

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Dagmar Voříšková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

Stanovení specifických IgE – porovnání používaných metod

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Jitka Gorčíková

PLZEŇ 2016

Prohlášení:

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

V Plzni dne 20. 3. 2016

.....

vlastnoruční podpis

Děkuji Ing. Jitce Gorčíkové, že se ujala role vedoucí mé práce a Ing. Tomáši Vlasovi za odborné rady a za to, že mi byl k dispozici kdykoliv jsem měla jakékoliv dotazy. Dále děkuji Ústavu Imunologie a Alergologie FN Plzeň za poskytnutí informací, které jsou nezbytnou součástí mé práce.

Anotace

Příjmení a jméno: Voříšková Dagmar

Katedra: Teoretických oborů

Název práce: Stanovení specifických IgE – porovnání používaných metod

Vedoucí práce: Ing. Jitka Gorčíková

Počet stran - číslované: 34

Počet stran – nečíslované: 17

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 40

Klíčová slova: Immulite – ImmunoCAP - ImmunoCAP ISAC – alergie – imunologie – protilátky – antigeny - metody

Souhrn:

Tato bakalářská práce pojednává o třech metodách užívaných v imunologických laboratořích, tedy Immulite 2000, ImmunoCAP 250 a ImmunoCAP ISAC. V teoretické části je popsána obecná imunologie, uvedení do problematiky alergií a upřesnění protilátek, konkrétně rozdělení do jednotlivých tříd imunoglobulinů a jejich popis. Praktická část se pak zabývá zmiňovanými metodami, jejich vlastnostmi a faktory, které ovlivňují výsledky vyšetření.

Annotation

Surname and name: Voříšková Dagmar

Department: of Theoretical Fields

Title of Thesis: Determination of specific IgE - comparison of methods used

Consultant: Ing. Jitka Gorčíková

Number of pages - numbered: 34

Number of pages - unnumbered: 17

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 40

Key words: Immulite – ImmunoCAP - ImmunoCAP ISAC – allergy – immunology – antibodies – antigens - methods

Summary:

This bachelor work discusses three methods used in immunological laboratories, meaning Immulite 2000, ImmunoCAP 250 and ImmunoCAP ISAC. In the theoretical part is described basic immunology, introduction to the topic of allergies and specification of antibodies, particularly divergence of immunoglobulins into specific classes and description of them. The practical part is dealing with methods mentioned, their attributes and factors affecting examination results.

OBSAH

Úvod	12
Teoretická část.....	13
1 Obecná imunologie.....	13
2 Alergie	15
2.1 Typy alergických reakcí	15
2.1.1 První typ	15
2.1.2 Druhý typ.....	16
2.1.3 Třetí typ	16
2.1.4 Čtvrtý typ.....	17
2.2 Alergeny	17
2.2.1. Nomenklatura	17
2.2.2 Potravinové alergeny	17
2.2.3 Respiračně přijímané alergeny	18
2.2.4 Injekčně přijímané alergeny	18
2.2.4.1 Alergeny v léčích.....	18
2.2.4.2 Zvířecí jedy.....	19
2.2.5 Kožní alergeny.....	19
2.3 Příznaky	19
2.3.1 Kůže.....	19
2.3.1.1 Ekzém	19
2.3.1.2 Otoky	20
2.3.2 Dýchací cesty.....	20
2.3.3 Ostatní oblasti	21
2.3.4 Anafylaxe.....	21

2.4 Genetické predispozice.....	21
2.5 Léčba	22
2.5.1. První pomoc.....	22
2.5.2 Testy	22
2.5.3 Symptomatická léčba.....	22
2.5.4 Příčinná léčba	23
3 Protilátky	23
3.1 Obecná charakteristika	23
3.1.1 Třídy imunoglobulinů.....	24
3.1.1.1 Imunoglobuliny třídy A	24
3.1.1.2 Imunoglobuliny třídy D	24
3.1.1.3 Imunoglobuliny třídy E	25
3.1.1.3.1 Specifické IgE.....	25
3.1.1.4 Imunoglobuliny třídy G	26
3.1.1.5 Imunoglobuliny třídy M	27
Praktická část.....	28
4 Cíl práce.....	28
4.1 Metodika.....	28
4.2 Výzkumné otázky	28
5 Metody.....	28
5.1 ImmunoCAP 250.....	29
5.1.1 Postup	30
5.2 Immulite 2000.....	30
5.2.1 Postup	31
5.3 ImmunoCAP ISAC.....	31
5.3.1 Postup	32
6 Faktory.....	33

6.1 Kvantita, semikvantita, kvalita	33
6.1.1 Kvantita	34
6.1.2 Semikvantita	34
6.1.3 Kvalita	34
6.2 Druhy alergenů	34
6.2.1 Nativní	35
6.2.2 Rekombinantní.....	35
6.3 Senzitivita	35
6.3.1 Immulite 2000.....	36
6.3.2.1 ImmunoCAP 250 pro Bet v 1	36
6.3.2.2 ImmunoCAP 250 pro Bet v 2	37
6.3.2.3 ImmunoCAP 250 pro rekombinantní alergeny	37
6.3.3.1 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1	38
6.3.3.2 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2.....	38
6.3.3.3 ImmunoCAP ISAC pro rekombinantní alergeny	38
6.4 Grafické znázornění senzitivity	39
6.5 Specifita	39
6.5.1 Immulite 2000.....	40
6.5.2.1 ImmunoCAP 250 pro Bet v 1	40
6.5.2.2 ImmunoCAP 250 pro Bet v 2	40
6.5.2.3 ImmunoCAP 250 pro rekombinantní alergeny	41
6.5.3.1 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1	41
6.5.3.2 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2.....	41
6.5.3.3 ImmunoCAP ISAC pro rekombinantní alergeny	42
6.6 Grafické znázornění specifity	42
Diskuze	43
Závěr.....	45

Literatura	46
Seznam zkratk.....	50
Seznam tabulek.....	51
Seznam grafů	51
Přílohy	52

Úvod

Za téma své bakalářské práce jsem si zvolila porovnání užívaných metod pro stanovení specifických IgE. Práce pojednává o jednotlivých metodách Immulite, ImmunoCAP a ImmunoCAP ISAC, konkrétně o jejich výhodách a nevýhodách ohledně sensitivity, specifity, užívaného objemu, objektivity nebo subjektivitě hodnocení, počtu vyšetření etc.

Dále rozebírané metody jsou aktuální a stále užívané v nemocnicích. Výsledky vyšetření, z nichž byla čerpána data pro jednotlivé výpočty pocházejí konkrétně z FN Plzeň a byla pro jejich získání řádně vyplněna žádost o poskytnutí informací.

Teoretická část uvádí do problematiky imunologie, konkrétně alergologie, pojednává o jednotlivých alergiích a konkrétních mechanismech a protilátkách, které hypersenzitivní reakce způsobují, jak se tyto reakce projevují, jak se zjišťují, vyšetřují a následně léčí.

Praktická část se pak zabývá výhradně specifickými protilátkami imunoglobulinů třídy E a metodami, pomocí nichž se tyto protilátky vyšetřují. Tyto metody jsou popsány a jejich vlastnosti rozvedeny tak, aby byly zřejmé jejich výhody a nevýhody.

Výsledky využívané pro tuto práci byly měřeny prostřednictvím výše zmíněných metod a byly na nich vyšetřovány alergeny na pyly břízy Bet v 1 a Bet v 2. Tyto informace pak byly dále využity k výpočtům sensitivity a specifity. V diskuzi se pak rozebírají údaje poskytnuté výrobcem a jejich porovnání mezi metodami navzájem. Zároveň se zde porovnávají získané výsledky s hodnotami uvedenými výrobcem.

Teoretická část

1 Obecná imunologie

Imunologie je věda, která se zabývá různými aspekty imunitního systému ve všech organismech, jak fyziologickými tak patologickými, ať už se jedná o hypofunkci nebo hypersenzibilitu. Pomocí tohoto vědního oboru zkoumáme reakce našeho organismu na cizí antigeny. Na tom, jak na tyto vnější vlivy imunitní systém zareaguje může záviset život daného jedince. Nebezpečné jsou oba extrémy – nedostatečně i přílišně reagující – imunitní odpovědi.

Hlavní funkce imunitního systému jsou 3. Schopnost bránit svůj organismus tak, aby nedošlo k jeho poškození z důvodu nenalezení, nezabránění průniku nebo nezneškodnění patogenického antigenu prostředky, které máme k dispozici. Schopnost rozeznávat vlastní tkáň a mít zakódované, že těmto tkáním nemá ublížit optimálně ani při snaze je ochránit. Pro případ, že by imunitní systém nefungoval tak, jak má, jsou některé takzvané „privilegované“ orgány před ním úplně chráněny – dojde-li k napadení organismu, k těmto tkáním se imunitní systém nedostane, aby je nemohl případně poškodit. A třetí, ale neméně důležitá funkce je interní dohled, rozpoznávání a odstraňování starých, poškozených nebo jinak změněných a dále buď nesprávně nebo úplně nefunkčních buněk. (1)

Jestliže imunitní systém funguje málo, může se jednat o imunodeficienci, což znamená, že imunitní systém nemůže dostatečně bojovat proti patogenům a nebo toho není schopen vůbec. Někdy se lidé s těmito defekty přímo narodí, čemuž se říká primární imunodeficiencie. V případě sekundární imunodeficiencie jsou tyto defekty získány v průběhu života. Z vážných onemocnění je nejznámější AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Pacienti s jakýmkoli druhem imunodeficiencie jsou mnohem více náchylní k onemocnění než zdraví jedinci. Ovšem za některých okolností je snížení funkce našeho imunitního systému přímo vyhledáváno. Takovýto případ je například hrozba rejekce transplantovaného orgánu. Při transplantaci by imunitní systém příjemce začal na darovanou tkáň reagovat jako na cizí těleso a snažil by se ho zneškodnit, proto se činnost příjemcova imunitního systému reguluje pomocí imunosupresiv, aby tělo mělo čas novou tkáň přijmout. (2) (3)

V opačném případě, kdy imunitní systém reaguje ve větším měřítku než je žádoucí, se jedná o hypersenzitivitu. Do této kategorie spadají například autoimunitní onemocnění nebo alergie. Autoimunitní onemocnění, jak už název napovídá, je patologický jev, kdy dochází k napadení vlastních tkání buňkami imunitního systému. Zde je další možnost využití imunosupresivních látek, které se při těchto problémech využívají jako léčiva, ta totiž regulují imunitní odpověď a tím snižují důsledky jejího neadekvátního zásahu. (3)

Alergie vznikly původně správnou funkcí imunitního systému. Dříve totiž reakce, kdy se imunoglobulinové protilátky třídy E tvořily a vázaly na mastocyty (žírné buňky) nebo bazofyly, sloužila k vypuzení střevních parazitů. (4) V dnešní vyspělejší době jsou už ovšem hygienické podmínky na vyšší úrovni, tedy případy napadení střevními parazity se pomalu vytrácejí a náš imunitní systém se tedy zabývá méně závažnými problémy. Začíná vnímat jako hrozbu i zdánlivě neškodné látky, jako například pylová zrna, které se pak stávají jeho novým cílem. (5)

Klíčové primární orgány imunitního systému jsou thymus a kostní dřeň a sekundární jsou lymfatické tkáně jako játra, slezina, lymfatické cévy, uzliny a další. Jestliže je to nutné, pak mohou být některé tyto tkáně chirurgicky odstraněny. Ovšem mnoho komponentů imunitního systému je buněčného původu a není spojováno s nějakým specifickým orgánem, jsou spíše umístěny nebo cirkulují v různých tkáních napříč celým tělem.

