

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**Stanovení cirkulujících protilátek k průkazu
autoimunního onemocnění metodou nepřímé
imunofluorescence.**

Detection of circulating antibodies to determination of autoimmune
diseases by means of imunofluorescence.

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Konzultant bakalářské práce: MUDr. Hadži Nikolov Dimitar, Ph.D.
Fingerlandův ústav patologie
Fakultní nemocnice Hradec Králové

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Tímto bych chtěla poděkovat především konzultantovi diplomové práce, panu MUDr. Dimitaru Hadži Nikolovovi, Ph.D., za odborné vedení a zasvěcení do problematiky imunofluorescence, panu primáři MUDr. Miroslavu Podholovi za užitečné rady a dále také vedoucímu práce, panu Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D, PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. a Doc. RNDr. Petru Klemmerovi, CSc. za konzultace.

Neméně také celému Fingerlandově ústavu patologie v čele s přednostou Prof. MUDr. Alešem Ryškou Ph.D., a vedoucí laborantkou Zdeňkou Fejglovou, za umožnění vypracování této práce, a nakonec i všem laborantkám, kteří mně ochotně seznámili s laboratorní technikou a postupy imunofluorescenční laboratoře.

V Hradci Králové dne

.....

Abstrakt:

Kateřina Siegllová

Stanovení cirkulujících protilátek k průkazu autoimunních onemocnění metodou nepřímé imunofluorescence.

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotní laborant

Cíl práce: Cílem této práce je průzkum možné souvislosti přítomnosti protilátky v séru proti kartáčovému lemu resorpčních epitelů (ABBA – anti brush border antibody) s idiopatickým střevním zánětem (Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida).

Metody: K průkazu souvislosti idiopatického střevního zánětu a pozitivitu na ABBA protilátku využíváme dvou pohledů, dle kterých postupujeme při výběru a porovnávání dat. Prvním pohledem je srovnání počtu ABBA pozitivních pacientů s jejich diagnózou endoskopické biopsie. Druhým pohledem zkoumám pozitivitu či negativitu ABBA vyšetření všech pacientů s diagnózou idiopatického střevního zánětu. Experimentální část takto shrnuje výsledky z let 2009 až 2011 provedené na Fingerlandově ústavu patologie.

Výsledky: Průzkum ukázal, že mezi všemi ABBA pozitivními pacienty je početná skupina těch, kteří nemají morfologický obraz idiopatického střevního zánětu – 72,47%. U pacientů s klinickou diagnózou Crohnovy nemoci se vyskytuje ABBA v 66,67% a u pacientů s ulcerózní kolitidou v 39,37%.

Závěr: Z výsledků jsme zjistili, že ABBA pozitivní pacient má 1,7x větší pravděpodobnost, že trpí Crohnovou nemocí než ulcerózní kolitidou. Zároveň také pacient s nejvyšším stupněm positivity semikvantitativního hodnocení (+++) trpí s 3,7x větší pravděpodobností Crohnovou nemocí než ulcerózní kolitidou a pacient s negativním výsledkem má 1,8x větší pravděpodobnost, že trpí spíše ulcerózní kolitidou než Crohnovou nemocí.

Abstract:

Kateřina Siegllová

Detection of circulating antibodies to determination of autoimmuno diseases by means of imunofluorescence.

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical Laboratory Technician

Background: The aim of this thesis is to explore of coherence between the presence of antibody against anti brush border antibody (ABBA) and idiopatic bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis).

Methods: Evidence of connection idiopatic bowel disease with positive ABBA test is examine by two perspectives, which are used for selecting and comparising of data. The first way is comparison of the number ABBA positive patients with their diagnosis of endoscopic biopsy. The second way check the positivity or negativity of ABBA examination of all patients with diagnose of idiopatic bowel disease. Experimental part summarize by this way the results, which was done at the Fingerland institute of pathology since 2009 to 2011.

Results: The survey showed that among all the ABBA-positive patients is a large group of those who don't have the morphological signs of Inflammatory Bowel Disease - 72,47%. 66.67% of patients with a clinical diagnosis of Crohn's disease, and 39.37% of patients with ulcerative colitis are ABBA positive.

Conclusion: The results shows, that ABBA positive patient suffer from Crohn's disease 1,7 times more often than ulcerative colitis. However, patient with the highest level of positive semiquantitative evaluation (+ + +) suffer 3,7 times more likely from Crohn's disease than ulcerative colitis. On the other side, patient with negative ABBA test suffer 1,8 times more likely from ulcerative colitis.

Obsah

1. Úvod:	9
2. Teoretická část:	10
2.1. Úvod do problematiky	10
2.2. Imunitní systém.....	11
2.2.1. Centrální tolerance	12
2.2.2. Periferní tolerance	12
2.3. Protilátky (imunoglobuliny)	13
2.3.1. Struktura.....	13
2.3.2. Typy (třídy, izotypy)	14
2.3.3. Vazebné místo (interakce Ag-Ab).....	15
2.3.4. Účinek	15
2.3.5. Polyklonální a monoklonální Ab	15
2.3.6. Cirkulující protilátky	16
2.4. Autoimunní onemocnění	18
2.4.1. Systémová autoimunní onemocnění	19
2.4.2. Onemocnění postihující jeden orgán spolu s postižením dalších orgánů	20
2.4.3. Orgánově specifická autoimunní onemocnění.....	20
2.5. Struktura trávicí trubice	20
2.5.1. Tunica mucosa	21
2.5.2. Tela submucosa	22
2.5.3. Tunica muscularis externa.....	22
2.5.4. Tunica serosa.....	23
2.6. Idiopatické střevní záněty.....	23
2.6.1. Crohnova nemoc	26
2.6.2. Ulcerózní kolitida	30

2.7.	Fluorescence	33
2.7.1.	Historie a princip.....	33
2.7.2.	Fluorochromy	34
2.7.3.	Fluorescenční mikroskopie.....	35
2.7.4.	Imunofluorescence	37
3.	Zadání práce, cíl práce.....	40
4.	Experimentální část:	41
4.1.	Zpracování endobiopsie a zhotovení barveného preparátu	41
4.1.1.	Příjem materiálu	41
4.1.2.	Zpracování	41
4.1.3.	Roztoky, činidla, média.....	42
4.1.4.	Pomůcky a přístroje.....	42
4.2.	Zpracování materiálu pro fluorescenční vyšetření	43
4.2.1.	Příjem materiálu	43
4.2.2.	Zpracování	43
4.2.3.	Roztoky, činidla, média.....	44
4.2.4.	Pomůcky a přístroje.....	44
5.	Způsob vyhodnocení	45
5.1.	První výběrový soubor – porovnání ABBA pozitivních IF vyšetření s histologickým nálezem endobiopsií	45
5.2.	Druhý výběrový soubor – porovnání klinické diagnózy (DG CN – K50, DG UK – K51) s výsledkem ABBA vyšetření	46
6.	Výsledky:.....	47
6.1.	První výběrový soubor – porovnání ABBA pozitivních IF vyšetření s histologickým nálezem endobiopsií	47
6.2.	Druhý výběrový soubor – porovnání klinické diagnózy (DG CN – K50, DG UK – K51) s výsledkem ABBA vyšetření	56
7.	Diskuze.....	67

8.	Závěr	70
9.	Zkratky:.....	71
10.	Literatura:	73
11.	Přílohy:	77

1. Úvod:

Již v minulých letech, při studiu na střední zdravotnické škole, jsem byla okouzlena histologickou technikou a histologií jako takovou, a proto jsem si vybírala téma, které je mi tímto blízké. Díky možnosti pracovat na Fingerlandově ústavu patologie, jako laboratorní asistent, jsem mohla hlouběji proniknout do histologické praxe a poznat tak všechny běžně užívané metodiky k diagnostice. Velice zajímavá se mi zdála problematika buněčných ultrastruktur a antigenů, které jsou dokazovány imunohistochemickými a imunofluorescenčními technikami. Tato bakalářská práce je proto věnována bližšímu prozkoumání imunofluorescenčních technik, jejich praktickému využití a problematice.

Imunofluorescence je taková metoda, která se na rozdíl od imunohistochemie, využívá především k průkazu protilátek přítomných v séru pacienta, namířených proti jeho vlastním tkáním, k detekci autoimunitních chorob. Z mnoha různých protilátek vyšetřovaných ve Fingerlandově ústavu patologie v Hradci Králové jsem se zaměřila na protilátku proti kartáčovému lemu resorpčních epitelů (ABBA – anti brush border antibody).

Cílem této práce je blíže prozkoumat souvislost přítomnosti protilátky ABBA v séru pacienta s idiopatickým střevním zánětem (Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida). Abych mohla tuto souvislost zkoumat a hodnotit, použila jsem dva výběrové soubory z řad pacientů. První výběrový soubor jsou pacienti imunofluorescenčně vyšetřeni na Fingerlandově ústavu patologie v časové periodě posledních 3 let (2009-2011), kteří mají pozitivní ABBA protilátky. U těchto pacientů jsem sledovala výsledky jejich endobioptických vyšetření. Druhý výběrový soubor představuje všechny pacienty endobiopticky vyšetřené ve stejné časové periodě s diagnózou Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy a porovnávám je s výsledky jejich imunofluorescenčního vyšetření a to zda jsou, či nejsou ABBA pozitivní.

Pokud se tato souvislost prokáže, mohla by být užitečným ukazatelem při již tak dosti nesnadné diagnostice idiopatických střevních onemocnění.

2. Teoretická část:

2.1. Úvod do problematiky

Již Skogh ve své práci v r. 1982 (Skogh a kol., 1982) poukázal na častý výskyt pozitivitu ABBA u pacientů postižených Crohnovou nemocí (celkem u 61% nemocných oproti 10% u zdravých kontrol). I prof. MUDr. Zdeněk Nožička, CSc. prováděl průzkum ohledně této souvislosti a ve své práci, v r. 1991 (Nožička, 1991) na katedře patologické anatomie a soudního lékařství v Hradci Králové, uvádí pozitivitu ABBA u Crohnovy nemoci v 62%, u ulcerózní kolitidy v 7%, u nespecifikovaných dyspepsií ve 34% a u hepatopatií ve 28%.

Chtěla bych navázat na tyto předchůdce z řad lékařů a na jejich poznatky ohledně souvislosti pozitivitu ABBA na idiopatických střevních onemocněních, popsat současné hodnoty a ty porovnat s hodnotami jimi zjištěnými v letech předešlých.

Abychom se mohli blíže zabývat již výše zmíněnou problematikou, je třeba se seznámit se základy tří různých vědeckých odvětví, které se při průkazu cirkulujících protilátek spojují v jeden celek, který dokáže pomoci v diagnóze a prognóze u nemocných. Mezi tyto odvětví patří nepochybně imunologie, díky jejímž poznatkům o imunitním systému a jeho funkci (popř. dysfunkci) je nám známo velké množství autoimunních onemocnění. Dále můžeme využívat imunitních reakcí antigenu a protilátky k diagnostice těchto onemocnění. Druhým odvětvím těsně spjatým s průkazem autoimunních protilátek je analytická chemie a instrumentální metody, které nám umožňují využívat vlastností látek a dějů (fluorescence) k detekci vazby antigen-protilátka. Konečně posledním odvětvím je klinická medicína, bez níž by všechny techniky neměly pro nemocného žádný význam. Znalost buněčných struktur, ultrastruktur a dějů probíhajících v organismu je nutná k porozumění nemoci, její identifikaci a možnosti aplikace léčby.

