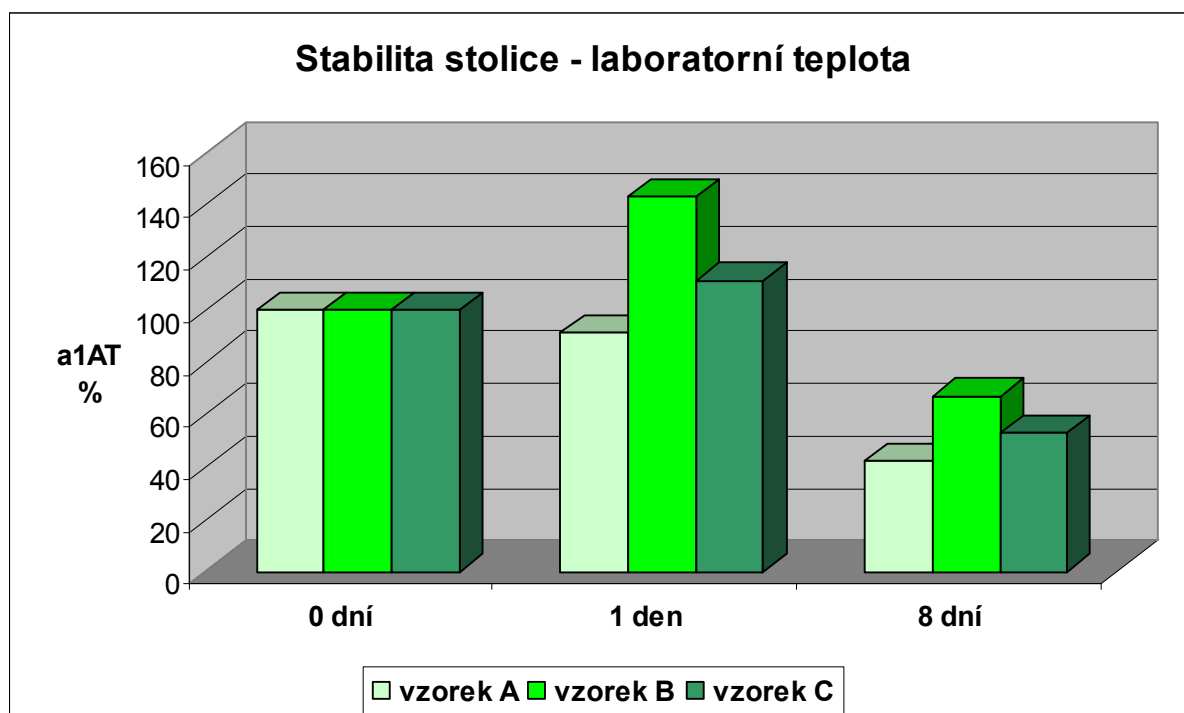
Z grafu je patrné, že u vzorku A se hodnota koncentrace α_1 – antitrypsinu skladováním extraktu 1 den před analýzou a 8 dní před analýzou v mrazáku snižuje oproti extraktu připraveném v den analýzy (0 dní), dle doporučení výrobce. U vzorku B je zajímavé pozorovat, jak se stabilita hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu skladovaného 1 den zvyšuje, zatímco skladování extraktu 8 dní stabilitu hodnoty koncentrace α_1 - antitrypsinu ještě snižuje v porovnání s extraktem připraveným dle doporučení výrobce (0 dní). Vzorek C naopak

vykazuje snížení hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktu skladovaném 1 den v porovnání s hodnotou koncentrace α_1 – antitrypsinu připraveného v den analýzy (0 dní) a zvýšení hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktu skladovaného 8 dní v mrazáku.

Stabilita stolice – laboratorní teplota

Graf 6. znázorňuje stabilitu α_1 -antitrypsinu ve stolici skladované 1 den a 8 dní před měřením. Stolice byly uchovávány při laboratorní teplotě tj. $t = +25\text{ C}^0$.