Imunita v lidském organismu má mnoho vlastností. Specifita zajišťuje vyvolání specifické odpovědi pro daný antigen. Rozmanitost umožňuje imunitnímu systému odpovídat na velké množství patogenů. Paměť vede k rozšířeným možnostem imunitní odpovědi při opakovaném vystavení stejným antigenům. Klonové rozmnožování zvyšuje počet antigenně specifických lymfocytů z relativně malého počtu naivních lymfocytů. Specializace tvoří odpovědi, které jsou optimální pro obranu proti různým typům mikrobů. (6) Vrozená a získaná složka imunitního systému poskytuje obranu proti řadě infekčních organismů lišících se ve velikosti, způsobu vstupu do těla, reprodukci, patogenitě a dalších (7)

2 Alergie

Když imunitní systém jedná s antigenem, který by za normálních okolností neměl vyhodnotit jako hrozbu, může ohrozit vlastní organismus. V takovém případě jde o hypersenzitivitu neboli přecitlivělost imunitního systému, která může být pro jedince jen nepříjemným problémem a nebo i smrtelnou závadou. Alergie jsou nejčastějším typem nesprávné funkce imunitního systému. (3)

Alergie mohou vzniknout de novo, ale většinou je-li alespoň jeden rodič na něco alergický, je tam velká šance, že potomek bude také. I když se může jednat o dědičný typ alergie, potomek nemusí být alergický na to samé, na co rodič. Dědí se totiž hypersenzitivita imunitního systému jako taková, nikoliv přecitlivělost na určitý antigen. Přestože se alergie může projevit v jakémkoli věku, obvykle jsou patrný její příznaky už v dětství. Platí zde, že jestliže jedinec zdědí možnost mít alergii, většinou se u nich projeví ten typ, jehož antigenu je daný organismus vystavován nejvíce. Zároveň je možné být alergický na více látek najednou. (8)

Alergeny mohou být ve vzduchu, inhalací se například dostane do organismu pyl, prach, plíseň, zvířecí srst nebo kůže a další. Alergeny, které mohou být přijaty do těla alimentární cestou jsou nejčastěji v jídle, hlavně ve vajíčkách, mléce, oříškách nebo v lécích podávaných perorálně, zejména penicilin. Alergeny, které se dostávají do organismu injekčně nemusí být jen léky, ale například i hmyzí jedy od včel, vos, mravenců a dalších. Někdo může být alergický i na látku, které se dotkne, čehož nejčastějším případem je latex nebo některé kovy. (8) (9)

2.1 Typy alergických reakcí

Typy alergické reakce se různí individuálně od senné rýmy přes vyrážku až po anafylaktický šok. „Za určitých okolností může imunitní reakce vyvolat více či méně závažné poškození organismu. V takových případech mluvíme o imunopatologických reakcích.“ (Hořejší, Bartůňková, Brdička, Špíšek, 2013, s.217) Tyto imunopatologické reakce lze rozdělit na 4 typy. (1) (10)

2.1.1 První typ

V prvním typu se jedná atopii, tedy o reakci, v níž jsou hlavním aktérem protilátky IgE (nebo například histamin), které se váží na některé antigeny z vnějšího prostředí jako

například pyl, roztoči, potravinové alergený etc. První setkání s alergenem vede k senzibilizaci jedince. Principem imunitní odpovědi v tomto případě je sekrece IgE protilátek plazmocyty pod vlivem Th2 cytokinů. Reakce může probíhat lokálně, což se podobá případům, kdy by se tělo snažilo vypudit parazity ze sliznice a následkem této reakce je pak alergická rýma, kopřivka nebo astma bronchiale. Další způsob postupu je systémový, kdy se dostaly antigeny do krevního oběhu senzibilizovaného jedince a to může zapříčinit anafylaktický šok. (1) (4)

2.1.2 Druhý typ

Druhý typ je zprostředkováván Imunoglobuliny třídy G a M, které mohou aktivovat komplement nebo způsobit ADCC (Antibody Dependent Cytotoxicity) reakci. Zatímco reakci prvního typu zprostředkovává vazba IgE protilátek na bazofily a mastocyty, Fc receptory pro vazbu Fc části protilátek třídy IgG mají na svém povrchu NK buňky nebo fagocyty. Při fyziologickém stavu by tato reakce sloužila k opsonizaci, neutralizaci toxinů, blokování adheze virů, případně lýze mikroorganismů. Tuto reakci můžeme pozorovat i při vybírání vhodného dárce pro transplantace, kdy se provádí testy na krevní skupinu. Tento typ reakce se konkrétně může uplatnit, jestliže nevybereme správného dárce z hlediska systému AB0, kdy dojde k lýze krevních buněk. Organismus ví, jaké má na erythrocytech antigeny (takzvané aglutinogeny) a nevytváří proti těmto konkrétním polysacharidovým antigenům IgM protilátky, zato má protilátky proti ostatním. Při podání krve s aglutinogeny, které v sobě příjemce neměl zaktivujeme komplement, protilátky proti těmto antigenům se na ně naváží a zapříčiní hemolýzu, což je život ohrožující stav. (1) (3) (4) (11)

2.1.3 Třetí typ

Principem reakce třetího typu je tvorba imunokomplexů. Funkčně jde o kombinaci typů 1 a 2, místo protilátek třídy IgE je zde ovšem hlavním činitelem IgG. Antigen s protilátkou vytvoří imunokomplex, který se pak naváže na Fc receptor fagocytů nebo aktivuje komplement, k místu reakce jsou přilákány neutrofilý a další poškození provádí aktivované mastocyty. Hlavní fyziologická funkce této reakce je stimulace akutních zánětů. (1) (4)

2.1.4 Čtvrtý typ

Čtvrtý typ je nazýván reakcí oddáleného typu a využívá mechanismu aktivace Th1, Tc a makrofágů. Za normálních okolností by docházelo k destrukci buněk infikovaných viry, patologická analogie této reakce útočí i na buňky zdravé nebo infikované relativně neškodnými viry. Výsledkem pak může být sarkoidóza, rozpadová TBC, roztroušená skleróza a jiné. (1) (4)

2.2 Alergeny

Alergen je výraz pro antigen z vnějšího prostředí, na který naše tělo reaguje pomocí protilátek. Nejčastěji se jedná o protilátky IgE, nicméně se můžeme v případě alergií setkat i s jinými isotypy imunoglobulinů, například IgG nebo IgM. Alergenů je okolo nás celá řada a stále se objevují nové druhy. (8) (9) (12)

2.2.1. Nomenklatura

Pro zpřehlednění seznamu alergenů při dohledávání jistého alergenů nebo zadávání nového se používá nomenklatura podle organizace WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. Při zadávání alergenů do databáze použijeme 3 – 4 písmena z rodu (z latinského názvu alergenů), následovaná 1 – 2 písmeny z druhu. Číslo tvoří číslo alergenů, 1 – 2 čísla isoalergenů a 1 – 2 variantní čísla. K dohledání alergenů se používá zkrácená verze, zahrnující pouze první 3 parametry. Výsledek je tedy například Bet v 1, kde Bet (z latinského Betula) v (z latinského Verrucosa) 1 (pořadové číslo). (13)

2.2.2 Potravinové alergen

Jedny z nejčastějších alergenů jsou právě ty, které přijímáme alimentární cestou. Jedná se o alergen obsažené v potravinách. Reakce na potravinové alergen se významně liší u různých jedinců, ale i u konkrétních alergenů. Významnou roli při projevu reakce našeho imunitního systému s alergenem je zároveň jeho zpracování. Například jedinec hypersenzitivní na ořechy může mít prudkou a intenzivní reakci při konzumaci jejich neupravené formy, ale při například tepelném zpracování se alergická reakce dostavit nemusí. (12)

Mezi nejznámější potravinové alergen radíme ořechy, arašídy, zrna (slunečnicová nebo sezamová semena, oves, pšenice, žito,...) a mandle, bílkoviny obsažené v mléce

a jeho produktech, potravinové přísady jako konzervanty nebo barviva, koření, ovoce a zelenina (citrusy, mrkev, jablka,...), lepek (Celiakie) a mnoho dalších. (12)

2.2.3 Respiračně přijímané alergeny

Alergeny, které se do organismu dostanou vdechnutím patří také mezi rozšířenější, ale hlavně se jim mnohem hůře vyhýbá na rozdíl například od potravinových alergenů, kde se jen vyvarujeme určité složky potravy. Nejčastějšími alergeny v tomto případě jsou prach (části těl mrtvých roztočů nebo jejich trus), zvířecí chlupy, kousky kůže nebo peří, plísně, kosmetické přípravky, pylová zrna, dezinfekční prostředky, průmyslové emise a další. (12)

2.2.4 Injekčně přijímané alergeny

V tomto případě se musí alergen dostat do krevního oběhu překonáním kožní bariéry, tedy vpichem. Ať už se jedná o injekční jehlu nebo o hmyzí žihadlo, k alergické reakci dojde i při velmi malém množství alergenu – v řádech miligramů.

2.2.4.1 Alergeny v lécích

Stejně jako v potravě se může vyskytovat složka, která vyprovokuje imunitní systém k přehnané reakci, tak totéž může nastat i chemofarmak. U většiny medikamentů je vypsáno velké množství zjištěných nežádoucích účinků a stále je jistá pravděpodobnost, že se objeví nějaké nové. Další nepříjemný fakt je, že lidský organismus není schopen odbourat všechny složky léčiv, hlavně složité umělé chemické sloučeniny, stejně jako například těžké kovy. Malé množství tedy zůstane těle a ukládá se do kostí, svalů nebo orgánů – především vylučovacích. (12) (14)

Řadí se sem například antibiotika, protizánětlivé medikamenty, kdy se před podáním konkrétní léčivé dávky podá nejprve senzibilizační dávka, tedy organismus se vystaví působení antigenu v kontrolované míře a samozřejmě pod dohledem, ale také sem patří například lokální anestetika nebo kontrastní látky pro röntgenové vyšetření, u kterých se tato senzibilizace neprovádí. Pravděpodobnost možných komplikací roste s průkazem různých rizikových faktorů jako například věk, pohlaví nebo genetické faktory. Organismus ovšem nemusí nutně reagovat pouze na účinnou látku, ale například na konzervační medium, vehikulum nebo barvivo. (14)

2.2.4.2 Zvířecí jedy

Nejčastěji se jedná o jedy mravenců, včel, vos nebo sršní. Nejčastějšími složkami hmyzího jedu, které mohou vyvolat alergickou reakci jsou například hyaluronidáza, fosfolipidáza nebo kyselá fosfatáza a toxická reakce se zakládá na přímém účinku některé z těchto složek. (14)

2.2.5 Kožní alergen

Alergické reakce při styku nějaké látky s kůží nejsou nejčastější, ale rozhodně by se na ně nemělo zapomínat. Mezi nejznámější látky, které tyto komplikace mohou vyvolat patří latex. V tomto případě může nastat problém obzvláště při operačních zákrocích, latex je totiž látka, z níž se vyrábí rukavice do nemocnic. Je velice důležité upozornit na jakékoliv alergie před zásahem do organismu ať už v podobě léků nebo právě operačním výkonem a v tomto případě se nejedná o výjimku. S tímto alergenem se ovšem nesetkáme pouze v nemocnicích. Mnoho lidí má své vlastní gumové rukavice doma a používá je například při úklidu. Do styku s latexem může jedinec přijít i při kontaktu s balónky, gumou na gumování, gumičkami nebo některými hračkami. Dalším příkladem látky hyperreagující s kůží mohou být nějaké kovy, například stříbro. (8)

2.3 Příznaky

Symptomy při expozici alergenu jsou různé, od lehkých po život ohrožující stavy. Při alergické reakci mohou být postiženy různé oblasti organismu. Nejčastějšími obtížemi jsou různé vyrážky, dýchací problémy, otoky, průjmy, rýma a další. (15)

2.3.1 Kůže

Alergická reakce, která se projevuje na kůži se často vyznačuje abnormálním zarudnutím postižené oblasti, makulopapulózní až hnisavé vyrážky často ve spojení s atopickou dermatitidou, návaly horka a otoky. Reakce se může objevit řádově v minutách až hodinách po expozici alergenu. Různé alergie mohou být doprovázeny různými projevy – například akutní urtikárie se objevuje nejčastěji u potravinových alergií, zatímco chronická kopřivka se u potravinových alergií nevyskytuje prakticky vůbec. (12) (14) (16)

2.3.1.1 Ekzém

Ohledně alergií můžeme narazit na dva druhy ekzému: kontaktní a atopický.