Níže popisuji nejzákladnější souhrn informací z těchto vědních oborů, potřebných k porozumění problematiky autoimunních chorob, idiopatických střevních onemocnění a imunofluorescenčních technik.

2.2. Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává „škodlivé“ od „neškodného“, a chrání tak organismus. Tato obrana organismu vůči vnějším škodlivinám, jako jsou patogeny a jejich toxické produkty, se nazývá obranyschopnost. (Hořejší, Bartůňková 2009).

Imunitní systém zahrnuje mnoho dějů, které se společně podílejí na likvidaci tělu „škodlivého“. Imunitu dělíme na dvě základní kategorie mechanismů: nespecifický (neadaptivní, vrozený) a specifický (adaptivní). Obě kategorie zahrnují jak složku humorální (látkovou), tak buněčnou. Následující tabulka zobrazuje základní členění imunitního systému.

Mechanismus	Buněčná složka	Humorální složka
Nespecifický	Fagocyty, NK buňky, mastocyty	Komplement, interferony, lektiny a jiné proteiny
Specifický	T lymfocyty (T_c , T_{H1} , T_{H2})	B lymfocyty, protilátky

Tabulka 1: základní členění imunitního systému (NK buňky – přirození zabíječi)

Další neméně důležitou úlohou imunitního systému je imunitní dohled, který ničí staré, poškozené či jinak změněné buňky tzv. vnitřní škodliviny. Aby mohl takovou činnost provádět, musí být nastaven tak, aby rozpoznal „správné“ a „zdravé“ buňky, které nesmí nijak poškodit – tzv. autotolerance (viz. 1.1. a 1.2.).

Každá buňka lidského těla prezentuje na svém povrchu (membráně) velké množství molekul zodpovědných za antigenní specifitu (příslušnost k určité skupině buněk). Každá jaderná buňka také exprimuje na svůj povrch určitý „vzorek“ své práce (peptidy z bílkovin o délce 8-10 aminokyselin) pomocí MHC glykoproteinů I. třídy (major histocompatibility complex) u lidí označované jako HLA (human leukocyte antigens). Podle těchto vystavených antigenů imunitní systém (T_c – cytotoxický typ T lymfocytů, makrofágy, aj.) vykonává imunitní dohled pomocí receptorů, tzn., že likviduje škodliviny z vnějšího prostředí, buňky nádorově zvrhlé či nakažené viry. Makrofágy rozpoznanou buňku či škodlivinu pohltnou a navíc opět prezentují antigenní fragment tentokrát pomocí povrchových MHC glykoproteinů II. třídy.

Tyto fragmenty na MHC II. třídě rozpoznávají T_H lymfocyty a pomocí produkce cytokinů spolu s produkty makrofágů tak stimulovat ostatní buňky imunitního systému. Celá zánětlivá reakce je řízená velkým množstvím prozánětlivých a protizánětlivých faktorů produkovaných jak poškozenými tkáněmi, tak účastníky imunitního systému. Mezi tyto regulační látky patří např.: interleukiny (IL), tumor nekrotizující faktor (TNF), interferony (INF), aj.

Po stimulaci panenských B lymfocytů, pomocí antigenu a T_H lymfocytů, pod vlivem molekul produkovaných buňkami zánětlivé reakce, se z nich tvoří plazmatické buňky, které jsou schopné sekrece protilátky (imunoglobulinu) namířené proti antigenu.

2.2.1. Centrální tolerance

Tato autotolerance má svůj původ pro T lymfocyty v brzlíku (thymu), kde dochází k reakcím mezi T lymfocyty a buňkami prezentujícími soubor autoantigenů – PAE (peripheral antigen expressing cells), což jsou thymické epiteliární medulární buňky. Tyto buňky prezentují takové antigeny, které jsou exprimovány všemi typy buněk v lidském organismu. Podle výsledků této reakce je repertoár T lymfocytů dělen do dvou skupin: první skupina T lymfocytů s antigeny nereaguje, či reaguje pouze částečně a je „propuštěna“ do krevního oběhu a druhá, která s antigeny reaguje (tzv. autoreaktivní) je zničena apoptózou. B lymfocyty tvořící se v kostní dřeni mohou díky své variabilitě také rozpoznávat Ag vlastního organismu. Tyto autoreaktivní B lymfocyty jsou ale již v prvních fázích vývoje v kostní dřeni zlikvidovány apoptózou.

2.2.2. Periferní tolerance

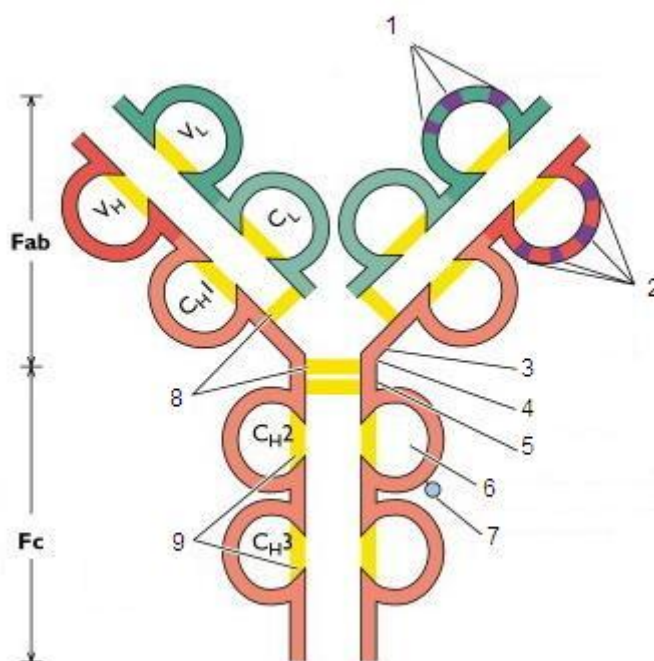
Periferní tolerance hraje zřejmě důležitou roli při vzniku autoimunních onemocnění. Je udržována několika mechanismy: klonální delecí (eliminace autoreaktivních lymfocytů apoptózou), klonální anergií (útlum aktivovaného lymfocytu při chybění kostimulačních signálů), klonální ignorací (nerozpoznání autoantigenu lymfocytem kvůli jeho podprahovému množství) a supresí (eliminace autoreaktivních lymfocytů jinými imunokompetentními buňkami a jejich produkty).

2.3. Protilátky (imunoglobuliny)

2.3.1. Struktura

Protilátka neboli imunoglobulin (Ig) se skládá: ze dvou těžkých (H) řetězců, které jsou kovalentně spojeny disulfidickými (cystinovými) můstky a ze dvou lehkých (L) řetězců, které jsou k těžkým připojeny cystinovými můstky. Každý H řetězec se skládá ze čtyř (u některých tříd z pěti) strukturně podobných domén, z nichž každá je tvořena sekvencí 110-120 aminokyselin.

Jednotlivé domény jsou spojeny krátkými spojovacími úseky polypeptidového řetězce. L řetězce jsou tvořeny dvěma imunoglobulinovými doménami. Domény na N-konci těžkého i lehkého řetězce jsou variabilní (označují se V_H a V_L), tzn., že detaily jejich struktury se liší individuálně mezi molekulami produkovanými různými klony B lymfocytů. Tyto variabilní domény L a H řetězců společně tvoří vazebné místo pro antigen (Ag). Ostatní domény jsou konstantní (C_L a $C_{H1} - C_{H4}$), tzn. shodné u řetězců téhož typu. (Hořejší, Bartůňková, 2009)



Obrázek 1: Struktura molekuly imunoglobulinu. Zeleně – lehké řetězce, červeně – těžké řetězce, 1 – hypervariabilní části lehkých řetězců, 2 – hypervariabilní části těžkých řetězců, 3 a 5 – místo, kde molekulu Ig štěpí papain, 4 – pantová oblast, 6 – místo pro vazbu komplementu, 7 – karbohydrát, 8 – inter řetězcové disulfidické můstky, 9 – intra řetězcové disulfidické můstky

2.3.2. Typy (třídy, izotypy)

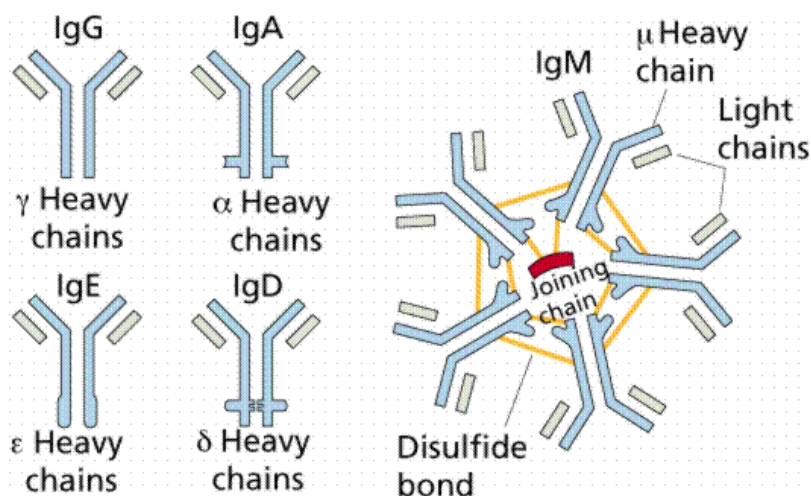
Ig třídíme do několika tříd (izotypů) podle druhu konstantních H řetězců (μ , δ , γ , α a ϵ) na IgM, IgD, IgG (IgG1-IgG4), IgA (IgA1 a IgA2) a IgE. Dále existují dva druhy L řetězců: κ a λ . Jakýkoliv typ H řetězce se může párovat jak s L řetězcem κ , tak s řetězcem λ a tvořit tak kompletní molekulu Ig.

IgM se vyskytuje ve dvou formách: monomerní (vyskytuje se na povrchích panenských B lymfocytů, kde tvoří receptor lymfocytu B = BCR) a pentamerní (někdy i hexamerní) - sekretovaný, který je tvořen jednotlivými monomery spojenými do kruhu cystinovými můstky a jedním L řetězcem. Má 10 vazebných míst pro Ag. Je prvním typem Ig, který se začne tvořit po kontaktu s Ag.

IgG je nejčastějším typem sekretovaného Ig. V organismu se vyskytuje v podobě monomeru (tvar písmena Y). Aktivuje komplement.

IgA se vyskytuje ve dvou formách: sérový a slizniční. Slizniční IgA se skládá ze dvou monomerů spojených J-řetězcem a ze sekreční komponenty. Sérový IgA se vyskytuje v podobě monomeru, dimeru či trimeru a funguje především jako opsonin. Nedokáže aktivovat komplementový systém.

IgE je zastoupen u zdravých lidí v séru pouze ve velmi malých koncentracích. Uplatňuje se především v reakci proti parazitům a na povrchích sliznic se vyskytuje u alergických (atopických) reakcí.



Obrázek 2: Struktura jednotlivých tříd imunoglobulinů

2.3.3. Vazebné místo (interakce Ag-Ab)

Vazebné místo Ig (variabilní oblast L a H řetězců Ig) interaguje s Ag pomocí nekovalentních vazeb (vodíkové můstky, iontové, hydrofobní a van der Waalsovy síly). Vazebné místo je více či méně komplementární svým prostorovým uspořádáním a rozložením nábojů ke struktuře na povrchu Ag (epitopu), se kterým vytváří komplex antigen-protilátka (Ag-Ab). Komplexy Ag-Ab (obsahující také často komplementové fragmenty) se nazývají imunokomplexy.

