

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Anna Černá

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**Anna Černá**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**STANOVENÍ PROTILÁTKY ANTI-MCV, ZAVEDENÍ NOVÉ  
METODY**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2023

Místo tohoto listu bude v tištěné verzi vloženo **zadání bakalářské práce** s razítkem.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 3. 2023.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Černá Anna

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Stanovení protilátky anti-MCV, zavedení nové metody

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 51

Počet stran – nečíslované: 23

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 39

Klíčová slova: anti-MCV, revmatoidní artritida, autoimunitní onemocnění, ACPA

### **Souhrn:**

Bakalářská práce se zabývá zavedením metody anti-MCV do běžného provozu laboratoře. V rámci praktické části byla metoda řádně validována a verifikována a bylo provedeno ekonomické zhodnocení využívané diagnostické sady od výrobce ORGENTEC. Výsledky této práce ukázaly, že je metoda vhodná pro použití v běžném provozu laboratoře.

V poslední části je porovnána senzitivita a specifčnost metody anti-MCV s jinými serologickými markery z výsledku stanovovaných vzorků z FN Plzeň. Výsledky neukázali výhodu stanovování anti-MCV oproti ostatním markerům. Při analýze korelací mezi anti-MCV a ostatními serologickými markery mělo anti-MCV nejvyšší korelaci s anti-CCP.

## **Abstract**

Surname and name: Černá Anna

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

Title of thesis: Determination of anti-MCV antibody, implementation of a new method

Consultant: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 51

Number of pages – unnumbered: 23

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 39

Keywords: anti-MCV, rheumatoid arthritis, autoimmune disease, ACPA

### Summary:

The bachelor thesis deals with the implementation of the anti-MCV method into the routine laboratory operation. In the practical part, the method was properly validated and verified, and an economic evaluation of the diagnostic kit from ORGENTEC was performed. The results of this work showed that the method is suitable for use in routine laboratory operations.

In the final section, the sensitivity and specificity of the anti-MCV method were compared with other serological markers from samples collected at the FN Pilsen. The results did not show an advantage of using anti-MCV over other markers. When analyzing correlations between anti-MCV and other serological markers, anti-MCV had the highest correlation with anti-CCP.

## **Předmluva**

Revmatoidní artritida je autoimunitní onemocnění s velkým sociálním dopadem. Pacienti s revmatoidní artritidou musí omezit své každodenní aktivity kvůli bolesti a ztuhlosti kloubů. To může mít negativní dopad jak na jejich pracovní, tak i osobní život. Někteří pacienti s revmatoidní artritidou se mohou potýkat s dalšími zdravotními problémy, jako je například únava, deprese, nebo problémy s trávením, což může ještě více omezit jejich schopnost plnit denní úkoly. Včasná diagnóza a správná léčba revmatoidní artritidy může pomoci minimalizovat vliv onemocnění na kvalitu života pacientů a umožnit jim udržet jeho kvalitu.

Anti-MCV je nová diagnostická metoda, která může pomoci při zjišťování diagnózy a sledování průběhu onemocnění. Cílem mé bakalářské práce bylo dokázat, že je metoda vhodná stanovovat v běžné laboratorní praxi. Následně jsem anti-MCV porovnála s anti-CCP, RF, RF-IgG, RF-IgA a RF-IgM, které se stanovují při diagnostice revmatoidní artritidy, abych dokázala, zda je tato nová metoda skutečně lepší.

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Bc. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň za poskytnutí laboratorního vybavení pro zpracování praktické části bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, za podporu při psaní této bakalářské práce.

# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	11
SEZNAM TABULEK .....	12
SEZNAM ZKRATEK .....	13
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	16
1.1 Autotolerance a autoimunita .....	16
1.2 Autoimunitní reakce .....	16
1.3 Vznik autoimunitních onemocnění .....	17
1.4 Vnitřní faktory .....	17
1.4.1 Dědičnost .....	17
1.4.2 Hormonální příčiny .....	18
1.5 Vnější faktory .....	18
1.5.1 Infekce .....	19
1.5.2 Mikrobiom .....	19
1.5.3 Léky .....	20
1.5.4 Chemické látky .....	21
1.5.5 Psychika.....	21
1.5.6 Transplantace.....	21
1.6 Fáze vzniku autoimunitních onemocnění .....	21
1.7 Klasifikace .....	22
1.7.1 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění .....	23
1.7.2 Systémová autoimunitní onemocnění.....	23
1.7.3 Orgánově lokalizovaná autoimunitní onemocnění .....	23
1.7.4 Vznik dalších autoimunitních onemocnění .....	23
2 REVMATOIDNÍ ARTRITIDA.....	24
2.1 Definice.....	24
2.2 Etiologie.....	24
2.3 Mechanismus patogeneze .....	25
2.3.1 Synovie .....	25
2.3.2 T-lymfocytární imunitní odpověď .....	25
2.3.3 B-lymfocytární imunitní odpověď.....	26
2.3.4 Přirozená imunita při patogenezi onemocnění .....	26
2.3.5 NK buňky .....	27
2.4 Klinický obraz.....	27



2.5	Diagnostika .....	28
2.6	Prognóza .....	29
2.7	Terapie .....	29
3	STANOVOVANÉ PROTI LÁTKY PŘI REVMATOIDNÍ ARTRITIDĚ .....	32
3.1	Revmatoidní faktor (RF).....	32
3.1.1	RF u zdravých pacientů .....	32
3.1.2	RF u nerevmatických onemocnění .....	33
3.1.3	RF u pacientů s autoimunitními onemocněními.....	33
3.1.4	RF u pacientů s revmatoidní artritidou .....	33
3.1.5	Role RF při diagnostice revmatoidní artritidy.....	34
3.2	ACPA.....	34
3.3	Anti-CCP .....	34
3.3.1	Patogenní role anti-CCP protilátek při revmatoidní artritidě .....	35
3.3.2	Relevance stanovení anti-CCP .....	36
3.3.3	Senzitivita a specifičnost RF proti anti-CCP při diagnostice RA.....	36
3.4	Anti-MCV .....	37
3.4.1	Historie .....	37
3.4.2	Vznik mutovaného citrulinovaného vimentinu .....	38
3.4.3	Diagnostická schopnost anti-MCV.....	38
3.4.4	Prediktivní hodnota anti-MCV protilátek v časně fázi RA .....	39
3.4.5	Asociace anti-MCV s aktivitou onemocnění.....	39
3.4.6	Anti-MCV při jiných onemocnění.....	39
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	40
4	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	40
4.1	Hlavní cíl.....	40
4.2	Dílčí cíle.....	40
5	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	41
	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU.....	42
5.1	Ověření analytických vlastností metody .....	42
5.2	Ekonomická rozvaha.....	42
5.3	Porovnání anti-MCV s jinými serologickými markery .....	42
6	METODIKA PRÁCE .....	43
6.1	Metoda anti-MCV ORG 548 od ORGENTEC Diagnostika GmbH.....	43
6.1.1	Princip testu .....	43
6.1.2	Součásti diagnostické sady .....	43
6.1.3	Laboratorní pomůcky potřebné k provedení metody .....	43
6.1.4	Vzorky .....	44

6.1.5	Příprava roztoků a vzorků.....	44
6.1.6	Postup stanovení.....	45
6.1.7	Validace testu .....	46
6.1.8	Vlastnosti testu .....	46
6.2	Analytické vlastnosti metody.....	47
6.2.1	Opakovatelnost .....	47
6.2.2	Mezilehlá přesnost.....	47
6.2.3	Schopnost metody odhalit pozitivní vzorek .....	47
6.2.4	Linearita metody.....	48
6.3	Výpočet ekonomické rozvahy.....	48
6.4	Klinické porovnání metody anti-MCV s jinými serologickými markery.....	49
7	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	50
7.1	Analytické vlastnosti metody.....	50
7.1.1	Mezilehlá přesnost.....	50
7.1.2	Opakovatelnost .....	50
7.1.3	Schopnost metody odhalit pozitivní výsledek.....	51
7.1.4	Linearita metody.....	52
7.2	Ekonomická rozvaha.....	52
7.2.1	Diagnostická sada ORG 548 Anti-MCV.....	52
7.2.2	Diagnostická sada od MyBioSource (Catalog # MBS268942).....	53
7.3	Klinické porovnání metody anti-MCV s jinými serologickými markery.....	55
7.3.1	Senzitivita .....	55
7.3.2	Specifičnost .....	56
7.3.3	Korelace anti-MCV s jinými serologickými markery revmatoidní artritidy.....	56
	DISKUZE.....	62
	ZÁVĚR.....	66
	SEZNAM LITERATURY.....	67
	SEZNAM PŘÍLOH .....	73
	PŘÍLOHY .....	74
	Příloha 1 – Povolení sběru informací ve FN Plzeň .....	74

## SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Korelace mezi anti-MCV a anti-CCP.....	57
Graf č. 2: Korelace mezi anti-MCV a RF.....	58
Graf č. 3: Korelace mezi anti-MCV a RF IgG .....	59
Graf č. 4: Korelace mezi anti-MCV a RF IgA .....	60
Graf č. 5: Korelace mezi anti-MCV a RF IgM.....	61

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklad pipetovacího schématu.....	46
Tabulka 2: Koncentrace roztoku pozitivní kontroly v čase.....	50
Tabulka 3: Parametry mezilehlé přesnosti .....	50
Tabulka 4: Koncentrace roztoku při testování opakovatelnosti .....	51
Tabulka 5: Parametry opakovatelnosti .....	51
Tabulka 6: Schopnost metody odhalit pozitivní výsledek.....	51
Tabulka 7: Linearita metody.....	52
Tabulka 8: Ekonomické náklady za stanovení určitého počtu vzorků .....	53
Tabulka 9: Ekonomické náklady za stanovení určitého počtu vzorků .....	54
Tabulka 10: Senzitivita serologických markerů .....	55
Tabulka 11: Senzitivita serologických markerů pacientů se séropozitivní revmatoidní artritidou .....	55
Tabulka 12: Specifičnost serologických markerů .....	56

## SEZNAM ZKRATEK

ACPA .....	anti-citrullinated peptide antibodies
ANA .....	antinukleární protilátky
anti ds-DNA.....	protilátky proti deoxyribonukleové dvouvláknové kyselině
anti-CCP .....	anti-cyclic citrullinated peptide
anti-MCV.....	protilátky proti mutovanému citrulinovanému vimentinu
anti-Sm .....	autoprotilátka proti Sm antigenu
APC .....	antigen prezentující buňka
ASLO.....	anti-streptolysin O
CCL2 .....	chemokinový (C-C) ligand 2
CD.....	the cluster of differentiation
COX.....	cyklooxygenáza
CRP.....	c-reaktivní protein
DMD.....	disease modifying drugs
DNA .....	deoxyribonukleová kyselina
ELISA.....	enzyme-linked immunosorbent assay
FLS .....	synovioblastům podobné fibroblasty
FOXP3 .....	forkhead box P3 (transkripční faktor)
HCV.....	virus hepatitidy C
HIV .....	human immunodeficiency virus
HLA .....	human leukocyte antigen
Ig .....	imunoglobulin

IL ..... interleukin

ILC..... innate lymphoid cells

INF..... interferon

kol. .... kolektiv

MHC..... major histocompatibility complex

MLS ..... synoviocytům podobné makrofágy

MMP..... matrix metalloproteinases

PAD ..... peptidyl arginin deimináza

RA..... revmatoidní artritida

RF ..... revmatoidní faktor

RUO..... research use only

s.r.o. .... společnost s ručením omezeným

SLO..... streptolysin O

VEGF..... vaskulární endoteliární růstový faktor

## ÚVOD

Autoimunitní onemocnění jsou rozsáhlou skupinou nemocí, při kterých organismus napadá své vlastní tkáně a orgány. Jedním z nejčastějších onemocnění, patřící do této skupiny, je revmatoidní artritida. Při tomto onemocnění se klade důraz na časnou diagnostiku, díky které může lékař začít s brzkou léčbou.

V imunologických laboratořích se při diagnostice revmatoidní artritidy můžeme setkat se stanovením RF a anti-CCP. Toto jsou poměrně dobré serologické markery, které ale nedokáží odhalit nemocného v dostatečném předstihu počátku onemocnění. Od toho by měl sloužit nově zaváděný serologický marker anti-MCV, který by měl být schopný odhalit nemocného již v časně fázi onemocnění.

V teoretické části bakalářské práce se zabývám autoimunitními onemocněními obecně, tedy jejich vznikem, faktory, které je způsobují a jejich dělením. Následně se zabývám revmatoidní artritidou, kde popisuji toto onemocnění, jeho patogenezi a částečně i jeho terapii. Poslední část teorie je o samotných serologických markerech RF, anti-CCP a anti-MCV.

V praktické části mé bakalářské práce se zabývám postupy, které jsou nutné v laboratoři provést, aby se metoda mohla využívat v běžné praxi. V laboratoři Ústavu imunologie a alergologie ve FN Plzeň využívají na stanovení anti-MCV diagnostickou sadu od výrobce ORGENTEC Diagnostika GmbH. Tuto diagnostickou sadu jsem porovnála z ekonomického hlediska i s jinou dostupnou diagnostickou sadou. Na závěr se v této části bakalářské práce nachází porovnání senzitivit a specifit stanovení jednotlivých serologických markerů (RF v různých třídách imunoglobulinů, anti-CCP a anti-MCV), a nakonec porovnání korelací mezi anti-MCV a těmito ostatními markery.

Diskuze je věnována zhodnocením výsledků bakalářské práce a porovnáním výsledků s odbornými články od různých autorů.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ

### 1.1 Autotolerance a autoimunita

Jedním ze základních homeostatických mechanismů je schopnost imunitního systému rozeznat neškodné antigeny od nebezpečných, které mohou poškodit organismus. Tyto antigeny mohou být z vnějšího prostředí, tedy exoantigeny, nebo z organismu samotného, které nazýváme endoantigeny. Imunitní systém fyziologicky rozeznává vlastní buňky a udržuje toleranci vůči nim. Tento proces se nazývá autotolerance. Pokud imunitní systém začne reagovat a poškozovat vlastní tkáň, hovoříme o autoimunitě. (1)

Autoimunita je tedy stav, kdy selžou mechanismy autotolerance. T a B-lymfocyty následně začnou poškozovat vlastní tkáň. Nemoci způsobené autoimunitou se nazývají autoimunitní onemocnění. (2) Tyto antigeny, proti kterým je imunitní systém namířen, nazýváme autoantigeny. (3)

### 1.2 Autoimunitní reakce

Autoimunitní reakce mohou být buněčného nebo humorálního typu. V případě humorálního typu se uplatňují imunopatologické reakce II. a III. typu. Při buněčném typu autoimunitní reakce se jedná o imunopatologickou reakci IV. typu. (1)

Při imunopatologických reakcích II. typu se uplatňují cytotoxické protilátky. Reakce je namířena proti autoantigenům, které jsou přítomné v určité tkáni nebo buněčné linii. Tento typ je zejména u orgánově specifických autoimunitních onemocnění. (1)

U autoimunitních onemocnění způsobenými imunopatologickými reakcemi III. typu dochází k tvorbě autoprotiátky typu IgG, která se váže na autoantigen. Dochází tak k tvorbě imunokomplexů. Ty se následně vážou na Fc receptory fagocytů, především neutrofilů nebo mohou aktivovat komplement. Při reakci mají pomocnou úlohu i žírné buňky. Vzniká zánět, který kvůli přetrvávání autoantigeny v těle přechází do chronického stavu. (1)

Imunopatologické reakce IV. typu jsou způsobeny  $CD4^+$  T-lymfocyty, které aktivují makrofágy nebo  $CD8^+$  T-lymfocyty. (1; 3)



### 1.3 Vznik autoimunitních onemocnění

Autoimunitní onemocnění vznikají jako důsledek selhání mechanismů tolerance. (1) Základní otázkou je, z jakého důvodu autotolerance selhává. Znalost odpovědi na tuto otázku by nám mohlo pomoci odhalit příčinu vzniku a patogenezi různých autoimunitních onemocnění. Vědomosti o autoimunitních onemocněních se zlepšili v posledních dvou dekadách, hlavně díky zvířecím modelům a odhalením genů predisponující jedince k autoimunitě. (2)

Faktory, které se uplatňují při rozvoji těchto onemocnění dělíme na vnitřní faktory a faktory vnějšího prostředí. (1)

### 1.4 Vnitřní faktory

#### 1.4.1 Dědičnost

O tom, že se uplatňují genetické faktory není pochyb. Tomu svědčí například vyšší výskyt téhož autoimunitního onemocnění v rodinách. Po objevu lidského genomu mohli být určeny geny, které se častěji vyskytují s různými autoimunitními chorobami. U některých autoimunitních onemocnění se pro jejich rozvoj uplatňují polymorfismy více než jednoho genu. To způsobuje problém s diagnostikou a zvyšuje obtížnost studie těchto chorob. (4)

Po vytvoření rodokmenu můžeme sledovat vyšší akumulaci různých autoimunitních onemocnění v jednotlivých rodinách. I u zdravých příslušníků těchto rodin můžeme v krvi nalézt autoprotilátky. Tito lidé ale nemusí nikdy onemocnět, kvůli například různým protektivním genům (to znamená, že mají jiné geny, které je chrání proti onemocnění). Většinou to tak ale není. Pacienti s autoprotilátkami v krvi mají vyšší riziko rozvinutí autoimunitního onemocnění než lidé bez nich. Je proto třeba, aby tito pacienti byli kvůli svému zvýšenému riziku pozorováni lékaři a případný výskyt onemocnění se zachytil co nejdříve. (4)

Další důkaz o dědičnosti autoimunitních onemocnění můžeme získat při sledování jednovaječných dvojčat, tedy osob, které mají stejné geny. Výzkumy, pozorující různá autoimunitní onemocnění, vedly k závěru, že se u těchto jednovaječných dvojčat vyskytují stejná autoimunitní onemocnění asi v 20 až 50 % případů. V případě, kdyby autoimunitní choroby měly čistě genetický výskyt, byla by frekvence onemocnění u jednovaječných dvojčat 100%, což tak ale není. Z toho se dá vyvodit, že pro vznik autoimunitních onemocnění je potřeba i dalších faktorů než jen těch genetických. (4)