Kontaktní ekzém, jak již z názvu vyplývá, je dán stykem s alergizující noxou. Jedná se o lokální alergickou reakci, tedy ekzém nastane jen v místě, kde došlo ke kontaktu s alergenem a blízkém okolí. Nejčastějšími látkami vyvolávající tento druh ekzému jsou určité kovy (například nikl), parfémy, některé rostliny, latex a další. (14)

Atopický ekzém je verze chronické dermatitidy postihující nejčastěji obličej a krk, loketní a zákolenní jamky, trup, ale i kterákoli další místa na kůži. Toto zánětlivé kožní onemocnění se projevuje především sníženým prahem pro svědění, což vyvolává zejména histamin, ale může se zhoršit při stafylokokové kožní infekci, zvýšeném stresu, častém mytí a dalšími iritanty. V postižené oblasti je kůže zarudlá, občas s pupínky a puchýřky, z nichž může vytékat hnis. (12) (14)

2.3.1.2 Otoky

Otoky se mohou vyskytovat buď v podkoží, jak je tomu v případě angioedému nebo v kůži, což je při kopřivce.

Angioneurotický otok neboli angioedém vzniká lokální vazodilatací a zvýšenou cévní permeabilitou a projevuje se brněním nebo svěděním v postižené oblasti. V nadpoloviční většině případů je angioedém idiopatický, tedy není známa jeho příčina. Často je ovšem spojován právě s alergií, vyskytují se ovšem i jiné druhy angioedému, například hereditární (jehož podkladem je deficience C1 inhibitoru), získaný, tlakový nebo lékový a další. (14)

Urtikárie, tedy kopřivka, je obdobou angioedému s tím rozdílem, že otok, který vzniká ze stejných důvodů, se nachází v kůži. Urtikárie se vyskytuje u mnoha pacientů současně s angioedémem. Kopřivka může být chronická, tedy zmizí až například po měsíci, nebo akutní. (14)

2.3.2 Dýchací cesty

V dýchacích cestách se může objevovat také angioedém, ale specifická onemocnění pro respirační trakt jsou asthma nebo různé druhy rýmy.

Asthma bronchiale je zánětlivé onemocnění až případný kolaps průdušek a průdušinek. Jedná se o reverzibilní obstrukci dýchacích cest, která může být zapříčiněna například křečí dýchacích svalů. Při chronickém asthmatu může dojít k strukturálnímu zúžení průsvitu dýchacích cest. Hlavními příznaky doprovázejícími asthma je expirační

dušnost, sípání, nedostatečnost dechu, kašel a další a může vést ke tkáňové hypoxii, která se projeví zmodráním rtů. (12) (14) (17)

Rinitida je střídání nosní sekrece vodnatého charakteru s blokádou, kýcháním a svěděním v dutině nosní a často ústí až do asthmatu. Rinitida může být buď celoroční reakcí například na zvířecí srst nebo roztoče nebo sezonní, jejímž příkladem je senná rýma s původem v pylu nebo plísních. (8) (9) (14)

2.3.3 Ostatní oblasti

Alergie se neprojevují jen na kůži nebo v dýchacím ústrojí. Časté doprovodné projevy mohou být v trávicím ústrojí (stomatitida, ezofagitida, gastritida, enetritida, kolitida, cholecystitida, pankreatitida, časté průjmy a další), v oblasti očí (konjunktivitida, zánět slzných kanálků, otoky víček a jiné), v oblasti uší (zánět zevního zvukovodu, zánět středního ucha, hučení v uších, nedoslýchavost, závratě a další). (12) (14)

2.3.4 Anafylaxe

Velmi závažná alergická reakce, která se projevuje jakýmkoli příznakem (kožní, respirační, kardiovaskulární a další), je vyvolaná jakýmkoli alergenem (potravinou, lékem, hmyzím jedem, alergenem napadajícím respirační trakt a dalšími), ale působí v mnohem větší míře než běžná alergická reakce. Způsob podání a délka expozice alergenu má velký vliv na vývoj reakce – parenterální podání má za následek zvýšené riziko a rychlý nástup anafylaktické reakce. (14) (18)

2.4 Genetické predispozice

Bez genetické zátěže má jedinec šanci přibližně 1 : 5 získat alergii de novo, tato pravděpodobnost se přibližně zdvojnásobuje, je-li alespoň jeden z rodičů alergik, jedná-li se o matku, je tato pravděpodobnost vyšší a pokud jsou oba rodiče postiženi alergií, pak je pravděpodobnost, že potomek bude trpět alergií skoro 80%. Ovšem dědí se pouze dispozice, že bude jedinec alergik, nedědí se, na který alergen bude citlivý. V dnešní době je ovšem často zastáváno tvrzení, že faktory vnějšího prostředí mají větší vliv na riziko vzniku a průběh alergického onemocnění. (19)

2.5 Léčba

Prvním krokem k léčbě alergie je diagnóza, jejíž první a zároveň nejdůležitější složkou je rodinná a osobní anamnéza. Nedílnou součástí diagnostického postupu jsou různé provokační testy a celková i specifická vyšetření. Samotná terapie pak může probíhat různě. Jeden způsob je například nefarmakologická léčba, tedy léčba, k jejímuž průběhu nejsou zapotřebí farmaka a jedná se většinou o vyhýbání se alergenům, klidový režim nebo pobyt v lázních a jiné. Další možný léčebný postup je systémová nebo lokální farmakologická léčba, kde jak již z názvu vyplývá jde o terapii za pomoci medikamentů. Třetí možnost postupu je alergenová imunoterapie, která je zaměřena přímo na příčinu onemocnění. Jejím principem je podávání alergenu a postupné zvyšování jeho dávky a tedy snížení výraznosti příznaků. (14)

2.5.1. První pomoc

Alergici s častým špatným průběhem reakce, by na další možný nástup takového případu měli být připraveni. Jako první pomoc se doporučuje prednison, antihistaminikum, adrenalin v autoinjektoru nebo SABA (= rychle působící β_2 mimetika). (14)

2.5.2 Testy

U alergologa mohou být provedena různá vyšetření nebo provokační testy, pro které je vždy potřeba informovaný souhlas pacienta. Například na alergeny přijímané alimentární cestou se dá pacientovi vypít roztok zhotovený z látky obsahující alergen, na který je podezření. Nazální testy jsou obdobou orálních s tím rozdílem, že roztok je v podobě spreje podán do nostril. Na rozpoznání alergenu, který reaguje při dotyku se používají kožní testy, například Prick test, při němž se jednotlivé alergeny nanese na hřbet ruky a vytvořenou kapkou se provede vpich do kůže nebo Scratch test, kdy se udělají drobné škrábance do horní části zad nebo na vnitřní část předloktí a do nich se kápne alergen. Lékař má při sobě vždy injekci s epinephrinem pro případné zvrácení alergické reakce. (8) (14)

2.5.3 Symptomatická léčba

Nejlepší léčbou alergie je samozřejmě snížit expozici alergenům na minimum, což nejde vždy. Lékař tedy může nakázat léčbu podle toho, jaký alergen způsobuje reakci a jak silná je. Většinou se předepisují antihistaminika nebo kortikosteroidy a když by došlo

k alergické reakci, je dobré mít po ruce adrenalin. Další možností jsou bronchodilatancia, tedy farmaka působící na průdušky, konkrétně rozšířením jejich průsvitu a jejich přidáním ke kortikoterapii se sníží dávkování kortikoidů. (8) (12) (14)

2.5.4 Příčinná léčba

Alergenová imunoterapie je druh léčby, kdy se pacientovi podává jeho alergen v malých, postupně se však zvyšujících dávkách. Tato imunoterapie pracuje na principu tvorby IgG protilátek blokujičích IgE protilátky, což zapříčiní, že se alergen nespojí s IgE protilátkou. IgE nasednou na mastocyty a bazofily, ale protože na sobě nemají antigen, tak je neaktivují a ty tedy nevyprodukují histamin ani jiné chemické mediátory zapříčiňující symptomy alergické reakce. (8) (14)

3 Protilátky

3.1 Obecná charakteristika

Protilátky jsou rozpustné imunoglobuliny krevní plazmy. Jak z názvu vyplývá, jedná se o globuliny, což znamená, že jsou smotané a jejich struktura se jeví být kulovitá, proto se mohou tedy nazývat i „sferoproteiny“ a kromě imunoglobulinů mají tuto globulární konformaci například enzymy. Druhým možným uspořádáním jsou fibrilární bílkoviny nebo také „skleroproteiny“, například keratin nebo kolagen. (20)

Struktura protilátek sestává z H řetězců, kde H je převzato z anglického „heavy“ a označuje tedy těžký řetězec, a L (z anglického „light“), lehkých řetězců, které jsou kovalentně propojeny disulfidickými můstky. Zatímco lehké řetězce se dále dělí už jen na κ („kappa“) a λ („labda“), těžké řetězce nesou označení každý podle třídy protilátky, které náleží, tedy α („alpha“) pro IgA, δ („delta“) pro IgD, ϵ („éta“) pro IgE, γ („gamma“) pro IgG a μ („mí“) pro IgM.