2.3.4. Účinek

Protilátky plní několik důležitých funkcí v organismu: neutralizace (toxinů, virů a jiných mikroorganismů vazbou na jejich epitopy a tím blokují jejich toxický účinek), opsonizace (vazbou na Ag se zlepšuje či vůbec umožňuje jeho pohlcení fagocyty a aktivace jejich destrukčních mechanismů) a aktivace komplementu (klasickou cestou, což napomáhá k rozvoji zánětlivé reakce).

2.3.5. Polyklonální a monoklonální Ab

Protilátková odpověď i proti nejjednodušším antigenům je většinou polyklonální a výsledkem je směs stovek či spíše tisíců individuálně více či méně odlišných molekul Ig, produktů velkého počtu různých klonů plasmocytů. Výsledkem záměrné imunizace experimentálního zvířete je polyklonální antisérum reagujícím s řadou epitopů na určitém Ag. (Hořejší, Bartůňková, 2009)

Naproti tomu monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu plasmatických buněk, mají jednu specifitu a jsou jednoho izotypu. V některých případech se tyto monoklonální protilátky vyskytují ve větších koncentracích i v lidském organismu a to v případech nádoru z plasmatických buněk (plasmocytomu). Monoklonální protilátky lze vytvářet in vivo a to po izolaci B lymfocytu (ze sleziny záměrně imunizovaného experimentálního zvířete) a jeho fúzí se vhodnou myelomovou buněčnou linií, která následně neomezeně dlouho produkuje monoklonální Ab. Tyto monoklonální protilátky jsou hojně laboratorně využívány (v našem případě v přímé i nepřímé imunoflouescenci). (Hořejší, Bartůňková, 2009)

2.3.6. Cirkulující protilátky

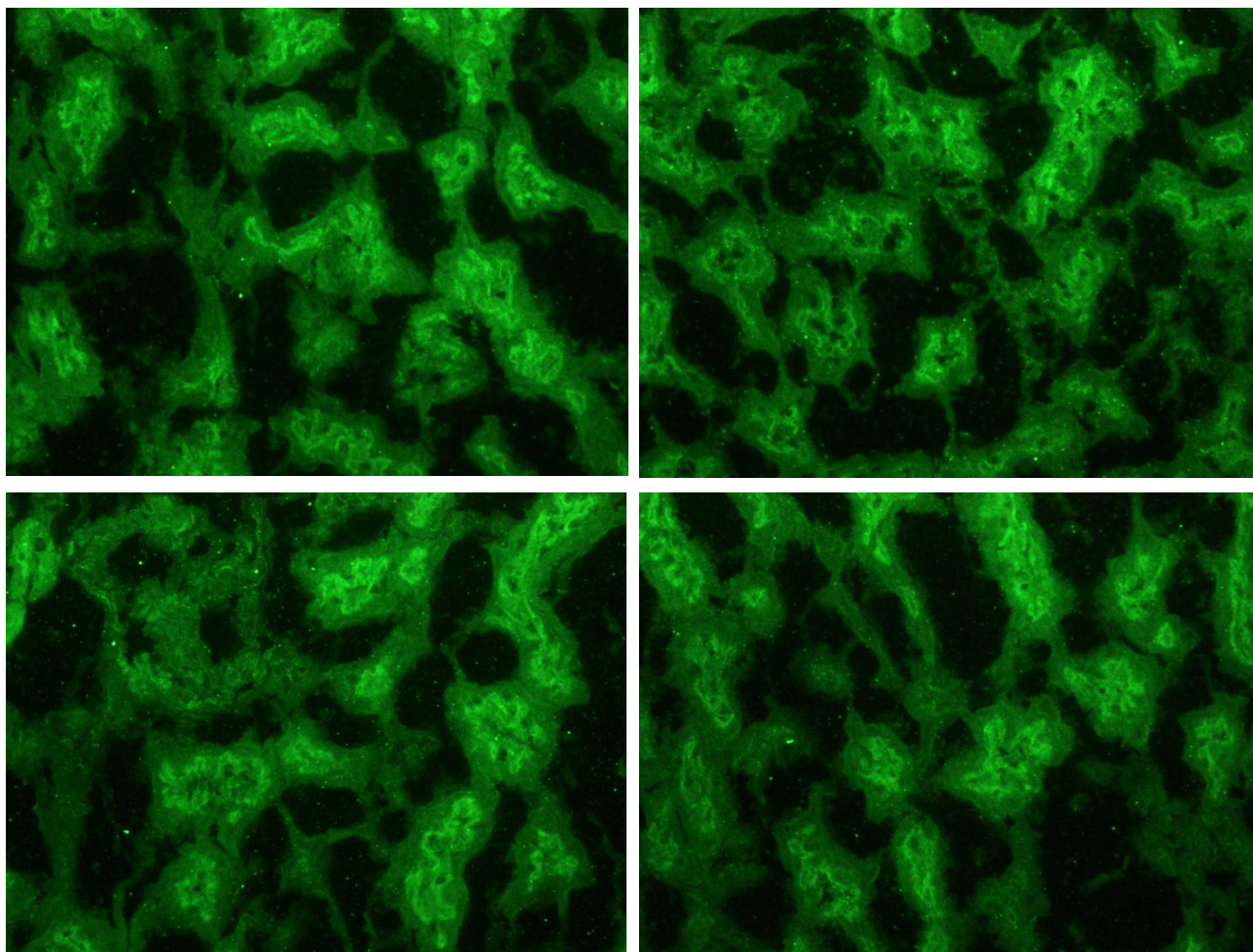
Jako cirkulující protilátky označujeme takové protilátky, které se nacházejí v krevním řečišti a cirkulují tak v krvi. Klinická praxe se zaměřuje na ty cirkulující protilátky, které se vymykají fyziologickému stavu jak svou koncentrací, tak specifitou.

Na Fingerlandově ústavu patologie detekujeme větší počet cirkulujících autoprotilátek metodou nepřímé imunofluorescence, jako jsou např. anti thyreoglobulin, anti thyreoperoxidáza, dále autoprotilátky proti parietálním buňkám, kůře nadledvin, proti mitochondriím (anti mitochondrial antibody - AMA), anti-nukleární faktor - ANF (anti nuclear antibody - ANA), proti kartáčovému lemu resorpčních epitelí (anti brush border antibody – ABBA), retikulinu IgA, endomysiu IgA, hladké svaloviny (anti smooth muscle antibody - ASMA) a ANCA-protilátky. (Hadži Nikolov, 2011)

2.3.6.1. Anti brush border antibody – ABBA

Tato protilátka byla vyčleněna v 70. letech při experimentálního hledání antinukleárního faktoru. Při nepřímém fluorescenčním vyšetření pozorujeme při pozitivě na ABBA světélkující apikální póly resorpčních epitelí krysí ledviny. To je hlavní rozdíl od ANF, kde světélkuje perinukleární a bazální část. (Nožička, 1991)

Co je antigenem, nebo přesněji epitopem, způsobujícím tvorbu této protilátky dodnes není přesně známo. Mikrostruktura mikroklyků, které tvoří kartáčový lem resorpčních epitelí, je velice složitá a skládá se z mnoha struktur, které by mohly tvořit antigenní determinantu. Jsou to například proteiny tvořící jak mikroklyky, tak náležící do cytoskeletu (aktin, myosin, fimbrin, villin, calmodulin, peptid 100kD, aj.).



Obrázek 3 až 6: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu – pozitivita ABBA na řezu z krysí ledviny

2.4. Autoimunní onemocnění

Pokud imunitní reakce vyvolává poškození organismu, nebo tkání, mluvíme o imunopatologických reakcích – autoimunní onemocnění. Takové poškození může být důsledkem nepřiměřené imunitní reakce na normální autoantigeny, tzv. autoimunitní reakce.

O autoimunitě se poprvé začalo uvažovat již počátkem 20. Století, avšak první důkaz autoimunního onemocnění datujeme do r. 1937, kdy byl proveden pokus na opicích (po vstříknutí mozkové tkáně opice, nemocné „alergickou“ encefalomyelitidou, do mozku zdravé opice došlo k nakažení právě touto nemocí). V r. 1945 byly popsány první autoprotilátky zodpovědné za hemolytickou anemii. (Shoenfeld a spol., 2007)

Autoimunní reakce může být jak humorálního, tak buněčného typu. V případě humorálního typu dochází k tvorbě autoprotilátek, většinou třídy IgG, které působí na tkáň buďto cytotoxickými mechanismy, nebo tvorbou a ukládáním imunokomplexů. Buněčně zprostředkované autoimunní reakce jsou charakterizovány poškozujícím zánětem způsobeným T_C a T_{H1} lymfocyty, jejich cytokinovými produkty a aktivací makrofágů. (Hořejší, Bartůňková, 2009)

Za autoimunní onemocnění protilátkového typu je nejspíše zodpovědný B1 typ B lymfocytů, který se fyziologicky vyskytuje především v období těsně po narození. V této době převládají při obraně organismu T_{H2} T lymfocyty a B lymfocytární systém, který je zastoupen především B1 typem, je dotvářen expozicí mikrobiálním, potravním i environmentálním antigenním podnětům. B1 typ charakterizuje koexprese znaků CD19/CD5, produkcí polyreaktivních, nízkoafinitních protilátek třídy IgM, které jsou schopné reagovat i s vlastními strukturami. Díky nízké afinitě tato vazba na vlastní struktury nezpůsobuje žádnou zánětlivou reakci. V pozdějším období jsou tyto protilátky nahrazovány vysoko afinitními přísně specifickými protilátkami, produkovanými B2 B lymfocyty. Vyskytují-li se v pozdějších fázích ontogenetického vývoje B lymfocyty, které koexprimují CD19/CD5, jsou obvykle zdrojem vysokoafinitních autoprotilátek třídy IgG. (Krejsek, Kopecký, 2004)

Dr. Ernst Witebsky a Dr. Noel Rose postulovali čtyři základní kriteria nutná k zařazení určité choroby mezi autoimunní.

1. Definování, co je cílem útoku, který orgán nebo buňka, přesněji i která struktura (tzv. autoantigen).
2. Určení, které mechanismy imunity jsou zodpovědné za napadení vlastních tkání – zda jsou to buňky nebo protilátky
3. Experimentální důkaz imunizace zdravého pokusného zvířete látkou aktivující imunitní reakci (tzv. adjuvans) spolu s příslušným předpokládaným autoantigenem a indukovat tak tvorbu autoprotilátek proti určité tkáni, která se stala terčem útoku u určitého onemocnění.
4. Důkaz, že pasivním přenosem protilátek z jednoho zvířete na druhé způsobíme příslušné onemocnění. (Shoenfeld a spol., 2007)

Aby mohlo vzniknout autoimunní onemocnění, je třeba prolomení autotolerance. K tomuto prolomení je obvykle potřeba kombinace několika současně působících faktorů: genetické dispozice (vnitřní faktory – např. pohlaví, dědičnost, věk, HLA molekuly), imunitní faktory (defekty imunity), hormony (estrogeny) a vnější faktory (životní prostředí, viry, léky, UV záření, stres, atd.).

Autoimunní choroby obecně postihují převážně ženy v reprodukčním věku (u některých onemocnění je postižení žen až 10x častější než mužů).