Osa x znázorňuje dobu skladování stolice, osa y znázorňuje množství α_1 - antitrypsinu v extraktu připravovaného ze vzorku stolice, která byla podrobena výše uvedenému skladování (1 den a 8 dní před analýzou), uvedeného v procentech. Jako 100 % je uvedena hodnota extraktu připraveného dle návodu výrobce, tj. extrakt ze stolic byl připraven v den měření (den 0). Na sloupcích, vyznačující hodnotu α_1 - antitrypsinu měřenou po různé době skladování stolic, je možno pozorovat procentuální odchylku od hodnoty uváděné výrobcem.



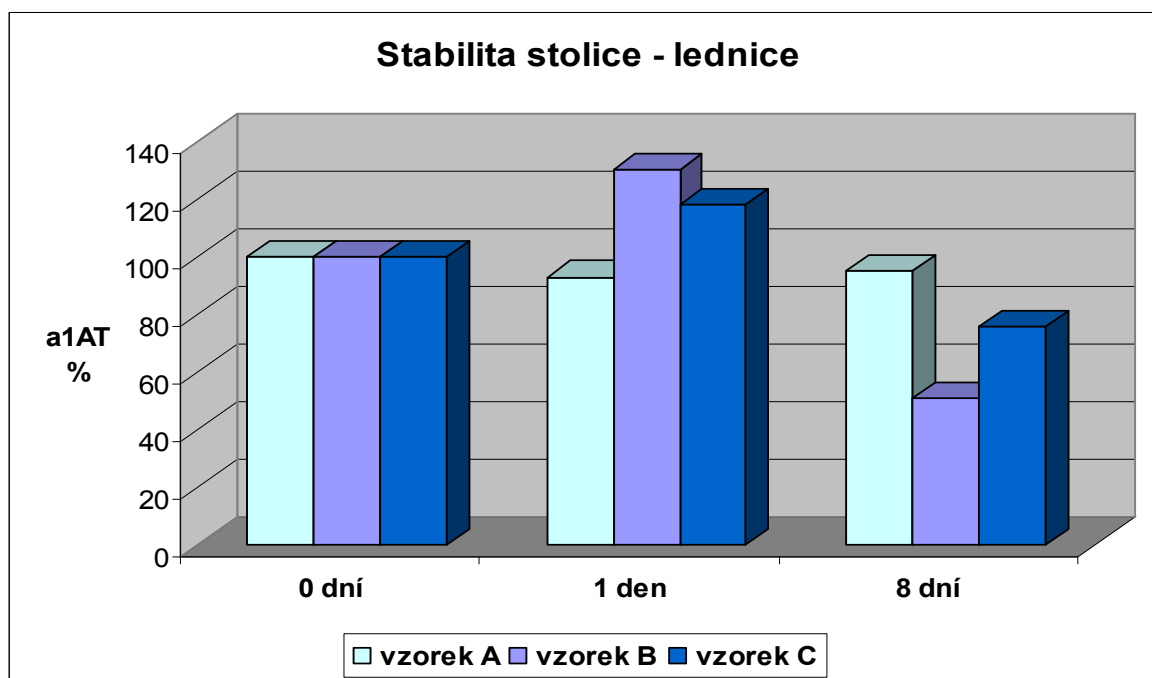
Graf 6. Stabilita stolice – laboratorní teplota

U vzorku A je z grafu patrné, že skladování stolice 1 den až 8 dní při pokojové teplotě, neprospívá stabilitě hodnoty koncentrace α_1 -antitrypsinu. U vzorků B a C, skladováním 1 den při pokojové teplotě, došlo ke zvýšení hodnoty koncentrace α_1 -antitrypsinu, oproti vzorku stolice připraveném v den analýzy (0 dní). Také skladování vzorků stolice B a C 8 dní při pokojové teplotě hodnotu koncentrace α_1 -antitrypsinu výrazně snižuje.