Další dělení protilátek je na monoklonální, které jsou monospecifické a tedy rozpoznají a váží se pouze s jedním epitopem antigenu, zatímco polyklonální jsou namířeny proti více epitopům. (20)

3.1.1 Třídy imunoglobulinů

Imunoglobuliny jsou řazeny do specifické části humorální složky imunitního systému a dělí se do pěti tříd: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. (18)

3.1.1.1 Imunoglobuliny třídy A

IgA má formu dimeru a můžeme ho najít například v slzách, slinách, mateřském mléce, v séru, kde se jeho koncentrace pohybuje mezi 0,9 – 3,5 g/l, ale často se též bere v potaz kvůli svému výskytu na povrchu sliznic. Představuje tedy první linii v obraně proti vdechnutým nebo alimentární cestou přijatých patogenů, v séru pak působí na druhém místě v případě, že patogeny prošly slizničním povrchem. Kromě ochrany sliznic má také funkci opsonizace. U člověka (a některých dalších savců – hlavně primátů) má IgA 2 podtřídy – IgA1 a IgA2. Tyto podtřídy jsou si značně podobné, hlavně proto, že vznikly duplikací genu pro tvorbu IgA – C α , liší se například v závěsu v oblasti mezi Fc fragmentem a Fab rameny – IgA1 má tento závěs značně prodloužený díky vložení duplikovaných úseků aminokyselin, což chybí u IgA2. Přestože dlouhý závěs aminokyselin u IgA1 je výhodou při rozpoznávání antigenů, zároveň je náchylnější k proteolýze, nemluvě o tom, že mnohé patogeny mají vyvinuté enzymy, které tyto aminokyselinové závěsy rozštěpí. Tyto IgA1 proteázy kompromitují funkci IgA a tedy zjednodušují průchod patogenů přes slizniční stěnu. Biologický poločas imunoglobulinů třídy A se pohybuje okolo 6 dnů. Při selektivním deficitu IgA je značně zvýšený počet B lymfocytů produkujících IgD v respirační sliznici. (18) (21) (22) (23)

3.1.1.2 Imunoglobuliny třídy D

IgD se nachází ve formě monomeru v séru v koncentraci přibližně 0,1 g/l, přednostně na lymfocytech B, kde má funkci receptoru pro antigeny a má biologický poločas přibližně 3 dny. Od objevení IgD je důvod, proč je vylučován zralými B lymfocyty neznámý. Tím, že jsou spojovány s různými BAP (z anglického B cell receptor-associated proteins – bílkoviny spojené s receptory B lymfocytů) jim je přiřazována funkce převádění různých, například apoptotických, signálů. Další funkcí vylučovaného IgD je obohacování slizniční imunity, což potvrzuje nadbytek B lymfocytů bez IgM, ale s IgD ve sliznici horních cest dýchacích a fakt, že vylučované IgD váže faktory virulence mikrobů stejně jako patogenní bakterie a viry napadající respirační trakt. Zvýšený počet B lymfocytů vylučujících IgD je patrný například při nedostatečném množství IgA v sliznici dýchacího

ústrojí. IgD jsou schopné vázat se na T lymfocyty, basofily, mastocyty (žírné buňky) a v menší míře i na monocyty, neutrofile a myeloidní dendritické buňky přes receptory odlišné od receptorů jiných tříd imunoglobulinů. Spojení IgD vyvolá u basofilů produkci imunoaktivačních cytokinů (například IL-4, IL-13, BAFF), prozánětlivých cytokinů (například TNF, IL-1 β) a chemokiny (například IL-8). Při zvýšeném množství IgM⁻IgD⁺ B lymfocytů dochází například k Hyper-IgD syndromu (HIDS), který se projevuje periodickými horečkami, systemickými na antibiotika rezistentními záněty, zvýšeným sérovým IgD a abnormálně aktivovanými makrofágy. Další možnou patologickou reakcí je Periodic fever-aphthous stomatitis-pharyngitis-adenitis (PFAPA) syndrom, který je také poruchou vyvolávající časté horečky a aseptické slizniční záněty, ale na rozdíl od HIDS, jehož vznik zapříčiňuje delecční substituce MvK (z anglického Mevalonate kinase), je patogeneze PFAPA syndromu neznámá – není jisté, jestli je neregulovaná produkce IgD příčina PFAPA syndromu nebo efekt prozánětlivé reakce. (18) (23)

3.1.1.3 Imunoglobuliny třídy E

IgE monomery měly dříve funkci obrany proti parazitům a v dnešní době, kdy už jsou parazitární intoxikace méně častou záležitostí, jsou tyto protilátky odpovědné za alergické reakce, konkrétně imunopatologické reakce I. typu. Můžeme je najít v intersticiální tekutině nebo v séru, kde je jeho fyziologická koncentrace nejnižší – 3×10^{-4} g/l a biologický poločas má z ostatních tříd také nejnižší, totiž 2 dny.

3.1.1.3.1 Specifické IgE

Mnohé alergie jsou zprostředkovávány imunoglobuliny třídy IgE. U senzibilizovaných jedinců trpících atopickým nebo anafylaktickým typem alergie jsou IgE molekuly jednotky kontaktu mezi alergenem a specializovanou buňkou, která následně vylučuje histamin a další látky z důvodu expozice alergenu, což zapříčiňuje zahájení alergické reakce. (26)

IgE protilátky jsou produkovány lymfocyty B, ale i u vysoce alergických jedinců je počet B lymfocytů produkujících IgE protilátky velmi nízký. Specifické IgE se dají získat buď izolací od zvířat nebo alergen-specifických protilátek odvozených u jiných lidských isotypů. Poprvé byla vyvinuta úspěšná technologie pro produkci monoklonálních protilátek v roce 1970 a byla založena na slučování plazmatických buněk vylučujících protilátky

s nesmrtelnými neoplastickými plazmatickými buněčnými liniemi, což poskytlo první možnost tvorby monoklonálních protilátek, u nichž byla známa specifita. (27)

Chceme-li získat monoklonální IgE protilátky, dosáhneme toho hybridomovou technikou, která využívá maligní B lymfocyty. Zároveň se zde využívá virus Epstein-Barrové, který zajišťuje vzniklým buňkám nesmrtelnost, i přesto ovšem je složité izolovat buňky produkující IgE protilátky, a proto se užívá „Phage display technology“, tedy zobrazovací metoda, kde se využívá bakteriofágů, tedy virů, kteří napadají bakterie, k propojení proteinu a genetické informace, která ho kóduje. Tedy do genu, který je zodpovědný za tvorbu kapsidu bakteriofágu se vloží gen, který kóduje protein, který chceme získat, což má za následek, že ho daný bakteriofág vystaví na svém povrchu, výsledkem čehož je propojení genotypu a fenotypu, což se dá využít dále jako screeningová metoda, která detekuje interakci mezi vystaveným proteinem a jiným proteinem, případně peptidem nebo DNA. Každopádně tyto metody byly rozvinuty a implementovány v průběhu posledních dvou dekad pro izolaci antigen-specifických protilátek pro více cílových objektů s vysokou účinností. Až po dalších přibližně 15 letech se tato technologie využila k izolaci alergen-specifických vazebných buňek odvozených od IgE, kde se využívá rozmanitosti H řetězců B lymfocytů produkujících IgE protilátky. (27) (28)

3.1.1.4 Imunoglobuliny třídy G

IgG protilátky mají podobu monomeru. Odpovědi zprostředkovávané pomocí IgG se různí v závislosti na typu sekundárních imunitních odpovědí, což ve výsledku znamená, že závisí na typu antigenu. To vede imunitní odpověď ke specifické IgG podtřídě - tedy IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4, kde uvedená čísla označují počet disulfidických můstků spojujících těžké řetězce. Můžeme je najít v intersticiální tekutině nebo v séru, kde mají ze všech 5 isotypů imunoglobulinů největší fyziologickou koncentraci – 8 – 18 g/l a také nejdelší biologický poločas – 21 dnů. Imunoglobuliny třídy G mají opsonizační funkci nebo se uplatňují při přestupu placentou (za což jsou odpovědné Fc oblasti, které mimo jiné obsahují vazebné epitopy pro novorozenecké FcRn, tedy neonatální Fc receptory). FcRn receptory jsou ovšem exprimovány i myeloidními buňkami, kde se podílí jak na fagocytóze tak na antigenní prezentaci spolu s klasickými Fcγ receptory a komplementem. Účastní se humorálních imunopatologických reakcí II. typu. Schopnost

spouštění Fc γ R (IgG-Fc receptor) exprimujících buněk se uplatňuje při fagocytóze nebo ADCC (což je na protilátkách závislá buňkami zprostředkovávaná cytotoxická reakce) a aktivování komplementu. (18) (24)

3.1.1.5 Imunoglobuliny třídy M

Imunoglobuliny třídy M mohou být nalezeny buď ve formě monomeru například na B lymfocytech jako BCR (receptory B lymfocytů) nebo tvoří pentamery. Najdeme je v séru v koncentraci přibližně 0,9 – 2,5 g/l. Jejich biologický poločas činí 6 dní a spolu s IgG se účastní humorálních imunopatologických reakcí II. typu. IgM protilátky mají funkci ochranného faktoru při zánětlivých nebo autoimunních onemocnění, jsou zároveň odpovědné za cytolytické reakce a aglutinace, kde díky struktuře pentameru mohou IgM vytvořit spoj mezi molekulami příliš vzdálenými než aby mohly být spojeny IgG protilátkami. Zvýšené hodnoty IgM v krvi mohou značit probíhající infekci nebo expozici antigenu. IgM protilátky mají také tu vlastnost, že pomáhají fagocytujícím makrofágům zbavovat se umírajících nebo mrtvých buněk (18) (25)

Praktická část

4 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je porovnat jednotlivé metody Immulite, ImmunoCAP a ImmunoCAP ISAC z hlediska jejich jednotlivých vlastností a konkrétních faktorů jako jsou vyšetřované alergeny, senzitivita a specifita, počet vyšetření, doba trvání metody, objemy jednotlivých složek etc.

4.1 Metodika

K vypracování této bakalářské práce byly využity informace z Ústavu Imunologie a Alergologie FN Plzeň, získané měřením alergenů Bet v 1 a Bet v 2 pomocí Immulite 2000, ImmunoCAP 250 a ImmunoCAP ISAC. Pro jednotlivé výpočty byl použit soubor 49 vzorků, kde všechny tyto byly vyšetřeny na výše zmíněné alergeny všemi třemi uvedenými metodami. Výsledky těchto vyšetření byly porovnány s údaji poskytnutými výrobcem a mezi sebou navzájem a z takto získaných informací byly získány výstupy, které jsou dále uvedeny.

4.2 Výzkumné otázky

Tato práce je zaměřena hlavně na metody vyšetřující specifické IgE, konkrétně jejich porovnání v určitých oblastech.

Výzkumná otázka č.1: V jakých oblastech je která metoda výhodnější, porovnáme-li jejich vlastnosti a výsledky mezi sebou?

Výzkumná otázka č. 2: Jaké jsou rozdíly mezi zde provedenými výpočty a výrobcem uvedenými informacemi?

5 Metody

Vyšetřujících metod existuje celá řada a jsou založeny na různých podstatách. Tato práce ovšem pojednává o Immulite, ImmunoCAP a ISAC, tedy budou následovat jen metody, na jejichž základě pracují.

První zmíněný je ImmunoCAP, který pracuje na principu fluorescence, což je vlastně druh fotoluminiscenčního záření a může být zapříčiněno dopadem jiného záření nebo částic. Fluorescence je velice subjektivní metoda, protože je to odečítající zdravotnický pracovník, který hodnotí vycházející fluorescenční signál. Nevýhoda metod využívajících právě fluorescenci spočívá kromě její subjektivity také v tom, že s narůstající dobou odečítání se zkoumaný materiál „vysvítí“, tedy fluorescenční signály po relativně krátkém čase ztrácí svoji intenzitu. (4) (29)

Na bázi chemiluminiscence je založen Immulite. Tento jev nastává, vzniká-li látka s excitovaným elektronem v chemické reakci, tyto látky se pak snaží dostat zpět do stabilního stavu a při této snaze dochází k uvolňování světelného signálu. (4)

Příkladem biočipu nebo též microarrayového testu je ImmunoCAP ISAC. Čip má podobu malé destičky, obvykle velikostně srovnatelné s rozměry podložního mikroskopického sklíčka. Na čipu jsou umístěna jednotlivá pole, kde každé pole slouží pro jeden vzorek a musí být dbáno na to, aby se vzorky mezi jednotlivými poli nepomíchaly, u ImmunoCAP ISAC jsou na jednom čipu 4 pole. Na pole se nanese vzorek, provede se daná metoda, která je popsána níže a odečítá se často pod mikroskopem, dle se hodnotí například buňky vydávající fluorescenční signál. (30)

5.1 ImmunoCAP 250

Laboratorní testy ImmunoCAP probíhají na plně automatizovaných laboratorních systémech a jsou navrženy tak, aby podávaly přesné a reprodukovatelné výsledky pro zvýšení operační účinnosti a zkrácení prodlení. ImmunoCAP je vysoce preferovaná technologie, která je obecně známa jako zlatý standard. Je navržena jako sendvičové assaye, tedy že pevná fáze zajišťuje navázání všech ovšem pouze relevantních protilátek. Toho je docíleno prostřednictvím extrémní vazebné kapacity v kombinaci s optimálním množstvím celulózy v každé ampulce. Pevná fáze spojená se standardizovaným materiálovým zdrojem alergenu, komponentami rekombinantních alergenů a relevantních markerů zajišťují nesrovnatelné klinické hodnoty díky vysokému výkonu a spolehlivým výsledkům.