Geny, které mají největší asociaci s autoimunitami, jsou geny pro MHC skupiny. Pro spoustu autoimunitních onemocnění, jako je například diabetes mellitus I. typu, je identifikováno více než 20 s onemocněním asociovaných genů, ale HLA lokus přispívá k onemocnění více než ostatní geny. Toto platí i u jiných autoimunitních onemocnění, kdy HLA lokusy, oproti ostatním asociovaným genům, přispívají více jak z poloviny k citlivosti k těmto onemocněním. Díky HLA otypování osob s různými autoimunitními onemocněními a bez nich se zjistilo, že u nemocných lidí se vyskytuje vyšší frekvence některých alel, než je v jinak zdravé populaci. Díky tomu dnes můžeme vypočítat relativní riziko rozvoje autoimunity u lidí s různými HLA znaky. Nejznámější je asociace HLA B27 s Bechtěrevovou nemocí s relativním rizikem až 87,4 %. (2)

#### **1.4.2 Hormonální příčiny**

Epidemiologické studie nám ukazují skutečnost, že ženy trpí autoimunitními onemocněními častěji než muži. Tento fakt je částečně dán tím, že ženám chybí některé protektivní faktory přítomné na chromozomu Y. I přesto největší roli v nerovnosti četností hrají hormonální rozdíly mezi pohlavími. Hormony jsou sami o sobě ovlivňovány vnějším prostředím, kvůli čemuž musíme myslet a dávat je do souvislosti s ostatními vlivy. Dle statistik, vzniká nejvíce autoimunitních chorob v reprodukčním věku, díky čemuž je zřejmé, že estrogény mají velkou roli v rozvoji autoimunit. Z experimentů na zvířatech se zjistilo, že odstranění vaječníků zabraňovalo rozvoji autoimunitních onemocnění. Naopak estrogen vznik autoimunitních nemocí urychloval. (3)

Estrogen zvyšuje efektivitu imunitního systému, díky čemuž jsou ženy oproti mužům odolnější proti infekcím. Tento silnější imunitní systém má ale nevýhodu toho, že jeho vlivem častěji vznikají autoimunitní onemocnění. (4)

Dalším takovým hormonem ovlivňující vznik autoimunitních chorob je prolaktin. Ten má imunostimulační účinky, na které reagují především T-lymfocyty. Hladiny prolaktinu se zvyšují především po porodu, což má nejspíše vztah s tím, že se mnoho autoimunitních onemocnění objeví právě v tomto období. (3)

### **1.5 Vnější faktory**

Díky různým poznatkům v dnešní době není pochyb, že spouštěcím mechanismem autoimunitních chorob jsou i různé vnější faktory. Ty jsou zodpovědné za to, proč se onemocnění vyskytne právě v určitém čase života, za typ onemocnění, i za jeho klinické projevy. (4)

### 1.5.1 Infekce

Virové a bakteriální infekce přispívají k rozvoji a zhoršení autoimunitních chorob. Často se u lidí, a i na zvířecích modelech autoimunitní onemocnění vyskytnou v souvislosti s infekcí, nebo jim někdy infekce předcházela. Ve většině případů infekční mikroorganismus není přítomen v lézi, a ani není již detekovatelný u člověka s rozvinutým autoimunitním onemocněním. To nám svědčí o tom, že se tato onemocnění nerozvinula kvůli infekci samotné, ale kvůli imunitní odpovědi organismu, která může být spuštěná nebo dysregulována těmito patogeny. (2)

Infekce určitých tkání mohou vyvolat lokální imunitní odpověď. Do této poškozené tkáně dochází k verbování leukocytů a aktivaci APC buněk, které začnou produkovat větší množství kostimulačních molekul a cytokinů aktivující T-lymfocyty. (2) To se dále projevuje změnou štěpení a prezentací vlastních antigenů T-lymfocytům. (3) Tato reakce vede k porušení T buněčné tolerance. T-lymfocyty aktivované touto infekcí jsou specifické nejen pro patogen vyvolávající infekci, ale i pro prezentovaný autoantigen. (2)

Další fenomén, při kterém vznikají autoimunitní onemocnění, jsou molekulární mimikry. Ty vznikají v případech, že infekční mikroorganismus má antigeny, které jsou podobné určitým antigenům vlastního těla. (3) Příkladem cross-reakce mezi autoantigenem a mikroorganismem je revmatická horečka. (2) Ta může vzniknout po infekci streptokoky, produkující SLO (streptolysin O), který je produkován téměř všemi pyogenními kmeny. 3 až 6 týdnů po infekci následně stoupá ASLO (antistreptolysin O), který nemá význam kvůli jeho dynamice stanovovat k průkazu streptokokové infekce. Titr těchto protilátek má smysl stanovovat pouze při podezření na akutní revmatickou horečku. (5) ASLO protilátky zkříženě reagují s kardiomyocyty, což následně způsobuje myokarditidu. (2)

Některé epidemiologické studie na myších ukazují, že redukce určitých infekcí vede ke zvýšené četnosti diabetu mellitus I. typu a mnohočetné sklerózy. To, jak tento systém funguje není známé. (2)

### 1.5.2 Mikrobiom

Lidské tělo je bohatě osídleno symbiotickými mikroorganismy. Většina těchto mikroorganismů jsou bakterie. Tyto bakterie obývají různé části těla, jako jsou střeva, vagína nebo dutina ústní. U různých jedinců se vyskytují v jednotlivých typech orgánů různé typy bakterií v různém množství. Faktory, jako jsou například výživa, životní prostředí a genetika jedince je výsledkem této diverzity. (6)

U systémového lupusu erythematodes byla popsána změna v poměru dvou bakterií ve střevní mikroflóře. Dalším příkladem jsou změny ve střevní mikroflóře a periodontitidám, které byly navrženy jako faktory v patogenezi revmatoidní artritidy. Nakonec například i u systémové sklerodermie, Sjögrenově syndromu a antifosfolipidovém syndromu se nacházejí modifikace v mikrobiomu střev a dutiny ústní. (6)

### 1.5.3 Léky

Některé léky se mohou podílet na rozvoji autoimunitních onemocnění. Buďto autoimunitní proces může být vyvolaný samotným lékem, anebo imunitní reakce může vzniknout přímo na látku léčebnou, na její metabolit, nebo na komplex látky, která se naváže na vlastní molekuly nebo buňky. To se nazývá léková hypersenzitivita, která často zmizí po tom, co se lék přestane brát. Pokud ale lék již vyvolal autoimunitní proces, i po jeho vysazení onemocnění dále pokračuje. I přes to, že existují případy, kdy stačí léčivo pouze vysadit, nejčastěji je potřeba, aby se této osobě nasadila imunosupresivní léčba. Mechanismy autoimunity způsobující lékem indukované autoimunitní onemocnění, mohou být podobné molekulárním mimikrám, anebo se mohou léky samy přímo vázat na příslušnou MHC molekulu a spustit odpověď T-lymfocytů. (3)

Pouze u malé části pacientů se indukuje autoimunita při užívání určitých léčiv. Důvodem tohoto jevu mohou být určité genetické predispozice. Například variabilita genů pro MHC molekuly může vést k různým reakcím T-lymfocytu na určitý lék. Příkladem je HLA-DR2, která se spojuje s penicilaminem indukovanou myasthenií gravis, zatímco HLA-DR3 molekula je asociovaná s penicilaminem indukovanou nefritidou. (3)

Je zde dána i metabolická variabilita léků, která je mezi jednotlivci určená geneticky. Nejlépe popsána je u léky indukovaného lupusu erythematodes. (3) Je známo více jak 80 léků, schopné toto onemocnění vyvolat, například prokainamid, hydralazin, methyldopa, nebo penicilamin. Onemocnění se může objevit klidně až po několika měsících, dokonce i letech po podání léčiva, s jeho předpokládaným kumulativním efektem. Předpokládá se, že důvodem je různá rychlost acetylace, a tudíž i rozdílná rychlost odbourávání látek játry. (7)

Léky mohou způsobovat i imunomodulační či vnitřní adjuvantní efekt, který vede k poruše mechanismů autotolerance. (3) Dochází k tomu například při imunoterapii interferonem  $\alpha$ , který se využívá například při léčbě karcinomu ledvin. Jedním z nežádoucích účinků interferonu  $\alpha$  je schopnost indukovat autoimunitu. Jsou popsány indukce autoimunity u endokrinního systému, hematopoetického systému, ale i autoimunitní poškození ledvin

nebo kožní nemoci. Přibližně u 1 % pacientů léčených interferonem  $\alpha$  může dojít k autoimunitnímu onemocnění štítné žlázy. (8)

#### **1.5.4 Chemické látky**

Typickým onemocněním způsobeným chemickými látkami je systémová sklerodermie. Jedná se o závažné onemocnění, jehož přesná příčina není zcela objasněna. Lze u nemocných prokázat autoprotilátku, zasahující enzym topoizomerázu, která má za úkol dohlížet na to, že se tvoří správná struktura DNA. Toto onemocnění, které vede ke ztluštění kůže, je častější u žen než u mužů. (4) U mužů vzniká systémová sklerodermie nejčastěji ve spojitosti s jejich pracovním prostředím, při práci s chemickými látkami, indukující toto onemocnění, kterými jsou například aromatické uhlovodíky, vinyl chlorid, epoxidová pryskyřice, anebo vystavení pesticidům. (9)

#### **1.5.5 Psychika**

I stres se podílí na autoimunitě. Lidé s autoimunitními onemocněními prochází obdobími relapsu a remise. Často se stává, že před propuknutí onemocnění se člověk stresuje. (4) To, že fyzický a psychický stres má souvislost s výskytem autoimunitních onemocnění, bylo naznačeno ve spoustě studiích jak na lidech, tak i na zvířatech. Až 80 % pacientů ve spoustě retrospektivních studiích přiznalo, že byli v neobvyklém stresu před tím, než u nich onemocnění propuklo. Problémem je, že stres u pacienta může způsobit vznik autoimunitního onemocnění, což zase způsobuje větší stres a může to průběh onemocnění ještě o to zhoršit. (10)

#### **1.5.6 Transplantace**

V současné době, se mohou některé autoimunitní onemocnění léčit transplantací kostní dřeně. Tímto se často pacient zbaví onemocnění a dostane se do období dlouhodobé remise. Problémem je menší část pacientů, u kterých se vyvine jiné sekundární autoimunitní onemocnění, které může nastat za pár měsíců až let od transplantace. (11)

### **1.6 Fáze vzniku autoimunitních onemocnění**

První fáze se nazývá fáze vnímavosti. U osoby v této fázi ještě nevznikají žádné známky autoimunitní reakce, ale kvůli snížené hranici pro vznik imunitní reakce nebo porušení stavu autotolerance je tento jedinec k onemocnění predisponován. Vyšší šance ke vzniku těchto typů onemocnění můžeme například zjistit vyšetřením různých genetických faktorů, které jsou popsány výše. (1)

Následuje fáze iniciace, ve které jedinec nejeví klinické příznaky, ale v jeho těle se již odehrávají známky autoimunitní reakce. Vyvolávajícími faktory bývá celá řada vnějších faktorů. V rámci náhodného laboratorního vyšetření, například v predisponovaných rodinách, je možno odhalit přítomnost autoprotilátek v séru, někdy již mnoho let před tím, než propukne samotné onemocnění. (1)

Ve fázi propagace jsme již schopni detekovat specifický typ autoprotilátky pro určitý druh autoimunitního onemocnění. V těle nemocného dochází k poškozování buněk a tkání cílového orgánu a vzniká zánět. (1)

Při předchozí fázi se spouští regulační mechanismy, které mohou buď sami, nebo pomocí protizánětlivé nebo imunosupresivní léčby rozvoj onemocnění zastavit. Cílem léčby je udržovat tuto fázi tak, aby nedocházelo k poškozování orgánů a dalšímu rozvoji onemocnění. (1)

Dále může dojít buď k fázi rezoluce nebo progresu. K rezoluci dochází při zastavení autoimunitního procesu. Toto může vzniknout spontánně, nebo pomocí léčebných zásahů z vnějšku. Pokud ale tyto regulační mechanismy selžou, dojde k fázi progresu a k rozvoji autoimunitní reakce. Imunitní systém si začne tvořit autoprotilátky proti řadě nových autoantigenů až dojde k úplnému selhání tolerance proti cílovému orgánu nebo tkáním. Léčebně se doktoři snaží zastavit tuto progresi. (1)

Poslední fází je fáze ireverzibilního poškození. U nemocného dochází k nevratnému poškození tkáně. Pokud se jednalo o tkáň s životně důležitou funkcí, dochází ke smrti pacienta. Pokud ale člověk přežije, dochází často ke snížení až úplnému vymizení autoprotilátek a autoreaktivních klonů T-lymfocytů. Někdy se ale může stát, že se rozvine z důvodu selhání procesů tolerance autoimunitní reakce v doposud nezasazených tkání. (1)

## **1.7 Klasifikace**

Autoimunitní onemocnění můžeme přibližně rozdělit na systémová a orgánově specifická. Tato hranice ale není zcela jasná, jelikož existují autoimunitní onemocnění, které jsou na rozhraní obou těchto definic. Jedná se o orgánově lokalizovaná autoimunitní onemocnění, která se manifestují v určitém orgánu, ale jsou doprovázena výskytem protilátek, které nejsou orgánově specifické. (1)

### **1.7.1 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění**

Onemocnění, která jsou limitována pouze na jeden orgán, se nazývají orgánově specifická autoimunitní onemocnění. Autoprotilátky nebo autoreaktivní lymfocyty jsou namířené proti strukturám, které se nacházejí pouze u jedné tkáně, nebo jejím buňkám. Jednou z nejznámějších onemocnění patřící do této skupiny je jubilejní diabetes mellitus, kdy dochází k destrukci  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků. Existují i choroby, které poškozují nervovou tkáň, jako například roztroušená skleróza, která poškozuje mozek a způsobuje ochrnutí. Jinou velkou skupinou autoimunitních chorob orgánově specifických jsou cytopenie. U těchto onemocnění je autoimunitní reakce namířena proti erytrocytům, leukocytům nebo trombocytům. (4)

### **1.7.2 Systémová autoimunitní onemocnění**

Druhou skupinou jsou choroby, které postihují najednou celou řadu orgánů nebo tkání. Tuto skupinu nazýváme systémová autoimunitní onemocnění. Klasickým příkladem onemocnění v této skupině je systémový lupus erythematosus. Jedná se o multisystémové onemocnění, při kterém dochází k poškození mozku, ledvin, kůže, kloubů a dalších tkání. Příčinou tohoto onemocnění je vznik autoprotilátek proti jaderným antigenům (ANA, anti ds-DNA a anti-Sm). Dalšími onemocněními, patřícími do této skupiny je Sjögrenova choroba, Bechtěreova choroba nebo revmatoidní artritida. (4)

### **1.7.3 Orgánově lokalizovaná autoimunitní onemocnění**

Do skupiny orgánově lokalizovaných onemocnění patří choroby, na jejichž vzniku se podílejí imunopatologické mechanismy, vedoucí k poškození převážně jen jednoho orgánu. Tato onemocnění jsou ale nadále provázána řadou systémových příznaků. Do této skupiny patří například nespecifické střevní záněty, jako jsou ulcerózní kolitida nebo Crohnova nemoc, dále celiakie, autoimunitní hepatitidy a plicní fibróza. (1)

### **1.7.4 Vznik dalších autoimunitních onemocnění**

U člověka s jedním autoimunitním onemocněním, je vyšší riziko, že se u něj objeví další autoimunitní onemocnění, obvykle ve stejné skupině, do které patří jeho první. Příklad ze systémových onemocnění: člověk trpící lupusem nebo revmatoidní artritidou má větší šanci onemocnět Sjögrenovou chorobou než člověk zdravý. Stejně tak orgánově specifické autoimunitní onemocnění, kdy u člověka s vitiligem (kdy vznikají autoreaktivní klony lymfocytů a autoprotilátky proti melanocytům), můžeme současně pátrat po onemocnění štítné žlázy nebo diabetu. (4)

## 2 REVMATOIDNÍ ARTRITIDA

### 2.1 Definice

Jedná se o systémové autoimunitní onemocnění, projevující se chronickým zánětem. Jedním ze základních projevů tohoto onemocnění je infiltraci kloubního prostředí zánětlivými buňkami, hyperplazie synoviální tkáně, a nakonec postupná destrukce chrupavky s přiléhající kostí. (12) Světově má toto onemocnění prevalenci 0,5 až 1 %. V České republice je prevalence revmatoidní artritidy 0,61 %. (13)

### 2.2 Etiologie

Etiologie tohoto onemocnění není zcela známa. Předpokládá se ale, že na vzniku tohoto onemocnění se podílí řada vnějších a vnitřních faktorů. Z genetických faktorů se spojuje s nosičstvím alel HLA-DR4 nebo HLA-DR1. Tyto alely se u pacientů s revmatoidní artritidou vyskytují v 70 až 90 % případů. (12)

Při srovnání HLA-DR alel asociovaných s revmatoidní artritidou oproti těm bez asociace s touto chorobou se ukázalo, že HLA-DR alely mají typickou sekvenci aminokyselin blízko peptid-vázající oblasti DR $\beta$  řetězce. Této sekvenci se říká tzv. „sdílený epitop“. Osoba se dvěma kopiemi sdíleného epitopu má kromě vyššího rizika vzniku revmatoidní artritidy i vysoké riziko závažného průběhu onemocnění. (3)

Četnost výskytu revmatoidní artritidy u jedinců se sourozencem trpícím tímto onemocněním stoupá na 8 % a v případě jednovaječných dvojčat tato četnost stoupá až na 30 %. I přes to, že je riziko u jednovaječných dvojčat takto masivně zvýšeno, stále se onemocnění projeví pouze u menšiny, čímž se nám potvrzuje fakt, že velikou roli v rozvoji onemocnění hrají i faktory vnější. (3)