Stabilita stolice - lednice

Graf 7. znázorňuje stabilitu α_1 -antitrypsinu ve stolici skladované 1 den a 8 dní před měřením. Stolice byly uchovávány v lednici tj. $t = +5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Osa x znázorňuje dobu skladování stolice, osa y znázorňuje množství α_1 - antitrypsinu v extraktu připraveného ze vzorků stolic, které byly podrobeny výše uvedenému skladování (1 den a 8 dní před analýzou), uvedeného v procentech. Jako 100 % je uvedena hodnota extraktu připraveného dle návodu výrobce, tj. extrakt ze stolic byl připraven v den měření (den 0). Na sloupcích, vyznačující hodnotu α_1 - antitrypsinu měřenou po různé době skladování stolic, je možno pozorovat procentuální odchylku od hodnoty uváděné výrobcem.



Graf 7. Stabilita stolice - lednice

Přestože u vzorků B a C se hodnoty koncentrací α_1 – antitrypsinu v extraktu skladováním stolic 1 den v lednici zvyšují, naopak skladování těchto vzorků déle než 1 den snižuje hodnotu koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici. Oproti tomu vzorek A vykazuje celkově nestabilní hodnotu koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici skladovanou déle než 1 den.

Z výsledků naměřených hodnot koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktech stolic vyplynulo, že doporučení výrobce analyzovat extrakt ze stolice připravený v den analýzy nevykazuje nejlepší výsledky. Koncentrace α_1 – antitrypsinu nedosahují u těchto měření nejvyšších hodnot. Výsledky našich měření naznačují, že nejvyšší hodnoty koncentrace α_1 – antitrypsinu jsou v extraktu, který je připraven den před analýzou a skladován v lednici.

Tyto výsledky vedou k závěru, že příprava extraktu 1 den před analýzou a jeho ponechání v lednici, se jeví jako vhodnější varianta stanovení α_1 – antitrypsinu, než dle návodu udávaného výrobcem.

Při přípravě extraktu ze stolic, které byly uchovávány různou dobu při různých teplotách vyplynulo, že uchovávání stolic 1 den při laboratorní teplotě či v lednici výrazně

neovlivní hodnotu koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktu připraveném v den měření. Při skladování stolice 8 dní při laboratorní teplotě či v lednici hodnota koncentrace α_1 – antitrypsinu v extraktu klesá.

5. DISKUZE

K diagnostice poruch v oblasti zažívacího ústrojí se používají specializovaná vyšetření, zejména moderní zobrazovací metody (endoskopie, sonografie, RTG, CT, NMR), poskytující morfologický obraz orgánů. Nelze však opomenout ani metody biochemické, jejichž přínos je především v oblasti funkčních testů, screeningových programů a sledování dynamiky procesů v průběhu léčby.

Stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici je diagnostickým ukazatelem zánětlivých onemocnění tenkého a tlustého střeva, zejména malabsorpčního syndromu.

α_1 – antitrypsin lze v klinických laboratořích stanovit metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pomocí komerčně dostupných setů v provedení mikrotitračních destiček. Jelikož gastroenterologická laboratoř VFN, 1. LF. UK v Praze má v plánu toto vyšetření zavést jako rutinní, byly porovnávány dva komerční ELISA sety firem Immundiagnostik a Ridascreen.

Pro analýzu bylo vybráno 20 vzorků stolic, u nichž byl předpoklad pozitivního α_1 – antitrypsinu ve stolici, tzn. u pacientů, kteří v době odběrů prodělali zánětlivé onemocnění tenkého nebo tlustého střeva. Vzorky byly skladovány zamražením a extrakty byly připraveny v den analýzy dle doporučení výrobce. Výsledky obou metod byly navzájem porovnány a byla provedena korelace dat. Hodnota korelačního koeficientu (0,91) naznačuje, že metody spolu dobře korelují.