2.4.1. Systémová autoimunní onemocnění

Do této skupiny autoimunních onemocnění řadíme taková, u kterých jsou Ab namířené proti strukturám jaderných a dalších orgánově nespecifických Ag. Nejčastěji bývá tkáňové poškození způsobeno imunokomplexy. Patří sem např. systémový lupus erythematoses (SLE) s ANA (anti nuclear antibody), revmatoidní artritida (s výskytem revmatoidního faktoru), Sjögrenova choroba, systémová sklerodermie, aj.

2.4.2. Onemocnění postihující jeden orgán spolu s postižením dalších orgánů

Patří sem onemocnění, u kterých dochází k autoimunnímu poškození převážně jednoho orgánu a jsou doprovázeny řadou systémových příznaků se současným výskytem velkého množství orgánově nespecifických Ab. Patří sem nespecifické střevní záněty (Crohnova nemoc s ASCA – anti-saccaromyces cerevisiae a ulcerózní kolitida s ANCA – anti neutrophyl cytoplasmatic antibody), celiakie, autoimunní hepatitidy a plicní fibrózy.

2.4.3. Orgánově specifická autoimunní onemocnění

U těchto onemocnění se kombinuje jak humorální tak buněčná složka imunitního systému. Přítomnost autoprotilátek zde má významný diagnostický účinek, avšak nevyskytují se u všech onemocnění (u těch, které jsou způsobené buněčnou složkou imunitního systému). Mezi těmito onemocněními nalezneme např. některou z autoimunních endokrinopatií (Hashimotovu tyreoiditidu, Graves-Basedovu chorobu, Adisonovu nemoc či juvenilní typ diabetu mellitu), neurologická onemocnění (např. myastenia gravis), cytopenie (hemolytická anemie, trombocytopenie, aj.), kožní onemocnění (např. psoriáza) a oční onemocnění (uveitida).

2.5. Struktura trávicí trubice

Abychom mohli plně porozumět rozdílům mezi Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou, je třeba ozřejmit základní stavbu trávicí trubice, kterou obě nemoci postihují. S ohledem na probírané téma se podrobněji zaměřím na tenké a tlusté střevo.

Trávicí trubice je osou trávicího (gastrointestinálního) systému, do kterého patří: dutina ústní, část hltanu, jícen, žaludek, tenké střevo a tlusté střevo se svým análním úsekem. K této trubici jsou připojeny velké žlázy – slinné, játra a pankreas. Stěna trávicí trubice se skládá ze čtyř vrstev, které jsou popsány níže a jsou řazeny směrem zevnitř k povrchu. (Konrádová, 2000)

Tenké střevo se skládá za tří oddílů – duodenum, jejunum a ileum. V tenkém střevě rozlišujeme slizniční řasy – plicae circulares Kerckringi, které jsou tvořeny sliznicí a submukózou a od duodena k jejunu se snižují a v ileu mizí.

Sliznice tlustého střeva je na rozdíl od tenkého hladká, nejsou zde vytvořeny ani slizniční řasy ani střevní klky, ale zato Lieberkühnovy krypty jsou zde širší a hlubší. Tlusté střevo se skládá z těchto oddílů: cékum, kolon ascendens, kolon transversum, kolon descendens, sigmoideum a rektum. V rektu sliznice tvoří podélné záhyby tzv. columnae rectales.

2.5.1. Tunica mucosa

Tunica mucosa se skládá ze tří vrstev:

2.5.1.1. Lamina epithelialis

Charakter epitelu se v průběhu trávicí trubice podstatně liší. V dutině ústní, hltanu, jícnu a anální části tlustého střeva se nachází epitel vícevrstevný dlaždicový nerohovatějící. Ostatní části jsou vystlány epitelem jednovrstevným cylindrickým, který má v žaludku také funkci sekreční a ve střevě funkci absorpční.

Povrch střevních klků pokrývá jednovrstevný epitel cylindrický, který je tvořen především enterocyty, jejichž apikální pól je tvořen kartáčovým lemem s mikrokly. Nacházíme zde i pohárkové buňky, membránové epitelové buňky (M-buňky) a buňky enteroendokrinní. Mikrokly obsahují longitudinálně uspořádaná aktinová mikrofilamenta, která jsou ukotvena v terminální síti uložené pod apikální buněčnou membránou. Na povrchu mikrokly se nachází glykokalyx. V blízkosti povrchu mikrokly se nacházejí enzymy, které napomáhají trávení a vstřebávání živin.

2.5.1.2. Lamina propria mucosae

Tato vrstva se skládá z řídkého kolagenního vaziva s četnými žlázkami. Mohou se zde nacházet i malé lymfatické folikuly, jakožto i ve vrstvě submukózy. Pod epitelem, v intersticiu, se nachází četné makrofágy, lymfocyty a plasmatické buňky, které tvorbou protilátek chrání trávicí trubici před vniknutím bakterií.

Lamina epithelialis a lamina propria mucosae vybíhá v četné střevní klky – villi intestinales, které jsou 0,5-1,5mm dlouhé. Mezi bazemi klků vyustují tubulózní žlázy, tzv. Lieberkühnovy krypty, které dosahují až k lamina muscularis mucosae. Na dně krypt se nacházejí Panethovy buňky, které secernují proteiny.

2.5.1.3. Lamina muscularis mucosae

Dvě vrstvy hladkých svalových buněk jsou zde uspořádány tak, že ve vnitřní vrstvě jsou buňky orientovány spíše cirkulárně, ve vnější longitudinálně.

2.5.2. Tela submucosa

V submukóze nacházíme podobné struktury jako v lamina propria mucosae. Řídké kolagenní vazivo, větší krevní a lymfatické cévy, žlázy, lymfatická tkáň a vyskytuje se zde také nervový plexus submucosus Meissneri, který je tvořen vegetativními a senzitivními nervovými vlákny a drobnými vegetativními ganglii.

V duodenu se nacházejí rozvětvené tubulózní žlázy – tzv. Brunnerovy žlázy, které produkují výrazně alkalický sekret, který vyrovnává pH a chrání tak sliznici před kyselým žaludečním obsahem.

Zejména v ileu v lamina propria mucosae i submukóze se nacházejí četné lymfatické folikuly – Peyerovy plaky.

2.5.3. Tunica muscularis externa

Od úst až po horní třetinu jícnu je tato vrstva tvořena příčně pruhovanou svalovinou. V distálnějších částech se nachází hladká svalovina. Tunica muscularis externa se skládá ze dvou vrstev svaloviny uspořádaných tak, že každá se obtáčí v šroubovici, ale s rozdílnou výškou závitů. Mezi oběma vrstvami se nachází řídké kolagenní vazivo s krevními a nervovými cévami a nervovým plexem – plexus myentericus Auerbrachi. Tato svalová vrstva zajišťuje střevní motilitu.

2.5.4. Tunica serosa

V řídkém kolagenním vazivu se nacházejí četné krevní a lymfatické cévy. Zevně je pokryta jednovrstevným plochým epitelem – mezotelem. V oblasti krčního a hrudního jícnu se na povrchu nachází adventicie.

Seróza v tlustém střevě vybíhá na povrchu v drobné výběžky tzv. appendices epiploicae, kde se vyskytují četné adipocyty.

2.6. Idiopatické střevní záněty

O idiopatických střevních zánětech se obecně tvrdí, že jsou to tzv. multifaktoriální onemocnění, kde při vzniku nemoci hrají stejnou roli jak hereditární, tak i vlivy vnějšího prostředí. Do této skupiny idiopatických střevních zánětů řadíme dvě základní onemocnění: Crohnovu nemoc (CN) a ulcerózní kolitidu (UK). Může však nastat situace, kdy není možné rozlišit CN od UK. Takovou situaci popisujeme jako indeterminovanou neboli neurčitou kolitidu (idiopatic bowel disease = IBD). CN i UK mají několik společných rysů, ale také mnoho rozdílů, které jsou přiblíženy v následujících podkapitolách a tabulce. IBD se vyznačuje překrývajícími se rysy CN i UK a není tak možné stanovit jednoznačnou diagnózu.

Crohnova nemoc	Ulcerózní kolitida
Může postihnout celý trávicí systém od úst až po konečník	Zasahuje vždy konečník a různě rozsáhlý úsek tlustého střeva
Vzniká ve vyšších etážích střev a šíří se distálně	Vzniká v oblasti konečníku a šíří se proximálně
Zasažené úseky střeva se střídají se zdravými	Postihuje sliznici vcelku
Průjmy většinou bez příměsí	Průjem s příměsí krve
Zánět postihuje celou střevní stěnu	Zánět postihuje pouze sliznici
Vznik píštělí	Píštěle jen vzácně
Postihuje muže i ženy ve věku 18-35 let	Postihuje až 1,5x častěji ženy, vyskytuje se ve věku 30-40 let

Tabulka 2: Hlavní rozdíly mezi Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou

Největší rozdíly mezi oběma onemocněními jsou nejvíce zřetelná v raných stádiích a v období relapsu. Postupem času se tyto rozdíly stírají, takže není tak jednoduché rozpoznat, o kterou z obou nemocí se jedná. Tento jev vysvětluje tzv. „*dvousložková teorie*“, která tvrdí, že primární příčina (dosud neznámá) způsobí charakteristické poškození a následně se přidruží superponovaný syndrom (způsobený nasedající infekcí, poruchou imunologickou, karencí či jinými mechanismy) a způsobí tak sekundární systémovou a laboratorní odezvu společnou jak pro CN tak pro UK s tím rozdílem, že u CN se tyto sekundární projevy vyskytují už od počátku onemocnění. (Lukáš a spol., 1999)

Pro rozlišení typu idiopatického střevního zánětu má stále největší význam endoskopické vyšetření (kolonoskopie, gastrokopie, rektální ultrazvuk, aj.). Můžeme tak pozorovat změny ve střevní stěně charakteristické pro jednotlivá onemocnění (Rameshshanker a Arebi, 2012). Definitivní klinickou diagnózu však potvrzuje až histologické vyšetření.