Onemocnění se vyskytuje dvakrát častěji u žen než u mužů s maximem výskytu ve věku 25 až 55 let. Rozdíl v prevalenci mezi pohlavími hrají v tomto případě roli hormony. (3)

Vliv prostředí dodnes není zcela prozkoumán. Často se dává revmatoidní artritida do souvislosti s kouřením, které se považuje za slabý rizikový faktor. (3) U člověka s HLA-DRB1 má kuřáctví silný vliv na riziko rozvoje revmatoidní artritidy. Včetně kouření, i expozice plic jiným látkám, jako je například oxid křemičitý, který může vyvolat rozvoj ACPA séropozitivní RA. (14)



Souvislost revmatoidní artritidy s infekčními onemocněními bylo testováno, ale stále neexistují důkazy o tom, že by byla iniciována nějakým konkrétním agens. (3)

U člověka s určitou kombinací vnitřních a vnějších rizikových faktorů dochází ke ztrátě tolerance a vytvoření zánětu v tkáni kloubu. Tato reakce je následně udržována setrvačností autoimunitních a cyklických pochodů, při kterých již není potřeba přítomnosti vyvolávajících faktorů. V postiženém kloubu dochází k hromadění zánětlivých buněk a k novotvorbě cév v synoviální membráně. Tímto vzniká granulační tkáň bohatě cévně zásobená, které se říká panus. Tato tkáň přerůstá přes chrupavku a kompaktu až do kostní dřeni. Nakonec dochází k destrukci chrupavky, kosti, vazů a šlach proteolytickými enzymy, které jsou tvořené buňkami panu, synoviocyty, chondrocyty a osteoklasty. (15)

## **2.3 Mechanismus patogeneze**

### **2.3.1 Synovie**

Synoviální tkáň pacientů můžeme považovat za terciární lymfoidní tkáň nebo ektopickou lymfoidní strukturu. Její struktura připomíná sekundární lymfoidní tkáň, kde dochází k diferenciaci B a T-lymfocytů. Tato terciární lymfoidní tkáň koreluje s titry autoprotilátek, množstvím zánětlivých cytokinů a se závažností onemocnění. To nám poukazuje na to, že terciární lymfoidní tkáň souvisí s přetrváváním zánětu při revmatoidní artritidě. (16)

V synovii dochází k aktivaci obou typů synoviocytů, kterými jsou synoviocytům podobné makrofágy (MLS) a synovioblastům podobné fibroblasty (FLS). Ty jsou ohromným zdrojem cytokinů a proteáz. MLS produkují prozánětlivé cytokiny, jako jsou IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ . FLS produkují kromě IL-6 i veliké množství matricových metaloproteináz a prostaglandiny s leukotrieny. (16)

Dále dochází k infiltraci synovie buňkami získané imunity. To vede k vytvoření panusu na rozhraní chrupavky a kosti. V tomto místě se vyskytují makrofágy, FLS, dendritické buňky, žírné buňky a plazmatické buňky produkující autoprotilátky. Polovinu buněk podestýlky tvoří CD4+ paměťové buňky. Ty buďto difúzně infiltrují tkáním, anebo tvoří zárodečná centra pro proliferaci B-lymfocytů. (16)

### **2.3.2 T-lymfocytární imunitní odpověď**

Díky asociaci určitých HLA lokusů s revmatoidní artritidou předpokládáme že na indukci tohoto onemocnění má vliv selekce T-lymfocytů a prezentace antigenu.

Revmatoidní artritida je převážně řízena CD4+ T-lymfocyty, což znamená, že IL-6, který tento druh buněk reguluje, je důležitým mediátorem při destrukci kosti. (16)

Dále se uplatňují Th17-lymfocyty produkující prozánětlivé cytokiny IL-17A, IL-17B a IL-22. IL-17 indukuje tvorbu dalších prozánětlivých cytokinů v chrupavce, synoviálních buňkách a makrofázích. Indukuje také tvorbu chemokinů, které slouží k náboru neutrofilů, makrofágů a lymfocytů do synovie. (16)

V zánětlivých kloubech se také vyskytuje množství Treg-lymfocytů. Ty se ale v autoimunitním zánětlivém prostředí stávají méně funkčními, nebo dokonce až patogenními. IL-1 $\beta$  a IL-6 snižují expresi FOXP3, který je hlavním regulátorem v Treg-lymfocytech, podílejících se na genové expresi, funkci a přežití tohoto subtypu. (16)

I přes množství T-lymfocytů v synovii jejich přesná role není stále známa. Cílení léčby na T-lymfocyty nebyla příliš účinná. (16)

### **2.3.3 B-lymfocytární imunitní odpověď**

Hlavní funkcí B-lymfocytů v synovii při patogenezi revmatoidní artritidy je produkce autoprotilátek, prezentace antigenů a sekrece cytokinů. (16)

Autoprotilátky jsou sekretované a produkovány B-lymfocyty po diferenciaci v plazmatické buňky. K expanzi autoreaktivních B-lymfocytů při revmatoidní artritidě nejspíše vede zkřížená reaktivita mezi některými proteiny s posttranslační modifikací a cizími antigeny. Dále dochází v B-lymfocytech k nadměrné tvorbě aktivací indukované cytidin deaminázy (AID), což je asociováno s vysokými hladinami Th-lymfocytárními cytokiny INF- $\gamma$  a IL-17. To vede ke vzniku anti-CCP a RF. (16)

### **2.3.4 Přirozená imunita při patogenezi onemocnění**

Buňky přirozené imunity jako jsou monocyty, makrofágy a dendritické buňky mají zásadní roly při iniciaci a progresy revmatoidní artritidy. Tyto buňky následně indukují získaný imunitní systém, který je důležitý v pozdějších stádiích onemocnění. (16)

Makrofágy jsou nejhojnějším druhem imunitních buněk nalézáných v postižené synovii. Makrofágy produkují převládající prozánětlivé cytokiny účastnící se patogeneze, jako jsou TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6. Další látky, které produkují jsou CCL2, IL-8 a metaloproteinázy. Klasicky aktivované makrofágy (M1) indukující erozi kloubů, vylučují hlavně prozánětlivé cytokiny. Alternativně aktivované makrofágy (M2) regulují zánět a přispívají k angiogenezi a tkáňové remodelaci. (16)

Dendritické buňky jsou schopné v závislosti na obdržených signálech vyvolat buďto toleranci nebo autoimunitu. Tyto buňky mohou podporovat rezistenci prostřednictvím různých mechanismů, jako je například generace a udržování Treg-lymfocytů. Jejich schopnost prezentovat antigen může podporovat aktivaci, anebo diferenciaci autoreaktivního klonu T-lymfocytů. V zánětlivé synovii při revmatoidní artritidě, je většina antigen prezentujících buněk právě plně diferencované dendritické buňky, které exprimují vysoké hladiny kostimulačních molekul pro T-lymfocyty a MHC I. a II. třídy. (16)

### **2.3.5 NK buňky**

Existují tři skupiny přirozených lymfoidních buněk s názvy ILC 1, ILC 2 a ILC 3. NK buňky, které patří do první skupiny, tedy ILC 1 se dále dělí do podskupin CD56dim a CD56bright. CD56bright NK buňky jsou schopné zvýšit produkci TNF, při kontaktně dependentní signalizaci CD14+ monocytu, aktivované IL-12, IL-15 nebo IL-18. (16)

ILC jsou nejčastěji buňky integrované ve tkáni. V nedávných studiích se odhalilo, že tyto buňky slouží jako spoj mezi vrozeným a adaptivním imunitním systémem, které jsou charakterizované absencí genů aktivující rekombinaci. (16)

Ve studii, zkoumající bioptické vzorky lymfatických uzlin od 12 pacientů v nejčasnější fázi revmatoidní artritidy, nebyli nalezeny rozdíly ve frekvenci celkových ILC. Pacienti s revmatoidní artritidou měli vyšší počty ILC 1 a ILC 3 v lymfatických uzlinách, než mají zdraví lidé. Díky tomuto zjištění se ukázalo, že distribuce ILC v lymfatických uzlinách se mění z normálního stavu na více zánětlivý stav během časných stádií revmatoidní artritidy. (16)

## **2.4 Klinický obraz**

Klinické projevy revmatoidní artritidy mohou být rozdílné. Pacienti mohou trpět od mírných příznaků s lehkou synovitiidou a krátkodobou ranní ztuhlostí až po těžké artritidy s rychlou destrukcí kloubních tkání a s mimokloubními příznaky. (12)

Začátek onemocnění bývá většinou plíživý a trvá několik týdnů až měsíců. Akutní postižení více kloubů najednou bývá méně časté. Současně s artritidou se objevuje ranní ztuhlost trvající až několik hodin. (12)

V počátku choroby bývá nejčastěji postižený metakarpofalangeální a radiokarpální. Dále proximální interfalangeální a metafalangeální. Z větších kloubů bývá častěji postižen

ramenní než kolenní kloub. V celém průběhu choroby se zvyšuje počet postižených kloubů, než kolik jich bylo v počátku onemocnění. (12)

Postižené klouby bývají teplejší a mají omezenou pohyblivost a jsou zvláště při pohybu bolestivé. Začíná se objevovat otok kvůli množství vzniklého výpotku, synoviálním zesílením a popraskáním měkkých tkání. (12)

Při další progresy onemocnění vedou tyto změny v kloubech k radiální rotaci karpálních kostí a ulnární deviaci prstů rukou. V závažných případech změny mohou postihnout i krční páteř, především v oblasti C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>. (12)

U déle probíhajícího či těžšího onemocnění se mohou vyskytnout mimokloubní postižení. Nejčastější bývají revmatoidní uzly s výskytem u 20 až 30 % nemocných. Jsou tvořeny nekrotickou centrální částí obklopenou palisádovitými fibroblasty, která nasedá na kolagenní tkáň. Jejich výskyt je nejčastěji v podkoží nad proximální hranou ulny. (12)

Dalším častým problémem bývá tenosynovitida v oblasti rukou a zápěstí. Jedná se o rupturu šlach, která vede k vývoji deformit. (12) Kůže při onemocnění bývá na prstech vyhlazená, lesklá a atrofická. Dalšími méně častými postiženími bývá osteoporóza, vaskulitida, plicní postižení a kardiální postižení. (15)

## **2.5 Diagnostika**

V roce 1987 byla vytvořena klasifikační kritéria, která závisela na přítomnosti polyartritidy, ranní ztuhlosti, výskyt u revmatických uzlů, revmatoidních faktorů a rentgenových změn. Toto nemohlo vyhovět konceptu časné revmatoidní artritidy, což se v dnešní době vymezuje do 3 měsíců od začátku příznaků. V roce 2010 byla vytvořena, validizována a publikována kritéria nová. Tato kritéria se jmenují ACR/EULAR 2010 při které je třeba přítomnost alespoň jednoho artritického kloubu, který nemůžeme vysvětlit jiným onemocněním. V případě splnění dalších kritérií se vypočítává bodové skóre dle tabulky. Pacient trpí revmatoidní artritidou v případě, že dosáhne skóre 6 a více. (17)

Body se přidělují ve čtyřech oblastech, kterými jsou:

- Synovitida velkých a malých kloubů.
- Sérologie, ve které je třeba odhalit přítomnost RF a ACPA.
- Trvání příznaků, které je delší než 6 týdnů.
- Reaktanty akutní fáze, jako je například CRP, který je buďto zvýšený nebo normální.

(17)

## 2.6 Prognóza

Již v časných stádiích onemocnění vzniká postižení kloubů, které je nevratné. V prvním desetiletí se kolem 70 % pacientů s revmatoidní artritidou setkává s mnoha relapsy a remisemi. Samotné remise netrvají ve většině případů příliš dlouho. Pět let po stanovení diagnózy třetina těchto lidí již není schopna pracovat. Někteří pacienti s těžkou formou jsou po 10 letech kvůli progresi onemocnění odkázáni na péči okolí. (3)

Onemocnění je spojováno se zvýšenou mortalitou, kdy se délka života zkracuje přibližně o 7 let v porovnání se stejnou věkovou skupinou a stejným pohlavím. Příčina úmrtí pacientů není často způsobena artritidou samotnou, ale mimokloubními komplikacemi, jako jsou plicní fibróza, vaskulitida, amyloidóza. Někdy může pacient zemřít na nežádoucí následky způsobené léčbou revmatoidní artritidy. (3)

Na vysoké mortalitě těchto pacientů má největší podíl ischemická choroba srdeční. Úmrtnost je u těchto pacientů dvakrát až třikrát častější. Zvýšená úmrtnost z této příčiny je ale problémem i u jiných autoimunitních onemocnění, jako je třeba například systémový lupus erythematoses nebo diabetes mellitus. (3)

## 2.7 Terapie

Vyléčit osobu s revmatoidní artritidou není úplně možné. Pouze se dosahuje různě dlouhých remisí. Terapeutické cíle při terapii revmatoidní artritidy jsou:

- 1) Snížení bolesti
- 2) Potlačení zánětu, který je prokazatelný hladinou CRP a nepřítomností oteklých kloubů
- 3) Zvládnutí každodenních aktivit
- 4) Udržet maximální kvalitu života (18)

Osobě, u které je revmatoidní artritida v akutním stavu, se doporučuje několikadenní klid na lůžku. V této chvíli je vhodné přes postižené klouby dát dlahy, které zabrání tvorbě deformit a uleví od bolesti. Lidé s revmatoidní artritidou by měli denně cvičit, za účelem potlačení bolesti, k odstranění ztuhlosti kloubů a obnovení pohyblivosti. (12)

Dále se v terapii využívá léčení léky neboli farmakoterapie. Léčba revmatoidní artritidy by měla zahrnovat, kromě režimových opatření a rehabilitací, také léky modifikující průběh choroby, glukokortikoidy, biologické léky a nesteroidní antirevmatika (NSA). (15)

NSA účinkují protizánětlivě, antipyreticky, analgeticky a mají dekontrakční účinek. Tyto léčiva inhibují enzym cyklooxygenázu (COX), který se uplatňuje při přeměně kyseliny arachidonové na zánětlivé prostaglandiny. Do NSA spadá spousta léků s různým chemickým složením, které se liší délkou biologického poločasu a vedlejšími účinky. Těmito léky jsou například diclofenac, ibuprofen, flurbiprofen, naproxen a další. Vedlejšími účinky těchto léků bývají renální a gastrointestinální toxicita. Ty jsou způsobené tím, že velká část starých nesteroidních antirevmatik má vlastnost neselektivní inhibice izoform COX 1 a COX 2. Kvůli tomu se při vývoji nových léků zaměřilo na objevení látek, které by cílily hlavně na COX 2. (18) Takovou novou skupinou léků jsou koxiby, které specificky inhibují COX 2, díky čemuž vzniká méně nežádoucích účinků na GIT. Na druhou stranu ale koxiby u pacientů zvyšují kardiovaskulární riziko. Proto se jich většina již přestala prodávat. V současnosti se využívá hlavně už jen celecoxib. (12)

Léky modifikující průběh choroby, jejichž zkratka vychází z anglického názvu Disease Modifying Drugs (DMD), nejsou léčivem první volby, ale jejich časná indikace může výrazně zmírnit průběh onemocnění. (18) DMD je možné kombinovat. Podávání by mělo být dlouhodobé, po několik let. Nejznámějším lékem v této skupině je metotrexát, který se podává jedenkrát týdně. (12)

Při akutních projevech revmatoidní artritidy se začínají podávat glukokortikoidy do nástupu účinku DMD. V posledních studiích se ukazuje, že v malých dávkách zpomalují rentgenovou progresi onemocnění a mají sami modifikující efekt. Velké dávky se používají jen na přechodnou dobu. (15)

Biologická léčba je v dnešní době nejúčinnější v léčbě revmatoidní artritidy. Dokáže zpomalit, nebo dokonce úplně zastavit postup onemocnění, díky cílené inhibici TNF- $\alpha$ . Mezi užívaná léčiva patří infliximab (chimérická monoklonální Ig proti TNF- $\alpha$ ), adalimumab

(plně humální monoklonální protilátka proti TNF- $\alpha$ ) nebo etanercept (solubilní receptor pro TNF). (12)

Intraartikulární terapií je nazýván proces, kdy se vpravují depotní formy kortikosteroidů do kloubů, což má významný protizánětlivý účinek, který je často přechodný, ale přetrvává až několik měsíců. Problém při opakovaném podávání (více jak čtyřikrát ročně) se může projevit katabolický efekt glukokortikoidů, což může vést k místním destrukcím. (12)

Chirurgická terapie zahrnuje dva výkony: synovektomie, při které se odstraňuje velká část zanícené kloubní výstelky, anebo se provádí totální náhrada kloubů. To se provádí především při postižení kyčelních a kolenních kloubů. V některých případech je třeba provést artrodézu, při které se fixuje kloub ve vhodné poloze, díky čemuž dojde k odstranění bolesti. (12)

## 3 STANOVOVANÉ PROTILÁTKY PŘI REVMATOIDNÍ ARTRITIDĚ

### 3.1 Revmatoidní faktor (RF)

Jedná se o skupinu imunoglobulinů, různých izotypů a afinity. (19) RF v těle fungují jako autoprottilátky, namířené proti Fc fragmentu pozměněného IgG. RF se může v těle vyskytovat ve všech třídách imunoglobulinů (IgM, IgG, IgA, IgD a IgE). (20)

V roce 1922 byly Kurtem Myersem, poprvé pozorovány tyto prottilátky u pacientů s jaterní cirhózou a chronickou bronchitidou. (19; 21) V prosinci roku 1940, norský doktor Erik Waaler pozoroval aglutinaci ovčích červených krvinek senzibilizovanými králičími prottilátkami při přidání séra pacientům s revmatoidní artritidou. (21) Později byl tento jev nezávisle znovuobjeven Harrym M. Rosem a kol. roku 1948. (22) Jméno „revmatoidní faktor“ bylo pro tuto prottilátku vybráno, kvůli její přítomnosti u pacientů s revmatoidní artritidou. Díky jejich názvu by nám mohlo připadat, že se jedná o specifické prottilátky pouze pro toto onemocnění, což tak ale není. RF může být pozitivní i v séru lidí s jinými autoimunitními onemocněními, neautoimunitními onemocněními, ale i u zdravých lidí. (19)

K produkci RF je potřeba stimulace imunitního systému faktory, jako jsou bakteriální lipopolysacharidy nebo virové antigeny. Stejně tak je jejich tvorba vyvolaná i autoantigeny a imunitními komplexy. RF má roli při aglutinaci, fagocytóze a odstraňování imunitních komplexů. Díky tomu by produkce RF mohla být považována za fyziologický jev. Přechodně v těle pacientů s některými infekcemi, ale i u zdravých lidí, se může vyskytovat RF s nízkou afinitou k Fc fragmentům imunoglobulinů. Vysokoafinitní RF vzniká jako produkt CD 5+ B-lymfocytů, při chronické stimulaci imunitního systému. Tyto vysoko afinitní RF fungují jako kryoglobulin, který zvyšuje koagulaci. (21)

#### 3.1.1 RF u zdravých pacientů

Pozitivita RF je stanovena až u 4 % zdravých mladých bělochů, s přibližně stejnou distribucí mezi oběma pohlavími. Jsou zde ale dány určité genetické a enviromentální faktory, které mění množství zdravých lidí s pozitivním RF. Například u domorodých indiánů bylo pozorováno až 30 % zdravé populace s pozitivním RF.