K umožnění tak jednoduché a rozsáhlé diagnostiky jak je jen možné byl navržen velký výběr assayí na alergie a astma. Tyto assaye zahrnují testy, které pokrývají mnoho

kategorií jako například pyly stromů a trav, mikroorganismy, roztoče, zvířecí srsti, hmyz, jedy a další. Imunodiagnostika zároveň nabízí assaye pro ohodnocení více než 20 nemocí vázaných s autoimunitní reakcí. (31)

5.1.1 Postup

Pro vyšetření je vhodné sérum nebo plasma v heparinu nebo EDTA z kapilární nebo venózní krve odebrané běžným postupem a uchovávané při pokojové teplotě, vzorek lze při teplotě 2 – 8°C skladovat až týden a pro delší uchování je možné vzorek skladovat při teplotě -20°C, ale měli bychom se snažit vyhnout opakovanému zmrazování.

Technologie je založena na vysoké celkové vazebné kapacitě dosažené prostřednictvím vysoké vazebné kapacitě na mg celulózy v kombinaci s optimálním množstvím celulózy v každé pevné fázi. Toto zajišťuje navázání všech relevantních protilátek.

Alergen, alergenová komponenta nebo vyvážená směs relevantních inhalačních alergenů kovalentně navázaných na pevnou fázi reaguje se specifickými IgE obsaženými ve vzorku patientského séra. Po promytí nespecifických IgE jsou přidány enzymaticky značené protilátky proti IgE, aby utvořily komplex. Po inkubaci jsou nenavázané enzymaticky značené anti-IgE odmyty a vazebný komplex je pak inkubován s rozvíjejícím činidlem. Po zastavení reakce se měří fluorescence eluátu. Čím vyšší fluorescence je, tím více specifických IgE je přítomno ve vzorku. (32)

5.2 Immulite 2000

Immulite 2000 3gAllergy TM Specific IgE je semi-kvantitativní dvoukroková chemiluminiscenční immunoassay prováděná na pevné fázi, která využívá kinetiky kapalně fáze v kuličkovém formátu. Toto reprezentuje významný pokrok nad konvenční metody spoléhající na alergeny navázané na pevném nosiči, například na papíře. Pevná fáze (kuličky) je pokryta anti-ligandem. Kapalná fáze sestává z alkalické fosfatázy, která se získává z telecích střev, konjugovaná s monoklonální myší protilátkou proti lidskému IgE v lidské nebo i nelidské sérové pufrové matrix. Individuální ligandy značené alergeny a panely v kapalně fázi nejsou dodávány spolu s ostatními reagenciemi, jsou ovšem požadovány pro správný průběh.

V prvním cyklu jsou patientský vzorek a ligandem značený alergen inkubovány spolu s potaženými kuličkami po dobu 30 minut. V průběhu této doby se IgE ve vzorku váže k ligandem značenému alergenu, který se posléze váže na anti-ligandy na kuličkách. Nenavázaný vzorek je poté odstraněn pomocí centrifugací a promytím.

V druhém cyklu je přidána do původní reakce enzymem konjugovaná monoklonální myší protilátka proti lidskému IgE na dalších 30 minut inkubace. Tato monoklonální myší protilátka proti lidskému IgE konjugovaná s enzymem se váže na imobilizované IgE. Nenavázaný enzymový konjugát je odstraněn opět centrifugací a promytím.

Nakonec je do reakce přidán chemiluminiscenční substrát a je generován signál v poměru k vázanému enzymu. (26)

5.2.1 Postup

Pro optimální výkon je důležité vykonat všechny rutiiní operace ohledně údržby, které jsou uvedeny v pracovní příručce, tedy přípravu, nastavení, seřízení, assaye a kvalitu kontrolující činnosti.

Vše začíná vložením alergenu, což se provede tím, že zvolíme prostřednictvím software volnou pozici v reagentovém karoselu. Nahradíme víčka zkumavek uzávěry vhodnými k vyšetření. Dále se vloží do přístroje zkumavky obsahující Immulite 2000 specifické alergenové panely, specifické IgE regulující protilátky a specifické IgE kontrolní protilátky tak, aby čárové kódy jednotlivých zkumavek byly v mezerách držáků, aby bylo možné je pomocí čtečky načíst do počítače. Až dokončíme scannování kódů na zkumavkách, vložíme držák se zkumavkami do reagenčního karoselu a takto se postupuje i s ostatními stojánky se zkumavkami. Prostřednictvím čárových kódů na zkumavkách si počítač spojí danou zkumavku s vyšetřením, které je požadováno.

Pozitivní výsledek indikuje, že protilátky k jednomu nebo více alergenům obsaženým v panelu jsou přítomny ve vzorku patientského séra. K identifikaci konkrétního alergenově specifického IgE by měl být vzorek testován s jednotlivými alergeny korespondujícími ke komponentám panelu. (26)

5.3 ImmunoCAP ISAC

ImmunoCAP ISAC je semikvantitativní in vitro imunoassay na pevné fázi ve formě bio čipu, kde se stanovují specifické IgE protilátky v lidském séru nebo plazmě.

Alergenové komponenty, které jsou upevněny na pevný substrát v mikroarrayovém formátu reagují se specifickými IgE protilátkami v patientském vzorku. Po odmytí nespecifických IgE protilátek je přidána fluorescenčně značená protilátka proti lidským IgE a vznikne komplex. Po inkubaci nenavázané fluorescenčně značené protilátky proti lidským IgE jsou opět odstraněny promytím. Tato procedura je následována fluorescenčním měřením za použití vhodného scanneru pro microarraye. Čím vyšší je odpovědná hodnota, tím více specifických IgE je přítomno ve vzorku. Výsledky testu jsou analyzovány pomocí MIA (=Microarray Image Analysis) software a standardizované jednotky pro specifické IgE jsou vypočítávány. ImmunoCAP ISAC slouží pouze pro výzkumné účely, nikoliv pro diagnostická vyšetření. (33) (34)

5.3.1 Postup

Může být použito sérum nebo plazma v heparinu z kapilární nebo venózní krve. Hemolýza neinterferuje s assayí. Krev se odebírá standardním postupem, skladuje se při pokojové teplotě maximálně 5 dní, při teplotě 2 – 8°C mohou být vzorky uchovány až týden a pokud je nutné zachovat vzorky déle než týden, je možné je skladovat v mrazáku při -20°C, ale je důležité pokud možno se vyhnout opakovanému zmrazování a při rozmrazování bychom se měli ujistit, že je vzorek homogenní a než bude použit k vyšetření měl by mít opět pokojovou teplotu.

Detekční IgE protilátka je připravena k použití, je ovšem nutné ji chránit před světlem a vyhnout se zmrazování a než se použije k vyšetření, musí rovněž dosáhnout pokojové teploty. Kontrolní specifické IgE je také ihned připraveno k použití a může být měřeno jako patientský vzorek a to při otevření nové soupravy nebo jednou měsíčně, protože je potřeba vytvořit novou kalibrační křivku. I tento kontrolní vzorek musí mít před použitím pokojovou teplotu.

Před vyšetřením čipy promyjeme přesným postupem uvedeným v příručce. Přibližně 15 minut po omytí čipů a odložení na suchou papírovou utěrku můžeme pokračovat přidáním vzorku a inkubací. Připravené čipy vložíme do vlhké komůrky reakčními stranami směrem vzhůru. Vlhkou komůrku připravíme tak, že nepoužitou papírovou utěrku umístíme do vlhké komůrky a napustíme ji destilovanou vodou, aby byla dostatečně vlhká, a nebudeme-li vlhkou komůrku ihned používat, uzavřeme ji, čímž zabráníme nechtěnému odpařování. Na reakční stranu čipu napipetujeme 30μl vzorku, přičemž na každém čipu jsou 4 reakční pole a při nanesení vzorku se musíme ujistit, že je

vzorek pouze v určeném reakčním poli a pokrývá ho celé a pokud možno se snažíme vyknout kontaktu pipety a reakčního pole. Opatrně uzavřeme vlhkou komůrku tak, abychom omylem nesmíchali vzorky a inkubujeme 120 minut. Poté vyjmeme čipy z vlhké komůrky opět opatrně, abychom zamezili smíchání vzorků, vzorky omyjeme pod tekoucí destilovanou vodou 5 – 10 sekund, přičemž čip držíme delší stranou směrem dolů opět proto, abychom zamezili smíchání vzorků a opakujeme mytí a osušení jako na začátku.

Suché čipy opět umístěné do vlhké komůrky jsou nyní připravené k inkubaci s roztokem detekční IgE protilátky. Napipetujeme 30 μ l roztoku detekční IgE protilátky na každé reakční pole čipu, uzavřeme vlhkou komůrku a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě a chráněné před světlem například překrytím komůrky hliníkovou folií. Po uplynutí inkubační doby vyjmeme čipy z vlhké komůrky a smyjeme roztok detekčních IgE protilátek držením čipu jeho delší stranou dolů pod tekoucí destilovanou vodou po dobu 5 – 10 sekund. Opět omyjeme a osušíme čipy jako na začátku a poté jsou připraveny k odečítání. Pro pozdější odečtení je možné čipy skladovat na suchém a temném místě až jeden týden. (33)

6 Faktory

Faktory, podle kterých se dají jednotlivé metody porovnávat jsou různé. Můžeme hledět na metody z pohledu zjišťování výsledků a tedy, jedná-li se o vyšetření kvalitativní, kvantitativní nebo semikvantitativní, přičemž se můžeme setkat například s kombinací kvalitativní a kvantitativní metody a jedná se tedy o metodu smíšenou. Dalším možným úhlem pohledu při porovnávání metod je, jak se metoda provádí, například zda je chemiluminiscenční nebo fluorescenční etc. Dále je možné dívat se na to, co metoda vyšetřuje, v tomto případě na druhy alergenů. Často zmiňovaným faktorem bývá senzitivita a specifita jednotlivých metod, jejich spolehlivost a tedy i reprodukovatelnost. Snad nejdůležitějšími faktory ovšem zůstávají cena, pracnost a časová náročnost, stále totiž záleží hlavně na schopnosti rychle vydat méně specifický výsledek než vydat přesné hodnoty pozdě, což je samozřejmě nemožné bez cenově dostupných prostředků.