Ve společnosti se tato onemocnění vyskytují v populaci asi pět nemocných na sto tisíc obyvatel (5:100 000). (Shoenfeld a spol., 2007) Jiná literatura však uvádí prevalenci v České republice u UK 40-45/100 000 obyvatel a u CN 18-22/100 000. (Lukáš a spol., 1999)

Musíme podotknout nemálo významnou skutečnost geografické variace (častější výskyt na severu než na jihu: Skandinávie x Afrika), rasových rozdílů (častější u bělochů a židovského obyvatelstva) a nakonec i genetických faktorů (přítomnost nemoci v rodině zvyšuje riziko vzniku nemoci: u UK 15x a u CN 3,5x) (Lukáš a spol., 1999) (Betteridge a spol., 2013)

Otázku příčiny vzniku těchto onemocnění se zabývalo mnoho studií a alespoň částečného rozřešení se dostavilo po pokusech s několika myšími liniemi, kde některé měly sklony buď ke spontánnímu, nebo podnícenému vzniku idiopatického střevního zánětu. U těchto myších linií byly zjištěny mutace genů pro TcR, HLA II. třídy, IL-2 a IL-10. Zcela jednoznačně jsou idiopatické střevní záněty asociovány s HLA DR2. Zcela nejzásadnější poznatek vlivu virových a bakteriálních infekcí na vznik idiopatických střevních onemocnění byl nález specifických protilátek proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA – AntiSaccharomyces Cerevisiae Antibodies) u 70% nemocných s CN oproti 5% s UK. Předpokládá se, že idiopatická střevní onemocnění jsou způsobená dysbalancí mezi prozánětlivými (TNF α , IL-1 β , IL-12, a INF γ) a protizánětlivými cytokiny tvořenými regulačními T lymfocyty (IL-10, TGF β) nebo cytokiny typu T_{H2} (IL-4). (Krejsek, Kopecký, 2004)

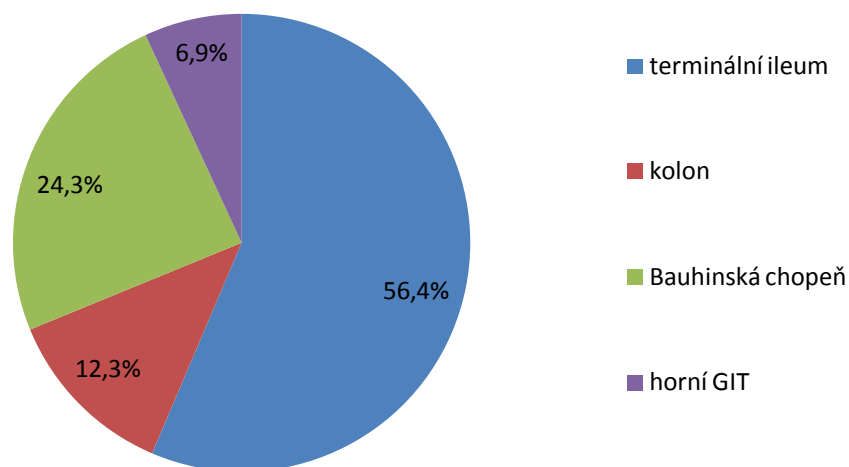
Díky zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů a chemotaktických faktorů (IL-8, LTD₄, PAF) u pacientů s idiopatickými střevními záněty dochází k akumulaci neutrofilních a eosinofilních granulocytů. Uvolněním obsahu cytoplasmatických granulí neutrofilních granulocytů dochází k tvorbě protilátek proti nim namířených (ANCA), především tedy proti pANCA. Výskyt protilátek pANCA a IL23A (Granlund a spol., 2013) je vyšší u pacientů s UK. Crohnova nemoc je také spojována s několika dalšími protilátkami jako jsou například anti-laminaribiosid (ALCA), anti-chitobiosid (ACCA), anti-mannobiosid (AMCA), anti-laminarin (anti-L) a anti-chitin (anti-C) (Kuna, 2013) (Plevy a spol., 2013). U pacientů s mírnou až střední aktivitou zánětu u UK a u pacientů v remisi můžeme prokázat kortikotropin stimulující faktor 2 (CRF2) v epiteliálních buňkách, nikoli však receptory pro tento faktor v lamina propria. (Chatzaki a spol., 2013)

V posledních letech se výzkumy zaměřují na pátrání po nějakém indikátoru, nejlépe zjištělným co nejméně invazivní metodou, který by nám dával možnost sledování aktivity onemocnění. Za takový indikátor může být považován C reaktivní protein (CRP) či měření CD4+ odpovědi imunitního systému, avšak praktické použití se stále pouze testuje. (Brandhorst a spol., 2013)

2.6.1. Crohnova nemoc

Crohnova nemoc neboli, regionální enterokolitida, je nespecifický granulomatózní zánět, pojmenovaný podle B. B. Crohna, který ji spolu s Ginzburgem a Oppenheimerem v r. 1932 popsal, avšak první popsané případy se objevují již v 18. Století (r. 1769 Morgagni). Je to idiopatické střevní onemocnění postihující jeden nebo více úseků tenkého nebo tlustého střeva, přednostně oblast ileocékální (tzv. terminální ileum), ale může se vyskytovat v jakékoliv oblasti od úst po konečník. Hlavním rysem je postižení stěny střeva s tzv. „skip areas“, neboli vynechanými místy nepostižené stěny, a mělkými vředy. Také může mít i jiné projevy mimo gastrointestinální trakt, jako jsou: kloubní a oční záněty, kožní vyrážky, výskyt aft v dutině ústní, záněty žlučových a jater. Na rozdíl od ostatních autoimunních onemocnění postihuje rovnoměrně muže i ženy převážně ve věku pod 40let (76,6%). Lokalizace výskytu uvádí graf 1.

Výskyt CN v částech GIT



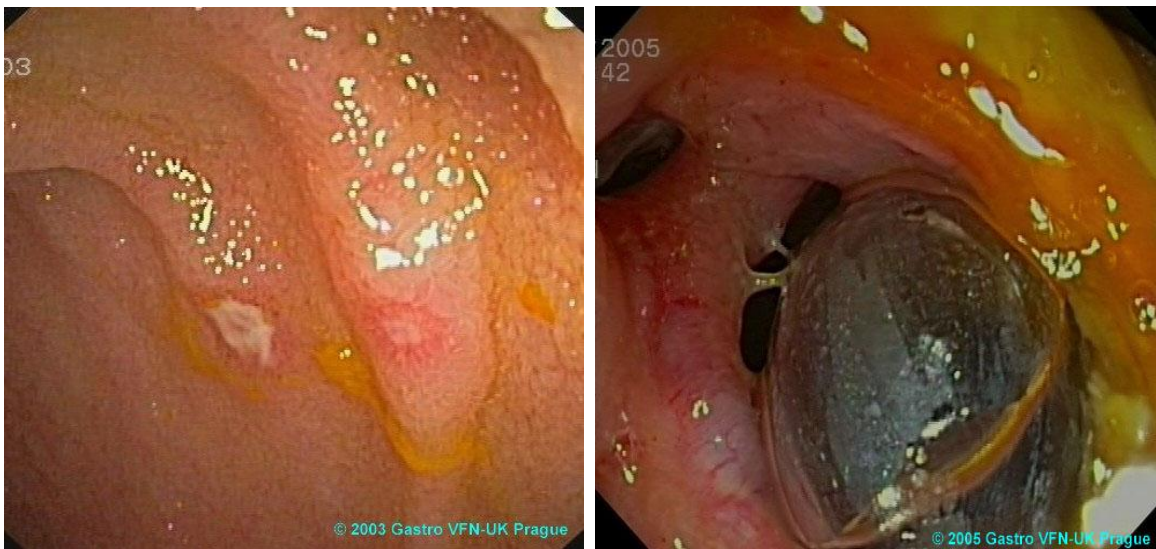
Graf 1: procentuální výskyt CN v částech GIT (Papi, 2005),

Klinická diagnostika Crohnovy choroby se opírá především v poskládání několika objektivních a subjektivních příznaků nemoci, jako jsou například abdominální bolest, hubnutí, krev ve stolici, anemie, a výsledků klinických a laboratorních testů. Při vážném podezření na toto onemocnění klinik přistupuje k endoskopii, kolonoskopii a ileoskopii. Tato vyšetření jsou však pro pacienta náročná a především v horním trávicím traktu skýtá mnohé problémy. Může se použít tzv. endoskopická kapsle, která pomocí kamery a několika čoček monitoruje celou trávicí trubici a díky své malé velikosti neobtěžuje pacienta. Díky ní můžeme zachytit i pacienty s lehkou slizniční erozí, která se nemusí jinak klinicky projevit či slouží k průběžnému monitorování nemoci. (Chermesh a Eliakim, 2008), (Goel a spol., 2013)

Crohnova choroba je rozdělována jednak podle anatomické lokalizace a jednak dle klinické povahy onemocnění. Velice záleží na lokalizaci. Lidé s postižením tenkého střeva mají sice menší riziko vzniku fistulí než pacienti s postižením ileo-cékálním, avšak mají vyšší riziko chirurgického řešení střevní neprůchodnosti. (Papi, 2005)

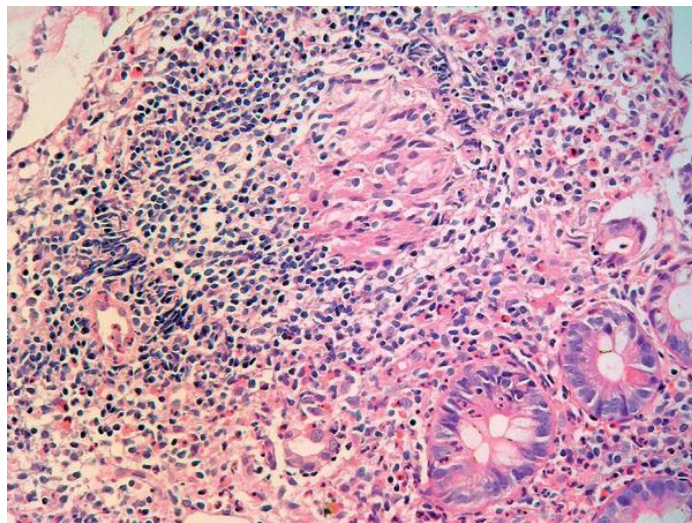
Vídeňská klasifikace rozděluje Crohnovu chorobu na tzv. nestenozující (non-stricturing), nefistulující (non-penetrating), stenozující (stricturing) a fistulující (penetrating). Fistulující typ je charakterizován tvorbou perianálních nebo intra-abdominálních fistul, abscesů a vředů. Stenozující typ je typický stálým výskytem zúžení lumen střeva s předstenozující dilatací a klinickými symptomy obstrukce. Nefistulující a nestenozující typ se neprojevuje klinickými komplikacemi. Existuje však i jiná, Montrealská klasifikace, která rozlišuje pacienty dle věku (A1-3), lokalizace (L1-4) a chování jako Vídeňská klasifikace (B1-3) (Selwin a spol., 2007). Papi (2005) provedl výzkum, ze kterého vyplývá, že 40% ze všech nestenozujících a nefistulujících typů se vyvine v jeden z typů s klinickými komplikacemi. Toto tvrzení také podporují další studie, jako například Louis et al., který tvrdí, že 45,9% pacientů s tichou formou během 10let manifestuje v ty s obstruujícími či fistulujícími komplikacemi. (Papi, 2005)

Vlastní příčina CN není dosud známá. Předpokládá se, že příčinou je faktor, který vniká do střevní stěny ze střevního lumen a uplatňuje zde svou antigenní povahu. Tímto vyvolávajícím faktorem může být například adherentně-invazivní typ *Escherichia coli*, která má vyšší schopnost přichytit se a pronikat do enterocyty. (Barnich et al., 2010). Makrofágy pak tento činitel likvidují a aktivují pomocí IL-1, TNF α T_{H1} lymfocyty, které svými produkty (INF γ , chemokiny) způsobují nepřiměřenou zánětlivou reakci a kumulaci CD64 + neutrofilních granulocytů (Amanzada a spol., 2013), které dávají vzniknout typickým granulomům. To by vysvětlovalo disperzní výsev primárních aftoidních lézí v místě hyperplastické lymfatické tkáně a lokální aktivace T lymfocytů, které následně způsobují vznik granulomů. Následně snad imunitní systém není schopen odstraňovat odumřelé enterocyty a jejich perzistence dále aktivuje zánět, který se tak šíří celou stěnou střevní. Zánět způsobuje intenzivní fibroprodukcí, která vede k výraznému ztluštění střevního lumen a vzniku *stenóz*. Možná z tohoto důvodu se nemoc soustředí na ileocékální část střeva, kde se vyskytuje hojná lymfatická tkáň.