Prottilátky u zdravých lidí jsou rozdílné než u pacientů s RA. Jejich titer je docela nízký a jsou málo afinitní. Bylo ale zjištěno, že vysoká koncentrace RF u zdravých lidí předpovídá možný vznik revmatoidní artritidy v budoucnosti. Prottilátky RF-IgM jsou občas



pozorovány u zdravých lidí vyššího věku, což by mohl být následek věkem podmíněné dysregulace imunitního systému. (19)

### **3.1.2 RF u nerevmatických onemocnění**

Tato protilátka může být detekovaná i u pacientů bez revmatických problémů. Je známé, že chronické virové infekce, zvláště takové, které cílí na B-lymfocyty, jako je například virus Epstein-Barrové, vede k produkci RF. Ten je ale odlišný od toho nalézaného u pacientů s revmatoidní artritidou. (19)

Kromě virových infekcí, se RF vyskytuje i u pacientů s bakteriálními, ale dokonce i s parazitárními infekcemi. Protilátky při těchto stavech jsou přechodné a nepoškozují osobu, která je má ve svém těle. Jedná se o nízko afinitní, polyreaktivní IgM protilátky, produkované B-lymfocyty. Ukazuje se, že RF u lidí s těmito problémy může být protektivní. B-lymfocyty produkující RF se mohou chovat jako antigen prezentující buňky a pomáhat při imunitní odpovědi proti infekčnímu agens. (19)

Pozitivní RF můžeme nalézt u 40 až 70 % pacientů s HCV a 10 až 20 % pacientů s HIV. Z bakteriálních infekcí se najde pozitivní RF u 40 % pacientů se subakutní bakteriální endokarditidy a přibližně 15 % pacientů s tuberkulózou. Z parazitárních infekcí se často vyskytuje pozitivní RF třeba v případě Chagasovy choroby u 15 až 25 % pacientů anebo malárie u 15 až 18 %. (19)

### **3.1.3 RF u pacientů s autoimunitními onemocněními**

Lidé se systémovými autoimunitními onemocněními, jako je například systémový lupus erythematoses, mohou mít často detekovatelnou hladinu RF. U tohoto onemocnění je frekvence výskytu RF 15 až 35 %. Kolem 60 % pacientů s primárním Sjögrenovým syndromem mají pozitivní RF s tím, že muži mívají vyšší hladinu RF-IgA než ženy. (19)

### **3.1.4 RF u pacientů s revmatoidní artritidou**

Jak již bylo popsáno, RF se nachází i u pacientů s jinými onemocněními pojivové tkáně. Pro potvrzení diagnózy revmatoidní artritidy musíme přihlížet na přítomnost příznaků onemocnění a v případě jejich přítomnosti je potřeba testovat i jiné serologické markery, například ACPA. Test mívá senzitivitu kolem 60 až 90 % a 85% specifitnost. (19)

Různé izotypy RF jsou nápomocné k diagnostice a k rozhodnutí o léčbě. Dokáží nám předpovědět začátek onemocnění, podat informace o prognóze a předpovědět odpověď na léky. Bylo vytvořeno mnoho hypotéz pro vysvětlení role RF při revmatoidní artritidě, včetně

důvodu, proč zvyšují eliminaci imunitních komplexů makrofágy, z jakých důvodů zlepšují cytotoxicitu antivirových protilátek, a i jejich schopnost zvyšující eliminaci parazitů. Jednou hypotézou je to, že RF zesiluje prezentaci antigenů T-lymfocytům, díky množství imunitních komplexů s exogenními antigeny přijatými dendritickými buňkami. Nakonec je také možné, že sekrece nízké afinitních RF zastavuje tvorbu vysoce afinitních RF B-lymfocytů. (19)

### **3.1.5 Role RF při diagnostice revmatoidní artritidy**

RF má zásadní roli při diferenciaci diagnostice polyartritidy, která se typicky vyskytuje u pacientů s revmatoidní artritidou. Proto se RF stal v roce 1987 jedním z klasifikačních kritérií pro diagnostiku tohoto onemocnění. Pro zvýšení specifčnosti se v poslední době ke klasifikaci přidalo stanovení protilátky anti-CCP. (19)

## **3.2 ACPA**

Koncept o ACPA (anti-citrullinated protein/peptide antibodies) byl poprvé vytvořen ve chvíli, kdy byly citrulinované epitopy určeny jako společný znak, který je rozeznáván anti-perinukleárním faktorem a antikeratinovou autoprotilátkou. Přišlo se na to, že ACPA je možná detekovat v časném stádiu onemocnění revmatoidní artritidy. Od té doby vzniklo velké množství výzkumů popisujících diagnostický význam stanovení ACPA. V dnešní době existuje mnoho ACPA testů. Nejužívanější v dnešní době je cyklický citrulinovaný peptid 2. generace (CCP2). (23) Kromě anti-CCP testů mezi ACPA patří i test anti-MCV, nebo protilátka proti centriolinu (anti-CEP-1) a další. (24)

ACPA je tedy koncept sjednocující reaktivitu cílící na citrulinované peptidy fibrinogenu, alfa-1 enolázy, vimentinu, filagrinu a histonů, kdy se užívá anti-CCP, který odráží přítomnost smíšených autoprotilátek proti cyklickým citrulinovaným peptidům. (25)

## **3.3 Anti-CCP**

V roce 1964, Nienhuis a kol. detekovali nepřímým imunofluorescenčním testem na buňkách bukové sliznice anti-perinukleární faktor, který byl přítomný až u 90 % pacientů s revmatoidní artritidou s 73 až 99 % specifčností. Později Young a kol. detekovali antikeratinové autoprotilátky použitím nepřímého imunofluorescenčního testu na kryosektovaných krysích játrech. Tento test měl také vysokou specifčností 88 až 99 % se senzitivitou 36 až 59 % u pacientů s RA. Tyto testy i přes své vysoké specifčnosti nikdy nebyly příliš užívány, kvůli jejich obtížné standardizaci přírodních substrátů a nedokonalé interpretaci výsledků. (26)

Roku 1995 Sebbag zjistil, že obě výše zmíněné protilátky, patří do skupiny autoantigenů namířených proti citrulinovanému fillagrinu, což je protein v epiteliálních buňkách. Citrulinizace je posttranslační modifikací, kdy se enzym peptidyl arginin deimináza (PAD) účastní přeměny argininu na citrulin. Tento proces probíhá v těle přirozeně při zánětech, apoptóze a keratinizaci. Fillagrin není sám přítomen v synoviu, ale jiné citrulinizované proteiny ano. V synoviu pacientů s revmatoidní artritidou se nachází například fibrinogen a fibronektin, ale i jiné citrulinizované epitopy v kloubech byly identifikovány jako cíl autoprotilátek. (26)

Nakonec v roce 1998 Schellekens vytvořil lineární citrulinizované peptidy z lidského fillagrinu, které lze snadno detekovat metodou ELISA. Pro zlepšení složení antigenu a vylepšení schopnosti protilátek rozeznat tento antigen, byl vyvinut cyklický citrulinovaný peptid (CCP). (26)

První komerčně dostupný test ACPA, byl ELISA test využívající 1. generaci CCP (CCP1). (26) Později se vytvořila 2. generace CCP (CCP2), která má větší sensitivitu než CCP1. (27) Později ještě došlo k vytvoření 3. generace CCP (CCP3). Tento test měl oproti starší generaci ve stejné proteinové struktuře další citrulinované epitopy. CCP2 a CCP3 jsou si svojí diagnostickou schopností podobné. CCP3 je dražší než CCP2 a jeho specifita je jen o něco lepší. (23)

### **3.3.1 Patogenní role anti-CCP protilátek při revmatoidní artritidě**

I přes prozkoumanou patofyziologii revmatoidní artritidy role ACPA protilátek v jejím vývoji stále není zcela objasněna. (28) U zdravých pacientů, kteří jsou ACPA pozitivní, je zvýšené riziko vzniku revmatoidní artritidy. (26) V klinických a biologických studiích vznikají velké argumenty o roli ACPA. (28) Jejich přítomnost koreluje se závažností poškození, strukturálním poškozením, radiografickými progresy a horší odpovědí na léčbu. (26) Zároveň se ukazuje na myších modelech a in vitro možný prozánětlivý efekt ACPA, který vyvolává tvorbu TNF. (28)

Anti-CCP spouští orgánové a tkáňové poškození u pacientů s revmatoidní artritidou tak, že aktivuje klasickou a alternativní cestu komplementu. CD4+ T-lymfocyty se aktivují v synoviální membráně kloubů, spouští tvorbu prozánětlivých cytokinů, které jsou tvořené aktivovanými makrofágy. Těmito cytokiny jsou například TNF- $\alpha$  a IL-6. Dochází ke stimulaci fibroblastů a následně angiogenezi způsobené vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF). Díky tomu má kloub svůj klasický vzhled pannusu. Další poškození kloubů

je způsobeno produkcí matrix metaloproteinázy (MMP) a chondrolytických enzymů. Osteoklastogeneze a kostní resorpce aktivovanými osteoklasty jsou stimulovány právě anti-CCP. Celý tento proces vede k vytvoření klasických deformit kloubů horních a dolních končetin. (29)

### **3.3.2 Relevance stanovení anti-CCP**

Přítomnost anti-CCP u pacienta vede k aktivaci cytokinů a následnému tkáňovému a orgánovému poškození. Toto poškození vede k tvorbě klasických příznaků revmatoidní artritidy, včetně bolesti, zánětu a omezené pohyblivosti postiženého kloubu. Časná detekce anti-CCP je tedy velice důležitá k brzkému zahájení léčby, která vede k menšímu poškození kloubů postižených jedinců. Je také známo, že s pozitivitou anti-CCP souvisejí i mimo-kloubní projevy, které zvyšují závažnost onemocnění. (29)

### **3.3.3 Senzitivita a specifčnost RF proti anti-CCP při diagnostice RA**

Je důležité poznamenat, že i když má pacient pozitivní autoprotilátky ACPA nebo RF, neznamena to automaticky, že trpí revmatoidní artritidou. Jelikož je revmatoidní artritida klinickou diagnózou, jsou důležité kromě laboratorních nálezů i nálezy klinické, které souvisejí s touto nemocí. (29)

Pokud je pacient pozitivní na anti-CCP a RF, je pravděpodobné, že tento pacient má skutečně revmatoidní artritidu. Zároveň je tento výsledek spojován s potenciálně agresivnějším průběhem onemocnění a horší prognózou. V případě pozitivního anti-CCP a negativního RF je pravděpodobné, že je pacient teprve v časném stádiu onemocnění, nebo to, že onemocnění u tohoto pacienta teprve vznikne. Pacient s negativními anti-CCP a RF může stále mít revmatoidní artritidu na základě zhodnocení klinických příznaků a klasifikačních kritérií. (29)

Pozitivní výsledek anti-CCP může indikovat i jiná onemocnění, než je revmatoidní artritida, například systémový lupus erythematosus nebo Sjögrenův syndrom. Toto jsou ale velice vzácné případy a nejsou nalézány konzistentně při jiných autoimunitních onemocnění. Anti-CCP je tak považována za specifický ukazatel revmatoidní artritidy. (29)

## 3.4 Anti-MCV

### 3.4.1 Historie

Despres a kol. před pár desítkami let objevili v séru pacientů s revmatoidní artritidou novou protilátku, která byla pojmenována Sa protilátka. Ta byla prvně identifikována u francozsko kanadského pacienta, podle jehož příjmení byla pojmenována (Savoie). (30) Zjistilo se, že jejich senzitivita záleží na stádiu onemocnění. Senzitivita se pohybuje v rozmezí 20 až 25 % v časných stádiích revmatoidní artritidy a kolem 47 % u pacientů s potvrzenou revmatoidní artritidou. (31)

V roce 2004 Vossenaar a kol. zjistili, že séra pacientů reagující s antigenem Sa, reagují zároveň s citrulinovanými formami vimentinu. Nejdříve získali několik peptidových sekvencí z vysoce purifikovaných přípravků obsahujících antigen Sa. Tyto peptidové sekvence byly unikátní pro vimentin, který je obsažen ve středním filamentu. (30)

Střední filamentum je rozmanitá skupina buněčných filament, které tvoří hlavní komponent cytoskeletu eukaryotních buněk. Společně s aktinovými mikrofilamenty a mikrotubuli tvoří podpůrnou jednotku, zodpovědnou za mechanickou integritu buňky. Tato jednotka je zároveň důležitá při dělení a pohybu buňky. Vimentin je důležitou součástí tohoto filamentu, který je součástí buněk mezenchymálního původu. V synovii existují dva druhy buněk, které obsahují mnoho vimentinu. Těmito buňkami jsou makrofágy podobné synoviocytům a fibroblasty podobné synoviocytům. Tyto buňky hrají důležitou roli v patofyziologii revmatoidní artritidy. (30) Vimentin se většinou in vivo v citrulinované formě nevyskytuje. Jeho citrulinizace může nastat v apoptujících makrofázích, a následně se z důvodu nedostatečného clearance apoptického materiálu s touto formou setká imunitní systém. Ten rozpoznává citrulinizovaný vimentin jako cizí a začíná proti němu tvořit protilátky. (31)

U pacientů s revmatoidní artritidou tvoří synoviální výstelku z 80 až 100 % synoviocyty podobné makrofágům, kdežto u zdravých pacientů je to 20 až 30 %. Makrofágy do synovie vede smrt buněk, na kterou jsou velice citlivé. Jejich množství v zánětlivé synovii je dále podporováno neustálým přísunem cirkulujících monocytů. Ty se v synovii následně diferencují ve zralé makrofágy. Hlavní myšlenkou Vossenaara bylo to, že potenciální přítomnost citrulinovaného vimentinu v revmatoidní synovii z něj dělá možný cíl anti-Sa protilátek. Díky technikám imunoblottingu a imunoprecipitace, dokázal prokázat, že citrulinizace je důležitá pro schopnost vimentinu chovat se jako antigen pro protilátky anti-Sa a prokázal tak, že citrulinovaný vimentin je vskutku antigen Sa. (30)

### 3.4.2 Vznik mutovaného citrulinovaného vimentinu

I přes vysokou specifickou antigenu Sa, prevalence anti-Sa protilátek byla příliš nízká na to, aby se mohla využít pro diagnostiku revmatoidní artritidy. Tým vědců v popředí s Bangem proto začaly zkoumat, jak probíhá exprese vimentinu v synovii při patologických podmínkách, aby zjistily, zda se zde nenachází další modifikace vimentinu, která by ovlivnila jeho antigenicitu. Za užití hmotnostní spektrometrie purifikovaného vimentinu z lidských fibroblastů synoviální tekutiny pacientů s revmatoidní artritidou, byly identifikovány mutace v DNA pro vimentin, ve kterých byl glycin vyměněn za arginin. Byla zjištěna zvýšená reaktivita protilátek obsažených v sérech pacientů s revmatoidní artritidou proti mutovanému citrulinovanému vimentinu oproti klasickému citrulinovanému vimentinu. Zjistily tedy, že mutace vimentinu je nezávislým spouštěčem antigeních vlastností.