6.1 Kvantita, semikvantita, kvalita

Nezákladnější dělení metod a postupů je právě dělení na kvantitu, kvalitu a semikvantitu. Je to rozhodující faktor, podle kterého se dále určuje, jak se budou

prezentovat výsledky, jestli podle stupnice a nebo se bude přímo určovat konkrétní počet nebo množství v daných jednotkách. Nutno podotknout, že nemusí vždy zůstat pouze u tohoto dělení, často se používají kombinace těchto metod.

6.1.1 Kvantita

Kvantitativním vyšetřením můžeme stanovovat koncentrace dané látky.

Kvantitativní metody často užívají k interpretaci výsledků proměnné, které značí konkrétní vlastnosti, zároveň je mezi nimi sledována závislost, tedy se jedná o deduktivní charakter metody. Metodami kvantitativního výzkumu jsou například standardizovaný rozhovor, dotazník nebo analýza dat. Výsledky těchto měření jsou často interpretovány například statisticky, často se zde objevují tabulky, grafy a další. Kvantitativní metody pracují s velkým počtem respondentů, kde výzkumník není pouhým pozorovatelem, ale přímo tvůrcem situací pro výzkum. Základem kvantitativní práce potvrzení hypotézy a zobecnění pro případné aplikace na podobné situace. Výhody spočívají v možnosti ověření dat, rychlé shromáždění dat, nezávislost na přesvědčení výzkumníka a další. Nevýhodou může být obecnost získaných výsledků nebo například skutečnost, že data jsou sbírána jen z určitého místa nebo v určitém čase. (35)

6.1.2 Semikvantita

Jak už název napovídá, jedná se o částečně kvantitativní popis, tedy je předem dána stupnice, na níž se pak vyhledává výsledek, nelze se zde dohledat přesných čísel nebo chemických či fyzikálních jednotek. Semikvantitativní metody se využívají například u citlivosti na antibiotika, v imunologické laboratoři pak například u zákalových reakcí.

6.1.3 Kvalita

Kvalitativní vyšetření jsou dobrá na to, abychom zjistili chemické složení vyšetřované látky. Pomocí kvalitativních vyšetření můžeme určit například izotyp protilátek nebo přítomnost M komponenty, čili monoklonálního imunoglobulinu. Po kvalitativní analýze obvykle přichází kvantitativní. (4)

6.2 Druhy alergenů

Další způsob dělení alergenů, který následuje, je dělení podle toho, jak je získáváme, zdali jsou získané z přirozených zdrojů nebo připravené uměle ve zkumavce.

6.2.1 Nativní

Jak sám název napovídá, nativní alergeny jsou získávány izolací z přírodních materiálů a případným očištěním. Čištění alergenů může zahrnovat mnoho podmínek jako například optimalizované podmínky extrakce, velikostní vyloučení nebo iontové výměnnou chromatografii a zbavení se interferujících kontaminantů kyselinou octovou. Takto získané alergeny se využívají většinou k léčebným postupům. Jedním nedostatkem používání nativních alergenů je složitost standardizační produkce. (4) (36) (37)

6.2.2 Rekombinantní

Rekombinantní alergeny jsou uměle syntetizované, což je možné, známe-li aminokyselinovou sekvenci. Vytvořit je můžeme tak, že odseknujeme část antigenu a připravíme ji ve zkumavce nebo pomocí genového inženýrství, tedy získáním genu pro daný antigen a vložením do buňky, která je schopna daný protein produkovat. Další příprava rekombinantního alergenu je jednoduchá a stoprocentně reprodukovatelná. Rekombinantní alergeny jsou tedy chemicky čisté a definovatelné. Tato čistota může být zároveň ovšem i nevýhodou, neboť může vyvstat problém při detekci protilátek, jsou-li vyšetřované protilátky mířené proti konformačním epitopům. Rekombinantní alergeny jsou totiž často pouze lineární – s přírodními mají společnou jen primární a sekundární konformaci, prostorovou strukturu už ne. (4)

Rekombinantní alergeny jsou tedy další cestou k vytvoření bezpečnějších léčivých imunologických vakcín. Samozřejmě se nabízí otázka, zda při vědomí, že nativní alergeny obsahují mnoho příměsí a v prostředí je nekonečné množství alergenů, omezený počet rekombinantních alergenů dokáže obsáhnout celé toto spektrum a navodit toleranci. (36)

6.3 Senzitivita

Senzitivita je vyjádření pro citlivost testu, tedy schopnost testu zachytit pozitivní nález. Pro výpočet senzitivity daného testu se užívá tento vzorec:

$$\text{Senzitivita} = \frac{TP}{TP+FN}$$

kde TP vychází z anglického „true positive“ tedy správně pozitivní a FN tedy „false negative“ je v překladu falešně negativní. Výsledek tedy bude mít podobu čísla mezi 0 a 1, chceme-li získat výsledek v procentech, pak toto číslo vynásobíme 100. Metody užívané

ve zdravotnictví ovšem nedosahují hodnoty 1 (nebo 100%), ale snaží se jí co nejvíce přiblížit. Důležitý pojem je tzv. „cut off“ hodnota, znamená meze, ve kterých leží většina (často se udává 95%) správně pozitivních výsledků, zbylých většinou 5% jsou pak falešně negativní výsledky, proto se snažíme, aby byla senzitivita co nejvyšší, tedy aby se blížila 100%. Samozřejmě pro vyšetřování se užívají metody, které jsou nejvýhodnější ohledně právě senzitivity, specifity, reliability a validity. (38)

6.3.1 Immulite 2000

Získala jsem k dispozici 49 výsledků vyšetření pomocí Immulite 2000. Z těchto původně 49 výsledků bylo 33 v porovnání s diagnózou shodných a tedy jsou považovány za správné, z čehož 26 vyšlo pozitivních a 7 bylo zaznamenáno jako negativní. Zbylých 16 vzorků je považováno za falešně pozitivní, tedy že podle metody jsou pozitivní, ale ve skutečnosti nejsou, nebo v opačném případě falešně negativní.

Tabulka 1: Immulite 2000

	Pozitivní	Negativní
Správně	26	7
Falešně	12	4
Celkem	49	
Senzitivita	0,87	

Dle výše uvedeného vzorce pro výpočet senzitivity jsem došla k závěru, že senzitivita Immulite dosahuje hodnoty 87%, je tedy poměrně vysoká.

6.3.2.1 ImmunoCAP 250 pro Bet v 1

Na stejném souboru vzorků byla provedena vyšetření i pomocí ImmunoCAP. Konkrétně pro Bet v 1, což je jeden z nejčastějších alergenů, konkrétně se jedná o alergii na pyly břízy, jsou výsledky následující:

Tabulka 2: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1

	Pozitivní	Negativní
Správně	23	8
Falešně	10	8
Celkem	49	
Senzitivita	0,74	

Výsledná senzitivita tohoto testu vychází na 74%, což je stále ještě přijatelný výsledek.

6.3.2.2 ImmunoCAP 250 pro Bet v 2

Na Bet v 2, jak níže uvedená tabulka vypovídá, je tato metoda poněkud méně senzitivní.

Tabulka 3: ImmunoCAP 250 pro Bet v 2

	Pozitivní	Negativní
Správně	21	15
Falešně	3	10
Celkem	49	
Senzitivita	0,68	

I přes relativně vysoký počet správně pozitivních výsledků, vyšší počet těch falešně negativních zapříčinil skutečnost, že senzitivita ImmunoCAP je pro Bet v 2 pouze 68%.

6.3.2.3 ImmunoCAP 250 pro rekombinantní alergeny

Hodnoty pro „rekombinantní“ alergeny se získávají přihlédnutím k oběma jednotlivým alergenům a jejich výsledkům. Například o správně pozitivní výsledek se v tomto případě jedná, když alespoň jeden z těchto výsledků daného vzorku je veden jako správně pozitivní, druhý je buď také správně pozitivní nebo falešně negativní.

Tabulka 4: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1 a Bet v 2

	Pozitivní	Negativní
Správně	29	16
Falešně	2	2
Celkem	49	
Senzitivita	0,94	

Protože vzorků splňujících daná kritéria je velké množství, pak i výsledná senzitivita vyjde jako vysoké číslo, čehož je důkazem právě uvedená tabulka. Přestože pro samotný Bet v 1 má hodnotu senzitivity 74% a pro Bet v 2 pouhých 68%, pro oba dohromady dosahuje až 94%.

6.3.3.1 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1

Biočipová metoda se jeví být pro tento konkrétní typ alergenu relativně senzitivní.

Tabulka 5: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1

	Pozitivní	Negativní
Správně	26	7
Falešně	10	6
Celkem	49	
Senzitivita	0,81	

Relativně nízký počet falešně negativních a naopak vysoký počet správně pozitivních výsledků dal vzniknout hodnotě senzitivity rovnající se 81%.

6.3.3.2 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2

Pro alergen Bet v 2 není microarrayová metoda asi úplně nejcitlivější.

Tabulka 6: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2

	Pozitivní	Negativní
Správně	22	15
Falešně	2	10
Celkem	49	
Senzitivita	0,69	

Senzitivita přibližně 69% nepatří mezi nejvyšší hodnoty, ale nutno podotknout, že to nemusí být metodou vzhledem k tomu, že ImmunoCAP 250 dosáhl prakticky obdobných výsledků u stejného alergenu.

6.3.3.3 ImmunoCAP ISAC pro rekombinantní alergeny

Co se sloučení výsledků obou alergenů týče, neexistovala v užitém souboru vzorků ani jedna dvojice výhradně falešně negativních výsledků.

Tabulka 7: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1 a Bet v 2

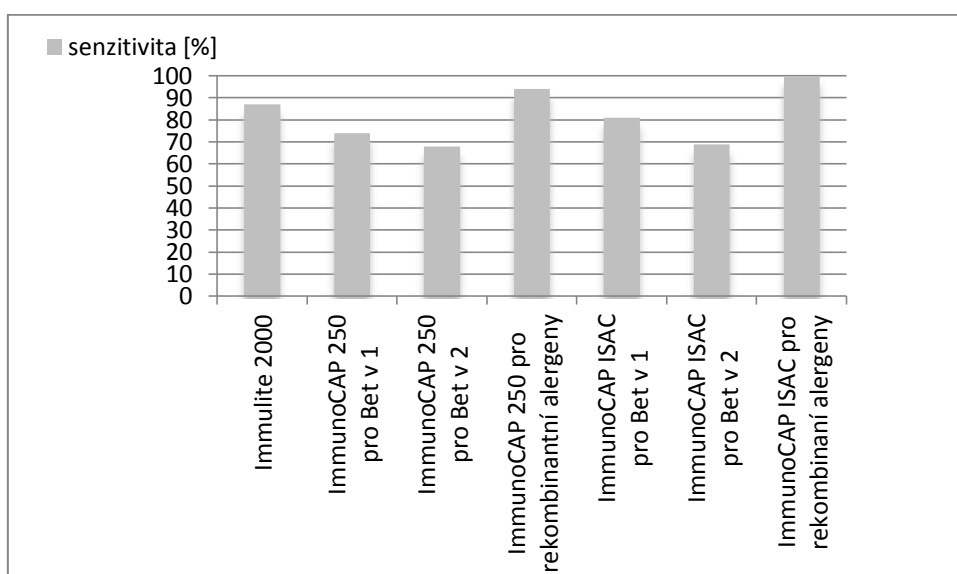
	Pozitivní	Negativní
Správně	29	17
Falešně	3	0
Celkem	49	
Senzitivita	1	

To tedy znamená, že dle výpočtu provedeného vzorcem, který byl aplikován na všechny ostatní tabulky, vychází senzitivita ImmunoCAP ISAC pro dané alergeny rovných 100%.