Obrázek 7 a 8: 7 - Aftoidní léze v tenkém střevě, 8 – terminální ileum: dilatační balónová výduť v anastomóze, píštěl (vlevo nahoře)

Mikroskopicky je CN charakteristická nesouvislým postiženým sliznicí se zánětlivou infiltrací a edematózním prosáknutím. Až do oblasti serózy proniká fibroprodukce. Na spodině vředů nacházíme intenzivní proliferaci nesespecifické granulační tkáně, mimo ně pak dilataci krypt, úbytek pohárkových buněk a zároveň zvýšení Panethových buněk. Typické pro CN jsou také epiteloidní granulomy a mikrogranulomy tvořené histiocyty, které se vyskytují v některých případech jako obrovské mnohojaderné buňky disperzně rozptýlené ve všech vrstvách stěny střevní. Aftózní vředy se pak nacházejí v blízkosti hyperplastických lymfatických folikulů.



Obrázek 9: Charakteristický histologický nález u Crohnovy nemoci: nekaszeifikující granulom, vytvořený nahromaděním aktivovaných histiocyty ve sliznici střeva

2.6.2. Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida (lat. *colon* = tlusté střevo, *-itis* = koncovka pro zánět, *ulcus* = vřed) neboli idiopatická proktokolitida, je nespecifický hemoragicko-katarální nebo ulcerózní zánět sliznice konečníku a přilehlé části nebo celého tračníku s nárazovým nebo chronicky exacerbujícím průběhem (Mařatka, 1988). Nejčastěji se toto onemocnění vyskytuje ve věku 30-40 let, až 1,5x častěji u žen a větší výskyty zaznamenáváme v ekonomicky vyspělých státech. Poslední výzkumy prokázaly protektivní účinky malých dávek alkoholu na rozdíl od kouření. (El-Tawil, 2013).

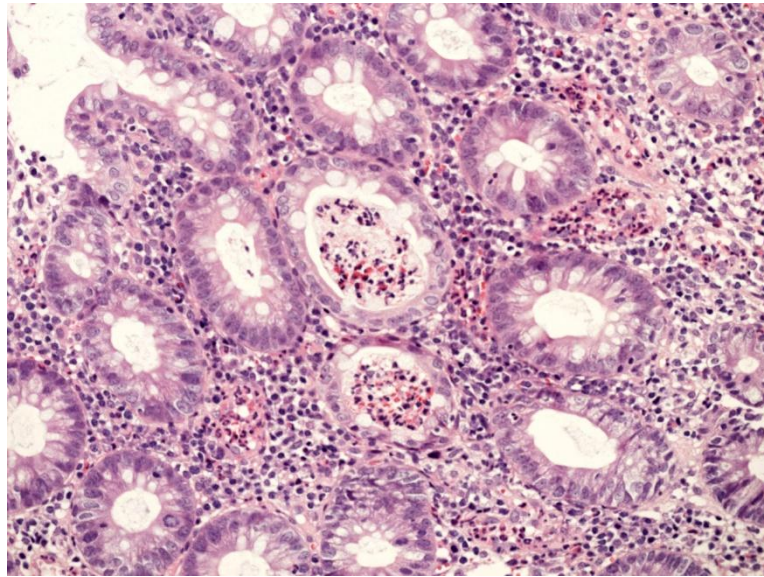
Etiologie stejně jako u CN není známá, ale kvůli difusnímu poškození sliznice a submukózy konečníku a tračníku lze předpokládat, že vyvolávající faktor/y se uplatňují zevnitř, a to krevní či nervovou cestou. Dochází pak k aktivaci T_{H2} lymfocytů, které svými CXC chemokiny aktivují zánětlivou reakci. Kvůli neznalosti tohoto vyvolávajícího faktoru prvotní lehká rektální forma katarálně-hemoragického zánětu neodpovídá na léčbu vůbec či pouze omezeně. Následná superinfekce modulující imunitní odezvu odpovídá na imunosupresivní a antiinfekční léčbu lépe, dokonce se v některých případech může zdát, že došlo k vyléčení. Primární příčina onemocnění však zůstává, a proto dochází k opětovné manifestaci.

Při sledování aktivity onemocnění je důležité sledovat pacienta nejen endoskopicky, ale současně také histologicky, jelikož makroskopický obraz nemusí vždy odpovídat skutečnému stavu. (Lemmens a spol., 2013) Dále pozorujeme vyšší hladiny C reaktivního proteinu (CRP) u pacientů s UK v aktivní fázi. (Rosenberg a spol., 2013)

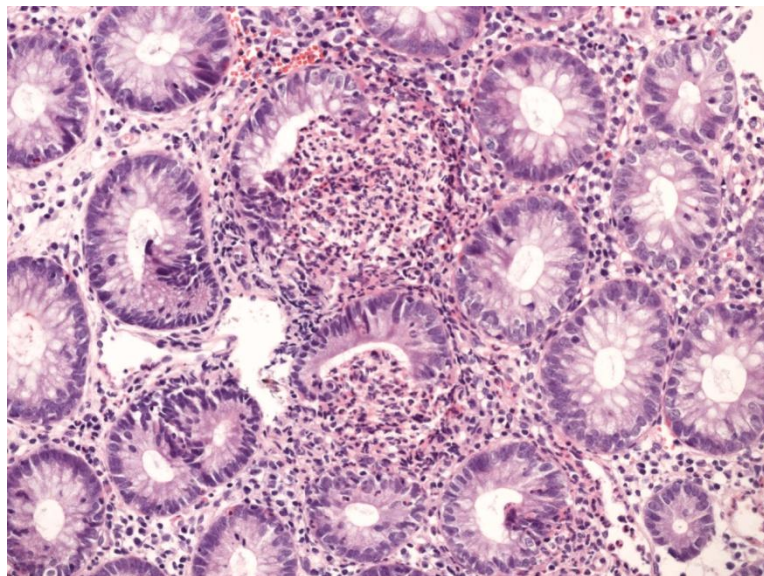


Obrázek 10: katarálně-hemoragický zánět rektální sliznice

Mikroskopický obraz UK odpovídá makroskopickému nálezu. V aktivní fázi nemoci je sliznice překrvená s hemoragiemi a difuzním zánětlivým infiltrátem. Typickým znakem jsou kryptové pseudoabscesy. V takto pozměněných kryptách sledujeme úbytek pohárkových buněk s oploštěním epitelových buněk a granulocytární exudát v lumen krypt. Na povrchu sliznice často pozorujeme erozi (rozpad tkáně), díky níž dochází k tvorbě ulcerací. Mimo to jsou velice časté i zánětlivé polypy, tvořené nespecifickou granulační tkání, ve kterých může docházet ke zvratu v karcinom. (Gerling a spol., 2013)



Obrázek 11: Histologický nález ulcerózní kolitidy: kryptové pseudoabscesy



Obrázek 12: Histologický nález ulcerózní kolitidy: zánětlivá destrukce krypt

2.7. Fluorescence

2.7.1. Historie a princip

Z historického hlediska bychom si měli vysvětlit několik pojmů: fluorescence, fosforescence a luminiscence.

Slovo luminiscence (lat. *lumen* = světlo) bylo poprvé použito fyzikem a historikem věd, Eilhardtem Wiedemannem, r. 1888 pro jev, kdy světelné záření je přítomné bez záření tepelného, tzv. „studené světlo“. (Valeur a spol., 2001) Je to vlastně obecná emise světla látkou, která může nastat při návratu elektronu z excitovaného stavu na stav základní. Luminiscenci dělíme na fluorescenci a fosforescenci.

Název fluorescence v pravém slova smyslu se používá až od doby zveřejnění druhého Becquerelova listu (Becquerel a Stokes, r. 1842), který zavedl označení fluorescence pro jev, kdy bezbarvá látka emituje záření za současného působení záření excitačního. Slovo fluorescence je vlastně „složenina“ ze dvou výrazů: *fluorspar* (minerál, který obsahuje kalcium fluorid = fluorit) a *opalescence* (rozptyl světla). (Valeur a spol., 2001) Excitaci vyvolává absorpce ultrafialového záření, které vybudí elektrony ze základního vibračního stavu na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Takto vybuzená molekula ztrácí při kolizích s okolními molekulami energii a přechází na nejnižší hladinu singletového excitovaného stavu. Z této nejnižší hladiny dochází k vyzáření fotonu a přechodu elektronu na základní hladinu. Jelikož k tomuto zářivému přechodu dochází z povolených stavů, doba, po kterou dochází k emisi záření, je 10^{-8} až 10^{-5} s. Energie vyzářených fotonů je zmenšená o vydané teplo a proto i emitované záření má větší vlnovou délku než excitační. Tento rozdíl je označován jako Stokesův posun.

Fosforescence (řec. *phos* = světlo, *phorensis* = nést) je vlastnost látky pojmenovaná už ve středověku, jako schopnost zářit ve tmě i nějakou dobu po předchozím osvětlení. Neznámější takovou látkou je Boloňský fosfor, objevený italským alchimistou Vincenzem Cascariolou r. 1602. Francis Perrin (1929) vyslovil hypotézu, že: „Fosforescence je stav molekuly, která se pohybuje mezi absorpcí a emisí ve stabilním i nestabilním intermediálním stavu, a jsou proto na chvíli schopné dosáhnout emisního stavu i bez přijetí určité množství energie z media.“ (Valeur a spol., 2001) Obecně však k fosforescenci odchází, když po absorpci záření dochází k excitaci elektronů na excitovaný singletový stav, který přejde v excitovaný tripletový (zakázaný) stav. Tento tripletový stav je charakterizovaný párem elektronů se stejným spinem. Proto dochází k zadržování tohoto stavu po delší dobu, než jak je tomu u fluorescence. Doba trvání tripletového excitovaného stavu může být i větší než 10 sekund. Nakonec však i z tohoto stavu dojde k vyzáření fotonu a přechodu na základní energetický stav.

2.7.2. Fluorochromy

Látka schopná fluorescence se nazývá fluorochrom. Fyzikální podstata fluorescence a fosforescence spočívá ve vlastnostech elektronového obalu atomů v molekulách fluorochromu. Elektrony těchto látek jsou schopny absorbovat foton excitačního světla, čímž se zvýší jejich energie. Část této nově nabyté energie však elektron po chvíli vyzáří jako foton s nižší energií a tedy delší vlnovou délkou. Protože došlo ke ztrátě energie, je vlnová délka emisního světla vždy delší než vlnová délka světla excitačního (Stokesovo pravidlo). Jelikož vlnová délka udává barvu světla, pozorujeme u emitovaného světla posun k červené části spektra. Existuje řada fluorescenčních látek, avšak na konjugaci jsou vhodné pouze fluorochromy obsahující chemickou skupinu, která se pevně váže na bílkovinu. Nenavázané barvivo musí být lehce odstranitelné, konjugací se nesmí snížit intenzita fluorescence a nesmí se jí poškodit imunochemická specifita proteinu a tedy vazebná schopnost protilátek. (Slavík, 1998)

Výčet některých používaných fluorochromů: (Slavík, 1998)