Díky tomuto zjištění, Bang a kol. použili *in vitro* citrulinovaný rekombinantní lidský vimentin (MCV) jako antigen v ELISA testech pro kvantitativní vyhodnocení IgG izotypu autoprotilátky proti anti-MCV v séru nebo plazmě. (30)

### 3.4.3 Diagnostická schopnost anti-MCV

Existuje mnoho studií, které se zabývaly diagnostickou schopností anti-MCV při revmatoidní artritidě. Musíme si ale uvědomit, že přesnost testu závisí na určitých faktorech, ze kterých je významný výběr pacientů a kontrolních vzorků. Zdraví jedinci v kontrolní skupině určují specifickou testu. Z nemocných jedinců potom získáváme senzitivitu testu, která se může měnit v závislosti na tom, v jaké fázi onemocnění se pacient nachází. Skutečné diagnostické vlastnosti testu získáme v případě, kdy test provedeme na populaci lidí, kteří přichází do klinické praxe s artritidou nebo jinou zánětlivou artropatií. V závislosti na studii se specifická testu pohybuje od 79 do 98 %. V testech, kde se jako kontrolní skupina využívají zdraví jedinci, byla specifická testu pro anti-MCV přes 95 %. (30)

Většina studií porovnávající anti-MCV a anti-CCP zjistila, že anti-MCV mívá o trochu větší senzitivitu, zatímco specifická mívá vyšší anti-CCP. Senzitivita testů anti-MCV a anti-CCP většinou ale není vyšší než ta RF, která je klasickým serologickým markerem revmatoidní artritidy. Studie tohoto serologického markeru ale poukázaly na to, že anti-MCV by mohlo mít význam v brzkých stádiích revmatoidní artritidy, kdy je pacient seronegativní v ostatních serologických markerech. Anti-MCV má senzitivitu u seronegativních pacientů s revmatoidní artritidou 43,8 %, což je lepší výsledek, než u anti-CCP, které má senzitivitu 30 %. Ukazuje se tedy, že test stanovení anti-MCV má právě diagnostický význam u pacientů s revmatoidní artritidou seronegativních v RF a anti-CCP. (30)

Stanovení kombinace anti-MCV s anti-CCP se ukázala jako nejefektivnější metoda při diagnostice časné revmatoidní artritidy. Přítomnost jakéhokoliv z těchto dvou serologických markerů má senzitivitu 81,2 % se specifícností v případě přítomnosti obou dvou auto-protilátek 97,8 %. (30)

#### **3.4.4 Prediktivní hodnota anti-MCV protilátek v časně fázi RA**

Jelikož počáteční fáze revmatoidní artritidy, jiných zánětlivých artritid nebo systémových zánětlivých onemocnění mají velice podobné počáteční příznaky, diferenciální diagnostika je v tomto období velice složitá. Proto možnost predikce rozvoje revmatoidní artritidy pomocí serologických markerů je zvláště v počátku tohoto onemocnění důležitá. Bylo prokázáno, že při screeningu sér pacientů před rozvojem onemocnění můžeme stanovit přítomnost anti-CCP až 14 let před klinickou manifestací revmatoidní artritidy, zatímco anti-MCV může být stanovitelná maximálně 10 let před počátkem nemoci. Anti-MCV má srovnatelně silnou prediktivní schopnost jako anti-CCP k identifikaci pacientů s nediferencovanou zánětlivou artritidou, které se rozvinou do revmatoidní artritidy v budoucnu. (30)

#### **3.4.5 Asociace anti-MCV s aktivitou onemocnění**

Kromě schopnosti rozlišení revmatoidní artritidy od jiných onemocnění v časném stádiu, by ideální serologickým marker měl dokázat i rozlišit pacienty, u kterých je potřeba začít s agresivní léčbou. Část studií nenašly žádnou korelaci mezi hodnotami anti-MCV a aktivitou onemocnění, ale většina nějakou korelaci odhalila. Ty ukazují že anti-MCV odráží aktivitu onemocnění a je v tomto směru lepším serologickým markerem než anti-CCP. (30)

Existuje také korelace mezi radiologickou progresí onemocnění a hodnotami anti-MCV. Sice je tato autoprottilátka silným indikátorem radiologické progresse, jeho prediktivní schopnost ale není lepší, než ta anti-CCP autoprottilátky. (30)

#### **3.4.6 Anti-MCV při jiných onemocnění**

Studie dedikované na diagnostickou přesnost anti-MCV při diagnostice revmatoidní artritidy poukázali na to, že jsou tyto autoprottilátky častěji přítomné u pacientů s nemocemi podobné revmatoidní artritidě, na rozdíl od anti-CCP. Frekvence positivity anti-MCV u nemocných se systematickým lupusem erythematosus je kolem 21,6 %, zatímco u anti-CCP dělá asi 9 %. Při primárním Sjögrenovo syndromu bylo anti-MCV pozitivních u 16 %, kdežto anti-CCP bylo pozitivní u 5 % pacientů. (30)

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 4 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 4.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo provést zavedení nové metody anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC Diagnostika GmbH. Pro splnění tohoto cíle bylo třeba vypočítat ekonomické náklady na provedení metody a zjistit její linearitu. Následně bylo třeba metodu validovat a verifikovat.

### 4.2 Dílčí cíle

1. Ověřit analytické vlastnosti metody.
2. Provést ekonomickou rozvahu metody anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC Diagnostika GmbH, s porovnáním diagnostické sady nakoupené od MyBioSource (Catalog # MBS268942)
3. Provést klinické porovnání metody s jinými užívanými k diagnostice revmatoidní artritidy.



## 5 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

- Je opakovatelnost metody anti-MCV ELISA vhodná pro klinické užití?
- Je mezilehlá přesnost metody anti-MCV ELISA vhodná pro klinické užití?
- Je metoda anti-MCV ELISA schopná odhalit pacienta s RA?
- Je linearita metody anti-MCV ELISA vhodná pro klinické užití?
- Vyplatí se laboratoři z ekonomického hlediska využívat metodu anti-MCV ELISA v praxi?
- Jaký je minimální počet vzorků v sérii, které se laboratoři z finančního hlediska vyplatí provádět?
- Nebylo by výhodnější v laboratoři využívat jinou diagnostickou sadu, než tu od výrobce ORGENTEC?
- Je specifčnost a senzitivita markeru anti-MCV lepší než ta ostatních serologických markerů?
- Jaká je korelace anti-MCV s ostatními serologickými markery revmatoidní artritidy?

# CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

## 5.1 Ověření analytických vlastností metody

K zjištění mezilehlé přesnosti a opakovatelnosti metody byla potřeba pozitivní kontrola z diagnostické sady anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC Diagnostika GmbH, Mainz, Germany.

## 5.2 Ekonomická rozvaha

Pro výpočet ekonomické rozvahy byla využita cena diagnostické sady anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC Diagnostika GmbH, Mainz, Germany nakoupená z webu Asco-med s.r.o.. Tuto diagnostickou sadu, která je využívána v Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň, jsem porovnála s diagnostickou sadou o podobné ceně, dostupnou z webu MyBioSource (Catalog # MBS268942).

K výpočtu dále bylo potřeba zjistit bodovou hodnotu pro tento zdravotnický výkon.

## 5.3 Porovnání anti-MCV s jinými serologickými markery

Pro zjištění korelace mezi metodou anti-MCV a jinými serologickými markery, stanovenými při revmatoidní artritidě byla využita anonymizovaná data z Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Plzni. Tato data byla získána exportem z laboratorního informačního systému z období 3. 1. 2022 až 23. 8. 2022 pro metody anti-CCP, RF, RF-IgG, RF-IgA, RF-IgM a anti-MCV. Pro můj úkol byly důležité jen výsledky vzorků, kterým byly stanoveny koncentrace všech zmíněných serologických markerů. Tomuto požadavku odpovídalo celkem 217 vzorků z toho 52 vzorků bylo od pacientů s diagnózou revmatoidní artritidy.

## 6 METODIKA PRÁCE

### 6.1 Metoda anti-MCV ORG 548 od ORGENTEC Diagnostika GmbH

Jedná se o ELISA test, který slouží k in vitro kvantitativnímu stanovení IgG třídy protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu, ve vzorcích sér nebo plazmy.

#### 6.1.1 Princip testu

Mikrotitrační destička je potažena čištěným antigenem MCV. Toto stanovení je založeno na nepřímé imunofluorescenční reakci navázaného enzymu. V pozitivních vzorcích jsou protilátky, které se navážou na antigen vázaný na povrchu jamky. V tomto místě se vytvoří komplex antigenu s protilátkou. Po proběhlé inkubaci se promyje reakční jamka k odstranění nenavázaných a nespecificky vázaných složek. Následně se přidá enzymatický konjugát, který se váže na imobilizovaný komplex antigenu s protilátkou. Po inkubaci dochází znovu k promytí jamky a odstranění nenavázaného konjugátu. Poté se přidá enzymatický substrát. V průběhu inkubace dojde k hydrolýze a vzniku zbarvení. Nakonec se přidá kyselina, která reakci zastaví a vytvoří se finální žlutý produkt. Koncentrace komplexu antigenu s protilátkou je dána intenzitou žlutého zbarvení, kterou lze fotometricky změřit při vlnové délce 450 nm.

#### 6.1.2 Součásti diagnostické sady

- Mikrotitrační destička potažená čištěným antigenem
- Kalibrátory A až F o vzrůstající koncentraci
- Pozitivní a negativní kontrola
- Vzorkový pufr
- Enzymový konjugát
- TMB substrátový roztok
- Ukončovací roztok
- Promývací pufr

#### 6.1.3 Laboratorní pomůcky potřebné k provedení metody

- Reader – čtečka mikrotitračních destiček, která je schopná měření při 450 nm
- Software schopný redukce dat

- Vícekanálový dávkovač nebo pipeta pro opakované dávkování 100  $\mu$ l
- Vortex mixér
- Mikropipety s jednorázovými špičkami na 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a 1000  $\mu$ l
- Laboratorní stopky
- Destilovaná či deionizovaná voda
- Odměrný válec na 100 ml a 1000 ml
- Plastová nádoba ke skladování promývacího roztoku

Metodu lze automatizovat na otevřených automatických přístrojích ELISA. Ve Fakultní nemoci v Plzni se na oddělení Imunologie a Alergologie využívá přístroj DS2.

#### **6.1.4 Vzorky**

K provedení metody je třeba využít sérum nebo plazmu. Krevní vzorky je nutné odbírat podle platných předpisů a je třeba s nimi zacházet jako s infekčním materiálem. Pro získání séra je nejprve potřeba krev nechat srazit a následně odstředit. Neměla by se využívat hemolytická, ikterická nebo lipemická séra. Vzorky se mohou skladovat při 2 až 8 °C až 5 dní. Při delším skladování se vzorky rozdělí na alikvotní části a skladují se při -20 °C. Je třeba se vyhnout opakovanému rozmrazování a zmrazování vzorku, jelikož to může vést ke ztrátě aktivity autoprotilátek.

#### **6.1.5 Příprava roztoků a vzorků**

- Promývací pufr se musí naředit padesátkrát destilovanou nebo deionizovanou vodou na celkový objem 1 l.
- Vzorkový pufr o objemu 20 ml je třeba naředit pětkrát na celkový objem 100 ml.
- Vzorky pacientů je nutné před použitím ředit v poměru 1:100. K tomuto poměru dojdeme smícháním 990  $\mu$ l předředěného vzorkového pufru s 10  $\mu$ l vzorku séra nebo plazmy.
- Kontrolní vzorky a kalibrátory není třeba ředit.

### 6.1.6 Postup stanovení

Je třeba si připravit dostatek jamek mikrotitrační destičky pro všechny kontrolní a ředěné vzorky.

- 1) Napipetování 100  $\mu$ l kalibračních roztoků (A, B, C, D, E, F), kontrol (pozitivní a negativní) a vzorků pacientů do jamek mikrotitrační destičky.
- 2) Inkubace 30 minut při pokojové teplotě (20 až 28 °C).
- 3) Promytí jamek mikrotitrační destičky třikrát pomocí 300  $\mu$ l promývacího roztoku.
- 4) Napipetování 100  $\mu$ l enzymového konjugátu do jamek mikrotitrační destičky.
- 5) Inkubace 15 minut při pokojové teplotě (20 až 28 °C).
- 6) Promytí jamek mikrotitrační destičky třikrát pomocí 300  $\mu$ l promývacího roztoku.
- 7) Napipetování 100  $\mu$ l TMB substrátu do jamek mikrotitrační destičky.
- 8) Inkubace 15 minut při pokojové teplotě (20 až 28 °C).
- 9) Napipetování 100  $\mu$ l ukončovacího roztoku do jamek mikrotitrační destičky.
- 10) Inkubace 5 minut při pokojové teplotě (20 až 28 °C).
- 11) Odečtení optické density při vlnové délce 450 nm a vypočtení výsledků. Vzniklá barva je stabilní minimálně po dobu 30 minut.

*Tabulka 1: Příklad pipetovacího schématu*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	Vz1										
B	B	Vz2										
C	C	Vz3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

*Zdroj: ORG 548 Anti-MCV (32)*

*Legenda:*

*A, B, C, D, E, F      Kalibrátory*

*C+, C-                Kontroly*

*Vz1, Vz2, Vz3...      Vzorky*

### **6.1.7 Validace testu**

Test je platný pouze v případě, že optická densita při vlnové délce 450 nm pro kalibrátory a kontroly odpovídá koncentračním rozsahům hodnot, dodané k diagnostické sadě. V případě, že by některá z koncentrací nebyla v uvedeném rozsahu, test není platný a je nutné stanovení opakovat.

### **6.1.8 Vlastnosti testu**

**Rozsah měření:** 0 až 1000 U/ml

**Limit detekce:** 1 U/ml

**Cut-off hodnota:** 20 U/ml.

**Negativní výsledek:** pod 20 U/ml

**Pozitivní výsledek:** nad 20 U/ml (32)

## **6.2 Analytické vlastnosti metody**

### **6.2.1 Opakovatelnost**

Pro ověření opakovatelnosti metody bylo potřeba provést stanovení jednoho vzorku o známé koncentraci osmkrát za sebou. Stanovovaným vzorkem byla pozitivní kontrola z diagnostické sady ORG 548 Anti-MCV o koncentraci 200 U/ml.

Řídila jsem se postupem, který jsem popsala v kapitole 6.1.6 Postup stanovení. V prvním bodě jsem po napipetování kalibračních a kontrolních roztoků na místo vzorků pipetovala do následujících osmi jamek mikrotitrační destičky pozitivní kontrolu. Následně jsem pokračovala podle postupu beze změny.

Pomocí čtečky mikrotitračních destiček jsem odečetla optickou densitu v jamkách. Výsledná data jsem si zapsala do tabulky a spočítala jsem požadované údaje pro ověření opakovatelnosti metody.

### **6.2.2 Mezilehlá přesnost**

Pro zjištění mezilehlé přesnosti metody bylo potřeba vždy jednou za 14 dnů stanovit koncentraci jednoho stejného vzorku. Toto stanovení jsem musela provést celkem desetkrát. Stanovovaným vzorkem byla pozitivní kontrola z diagnostické sady ORG 548 Anti-MCV o koncentraci 200 U/ml.

Zjištění koncentrace každého vzorku bylo provedeno podle postupu metody, popsaným v kapitole 6.1.6 Postup stanovení. V prvním bodě jsem po napipetování kalibračních a kontrolních roztoků využila už jen jednu jamku pro zjištění koncentrace pozitivní kontroly. Následně jsem již postupovala podle postupu beze změny.

Pomocí čtečky mikrotitračních destiček jsem dále odečetla optickou densitu v jamkách. Výsledná data jsem si zapsala do tabulky a spočítala jsem požadované údaje pro ověření mezilehlé přesnosti metody.

### **6.2.3 Schopnost metody odhalit pozitivní vzorek**

K zjištění schopnosti metody odhalit pozitivní vzorek je potřeba mít k dispozici vzorky od lidí s nemocí a bez této nemoci. Následně je třeba spočítat, v kolika procentech byla tato diagnostická sada schopná vyjít pozitivně u vzorků od nemocných lidí a u kolika vzorků od zdravých lidí vyšla naopak falešně pozitivní. Toto stanovení bylo provedeno pomocí dvanácti patientských vzorků s potvrzenou diagnózou revmatoidní artritidy a deseti vzorky od pacientů bez této diagnózy.

Řídila jsem se postupem, který jsem popsala v kapitole 6.1.6 Postup stanovení. Vzorky pacientů bylo nejprve třeba před použitím ředit v poměru 1:100. K tomuto poměru jsem došla smícháním 990  $\mu$ l předředěného vzorkového pufru s 10  $\mu$ l vzorku séra nebo plazmy. Podle postupu, jsem následně napipetovala do mikrotitrační destičky kromě kalibračních a kontrolních roztoků také 12 vzorků od pacientů s RA a 10 vzorků negativních. Poté jsem již postupovala podle postupu beze změny.

Pomocí čtečky mikrotitračních destiček jsem nakonec odečetla optickou densitu v jamkách. Výsledná data jsem si zapsala do tabulky a zjistila jsem, zda je metoda schopná odhalit pacienty s revmatoidní artritidou. Tyto výsledky jsem porovnávala s daty udávané výrobcem této diagnostické sady.

#### **6.2.4 Linearita metody**

Linearitu metody jsem ověřila tak, že jsem vzorek pacienta obsahující vysokou hladinu anti-MCV sériově zředila. Pro ověření dynamického rozsahu metody.

Pro stanovení linearitu jsem využila vysoce pozitivní vzorek, který jsem musela sériově ředit, od ředění 1:100 (toto ředění jsem vytvořila smícháním 990  $\mu$ l předředěného vzorkového pufru s 10  $\mu$ l vzorku), až do 1:12800. Tímto mi tedy vzniklo osm roztoků s různým ředěním. Dále jsem postupovala podle postupu, který jsem popsala v kapitole 6.1.6 Postup stanovení. V prvním kroku jsem do mikrotitrační destičky napipetovala 100  $\mu$ l kalibračních a kontrolních roztoků. Poté jsem do následujících osmi jamek napipetovala předem připravené roztoky o různém ředění. Další postup byl již beze změny.

Pomocí čtečky mikrotitračních destiček jsem nakonec odečetla optickou densitu v jamkách. Výsledná data jsem si zapsala do tabulky, z které jsem zjistila, zda je metoda lineární.

### **6.3 Výpočet ekonomické rozvahy**

Výpočet ekonomické rozvahy metody jsem provedla pro diagnostickou sadu anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC Diagnostika GmbH, která je využívána v laboratoři Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň. Dále jsem provedla výpočet i pro jinou diagnostickou sadu ke stanovení anti-MCV z webu MyBioSource (Catalog # MBS268942). Tyto dvě sady jsem porovnávala z ekonomického hlediska.



Výpočet jsem provedla v tabulkovém softwaru Microsoft Excel. V ekonomickém zhodnocení bylo třeba zohlednit i cenu za stanovení standardů a kalibrátorů, které je nutné udělat s každou sérií vzorků.

#### **6.4 Klinické porovnání metody anti-MCV s jinými serologickými markery**

Z dat, které mi byly poskytnuty Ústavem imunologie a alergologie FN Plzeň jsem vybrala pouze ty, které byly stanoveny ve všech potřebných metodách, tedy metodami anti-CCP, RF, RF-IgG, RF-IgA, RF-IgM a anti-MCV. Zjistila jsem, kteří z těchto pacientů trpí chorobou RA a kteří ne. Díky tomu jsem byla schopná vypočítat klinickou senzitivitu a specifčnost všech zmíněných serologických markerů.