Z důvodu lepší manipulace lze gastroenterologické laboratoři VFN, 1. LF. UK v Praze doporučit zakoupení setu firmy Ridascreen. Ve srovnání s ELISA sety firmy Immundiagnostik, jsou jednotlivé lahvičky v setu barevně rozlišeny, což usnadňuje orientaci při pipetování. Samotné vyhodnocení výsledků (pozitivity či negativity) se zdá být u setu Ridascreen rovněž jednodušší. Není zde zapotřebí násobení výsledku dilučním faktorem ani přepočítání koncentrace z původních jednotek udávané výrobcem na výslednou cut off hodnotu udávanou v jednotkách zcela jiných.

Jediný nedostatek setu firmy Ridascreen je vznik krystalů při ředění původně koncentrovaného promývacího roztoku. Na to však výrobce v návodu upozorňuje a krystaly lze snadno rozpustit ve vodní lázni při 37 °C.

Dále byla u tří patientských vzorků stolic porovnávána stabilita α_1 – antitrypsinu ve stolici a extraktech ze stolic připravených v závislosti na teplotě a době skladování.

Naměřené výsledky ukazují, že stabilita extraktu připraveného 1 den před měřením a uchovaného v lednici či mrazáku vykazuje lepší výsledky hodnot koncentrace α_1 – antitrypsinu než v extraktu připraveném v den analýzy dle doporučení výrobce. Proto lze doporučit extrakt ze stolice připravit, uchovat 1 den v lednici a poté provést výsledné měření koncentrace α_1 – antitrypsinu.

Dále bylo zjištěno, že stolice lze uchovávat 1 den v lednici do doby, než z nich bude připraven extrakt, aniž by se výrazně změnila hodnota koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici. Toho lze využít např. při uchovávání a transportu biologického materiálu od lékaře do laboratoře. Delší skladování stolic v lednici již není možno nedoporučit. Jak vyplývá z výsledků, uchovávání stolic 8 dní při laboratorní teplotě či v lednici vykazuje výrazně nižší koncentraci α_1 – antitrypsinu ve stolici. Proto lze doporučit stolice při delším skladování než 1 den vždy zamrazit.

6. ZÁVĚR

Metodou ELISA pomocí laboratorních setů dvou firem Immundiagnostik a Ridascreen byla stanovena koncentrace α_1 – antitrypsin ve 20 extraktech patientských stolic dle návodů výrobců. Výsledky metod byly porovnány a byla provedena korelace dat. Z hodnoty korelačního koeficientu (0,91) lze usuzovat, že metody spolu dobře korelují.

U tří vzorků patientských stolic byla porovnávána stabilita α_1 – antitrypsinu v závislosti na teplotě a době skladování.

Z výsledků porovnání stability α_1 – antitrypsinu vyplývá, že nejvhodnější pro stanovení koncentrace α_1 – antitrypsinu ve stolici je metoda, při níž je extrakt ze stolice uchován v lednici po dobu jednoho dne.

Není-li možno připravit extrakt ze stolice v den odběru stolice, lze stolici uchovat 1 den v lednici. Při skladování delším než 1 den, je potřeba stolice vždy zamrazit.

7. LITERATURA

- [1] **Mařatka Z. a kol.**, Gastroenterologie, Praha, 1999, str. 204 – 207
- [2] **Masopust J.**, Klinická biochemie, Požadování a hodnocení biochemických vyšetření, část II., Praha, 1998, s. 497
- [3] **Zima T.**, Laboratorní diagnostika, Praha, 2007, s. 534
- [4] **Maruna P.**, Proteiny akutní fáze, Praha, 2004, s. 95 – 99
- [5] **Bartůňková J., Paulík M. a kol.**, Vyšetřovací metody v imunologii, Praha, 2005, s. 53 - 56
- [6] **Kolektiv autorů**, Systémová enzymoterapie pro praxi, Praha, 2001
- [7] **Kocna P.**, Biochemická diagnostika v gastroenterologii, <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text6.htm> (21. 4. 2011)
- [8] **Elisa Technology**, http://www.genwaybio.com/gw_file.php (5. 3. 2011)
- [9] **Kocna P.**, Gastrolab – Miniencyklopedie laboratorních metod v gastroenterologii, <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/glab/glency1.htm> (18. 3. 2011)
- [10] **Schneiderka P. a kol.**, (2004), Kapitoly z klinické biochemie, 2. doplněné a přepracované vydání, Karolinum, Praha, (<http://ukb.lf1.cuni.cz/vyuka/textbook.php>) (5. 3. 2011)
- [11] **Mačák J., Mačáková J.**, Patologie, Praha 2004 s.
- [12] **Stříteský J.**, Patologie, Olomouc, 2001, s. 221- 244
- [13] **Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.**, Harperova Biochemie