6.4 Grafické znázornění senzitivity

Pro shrnutí a lepší představu ohledně vypočtených hodnot senzitivity slouží následující graf. Jednotlivé výsledky se zde dají velice dobře porovnat mezi sebou navzájem. Konkrétní metody jsou seřazeny dle pořadí v předcházejících podkapitolách.

Graf 1: Grafické znázornění senzitivity



Jak je možné z tohoto grafu vyčíst, senzitivita všech uvedených metod je docela vysoká a na rozdíl od specifity jsou si jednotlivé hodnoty relativně blízké.

6.5 Specifita

Podle specifity poznáme, jak je test nebo metoda schopný rozeznat správně negativní výsledek. Pro výpočet specifity se užívá vzorec:

$$\text{Specifita} = \frac{TN}{TN+FP}$$

kde TN vychází z anglického „true negative“ tedy správně negativní a FP tedy „false positive“ je v překladu falešně pozitivní. Princip získání a zaznamenání výsledků je obdobný jako u senzitivity, tedy výsledek vychází v rozmezí čísel 0 a 1, kdy se užívají v praxi hlavně metody, které se blíží k 1. Chceme-li výsledek v procentech, pak výsledné desetinné číslo vynásobíme 100. (38)

6.5.1 Immulite 2000

Co se specifity týče, Immulite nedosahuje zrovna vysokých výsledků.

Tabulka 8: Immulite 2000

	Pozitivní	Negativní
Správně	26	7
Falešně	12	4
Celkem	49	
Specifita	0,37	

Uplatněním výše uvedeného vzorce pro výpočet specifity, který byl užíván i pro výpočty všech následujících hodnot specifity u ostatních metod, pro Immulite vyšla pouhých 37%, což je vskutku nízké číslo.

6.5.2.1 ImmunoCAP 250 pro Bet v 1

Z vyšetření Bet v 1 pomocí ImmunoCAP v daném souboru vzorků výpočet specifity také nevyšel nijak vysoký.

Tabulka 9: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1

	Pozitivní	Negativní
Správně	23	8
Falešně	10	8
Celkem	49	
Specifita	0,44	

K výsledku specifity 44% mohl přispět jak relativně vysoký počet falešně pozitivních, tak i nízký počet správně negativních výsledků.

6.5.2.2 ImmunoCAP 250 pro Bet v 2

Pro alergen Bet v 2 je ImmunoCAP 250 asi vhodnější, alespoň dle výsledků výpočtu specifity z daných dat.

Tabulka 10: ImmunoCAP 250 pro Bet v 2

	Pozitivní	Negativní
Správně	21	15
Falešně	3	10
Celkem	49	
Specifita	0,83	

S 83% je výsledná hodnota specifity pro tento alergen skoro dvojnásobná než pro předchozí alergen.

6.5.2.3 ImmunoCAP 250 pro rekombinantní alergeny

I u specifity platí, že počet falešně pozitivních nebo negativních výsledků je relativně nízký, což dává vzniknout vysokým hodnotám.

Tabulka 11: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1 a Bet v 2

	Pozitivní	Negativní
Správně	29	16
Falešně	2	2
Celkem	49	
Specifita	0,89	

Přibližně 89% je docela vysoká hodnota specifity.

6.5.3.1 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1

Co se specifity týče nepatří ImmunoCAP ISAC mezi ty lepší.

Tabulka 12: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1

	Pozitivní	Negativní
Správně	26	7
Falešně	10	6
Celkem	49	
Specifita	0,41	

Pro ImmunoCAP 250 sice vyšla specifita také jen 44%, ImmunoCAP ISAC ovšem má ještě o 3% méně, tedy 41%.

6.5.3.2 ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2

Specifita pro Bet v 2 se pohybuje ve vyšších hodnotách. U tohoto alergenu dosáhly metody jak ImmunoCAP 250 tak ISAC poměrně vysokých výsledků.

Tabulka 13: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2

	Pozitivní	Negativní
Správně	22	15
Falešně	2	10
Celkem	49	
Specifita	0,88	

Dle výpočtu z dat vychází specifita ImmunoCAP ISAC pro alergen Bet v 2 přibližně 88%.

6.5.3.3 ImmunoCAP ISAC pro rekombinantní alergeny

Specifita pro sloučená data obou vyšetřovaných alergenů vyšla opět vysoká.

Tabulka 14: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1 a Bet v 2

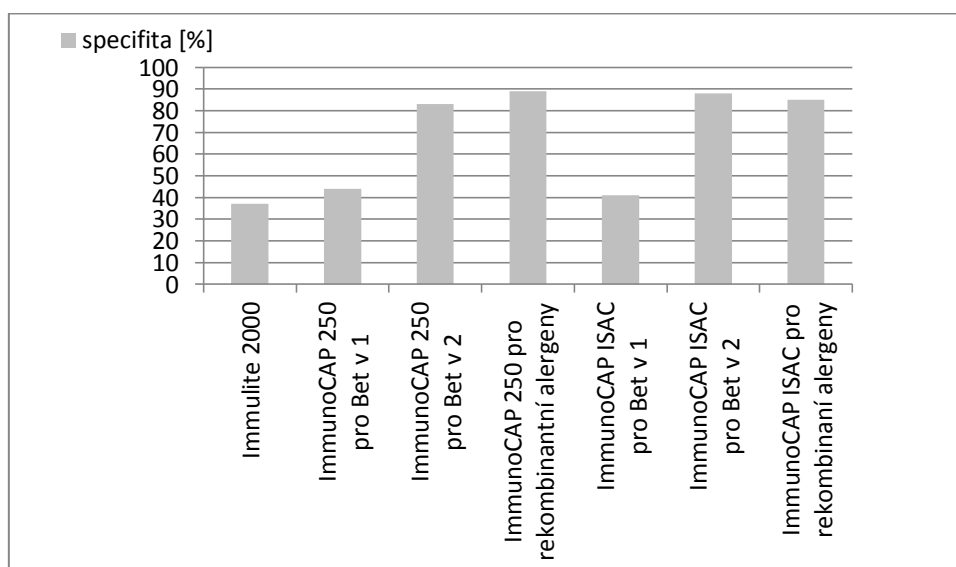
	Pozitivní	Negativní
Správně	29	17
Falešně	3	0
Celkem	49	
Specifita	0,85	

ImmunoCAP ISAC má pro alergeny Bet v 1 a Bet v 2 hodnotu specifity 85%.

6.6 Grafické znázornění specifity

Pro shrnutí a lepší představu ohledně vypočtených hodnot specifity slouží následující graf. Jednotlivé výsledky se zde dají velice dobře porovnat mezi sebou navzájem. Konkrétní metody jsou seřazeny dle pořadí v předcházejících podkapitolách.

Graf 2: Grafické znázornění specifity



Jak je z tohoto grafu možné vyčíst, hodnoty specifity si zdaleka nejsou tak podobné jako u senzitivity. Velice dobře se uvedené metody dají rozdělit do skupiny s vysokou a s nízkou hodnotou specifity.

Diskuze

V této bakalářské práci pojednávající o porovnání tří metod: Immulite, ImmunoCAP a ImmunoCAP ISAC byl stanoven cíl, jak již z názvu vyplývá, porovnat tyto metody. V souvislosti s tímto cílem byly vystaveny 2 výzkumné otázky.

První: V jakých oblastech je která metoda výhodnější, porovnáme-li jejich vlastnosti a výsledky mezi sebou?

Nejprve se zaměříme na použitý objem patientského séra. V příručce pro Immulite 2000 uvádí výrobce, že pro ostatní procedury se doporučuje dalších 250 μ l, ale na samotné vyšetření by mělo stačit 50 μ l vzorku. Pro ImmunoCAP 250 uvádí výrobce minimální objem vzorku na vyšetření 40 μ l, zatímco na provedení vyšetření pomocí biočipové metody ImmunoCAP ISAC stačí 30 μ l vzorku. (26) (32) (33)

Další faktor, na který se zaměříme je čas provedení vyšetření, tedy jak dlouho trvá vyšetření od vložení vzorku po získání výsledku. Příručka pro Immulite 2000 uvádí, že první výsledek vyšetření získáme za 35 minut a dále lze získat až 200 výsledků za hodinu. Výrobce ImmunoCAP 250 udává, že první výsledek získáme po 100 minutách od vložení a dále jeden výsledek za minutu. Microarrayová metoda ImmunoCAP ISAC je z těchto 3 nejdelší hlavně kvůli dlouhým inkubačním dobám, celkový čas na jednu assay činí až 225 minut. (26) (32) (33)

Počet vyšetření je faktor, který úzce souvisí dobou vyšetření. Dle údajů uvedených výrobcem lze tedy prostřednictvím Immulite 2000 po prvních 35 minutách získávat dále až 200 vyšetření za hodinu, pomocí ImmunoCAP 250 po prvních 100 minutách můžeme získávat 1 výsledek za minutu a ImmunoCAP ISAC má na jednom čipu 4 vyšetřovací pole, tedy 4 vyšetření na 1 čip. (26) (32) (33)

Ohledně subjektivity a objektivity je jisté, že metoda, která závisí na vyšetření laborantem přímo může být více zatížená lidskou chybovostí než metody, které provádí přístroje, nicméně převážná většina přístrojů potřebuje kontrolu zkušeného zdravotnického pracovníka, tudíž lze všechny metody považovat za subjektivní. Nejvíce subjektivní z metod, které jsou předmětem této práce, je však ImmunoCAP ISAC, neboť tuto metodu provádí výhradně zdravotnický pracovník a výsledky odečítá mikroskopem, zatímco

u ostatních metod se jedná z pohledu zdravotnického pracovníka spíše o kontrolu přístrojem vygenerovaných výsledků. (26) (32) (33)

Druhá: Jaké jsou rozdíly mezi zde provedenými výpočty a výrobcem uvedenými informacemi?

Nejprve se zaměříme na senzitivitu. První metodou, jejíž senzitivita byla vypočtena pro účely této práce, byl Immulite 2000. Ze souboru 49 výsledků, které byly vhodné a k dispozici, byla dle stanoveného vzorce vypočtena senzitivita 87%. Výrobce tyto výpočty prováděl na 4214 vzorcích a jím uvedená senzitivita v příručce se rovná 54,4%. Další zkoumanou metodou byl ImmunoCAP ISAC, který má v příručce od výrobce uvedenou senzitivitu 0,1 fluorescenčních molekul na μm^2 , výpočty provedené v této práci poukazují na to, že senzitivita ImmunoCAP ISAC je vyšší pro alergen Bet v 1 a dosahuje 81%, zatímco pro Bet v 2 jen 69%. Třetí zmiňovanou metodou je ImmunoCAP 250, jehož výrobcem udávaná senzitivita se pohybuje mezi 84 – 95%, uvedeno je ovšem 93%, což bylo vypočteno z výsledků 836 vzorků. V této práci dosáhl ImmunoCAP 250 výsledků senzitivity pro Bet v 1 74% a pro Bet v 2 68%. (26) (32) (33)

Dále porovnáme výsledky specifity jednotlivých metod První metodou, jejíž specifita byla vypočtena pro účely této práce, byl Immulite2000. Ze souborů 49 výsledků byla dle stanoveného vzorce vypočtena specifita pouhých 37%, zatímco výrobce, který k tomuto výsledku došel po změření 4214 vzorků, udává až 96,7%. Další zkoumanou metodou byl ImmunoCAP ISAC, jehož specifita v této práci vyšla na 41% pro Bet v 1 a 88% pro Bet v 2, zatímco výrobce uvádí specifitu 95%. Jako třetí byla vypočítávána specifita pro ImmunoCAP 250 a výsledkem těchto výpočtů byly hodnoty 44% pro Bet v 1 a 83% pro alergen Bet v 2, výrobce ovšem udává výpočtem ze souboru 836 vzorků hodnotu specifity na 89%. (26) (32) (33)

Závěr

Cílem této práce bylo porovnat metody Immulite 2000, ImmunoCAP 250 a ImmunoCAP ISAC v různých ohledech, tedy senzitivita, specifita, délka trvání vyšetření, počet vyšetření, objektivita a subjektivita hodnocení výsledků.