Jako poslední jsem vytvořila grafy korelací mezi anti-MCV a jednotlivými serologickými markery v tabulkovém softwaru Microsoft Excel. Díky těmto grafům jsem rozhodla, do jaké míry anti-MCV koreluje s ostatními stanovovanými serologickými markery.

## 7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 7.1 Analytické vlastnosti metody

#### 7.1.1 Mezilehlá přesnost

Vzorek: pozitivní kontrola z ORG 548 Anti-MCV

Očekávaná hodnota: 200 U/ml

Tabulka 2: Koncentrace roztoku pozitivní kontroly v čase

Vzorek	Den:	c [U/ml]
1	1.	243,32
2	14.	227,39
3	28.	265,241
4	42.	225,451
5	56.	243,854
6	70.	222,033
7	84.	240,942
8	98.	220,707
9	112.	247,541
10	126.	193,851

Zdroj: Vlastní

Tabulka 3: Parametry mezilehlé přesnosti

AM:	233,03
SD:	19,52
CV:	8,4 %
bias:	16,50 %
n:	10
$U_{tot}$	16,70 %

Zdroj: Vlastní

Celková povolená analytická chyba  $U_{tot}$  je do 18 %. Metoda tedy vyhovuje svojí mezilehlou přesností.

#### 7.1.2 Opakovatelnost

Vzorek: pozitivní kontrola z ORG 548 Anti-MCV

Očekávaná hodnota: 200 U/ml

Tabulka 4: Koncentrace roztoku při testování opakovatelnosti

Vzorek	c [U/ml]
1	207,794
2	189,597
3	206,939
4	211,668
5	201,375
6	220,446
7	211,876
8	199,609

Zdroj: Vlastní

Tabulka 5: Parametry opakovatelnosti

AM:	206,16
SD:	9,34
CV:	4,5 %
bias:	3,1 %
n:	8
$U_{tot}$	3,50 %

Zdroj: Vlastní

Celková povolená analytická chyba  $U_{tot}$  je do 18 %. Metoda tedy vyhovuje svojí opakovatelností.

### 7.1.3 Schopnost metody odhalit pozitivní výsledek

Tabulka 6: Schopnost metody odhalit pozitivní výsledek

Studovaná populace	n	n poz.	Výsledek [%]	Oček. hodn. [%]
Revmatoidní artritida	12	10	83,3	81,2
negativní	10	0	0,0	0,4

Zdroj: Vlastní

Očekávané hodnoty dané příbalovým letákem metody ORG 548 Anti-MCV ORGENTEC Diagnostika GmbH odpovídají vlastním výsledkům stanovení.

### 7.1.4 Linearita metody

Tabulka 7: Linearita metody

Ředění	Očekávaná hodnota	Zjištěná hodnota	P/O %
1:100	1342,0	1340	100,1
1:200	671,0	669	100,3
1:400	335,5	338	99,3
1:800	167,8	165	101,7
1:1600	83,9	83,1	101,0
1:3200	41,9	40,6	103,2
1:6400	21,0	22,1	95,0
1:12800	10,5	11,6	90,5

Zdroj: Vlastní

Očekávané hodnoty odpovídají hodnotám zjištěným. Metoda je tedy lineární.

## 7.2 Ekonomická rozvaha

### 7.2.1 Diagnostická sada ORG 548 Anti-MCV

Tato diagnostická sada byla nakoupená přes web Asco-med s.r.o..

Kód stanovení: 91567

Bodové ohodnocení: 313 bodů

Hodnota jednoho bodu je kolem 1 Kč

Cena diagnostické sady: 9 529 Kč

Počet možných stanovení v jedné sadě: 96

Na každé stanovení je potřeba:

Kalibrační křivka: 6 testů

Kontroly: 2 testy

Cena jednoho testu: 99,26 Kč

Cena za provedení metody u roztoků na kalibrační křivku a kontroly: 794,08 Kč

Výdělek za vyšetřený patientský vzorek: 313,00 Kč

Tabulka 8: Ekonomické náklady za stanovení určitého počtu vzorků

Počet stanovovaných vzorků:	Cena za stanovení [Kč]	Výdělek za stanovení [Kč]	Čistý výdělek [Kč]	Čistý výdělek/cena za stanovení
1	893,34	313,00	-580,34	-0,65
2	992,60	626,00	-366,60	-0,37
3	1 091,86	939,00	-152,86	-0,14
4	1 191,13	1 252,00	60,88	0,05
5	1 290,39	1 565,00	274,61	0,21
6	1 389,65	1 878,00	488,35	0,35
7	1 488,91	2 191,00	702,09	0,47
8	1 588,17	2 504,00	915,83	0,58
9	1 687,43	2 817,00	1 129,57	0,67
10	1 786,69	3 130,00	1 343,31	0,75
11	1 885,95	3 443,00	1 557,05	0,83
12	1 985,21	3 756,00	1 770,79	0,89
13	2 084,47	4 069,00	1 984,53	0,95
14	2 183,73	4 382,00	2 198,27	1,01
15	2 282,99	4 695,00	2 412,01	1,06
16	2 382,25	5 008,00	2 625,75	1,10
17	2 481,51	5 321,00	2 839,49	1,14
18	2 580,77	5 634,00	3 053,23	1,18
19	2 680,03	5 947,00	3 266,97	1,22
20	2 779,29	6 260,00	3 480,71	1,25

Zdroj: Vlastní

V tabulce č. 8 jsem spočítala náklady a výdělek laboratoře při stanovení určitého počtu vzorků. Při výpočtu bylo třeba zohlednit potřebu stanovení kalibračních roztoků a kontrol, které je třeba provést při stanovování série vzorků o určitém počtu.

Z výpočtu jsem zjistila, že kdyby se prováděla stanovení pouze jednoho až tří vzorků v sérii, laboratoř by pouze prodělávala peníze. Až od stanovení 4 vzorků najednou laboratoř vydělá 60,88 Kč. Čím více vzorků se stanoví v sérii, tím je to pro laboratoř výnosnější.

### 7.2.2 Diagnostická sada od MyBioSource (Catalog # MBS268942)

Jedná se o kvantitativní sendvičovou metodu, jejíž výsledky se udávají v ng/ml (namísto U/ml, jak je tomu v předchozí metodě). Jedná se o RUO (Research Use Only) metodu.

Kód stanovení: 91567

Bodové ohodnocení: 313 bodů

Hodnota jednoho bodu je kolem 1 Kč

Cena diagnostické sady: 9 122,22 Kč (\$405 převedeno na Kč ke dni 1. 1. 2023)

Počet možných stanovení v jedné sadě: 96

Na každé stanovení je potřeba:

Kalibrační křivka: 8 testů

Kontroly: 0 testy

Pozn.: Kontrola je součástí kalibrační křivky, kdy se ředí standardní roztok. V první jamce bude neředitelný standard a do dalších jamek se ředí k vytvoření kalibrační křivky. V 8. jamce se nachází standardní roztok o koncentraci 0 ng/ml

Cena jednoho testu: 95,02 Kč

Cena za provedení metody u roztoků na kalibrační křivku a kontroly: 760,19 Kč

Výdělek za vyšetřený patientský vzorek: 313,00 Kč

*Tabulka 9: Ekonomické náklady za stanovení určitého počtu vzorků*

Počet stanovovaných vzorků:	Cena za stanovení [Kč]	Výdělek za stanovení [Kč]	Čistý výdělek [Kč]	Čistý výdělek/cena za stanovení
1	855,21	313,00	-542,21	-0,63
2	950,23	626,00	-324,23	-0,34
3	1 045,25	939,00	-106,25	-0,10
4	1 140,28	1 252,00	111,72	0,10
5	1 235,30	1 565,00	329,70	0,27
6	1 330,32	1 878,00	547,68	0,41
7	1 425,35	2 191,00	765,65	0,54
8	1 520,37	2 504,00	983,63	0,65
9	1 615,39	2 817,00	1 201,61	0,74
10	1 710,42	3 130,00	1 419,58	0,83
11	1 805,44	3 443,00	1 637,56	0,91
12	1 900,46	3 756,00	1 855,54	0,98
13	1 995,49	4 069,00	2 073,51	1,04
14	2 090,51	4 382,00	2 291,49	1,10
15	2 185,53	4 695,00	2 509,47	1,15
16	2 280,56	5 008,00	2 727,45	1,20
17	2 375,58	5 321,00	2 945,42	1,24
18	2 470,60	5 634,00	3 163,40	1,28
19	2 565,62	5 947,00	3 381,38	1,32
20	2 660,65	6 260,00	3 599,35	1,35

*Zdroj: Vlastní*

V porovnání s předchozí diagnostickou sadou je využívání této diagnostické sady ekonomicky výhodnější, než využívání ORG 548 Anti-MCV. Při provádění metody diagnostickou sadou od MyBioSource laboratoř také začne vydělavat od 4. vzorku. Výdělek je při využití této diagnostické sady 111,72 Kč, tedy přesně o 50,85 Kč vyšší než při využití sady první. Při odečtení čistých výdělků první diagnostické sady od čistého výdělku diagnostické sady druhé jsem zjistila, že využíváním druhé diagnostické sady by laboratoř vydělala na každý stanovený vzorek o 4,24 Kč více než při využívání sady první.

Jedním z problémů této metody by mohla být její větší pracnost, kvůli potřebě ředění standardu, což by se mohlo odrážet ve větší práci pro laboratorní pracovníky.

### 7.3 Klinické porovnání metody anti-MCV s jinými serologickými markery

#### 7.3.1 Senzitivita

Tabulka 10: Senzitivita serologických markerů

	anti-CCP	RF	RF-IgG	RF-IgA	RF-IgM	anti-MCV
Správně pozitivní	13	14	12	15	18	19
Falešně negativní	39	38	40	37	34	33
Senzitivita:	25 %	27 %	23 %	29 %	35 %	37 %

Zdroj: Vlastní

Senzitivita serologických markerů při výběru pacientů s různými druhy revmatoidní artritidy (celkem 52 pacientů) vyšla příliš nízká. V tabulce č. 11 jsem tedy vybrala pouze pacienty se séropozitivní revmatoidní artritidou (celkem 25 pacientů), čímž se senzitivita všech serologických markerů zlepšila.

Tabulka 11: Senzitivita serologických markerů pacientů se séropozitivní revmatoidní artritidou

	anti-CCP	RF	RF-IgG	RF-IgA	RF-IgM	anti-MCV
Správně pozitivní	12	13	12	15	16	13
Falešně negativní	13	12	13	10	9	12
Senzitivita:	48 %	52 %	48 %	60 %	64 %	52 %

Zdroj: Vlastní

### 7.3.2 Specifičnost

Tabulka 12: Specifičnost serologických markerů

	anti-CCP	RF	RF-IgG	RF-IgA	RF-IgM	anti-MCV
Falešně pozitivní	11	14	6	17	23	14
Správně negativní	154	151	159	148	142	151
Specifičnost	93 %	92 %	96 %	90 %	86 %	92 %

Zdroj: Vlastní

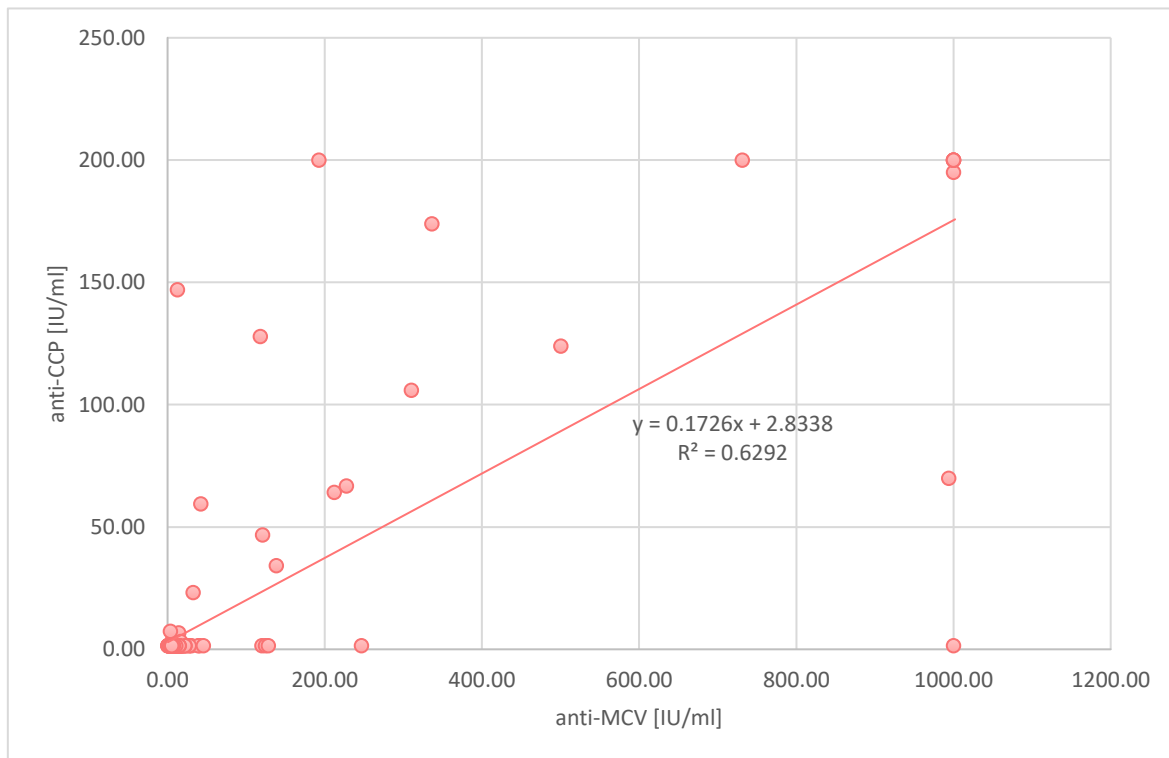
Specifičnost všech serologických markerů je dostatečně vysoká, aby byly všechny metody dostatečně dobře schopny rozlišit zdravé pacienty (tedy pacienty bez nemoci) od nemocných (tedy pacientů s RA).

### 7.3.3 Korelace anti-MCV s jinými serologickými markery revmatoidní artritidy

Z dat, které jsem obdržela jsem vybrala a vytvořila tabulku pouze z těch, jejichž vzorky byly stanovené ve všech serologických markerech. Díky této tabulce jsem následně vytvořila grafy korelací anti-MCV s ostatními jednotlivými serologickými markery.



Graf č. 1: Korelace mezi anti-MCV a anti-CCP

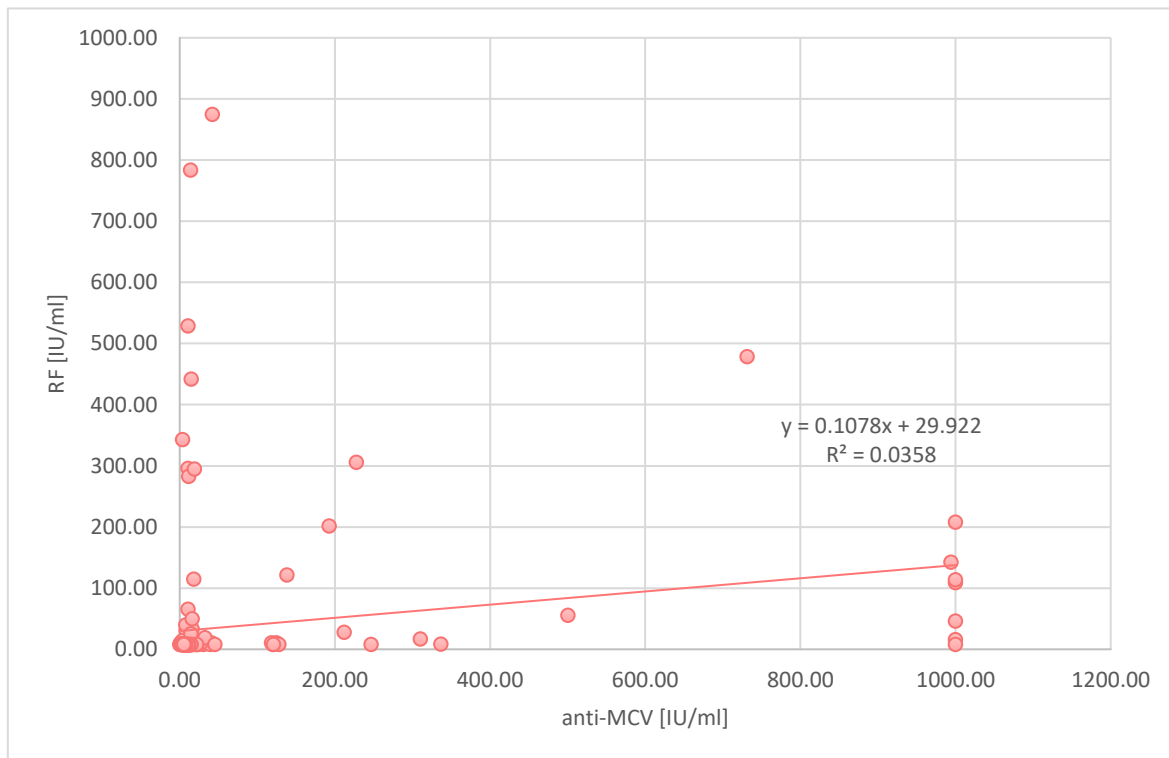


Zdroj: Vlastní

Korelace mezi markery anti-MCV a anti-CCP byla nejvyšší v porovnání s jinými serologickými markery.  $R^2$  je 62,92 %, což určuje docela vysokou korelaci.