- [14] **Biancone L., Fantini M., Tosti C., Bozzi R., Vavassori P. and Pallone F.** Fecal α_1 -antitrypsin clearance as a marker of clinical relapse in patients with Crohn's disease of the distal ileum. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003, 15:261–266
- [15] **TAKEDA H., NISHISE S., FURUKAWA M., NAGASHIMA R., SHINZAWA H. and TAKAHASHI T.** Fecal clearance of α_1 -antitrypsin with lansoprazole can detect protein-losing gastropathy. *Digestive Diseases and Science* 1999, November Vol. 44, 2313-2318
- [16] **Masopust J.,** *Klinická biochemie, Požadování a hodnocení biochemických vyšetření, část I., Praha, 1991, s. 250 – 270*
- [17] **Topinková K.,** *Gliadinové sekvence v patogenezi a diagnostice celiakie, Diplomová práce, 2009, http://ukb.lf1.cuni.cz/diplomky/dp_topin09.pdf, s. 19, (27. 4. 2011)*
- [18] **Wikipedie, <http://cs.wikipedia.org/wiki/ELISA> (25. 4. 2011)**
- [19] **Dastyh M., Breinek P. a kol.,** *Klinická biochemie, Brno, 2008, s. 47*
- [20] **Braamskamp Marjet J. A. M., Dolman Koert M., Tabbers Merit M.,** Protein – losing enteropathy in children. *Eur J Pediatr* 2010, 169:1179-1185
- [21] **Racek J. et al.,** *Klinická biochemie, Druhé, přepracované vydání, Praha, 2006, s. 197*
- [22] **Fischbach W., Becker W., Mössner J., Koch W. and Reiners C.** Faecal alpha-1-antitrypsin and excretion of ¹¹¹indium granulocytes in assessment of disease activity in chronic inflammatory bowel diseases. *Gut* 1987, 28: 386-393
- [23] **Fujii T., Shimizu T., Takahashi K., Kishiro M., Ohkubo M., Akimoto K., Yamashiro Y.** Fecal [alpha]1-Antitrypsin Concentrations as a Measure of Enteric Protein Loss After Modified Fontan Operations. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2003, 37:577-580

- [24] **Keller K., Knobel R., Ewe K.** Fecal [alpha]₁- Antitrypsin in Newborn Infants. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition. 1997, 3:271-275
- [25] **Duangmorn T., Kalayanee A., Suporn T., Supranee N., Rungtip S., Mongol K.** Fecal Alpha 1-Antitrypsin in Healthy and Intestinal – Disorder Thai Children. J Med Assoc Thai 2007, 90 (7): 1317-22

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EIA	enzyme immunoassay
GM-SCF	granulocyto-makrofágová kolonie stimulujícího faktor
SERPIN	serine protease inhibitor
CRP	C-reaktivní protein
RTG	rentgenové záření
CT	computed tomography (výpočetní tomografie)
NMR	nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)
IgE	protilátka-immunoglobulin třídy E
IgG	protilátka-immunoglobulin třídy G
IL-1 β	interleukin-1 beta
IL-2	interleukin-2
IL-4	interleukin-4
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
GIT	gastrointestinální trakt
PLE	protein-losing enteropathy
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
TBM	tetramethylbenzidin
OD	optical density