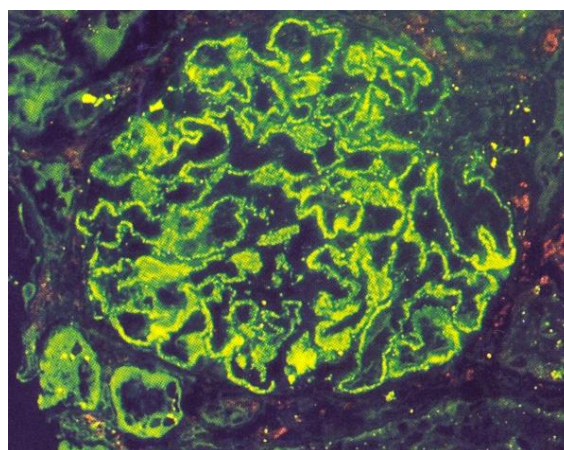
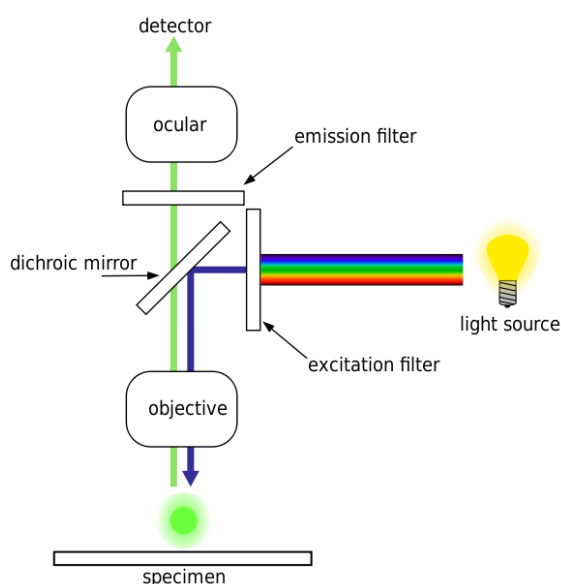
- FITC (fluorescein isothiokyanát) - maximum emise mezi 500-600 nm. Široce používán při imunofluorescenci (žluto-zelená)
- Rhodamin B (oranžovo-červená)
- Phycoerythrin (oranžová)
- Hoechst (bisbenzimid) - barví DNA
- DAPI - váže se na DNA a RNA (modrá)
- Ethidium bromid - váže se na dvouřetězcovou DNA a RNA (oranžová)
- Propidium Jodid - Barví DNA (červeně)
- Akridinová oranž - váže se na DNA (barví se zeleně) a RNA (tmavě červená)
- Congo Red - váže se na amyloid (růžová)
- GFP (zelený fluorescenční protein) – genová sekvence vkládaná do proteinu, která způsobí zelenou fluorescenci při jeho překládání v buňce (též příbuzný žlutý, modrozelený a nepříbuzný červený FP)

2.7.3. Fluorescenční mikroskopie

Vyhodnocování se provádí pomocí fluorescenčního či konfokálního mikroskopu (3D obraz), které využívají luminiscence fluorochromů při nasvícení světlem o určité vlnové délce. Systém polopropustných zrcadel a kondenzorů nám umožňuje pozorovat jen vymezené spektrum excitovaného vlnění (např. zelená). Detekčních systémů se používá buď přímo lidské oko, nebo různé druhy elektronických snímačů. (Lakowicz, 2006)

2.7.3.1. Fluorescenční mikroskop

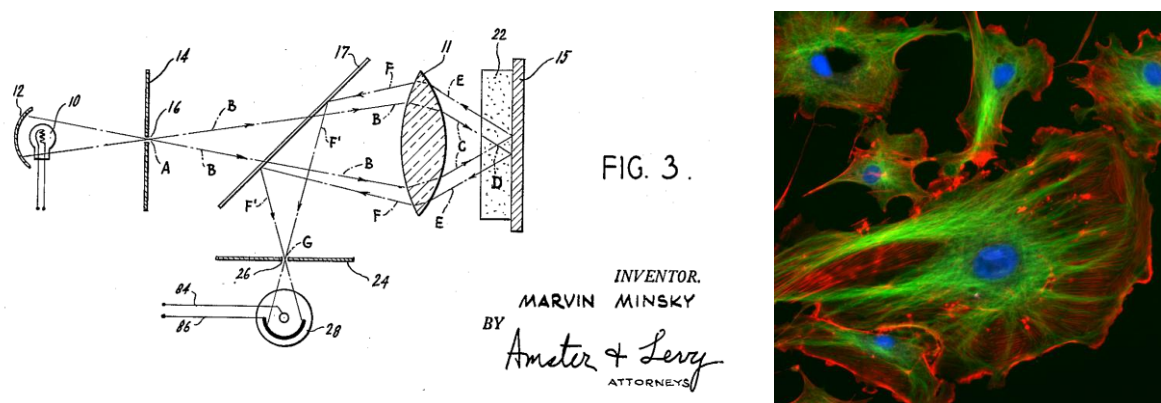
Pod pojmem fluorescenční mikroskop si můžeme představit jakékoliv zvětšovací přístrojové uspořádání, které využívá fluorescence ke studiu anorganických a organických látek. V přírodních vědách se využívá především sestavy epifluorescenčního mikroskopu, což je zástupce nejjednodušší konstrukce. Skládá se ze zdroje světla, které je pokud možno monochromatické, nebo alespoň světlo s úzkým vlnovým spektrem. Toho je docíleno použitím xenonové obloukové lampy, rtuťové výbojky či výkonných LED diod. Monochromatického záření se docílí tzv. excitačním filtrem, který propouští světlo o takové vlnové délce, které odpovídá vlnové délce excitačního maxima použitého fluorochromu, aby se dosáhlo co nejvyšší účinnosti excitace. Po odrazu od dichroického jinak také dichromatického zrcadla paprsek dopadá na povrch zkoumané látky (tkáňový řez), kde vyvolává excitaci fluorochromu. Ihned po excitaci dochází k emisi světla o nižší energii, tedy o větší vlnové délce, které je propouštěno přes dichroické zrcadlo k emisnímu filtru, který propustí paprsky pouze jedné nastavené vlnové délky, odpovídající emisní vlnové délce fluorochromu. Tento paprsek nakonec dopadá na detektor, v klinické praxi je toto záření pozorováno okem a hodnoceno semikvantitativně (+/++/+++).



Obrázek 13 a 14: 13 - Schéma epifluorescenčního mikroskopu, 14 – Glomerulus (FITC)

2.7.3.2. Konfokální mikroskop

Konfokální mikroskopie se od epifluorescenční liší nejenom v přístrojovém uspořádání, ale především v grafickém zobrazení. Jako zdroj budícího záření je zde využíván laserový paprsek, který dopadá bodově na zkoumanou látku, kde excituje fluorochrom. Ten ihned vyzáří světlo, které je navíc před dopadem na detektor ořezáváno na úzký proud paprsků. Tím je docíleno ostrosti, jaké nelze epifluorescenčním konstrukcí dosáhnout. Nevýhodou je však snížení intenzity excitovaného světla, která musí být kompenzována delší expozicí. Takto je bod po bodu „proskanován“ celý povrch zkoumané látky a detektorem zachycované excitační záření převáděné na signál, který je zesilován, postupně sbírán a interpretován softwarem. Výsledkem nám je buď 2D či 3D obraz vysoké kvality.



Obrázek 15 a 16: 15 - Schéma principu konfokálního mikroskopu z patentu Marvina Minskiho z roku 1957, 16 – imunofluorescenční detekce buněčných struktur

2.7.4. Imunofluorescence

Imunofluorescence (IF) je semikvantitativní metoda, která vznikla spolu s rozvojem sérologie a patří mezi běžné laboratorní techniky zejména při diagnostice autoimunitních chorob. Je založena na principu reakce antigenu s protilátkou (imunochemická reakce), kde se tato vazba zviditelňuje pomocí detekčních systémů, které zvyšují citlivost reakce a umožňují modifikace, které prostou precipitační metodou jsou jen těžko dosažitelné. V IF je detekčním systémem protilátka (Ab) značená fluorochromem, která se specificky váže na hledaný antigen (Ag). Následně využíváme vlastností fluorochromů ke zviditelnění vazby antigen-protilátka (Ag-Ab). V histologii využíváme IF k detekci různých antigenů ve tkáních i buňkách biotického materiálu (přímá imunofluorescence), dále cirkulujících autoprotiátěk v séru nemocného (nepřímá imunofluorescence). (Farlex, 2012)

Imunofluorescenční metody:

- **Přímá fluorescence** (DIF – direct imunofluorescence) - navázání značené protilátky fluorochromem přímo na antigen (Ag)
- **Nepřímá fluorescence** (IIF – indirect imunofluorescence) – vyhledávání protilátek v pacientově séru pomocí vazby značené protilátky namířené proti vazbě hledané protilátky s Ag v umělé buněčné kultuře (tzv. Anti-Ig)

2.7.4.1. Přímá imunofluorescence

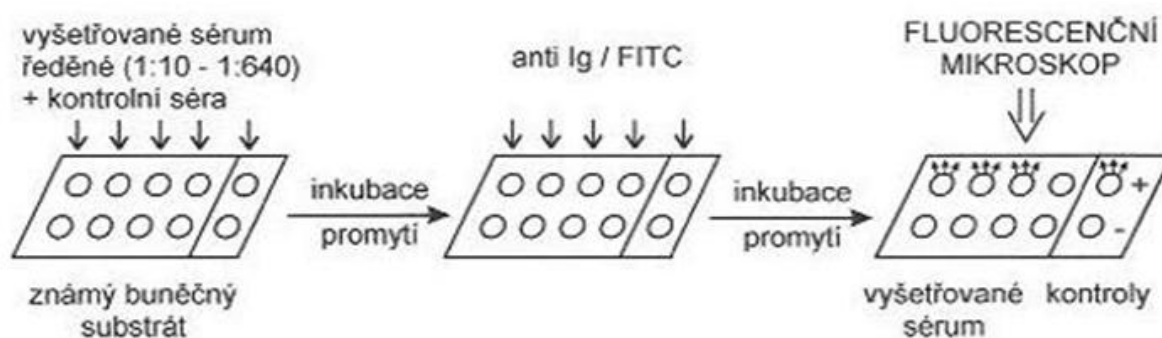
Při přímé imunofluorescenci je detekován antigen ve tkáni pomocí primární protilátky známé specifity, která je konjugována s fluorochromem. Tato metoda je hojně využívána především v histologii, kde slouží jako důležitá diagnostická metoda v průkazu nesčetných onemocnění včetně autoimunitních poruch (především kůže, ale i jiné tkáně).



Obrázek 17: Schéma přímé imunofluorescence (Toman, 2004)

2.7.4.2. Nepřímá imunofluorescence

Při nepřímé imunofluorescenci se prokazuje přítomnost protilátek (v imunologii i některých autoprotilátek) ve vyšetřovaném séru. Řez tkání nebo buněčná kultura se známým antigenem (např.: buněčná kultura záměrně infikovaná známým virem) se převrství vyšetřovaným sérem. V pozitivním případě se na antigen specificky naváže protilátka ze séra jako primární. Ve druhém kroku tento komplex převrstvíme sekundární protilátkou, což je protilátka proti imunoglobulinové frakci daného druhu (např.: protilátka proti lidskému IgG) a tato protilátka je konjugovaná s fluorochromem. Mezi jednotlivými kroky je nutné vzorky důkladně proplachovat, abychom odstranily nenavázané protilátky. Výsledkem všech vyšetření je titr protilátek, který zjistíme provedením testu u série postupně zředěných sér (viz.obr.6).



Obrázek 18: schéma nepřímé imunofluorescence (Toman, 2004)

3. Zadání práce, cíl práce

Na základě výše uvedených poznatků jsme se v této bakalářské práci snažili o průkaz souvislosti přítomnosti ABBA v séru pacienta s jeho možným onemocněním Crohnovou chorobou. K tomu jsme použili histologických a imunofluorescenčních výsledků zanesených do nemocničního informačního systému (NIS) a jejich statistického zpracování.