Korelační koeficient ( $r = 0,7932$ )

Graf č. 2: Korelace mezi anti-MCV a RF



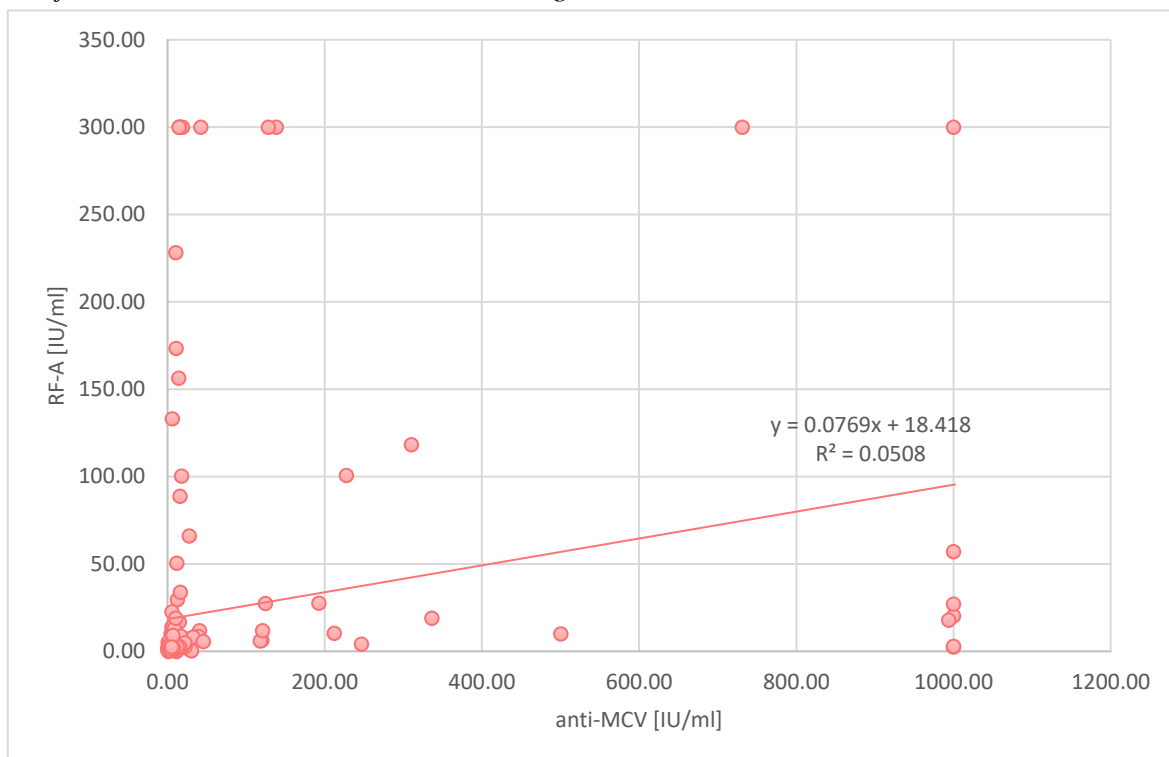
Zdroj: Vlastní

Korelace anti-MCV s RF byla nejnižší v porovnání s korelacemi anti-MCV s ostatními serologickými markery. Korelace těchto markerů je pouze 3,58 %. Anti-MCV a RF spolu téměř vůbec nekorelují.

Korelační koeficient ( $r = 0,1892$ )



Graf č. 4: Korelace mezi anti-MCV a RF-IgA

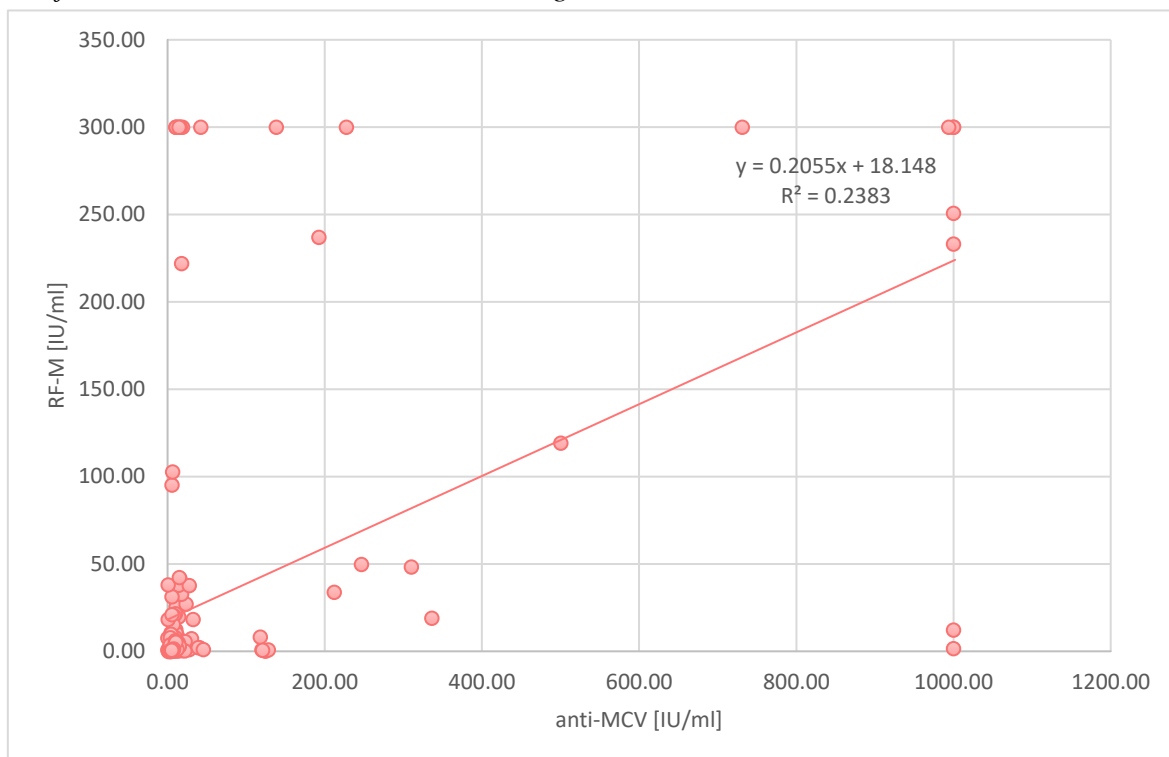


Zdroj: Vlastní

Korelace anti-MCV a serologického markeru RF-IgA je také nízká s pouhými 5,08 %. Tyto markery spolu téměř nekorelují.

Korelační koeficient ( $r = 0,2254$ )

Graf č. 5: Korelace mezi anti-MCV a RF-IgM



Zdroj: Vlastní

Korelace anti-MCV a RF-IgM je nejvyšší korelací v porovnání s ostatními třídami revmatoidních faktorů. Korelace mezi těmito serologickými markery je 23,83 %. I tak je ale korelace těchto markerů poměrně slabá.

Korelační koeficient ( $r = 0,4882$ )

## DISKUZE

Prověřila jsem diagnostickou sadu anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC Diagnostika GmbH, Mainz, Germany, pro její zavedení do běhu v klinické laboratoři.

Provedla jsem stanovení opakovatelnosti metody a mezilehlé přesnosti. Zjistila jsem, že metoda v těchto vlastnostech vyhovuje a je tudíž vhodná pro užití v klinické laboratoři.

Metoda vyhovuje i v linearitě a schopnosti rozeznat nemocné pacienty. Výsledky měření odpovídají výsledkům v příbalovém letáku metody anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC. (32)

Výpočtem ekonomické rozvahy bylo zjištěno, že by laboratoř prodělávala, kdyby prováděla stanovení méně než 4 vzorků v sérii. Při stanovení přesně 4 vzorků v sérii laboratoř dosahuje čistého zisku ve výši 60,88 Kč. Z výpočtu vyplývá, že čím více vzorků laboratoř udělá v jedné sérii, tím vyšší bude celkový zisk. Laboratoř by si měla sama určit, od kolika vzorků je pro ni ekonomicky výhodné stanovení provádět.

Při porovnání diagnostické sady Anti-MCV ELISA od výrobce ORGENTEC a té z webu MyBioSource s catalog # MBS268942, jsem zjistila, že využitím této druhé diagnostické sady by laboratoř při stanovení 4 vzorků v porovnání s první metodou vydělala pouze o 50,84 Kč více. Při využití diagnostické sady z MyBioSource by laboratoř na každém provedeném vzorku vydělala o 4,24 Kč víc než při využití diagnostické sady od výrobce ORGENTEC. Nicméně, je třeba brát v úvahu, že diagnostická sada z webu MyBioSource vyžaduje ředění standardního roztoku, a tedy vyšší pracovní zatížení laboratorních pracovníků. Přestože je dostupných mnoho různých diagnostických sad na stanovení autoprotilátky anti-MCV, při prostudování různých studií z celého světa jsem došla k závěru, že téměř nikdo nevyužívá jinou diagnostickou sadu než tu, kterou nabízí ORGENTEC. (24; 25; 26; 31; 33; 34; 35; 36)

Při výpočtu senzitivit serologických markerů pro všechny typy RA (z 52 vzorků) jsem pozorovala poměrně nízké senzitivity, které vyšly následovně: anti-CCP (25 %), RF (27 %), RF-IgG (23 %), RF-IgA (29 %), RF-IgM (35 %) a anti-MCV (37 %). Pokud jsem však vybrala pouze výsledky vzorků s diagnózou séropozitivní revmatoidní artritidy (25 vzorků), senzitivita všech markerů se zvýšila. Anti-CCP mělo senzitivitu 48 %, RF 52 %, RF-IgG 48 %, RF-IgA 60 %, RF-IgM 64 % a anti-MCV 52 %. Při srovnání s ostatními serologickými markery měla metoda anti-MCV v prvním případě nejvyšší senzitivitu.

Nicméně při výběru vzorků s diagnózou séropozitivní revmatoidní artritidy, senzitivita anti-MCV v porovnání s ostatními markery již není nejvyšší. V tomto případě má RF stejnou senzitivitu a RF-IgA a RF-IgM mají vyšší.

Specifičnosti serologických markerů vyšly bezpochyby lépe než senzitivity. Výsledné hodnoty specifičnosti serologických markerů byly následující: anti-CCP (93 %), RF (92 %), RF-IgG (96 %), RF-IgA (90 %), RF-IgM (86 %) a anti-MCV (92 %). Při srovnání specifičností anti-MCV s ostatními serologickými markery se ukázalo, že anti-MCV je až třetí v pořadí společně s RF za markery RF-IgG a anti-CCP, které vykazují lepší specifičnost.

Při porovnávání výsledků je důležité vzít v úvahu, že pacienti, u kterých jsou testovány tyto serologické markery, jsou lidé s revmatickými potížemi, kteří právě často z tohoto důvodu navštívili revmatologickou ordinaci ve FN Plzeň. Kvůli tomu je populace zdravých pacientů pro stanovení specifičností metod ze vzorků, které nejsou od pacientů s RA ale od lidí s jinou diagnózou. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, u některých infekčních a jiných autoimunitních onemocnění mohou vycházet tyto serologické markery pozitivně. Diagnózy, které byly uvedené u výsledků stanovení nemusí vždy odpovídat realitě. Pro potvrzení RA je potřeba vědět, zda má pacient tyto markery zvýšené. Pokud lékař v návaznosti na výsledky z laboratoře nediodagnostikoval pacientovi RA se zpětně již nemohu dozvědět.

Při porovnání senzitivity a specifičnosti anti-MCV v mé bakalářské práci s hodnotami udávanými příbalovým letákem (32), který je součástí diagnostické sady, se specifičnost příliš nelišila (specifičnost udávaná výrobcem: 98 %). Opak ale nastal u senzitivity, kterou výrobce udává o 29,2 % vyšší než ta, která vyšla v této bakalářské práci výpočtem za využití pouze vzorků s diagnózou séropozitivní revmatoidní artritidy (senzitivita udávaná výrobcem: 81,2 %). Výrobce může vybírat populační skupiny tak, aby dosáhl uspokojivých výsledků, což může vysvětlovat pozorované rozdíly mezi metodami.

Při porovnávání výsledků v mé bakalářské práci se studií od Song a kol. (33), (kteří prováděli porovnání stejných markerů až na RF) jsem zjistila, že rozdíly ve specifičnostech se lišily vždy jen o 2 až 4 %. Senzitivity v mé bakalářské práci se v porovnání se senzitivitami ve studii lišily významněji. Anti-MCV i anti-CCP mají ve studii stejnou hodnotu 89,6 %, což je v porovnání s mými výsledky u anti-MCV o 37,6 % vyšší a u anti-CCP o 41,6 %. Senzitivity RF ve třídách IgM (ve studii senzitivita 43,0 %) a IgA (ve studii senzitivita 29,0 %) se příliš nelišily od hodnot senzitivit v mé bakalářské práci, která využívala větší soubor 52 vzorků. Na rozdíl od toho se senzitivita RF-IgM ve studii (77,1 %) zase

přibližuje více k výsledku mé senzitivity, využívající užší soubor 25 vzorků pacientů se séropozitivní RA. Studie dospěla k závěru, že anti-MCV a anti-CCP mají lepší senzitivity a specifčnosti než RF v různých třídách Ig a jsou srovnatelné mezi sebou. Toto tvrzení se však v mé práci nepotvrdilo.

Další studie, se kterou jsem porovnála své výsledky je od Al-Shukaili a kol. (34). V této studii vyšetřovali senzitivitu a specifčnost anti-MCV, anti-CCP a RF. Ve studii vyšli taktéž podobné specifčnosti jako v mé bakalářské práci. Senzitivity jsou anti-MCV (72 %), anti-CCP (52 %) a RF (57 %). Zde mělo anti-MCV významně vyšší senzitivitu, oproti ostatním stanovovaným markerům. V porovnání s mými výsledky jsou senzitivity anti-CCP a RF o pouhých 4 a 5 % nižší, zatímco senzitivita anti-MCV je ve studii vyšší o 20 %. Autoři studie Al-Shukaili a kol. tedy dospěli k závěru, že anti-MCV má větší senzitivitu než anti-CCP. To se bohužel neshoduje s výsledky této bakalářské práce.

V další části mé bakalářské práce jsem se zabývala korelací mezi anti-MCV a ostatními serologickými markery. Korelační koeficienty se často v porovnání mezi různými studii, ale i mými vlastními výsledky v některých případech signifikantněji liší. To může být způsobeno výběrem různých populačních skupin nebo využíváním různých diagnostických sad. Dalším důvodem může být to, že některé studie vybírají různé populační skupiny, které k zjištění svých korelací využily. Vzorkem v této bakalářské práci jsou lidé nemocní i zdraví, různého věku i pohlaví. Nicméně korelace, které jsem vypočítala v mé bakalářské práci, se obecně nacházejí v průměru zmiňovaných studií.

Nejčastěji zkoumanou korelací ve vědeckých studiích je většinou ta mezi serologickými markery anti-MCV a anti-CCP. Korelační koeficient, který jsem získala z mých dat byl 0,7932, což je o něco nižší korelace než v případě studie od Eldina a kol. (35), jejichž korelační koeficient u pacientů s RA byla 0,842 (s časnou RA byla 0,840). Naopak hodnoty ze studie Shazly a kol. (36) se od předešlých hodnot i mých výsledků docela liší, s poměrně nízkým korelačním koeficientem 0,49. Další studie podporující vysoký korelační koeficient je ze studie od Tawfik a kol. (37), podporuje existenci vysokého korelačního koeficientu. Jejichž korelace byla 0,6. Korelační koeficient ve vědecké studii od Song a kol. vyšel 0,596 (33). Z výsledků mé bakalářské práce a jiných studií vyplývá, že korelace mezi anti-MCV a anti-CCP je středně pozitivní. Při zvýšení jednoho markeru je tedy pravděpodobnost, že bude zvýšený i ten druhý. I tak tato korelace není zcela dokonalá.



V mé bakalářské práci jsem dále vypočítala korelační koeficient mezi anti-MCV a RF, který činil 0,1892. Tento koeficient je nejnižší ze všech zkoumaných korelací. Podobně je na tom výsledek ze studie od Kim a kol. (38) jejichž korelace je dokonce nižší a to pouhých 0,023 u pacientů s RA. V případě studii od Tawfik a kol. (37) vyšel korelační koeficient mezi těmito markery vyšší než v této bakalářské práci, a to 0,3. Z výsledku vyplývá, že korelace mezi anti-MCV a RF je velmi nízká a tato korelace není zcela dokonalá. To podporují i výsledky jiných studií.

Korelace mezi anti-MCV a RF-IgG vykazuje velmi nízkou hodnotu, pouhých 0,2184. Nicméně jsem nenalezla referenční zdroj, který zjišťoval korelační koeficient mezi těmito dvěma serologickými markery.

Dále korelace mezi anti-MCV a RF-IgA vyšla pouze 0,2254. Tento výsledek se však neshoduje s jedinou nalezenou referenční studií od Nass a kol. (39), která zjistila vyšší korelační koeficient mezi těmito markery, a to 0,41. Při zhodnocení mého výsledku a výsledku zmíněné studie lze říci, že anti-MCV a RF-IgG spolu také nekorelují.

Korelační koeficient mezi anti-MCV a RF-IgM dosáhl hodnoty 0,4882. Tento korelační koeficient je vyšší než v referenční studii od Nass a kol. (39), ve které dosáhly korelace 0,38. Zároveň je můj korelační koeficient nižší, než ten ve studii od Eldin a kol. (35), ve které vyšel korelační koeficient 0,667 u pacientů s RA a 0,846 u pacientů s časnou RA. Poslední korelační koeficient ve vědecké studii od Song a kol. vyšel 0,301 (33) což je znovu nižší než v mých výsledcích. Celkově lze tedy říci, že mezi anti-MCV a RF-IgM je slabá pozitivní korelace, jak naznačují výsledky mé bakalářské práce i zmíněné studie.

Nejvýznamnější korelaci mezi sebou mají anti-MCV a anti-CCP. To je podporováno i výsledky z jiných studií. Tyto dva markery pravděpodobně vykazují takto silnou korelaci kvůli tomu, že oba patří do skupiny autoprotilátek ACPA a jsou si v určité míře podobné.

## ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem se zaměřovala na revmatoidní artritidu, serologické markery stanovované při tomto onemocnění, a hlavně postupy prováděnými v laboratoři při zavedení metody anti-MCV do běžného provozu imunologické laboratoře.