Z ohledu senzitivity se jevila nejlépe podle výpočtů provedených v této práci metoda Immulite 2000, zatímco podle údajů udávaných výrobcí měla nejvyšší hodnotu senzitivity metoda ImmunoCAP 250. Co se specifity týče, nejlépe na tom dle výpočtů uvedených v této práci jsou metody ImmunoCAP, zatímco podle příručky výrobce dosahuje nejvyšší hodnoty Immulite 2000.

Porovnáváme-li jednotlivé metody mezi sebou z hlediska objemu vzorku, který je potřeba na vyšetření, je nejvýhodnější biočipová metoda ImmunoCAP ISAC, ovšem je až několikanásobně časově náročnější než zbylé dvě. Ohledně času, který je potřeba na vyšetření, je jednoznačně nejrychlejší metoda Immulite 2000. ImmunoCAP ISAC je zároveň metodou, jejíž hodnocení je nejvíce subjektivní.

Výsledkem této práce tedy je, že každá metoda má své výhody a své nevýhody. V rutinním provozu se používají všechny tyto metody, protože zatím neexistuje jen jedna metoda, která by byla ve všem jednoznačně nejlepší.

Literatura

1. **Hořejší, V., a další, a další.** *Základy imunologie (5. vydání)*. Praha : Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
2. *The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection.* **Frohn, C., et al., et al.** 2, Lübeck : Springer International, 2001, Vol. 16. ISSN 1460-2385.
3. **Shetty, Nandini.** *Immunology: Introductory textbook (2. vydání)*. Delhi : New Age International (P) Ltd., Publishers, 2005. ISBN 81-224-1478-0.
4. **Bartůňková, J. and Paulík, M. a kolektiv.** *Vyšetřovací metody v imunologii (2. vydání)*. Praha : Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
5. **Krejsek, J. and Kopecký, O.** *Klinická imunologie*. Hradec Králové : Nukleus, 2004. ISBN 80-86225-50-X.
6. **Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H. and Pillai, Shiv.** *Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system (5. vydání)*. St. Luis, Missouri : Elsevier, 2014. ISBN 978-0-323-39082-8.
7. **Doan, T., et al., et al.** *Immunology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Klüwer bussines, 2008. ISBN 978-0-7817-9543-2.
8. **Moragne, W.** *Allergies*. Conncticut : Twenty-first Century Books, 1999. ISBN 0-7613-1359-1.
9. **Monroe, J.** *Allergies*. Minnesota : Capstone Press, 2001. ISBN 0-7368-0752-7.
10. **Hicks, Terry allan.** *Allergies*. New York : Marshall Cavendish Benchmark, 2006. ISBN 978-80-247-3460-6.
11. **Penka, M. and Tesařová, E.** *Hematologie a transfuzní lékařství II*. Praha : Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
12. **Müller-Burzler, H.** *Alergie: rozpoznávání a léčení alergického syndromu: dermatitida, astma, senná rýma, hyperaktivita*. Praha : Pragma, 2007. ISBN 978-80-7205-973-7.

13. **Federhen, S.** Taxonomy Help. *NCBI - National Center for Biotechnological Information*. [Online] 4 7, 2011. [Cited: 2 17, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53758/>. NBK53759.
14. **Čáp, P. and Průcha, M.** *Alergologie v kostce*. Praha : Triton, 2006. ISBN 80-7254-779-8.
15. **Kay, A. B., et al., et al.** *Allergy (2. vydání)*. Oxford : Blackwell Publishing Ltd., 2008. ISBN 978-1-4051-5720-9.
16. **Holgate, S. T., et al., et al.** *Allergy (4. vydání)*. Oxford : Elsevier, 2012. ISBN 978-0-723-43658-4.
17. **Miner, M., Young, S. H. and Dobožin, D.S.** *Allergies: The Complete Guide to Diagnosis, Treatment, and Daily Management*. New York : First Plume Print, 1999. ISBN 0-452-27966-6.
18. **Bartůňková, J. and Vernerová, E.** *Imunologie a alergologie (2. vydání)*. Praha : Triton, 2002. ISBN 80-7254-289-3.
19. **Špičák, V. and Panzner, P.** *Alergologie*. Praha : Galén, 2004. ISBN 978-80-7262-265-8.
20. **Luttmann, Werner, et al., et al.** *Immunology*. Oxford : Elsevier, 2006. ISBN 978-0-12-088544-2.
21. **Mestecky, J., et al., et al.** *Mucosal Immunology (4. vydání)*. Massachusetts : Academic Press - Elsevier, 2015. ISBN 978-0-12-415847-4.
22. **Woof, M. J. and Kerr, A. M.** PMC - US National Library of Medicine, National Institutes of Health. *NCBI - The National Center for Biotechnological Information*. [Online] 10 2, 2004. [Cited: 2 14, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782559/>. DOI 10.1111/j.1365-2567.2004.01958.x.
23. **Cerutti, A. and Chen, K.** PMC - US National Library of Medicine, National Institutes of Health. *NCBI - The National Center for Biotechnological Information*. [Online] 6 1, 2012. [Cited: 2 14, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109135/>. DOI 10.1016/j.coi.2011.01.006.

24. **Vidarsson, G., Dakkers, G. and Rispens, T.** PMS - US National Library of Medicine, National Institutes of Health. *NCBI - National Center for Biotechnological Information*. [Online] 10 20, 2014. [Cited: 2 17, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202688/>. DOI 10.3389/fimmu.2014.00520.
25. **Grönwall, C., Vas, J. and Silverman, J. G.** PMC - US National Library of Medicine, National Institutes of Health. *NCBI - The National Center for Biotechnological Information*. [Online] 4 4, 2012. [Cited: 2 15, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341951/>. DOI 10.3389/fimmu.2012.00066.
26. **Siemens.** *Immulite 2000 3gAllergy TM Specific IgE Universal Kit*. Llanberis : Siemens Healthcare, 2014. PIL2KUN-25.
27. **Gadermaier, E., et al., et al.** PMC - US National Library of Medicine, National Institutes of Health. *NCBI - National Center for Biotechnological Information*. [Online] 11 30, 2013. [Cited: 3 8, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4497803/>. DOI 10.1159/000355947.
28. **Smith, G. P.** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Pubmed.gov*. [Online] 6 14, 1985. [Cited: 3 14, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4001944>. PMID 4001944.
29. **Litzman, J., Petřek, M. and Thon, V.** *Vyšetřovací metody v klinické imunologii*. Brno : Masarykova universita, 1998. ISBN 80-210-1807-0.
30. **Jain, K. K.** *Textbook of Personalized Medicine*. Basel : Springer, 2015. ISBN 978-1-4939-2553-7.
31. **Phadia.** *ImmunoCAP Lab Tests*. Uppsala : Phadia , 2014. 52-5100-01/22.
32. —. *ImmunoCAP Specific IgE*. Uppsala : Phadia, 2012.
33. —. *ImmunoCAP ISAC sIgE 112*. Uppsala : Phadia AB, 2013. 21-01-02-3.
34. **Jahn-Schmid, B., et al., et al.** Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific

serum immunoglobulin E. *PubMed*. [Online] 10 10, 2003. [Cited: 3 15, 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519153>. ISSN 1365-2222.

35. **Babbie, E.** *The Practice of social Research (14. vydání)*. Boston : Nelson Education, Ltd., 2016. ISBN 978-1-305-10494-5.

36. **Valenta, R. and Coffman, R. L.** *Vaccines against Allergies*. Berlin : Springer , 2011. ISBN 978-3-642-20053-3.

37. **Tao, A. and Raz, E.** *Allergy Bioinformatics*. Dordrecht : Springer, 2015. ISBN 978-94-017-7442-0.

38. **Bencko, V.** *Epidemiologie, výukové texty pro studenty 1. LFUK (2. vydání)*. Praha : Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0383-7.

39. **Paul, William E.** *Fundamental Immunology (7. vydání)*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer bussiness , 2013. ISBN 978-1-4511-1783-7.

40. **Kopecký, O., et al., et al.** *Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii*. Hradec Králové : Garamon, 2004. ISBN 80-86472-17-5.

Seznam zkratek

ADCC - na protilátkách závislá buňkami zprostředkovávaná cytotoxická reakce

AIDS – z ang. “Acquired Immune Deficiency Syndrome“

BAFF – cytokin, z ang. „B-cell activating factor“

BAP – z ang. „B cell receptor-associated proteins“

BCR – z ang. „B cell receptor“

Bet v 1 – alergen pylu břízy

Bet v 2 – allergen pylu břízy

C1 – inhibitor

EDTA – chelatační protisrážlivé činidlo, kyselina ethylendiamintetraoctová

Etc. – z lat. “et cetera” = a tak dále

Fc – receptor na povrchu některých buněk

HIDS – z ang. “Hyper-IgD syndrome“

IgA – Imunoglobulin třídy A

IgD – Imunoglobulin třídy D

IgE – Imunoglobulin třídy E

IgG – Imunoglobulin třídy G

IgM – Imunoglobulin třídy M

IL - Interleukiny

IUIS – z ang. “International Union of Immunological Societies“

MvK – z ang. „Mevalonate kinase“

NK – z ang. “Natural Killer”

PFAPA – z ang. “Periodic fever-aphthous stomatitis-pharyngitis-adenitis“

SABA - rychle působící β_2 mimetika

TBC - Tuberkulóza

Tc – cytotoxické T lymfocyty

Th1 – pomocné T lymfocyty 1. typu

Th2 – pomocné T lymfocyty 2. Typu

TNF – z ang. „Tumor Necrosis Factor“

WHO – z ang. „World Health Organization“

Seznam tabulek

Tabulka 1: Immulite 2000

Tabulka 2: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1

Tabulka 3: ImmunoCAP 250 pro Bet v 2

Tabulka 4: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1 a Bet v 2

Tabulka 5: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1

Tabulka 6: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2

Tabulka 7: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1 a Bet v 2

Tabulka 8: Immulite 2000

Tabulka 9: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1

Tabulka 10: ImmunoCAP 250 pro Bet v 2

Tabulka 11: ImmunoCAP 250 pro Bet v 1 a Bet v 2

Tabulka 12: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1

Tabulka 13: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 2

Tabulka 14: ImmunoCAP ISAC pro Bet v 1 a Bet v 2

Seznam grafů

Graf 1: Grafické znázornění senzitivity

Graf 2: Grafické znázornění specifity

Přílohy

Příloha 1: Souhlas s poskytnutím informací FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Dagmar Voříšková

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem anonymizovaných informací o výsledcích laboratorních metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracování Vaší bakalářské práce s názvem „*Stanovení specifických IgE – porovnání používaných metod*“.

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

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

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

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

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

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

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

22. 3. 2016