V úvodu teoretické části jsem popsala autoimunitní onemocnění, a faktory jejich vzniku. Následně jsem se zaměřila konkrétně na revmatoidní artritidu. Popsala jsem vznik onemocnění, klinické příznaky a možnosti terapie. Nakonec jsem popsala jednotlivé serologické markery, stanovované o potvrzení diagnózy tohoto onemocnění, tedy RF, anti-CCP a anti-MCV.

Provedla jsem validaci a verifikaci metody, při které jsem zjistila, že metoda vyhovuje požadavkům pro užití v laboratoři. Z ekonomického hlediska se vyplatí využívat diagnostickou sadu od výrobce ORGENTEC. Až při testování čtyř a více vzorků nebude laboratoř na jejich stanovení prodělávat peníze. Metodu by laboratoř měla provádět s co možná největším množstvím vzorků v sérii.

Při porovnání senzitivit a specifických metod anti-MCV s RF, RF-IgG, RF-IgA, RF-IgM a anti-CCP mi výsledky nepoukazovali na to, že by bylo anti-MCV výhodnější stanovit než anti-CCP nebo RF. Tento fakt, ale nepodporují referenční studie, se kterými jsem výsledky porovnávala.

Při porovnání jednotlivých korelací mezi anti-MCV a ostatními serologickými markery jsem došla k závěru, že anti-MCV nejvíce koreluje s anti-CCP, zatímco RF a RF v různých třídách Ig koreluje pouze méně nebo vůbec.

Jedním z problémů bakalářské práce byl nedostatek vzorků, stanovovaných ve všech potřebných serologických markerech, obzvláště pak u pacientů, kteří již mají diagnostikovanou revmatoidní artritidu. Lékaři u těchto osob málokdy vyžadují stanovení všech serologických markerů, které jsem potřebovala pro tuto práci. Pro lepší zhodnocení senzitivit a specifických metod k jejich porovnání, a následně i zhodnocení korelací by to vyžadovalo větší spolupráci s lékařem, a tedy provádění stanovení všech potřebných serologických markerů u pacientů, obzvláště těch, s revmatoidní artritidou.

## SEZNAM LITERATURY

1. **HOŘEJŠÍ, Václav, a další.** *Základy imunologie*. 6. aktualizované vydání. Praha : Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
2. **ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. a PILLAI, Shiv.** *Cellular and molecular immunology*. Tenth edition. Philadelphia, PA : Elsevier, 2022. ISBN 978-0-323-75748-5.
3. **CHAPEL, Helen, a další.** *Základy klinické imunologie*. 6. vydání. Praha : Triton, 2018. ISBN 978-80-7553-396-8.
4. **SHOENFELD, Yehuda, FUČÍKOVÁ, Terezie a BARTŮŇKOVÁ, Jiřina.** *Autoimunita: Vnitřní nepřítel*. Praha : Grada, 2007. ISBN 978-80-247-2044-9.
5. **PAVELKA, Jan, a další.** Běžné streptokokové infekce - mýty a omyly. *SOLEN Medical education*. [online] 10. prosinec 2011. **12**(6): 414-415. ISSN 1213-0494 [cit. 6.10.2022]. Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/ped-201106-0009\\_Bezne\\_streptokokove\\_infekce-myty\\_a\\_omyly.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DB%25EC%25BEn%25E9%2Bstreptokokov%25E9%2Binfekce%2B%2526%25238211%253B%2Bm%25FDty%2Ba%2Bo myly%2Bin%253Aname%26sfrom%3D0%26spage%3D30](https://www.solen.cz/artkey/ped-201106-0009_Bezne_streptokokove_infekce-myty_a_omyly.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DB%25EC%25BEn%25E9%2Bstreptokokov%25E9%2Binfekce%2B%2526%25238211%253B%2Bm%25FDty%2Ba%2Bo myly%2Bin%253Aname%26sfrom%3D0%26spage%3D30).
6. **DE LUCA, F a Y SHOENFELD.** The microbiome in autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology* [online] 2018. **195**(1), 74–85 [cit. 5.1.2023]. ISSN 1365-2249, 0009-9104. Dostupné z: doi:10.1111/cei.13158
7. **BRYCHTOVÁ, Světlana a TICHÝ, Martin.** Lupus erythematodes indukovaný léky. *SOLEN Medical education*. [online] 16. březen 2015. **9**(1): 45-46 [cit. 9. 11 2022.] Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/der-201501-0011\\_Lupus\\_erythematodes\\_indukovany\\_leky.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DLupus%2Berythematodes%2Bindukovan%25FD%2B1%25E9ky%2Bin%253Aname%26sfrom%3D0%26spage%3D30](https://www.solen.cz/artkey/der-201501-0011_Lupus_erythematodes_indukovany_leky.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DLupus%2Berythematodes%2Bindukovan%25FD%2B1%25E9ky%2Bin%253Aname%26sfrom%3D0%26spage%3D30).
8. **LUKEŠOVÁ, Šárka, a další.** Interferon alfa v léčbě metastazujícího renálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi*. [online] 2006. **8**(10): 432-438 ISSN:1212-7299. Dostupné z: [https://www.internimedica.cz/artkey/int-200610-0004\\_Interferon\\_alfa\\_v\\_lecbe\\_metastazujiciho\\_renalniho\\_karcinomu.php?back=%2Fsearch](https://www.internimedica.cz/artkey/int-200610-0004_Interferon_alfa_v_lecbe_metastazujiciho_renalniho_karcinomu.php?back=%2Fsearch)

h.php%3Fquery%3DINTERFERON%2BALFA%2BV%2BL%25C9%25C8B%25CC%2B METASTAZUJ%25CDC%25CDHO%26sfrom%3D0%26spage%3D30.

9. **MADRAY, Victoria M., Jenny E. LILES a Loretta S. DAVIS.** Chemical-induced sclerodermoid disease triggered by pressure washing bleach solution. *JAAD Case Reports* [online] 2020. **6**(12), 1330–1332. ISSN 23525126. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdc.2020.09.027

10. **STOJANOVICH, Ljudmila a Dragomir MARISAVLJEVICH.** Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* [online] 2008. **7**(3), 209–213. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2007.11.007

11. **LOH, Yvonne, Yu OYAMA, Laisvyde STATKUTE, Kathleen QUIGLEY, Kimberly YAUNG, Elizabeth GONDA, Walter BARR, Borko JOVANOVIĆ, Robert CRAIG, Dusan STEFOSKI, Bruce COHEN a Richard K. BURT.** Development of a secondary autoimmune disorder after hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: role of conditioning regimen used. *Blood* [online] 2007. **109**(6), 2643–2548. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2006-07-035766

12. **PAVELKA, Karel,** a další. *Revmatologie*. Druhé, přepracované vydání. Praha : Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-688-5.

13. **BOYADZIEVA, Vladimira V., Nikolay STOILOV, Rumen M. STOILOV, Konstantin TACHKOV, Maria KAMUSHEVA, Konstantin MITOV a Guenka I. PETROVA.** Quality of Life and Cost Study of Rheumatoid Arthritis Therapy With Biological Medicines. *Frontiers in Pharmacology* [online] 2018. **9**, 794. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.00794.

14. **EDILOVA, Maria I., Ali AKRAM a Ali A. ABDUL-SATER.** Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biomedical Journal* [online] 2021. **44**(2), 172–182. ISSN 23194170. Dostupné z: doi:10.1016/j.bj.2020.06.010

15. **BEČVÁŘ, Radim a PAVELKA, Karel.** Současné trendy v diagnostice a léčbě revmatoidní artritidy. *SOLEN Medical education*. [online] 2009. **11**(7): 340-344. Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/int-200907-0008\\_Soucasne\\_trendy\\_v\\_diagnostice\\_a\\_lecbe\\_revmatoidni\\_artridy.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DSou%25E8asn%25E9%2Btrendy%2Bv%2B](https://www.solen.cz/artkey/int-200907-0008_Soucasne_trendy_v_diagnostice_a_lecbe_revmatoidni_artridy.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DSou%25E8asn%25E9%2Btrendy%2Bv%2B)

diagnos-

tice%2Ba%2BI%25E9%25E8b%25EC%2Brevmatoidn%25ED%2Bartritidy%2Bin%253Aname%26sfrom%3D0%26spage%3D30

16. **JANG, Sunhee, Eui-Jong KWON a Jennifer Jooa LEE.** Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online] 2022. **23**(2), 905. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23020905

17. **ŠEDOVÁ, Liliana a TOMASOVÁ STUDÝNKOVÁ, Jana.** Časná diagnostika revmatoidní artritidy, strategie léčby. *SOLEN Medical education*. [online] 2022. **19**(1): 10-17. Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/med-202201-0001\\_casna\\_diagnostika\\_revmatoidni\\_artritidy\\_strategie\\_lecby.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DRevmatoidn%25ED%2Bartritida%2Bklasifikace%2Bin%253Aname%2Bkey%2Babstr%26sfrom%3D0%26spage%3D30](https://www.solen.cz/artkey/med-202201-0001_casna_diagnostika_revmatoidni_artritidy_strategie_lecby.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DRevmatoidn%25ED%2Bartritida%2Bklasifikace%2Bin%253Aname%2Bkey%2Babstr%26sfrom%3D0%26spage%3D30)

18. **SUCHÝ, David.** Revmatoidní artritida - diagnóza a léčba. *SOLEN Medical education*. [Online] 2003. **5**(7): 342-347. Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/int-200307-0005\\_Revmatoidni\\_artritida-diagnoza\\_a\\_lecba.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DREVMATOIDN%25CD%2BARTRITIDA%2B%2526%25238211%253B%2BDIAGN%25D3ZA%2BA%2BL%25C9%25C8BA%2BDavid%2BSuch%25FD%2Bin%253Aauth%2Bname%26sfrom%3D30%26spage%3D30](https://www.solen.cz/artkey/int-200307-0005_Revmatoidni_artritida-diagnoza_a_lecba.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DREVMATOIDN%25CD%2BARTRITIDA%2B%2526%25238211%253B%2BDIAGN%25D3ZA%2BA%2BL%25C9%25C8BA%2BDavid%2BSuch%25FD%2Bin%253Aauth%2Bname%26sfrom%3D30%26spage%3D30)

19. **INGEGNOLI, Francesca, Roberto CASTELLI a Roberta GUALTIEROTTI.** Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Disease Markers* [online] 2013. **35**, 727–734. ISSN 0278-0240, 1875-8630. Dostupné z: doi:10.1155/2013/726598

20. **HRDÁ, Pavlína a ŠTERZL, Ivan.** Vyšetření autoprotilátek - současné možnosti. *SOLEN Medical education*. [online] 2003. **5**(8): 410-413. Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/int-200308-0007\\_Vysetreni\\_autoprotilatek-soucasne\\_moznosti.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3D%26sfrom%3D0%26spage%3D30](https://www.solen.cz/artkey/int-200308-0007_Vysetreni_autoprotilatek-soucasne_moznosti.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3D%26sfrom%3D0%26spage%3D30)

21. **MAŠLIŇSKA, Maria, Małgorzata MAŃCZAK a Brygida KWIATKOWSKA.** Usefulness of rheumatoid factor as an immunological and prognostic marker in PSS patients. *Clinical Rheumatology* [online] 2019. **38**(5), 1301–1307. ISSN 0770-3198, 1434-9949. Dostupné z: doi:10.1007/s10067-019-04438-z

22. **FRASER, Kevin J.** The Waaler-Rose test: Anatomy of the eponym. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* [online] 1988. **18**(1), 61–71. ISSN 00490172. Dostupné z: doi:10.1016/0049-0172(88)90035-2
23. **SOKOLOVA, Maria V., Georg SCHETT a Ulrike STEFFEN.** Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis: Historical Background and Novel Findings. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* [online] 2021. **63**(2), 138–151. ISSN 1559-0267. Dostupné z: doi:10.1007/s12016-021-08890-1
24. **ZHU, Jia-Ning, Liu-Yan NIE, Xiao-Yong LU a Hua-Xiang WU.** Meta-analysis: compared with anti-CCP and rheumatoid factor, could anti-MCV be the next biomarker in the rheumatoid arthritis classification criteria? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online] 2019. **57**(11), 1668–1679. ISSN 1437-4331, 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2019-0167
25. **STEFANOV, L, T. BOLYAROVA-KONOVA, Zlatimir KOLAROV, Pavlinka PAVLOVA a Mariana IVANOVA.** Serum anti-CCP antibodies in periodontitis associated with rheumatoid arthritis - relative value for the severity of periodontitis. *Revmatologija (Bulgaria)* [online] 2020. **28**(4), 3–18. ISSN 1310-0505. Dostupné z: doi:10.35465/28.4.2020.pp3-18
26. **AGGARWAL, Rohit, Katherine LIAO, Raj NAIR, Sarah RINGOLD a Karen H. COSTENBANDER.** Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis: ACPA Assays in RA. *Arthritis Care & Research* [online] 2009. **61**(11), 1472–1483. ISSN 00043591. Dostupné z: doi:10.1002/art.24827
27. **PUSZCZEWICZ, Mariusz a Cezary IWASZKIEWICZ.** Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Archives of Medical Science* [online] 2011. **2**, 189–194. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2011.22067
28. **DEGBOÉ, Yannick.** Pre-rheumatoid arthritis and ACPA: Contribution of ACPAs in the pathogeny of pre-disease stage. *Joint Bone Spine* [online] 2021. **88**(3), 105098. ISSN 1297319X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbspin.2020.105098
29. **IYENGAR, Karthikeyan. P., Abhishek VAISH a Arvind NUNE.** Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) and Rheumatoid arthritis: Clinical relevance. *Journal*

of Clinical Orthopaedics and Trauma [online] 2022. **24**, 101729. ISSN 09765662. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcot.2021.101729

30. **TESIJA KUNA, Andrea**. Mutated citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta* [online] 2012. **413**(1–2), 66–73. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2011.10.020

31. **DEJACO, Christian, Werner KLOTZ, Heike LARCHER, Christina DUFTNER, Michael SCHIRMER a Manfred HEROLD**. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* [online] 2006. **8**(4), R119. ISSN 14786354. Dostupné z: doi:10.1186/ar2008

32. **ORGENTEC Diagnostika GmbH**. *Anti-MCV®. Anti-MCV | ELISA-Test für den ACPA-Nachweis: frühe Diagnose der rheumatoiden Arthritis (RA)*, Rheumafrühdagnostik [online] 2022. Dostupné z: <https://www.orgentec.com/en/products/alegria/Auto-immune+Disease+Diagnostics/Rheumatology+Diagnostics/ORG+248.html>

33. **SONG, Jung Soo, Geum Bora PARK a Ae Ja PARK**. Comparison of Anti-mutated Citrullinated Vimentin with Anti-cyclic Citrullinated Peptide and Rheumatoid Factors for the Diagnostic Value of Rheumatoid Arthritis. *The Journal of the Korean Rheumatism Association* [online] 2007. **14**(3), 235. ISSN 1226-8070. Dostupné z: doi:10.4078/jkra.2007.14.3.235

34. **AL-SHUKAILI, Ahmed, Saif AL-GHAFRI, Safia AL-MARHOobi a Juma ALKAABI**. Evaluation of Anti-Mutated Citrullinated Vimentin Antibodies, Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies and Rheumatoid Factor in Omani Patients with Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Rheumatology* [online] 2012. 1–5. ISSN 1687-9260, 1687-9279. Dostupné z: doi:10.1155/2012/285854

35. **BADR ELDIN, Amina, Sameh MOBASHER a Gehan HEGAZY**. The Diagnostic Utility of Anti-Mutated Citrullinated Vimentin Antibodies, Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies and Rheumatoid Factor in Rheumatoid Arthritis. *Egyptian Journal of Rheumatology and Clinical Immunology* [online] 2014. **2**(1), 19–25. ISSN 2357-0970. Dostupné z: doi:10.21608/ejrci.2014.9983

36. **EL SHAZLY, Reem Ismail, Somaya Anwar HUSSEIN, Hala Zaki RASLAN a Amira Ahmed ELGOGARY**. Anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in

rheumatoid arthritis patients: Relation to disease activity and manifestations. *The Egyptian Rheumatologist* [online] 2014. **36**(2), 65–70. ISSN 11101164. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejr.2013.12.009

37. **TAWFIK, N. A. E., et al.** Anti-mutated citrullinated vimentin antibodies (anti-MCV): A relation with other diagnostic markers in rheumatoid arthritis patients. *Clin Med Diagn*, 2019, **9**: 61-67. Dostupné z: doi: 10.5923/j.cmd.20190904.01

38. **KIM, Seong-Kyu, Jisuk BAE, Hwajeong LEE, Ji Hun KIM, Sung-Hoon PARK a Jung-Yoon CHOE.** Greater prevalence of seropositivity for anti-cyclic citrullinated peptide antibody in unaffected first-degree relatives in multicase rheumatoid arthritis-affected families. *The Korean Journal of Internal Medicine* [online] 2013. **28**(1), 45. ISSN 1226-3303, 2005-6648. Dostupné z: doi:10.3904/kjim.2013.28.1.45

39. **NASS, Flávia R., Thelma L. SKARE, Isabela GOELDNER, Renato NISIHARA, Iara T. MESSIAS-REASON a Shirley R.R. UTIYAM.** Analysis of four serum biomarkers in rheumatoid arthritis: association with extra articular manifestations in patients and arthralgia in relatives. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)* [online] 2017. **57**(4), 286–293. ISSN 22555021. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbre.2016.03.001



# **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň

# PŘÍLOHY

## Příloha 1 – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



### FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro vnější vztahy a spolupráci s LF

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

Anna Černá

Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*

*Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví*

*Západočeská univerzita v Plzni*

### Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s lékařskou fakultou FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, včetně porovnání dvou metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Stanovení protilátky anti-MCV, zavedení nové metody*“. **Provádění ekonomické kalkulace Vám však dovoleno není.**

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

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

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

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

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

**Mgr. Bc. Světluše Chabrová**

Manažerka pro vzdělávání nelékařů

Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň

alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín

Tel: 377 103 204 / 377 402 207

E-mail: [chabrovas@fnplzen.cz](mailto:chabrovas@fnplzen.cz)

30. 8. 2022