4. Experimentální část:

Abychom mohli dojít k datům, jejichž hodnocení je cílem této bakalářské práce, musí proběhnout celá řada postupů. Jednak zhotovení barveného preparátu z endobiopsie pro světelnou mikroskopii a diagnostiku idiopatických střevních zánětů, pak je to důkaz protilátek (ABBA) obsažených v séru pacienta a jejich imunofluorescenční průkaz.

4.1. Zpracování endobiopsie a zhotovení barveného preparátu

4.1.1. Příjem materiálu

Materiál, ze kterého lze zhotovit preparát vhodný ke zhodnocení morfologie a případné stanovení diagnózy idiopatického střevního zánětu, je již z klinického pracoviště vložen do fixačního média (10% neutralizovaný formaldehyd).

4.1.2. Zpracování

Po důkladné fixaci, která je časově závislá na velikosti vzorku tkáně, je tato tkáň lékařem přikrojena do tkáňového bloku, o maximální velikosti 2x2x0,5cm, a vkládána do plastových kapslí označených bioptickým laboratorním číslem a prosycena 70% alkoholem. Následuje převedení tkáně do parafínu pomocí odvodňovací a prosycovací řady, která obsahuje nejméně tři lázně 96% alkoholu, tři lázně xylenu a tři poslední lázně parafínu o teplotě 56 - 58°C. Po prosycení tkáně parafínem je takto zalévána do parafínového bločku, ze kterého se po důkladném zchlazení krájí tenké řezy napínané na hladině želatiny na podložním skle označeném bioptickým číslem.

Pro barvení se používá klasické přehledné barvení hematoxylinem – eosinem. Celý barvicí proces probíhá v automatických barvicích přístrojích Sakura, které provádějí celý barvicí proces naprosto automaticky. Skládá se z těchto částí a lázní (v závorce pro přehlednost uvádím čas máčení v lázních):

- Zapékací komůrka (10min)
- 3 lázně xylenu (3x5min)
- 2 lázně 96% alkoholu (2x5min)
- Lázeň 70% alkoholu (3min)
- Lázeň destilované vody (2min)
- Lázeň Mayerova hematoxylinu (5min)
- Promývací lázeň s proudící pramenitou vodou (5min)

- Lázeň 1% roztoku eosinu (1min)
- Promývací lázeň s proudící pramenitou vodou (20s)
- Lázeň 70% alkoholu (5min)
- 2 lázně 96% alkoholu (2x5min)
- Lázeň acetonu (2min)
- 2 lázně xylenu (2x5min)

Montování probíhá automaticky v montovacím automatu, připojeným in-line k barvicímu automatu, s použitím xylenu a speciální montovací pásky. Po krátkém zaschnutí je preparát připravený k prohlížení světelným mikroskopem.

4.1.3. Roztoky, činidla, média

Jako fixační tekutina se používá neutralizovaný 10% formaldehyd o pH 7. Během prosycování parafínem, odparafinování a odvodňování jsou používány tyto roztoky: 96% alkohol, 70% alkohol, destilovaná a pramenitá voda, Mayerův hematoxylin, 1% roztok eosinu, aceton, xylen, parafín. Pro napínání tenkých řezů na podložní sklo se užívá roztoku želatiny (želatina + thymol + destilovaná voda). Ve FÚP se jako montovací médium v automatických montovacích přístrojích používá xylen, ve výjimečných případech pertex.

4.1.4. Pomůcky a přístroje

Přístrojem pro převedení tkáně do parafínu slouží autotechnikony (Shandon Citadel 1000 a 2000, Bamed TPC a Bamed Intelsint ETP). Zalévání do parafínu je prováděno pomocí zalévací linky Leica EG1160 a kovových formiček různých velikostí.

Ke krájení tenkých řezů slouží sáňkové mikrotomy Leica opatřené noži na výměnné žiletky, dále jsou třeba podložní skla, Pasteurova pipeta, plastová kádinka na želatinu, jehly, podložní destička, nahřívací ploténka, stojan na preparáty a buničitá vata.

Pro barvení je užíváno automatických barvicích přístrojů Tissue-Tek Prisma od firmy Sakura, do kterých jsou preparáty vkládány ve speciálních nosičích preparátů. Pro urychlení provozu je k tomuto barvicímu přístroji připojen in-line montovací automat Tissue-Tek Film. Pro jeho činnost je zapotřebí montovací páska vyráběná stejnou firmou.

4.2. Zpracování materiálu pro fluorescenční vyšetření

4.2.1. Příjem materiálu

Materiálem pro nepřímé imunofluorescenční vyšetření, mezi které se řadí i vyšetření na přítomnost ABBA, se provádí ze séra, či plné nesrážlivé krve, která se po přijetí na FÚP dále zpracovává stáčením v centrifuze EBA 20 (5min při 2500ot/min) a získané sérum se slévá do čisté zkumavky označené imunofluorescenčním katalogovým číslem. Séra se do doby zpracování uchovávají v ledničce (při 2-10°C) a to maximálně po dobu 3 dní. Pro delší skladování užíváme teploty mrazicího boxu (-24°C).

4.2.2. Zpracování

Nedílnou součástí vyšetření na přítomnost ABBA, je příprava tkáňových preparátů z krysí ledviny. Tyto preparáty se připravují do zásoby ze zmraženého bločku pomocí kryomikrotomu, který je uzpůsobený pro krájení tenkých řezů zmražených tkání v Cryomountu při -20°C. Takto připravené preparáty se uchovávají v mrazicím boxu při -20°C. Na každé vyšetření je zapotřebí jeden preparát na jedno vyšetřované sérum a dva preparáty jako kontrolní. Všechny preparáty po vyndání z mrazicího boxu necháme 15min proschnout při laboratorní teplotě.

Králičí protilátku před samotným vyšetřením čerstvě ředíme v poměru 1:80 fosfátovým pufrům s chloridem sodným (PBS) o pH 7,2. Vyšetřované sérum ředíme v poměru 1:7 s PBS o pH 7,6.

Preparáty pro proschnutí rovnáme do vlhké komůrky a zajistíme magnetickou páskou. Další postup je stručně popsán níže:

- Nakapání ředěného vyšetřovaného séra (doba působení 30min)
- Opláchnutí v několika lázních fosfátového pufru, zakapání preparátů pufrům, aby nedošlo k vyschnutí
- Nakapání naředěné králičí protilátky (doba působení 30min)
- Opláchnutí ve třech lázních PBS
- Zamontování do pufrovaného glycerinu

Pozitivní a negativní kontrola by měla vyloučit falešně pozitivní a falešně negativní výsledek testu. Pozitivní kontrola je připravována se sérem s již dříve prokázanou pozitivitou semikvantitativně na +++ . Na negativní kontrolu není kapáno žádné sérum, pouze ředěná protilátka.

Výsledky vyšetření jsou zapisovány do předem vytištěných archů. Zaznamenává se zde pořadové číslo vyšetření (imunofluorescenční číslo), druh vyšetření a semikvantitativní hodnocení (-/+ /++ /+++), které provádí zkušený lékař. Z těchto tištěných archů, které jsou uchovávány v archivech po dobu x let, jsou data přepisována do nemocničního informačního systému (NIS).

4.2.3. Roztoky, činidla, média

Králičí protilátka proti lidským imunoglobulinům: IgA, IgG, IgM, Kappa a Lambda značená FITC (RaAHu/IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda/FITC – od firmy Dako, kód F 0200), fosfátový pufr o pH 7,6, PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným), montovací médium (pufrovaný glycerin), Cryomount.

4.2.4. Pomůcky a přístroje

Kryomikrotom (Thermo scientific – microtom HM 550), podložní skla, krycí skla, vlhká komůrka, mikropipeta (100 μ l), lázně na pufr, magnetická páska, tkáňový blok z krysí ledviny, kovový terčik.

5. Způsob vyhodnocení

5.1. První výběrový soubor – porovnání ABBA pozitivních IF vyšetření s histologickým nálezem endobiopsií

První výběrový soubor zahrnuje všechna imunofluorescenční vyšetření z let 2009 až 2011, která vykazovala pozitivitu na ABBA: +, ++ nebo +++. Tato data byla získána z výsledkových archů. Každý pacient byl podroben průzkumu, zda mu někdy byla provedena endobiopsie z tenkého či tlustého střeva (zpracovaná pouze na FÚP FNHK) a s jakým výsledkem histopatologického nálezu. K tomu jsme potřebovali přístup do NIS a pomocí rodných čísel byl každý pacient zvlášť vyhledán a výsledky jeho vyšetření zaznamenány.

Tak byli pacienti řazeni do kategorií: histologicky potvrzená Crohnova nemoc (CN), histologicky potvrzená ulcerózní kolitida (UK), suspektní nález pro Crohnovu chorobu (SCN), suspektní nález pro ulcerózní kolitidu (SUK) a nespecifický nález (NN). Do kategorie nespecifického nálezu byly zahrnuty např.: normální nález, nespecifické zánětlivé změny, hyperplastický polyp, nádorové změny, celiakie, aj.

U tohoto výběrového souboru jsme sledovali i stupeň positivity ABBA u jednotlivých kategorií. Přítomnost sledovaného jevu vyznačuje číslice 1, nepřítomnost 0. Záznamy učiněné z tohoto průzkumu jsou zařazeny v přílohouvé části. Tyto záznamy obsahují pořadové číslo pacienta, rok narození (je udáván ve formátu dvoumístných čísel, jež představují poslední dvojčíslí z roku narození, např.: rok narození 1962 je zde uveden jako 62, rok narození jiný než ve 20. století je uveden jako celý, např.: 2002), imunofluorescenční číslo (IF), diagnostický kód (DG), číslo biopsie (BČ) a zařazení do výše uvedených kategorií.

5.2. Druhý výběrový soubor – porovnání klinické diagnózy (DG CN – K50, DG UK – K51) s výsledkem ABBA vyšetření

Druhý výběrový soubor zahrnuje všechny pacienty, kteří byli v jednotlivých letech (2009-2011) vyšetřeni na FÚP a jejich klinická diagnóza spadá do kategorie Crohnovy nemoci (DG K50), nebo ulcerózní kolitidy (DG K51). Tento výběr jsme učinili pomocí NIS vyhledávacích kritérií podle diagnózy pacienta v určitém časovém období. U těchto pacientů jsme dle jejich rodného čísla vyhledávali, zda podstoupili imunofluorescenční vyšetření (IF), zda toto vyšetření zahrnovalo výsledek na přítomnost ABBA protilátky a s jakým semikvantitativním výsledkem. V tabulce výsledků, umístěné v části přílohy, je uvedené pořadové číslo pacienta, diagnostický kód (DGK), zda bylo či nebylo provedeno imunofluorescenční vyšetření (IF) a výsledek vyšetření na ABBA (nevyšetřeno/-/+ /++ /+++). Přítomnost sledovaného jevu vyznačuje číslice 1, nepřítomnost 0.

Hledané vztahy v jednotlivých letech (2009, 2010 a 2011) jsme znázornili do formy tabulek a přehledných kruhových výsečových grafů. Nakonec i celkovou závislost za roky 2009-2011.

6. Výsledky:

Pro dosažení co nejkompexnějšího zobrazení současné situace závislosti idiopatických střevních onemocnění na pozitivě ABBA, jsme si vytvořili dva testované soubory. Výsledky jsme vyhledávali pomocí NIS (nemocniční informační systém – systém, do kterého se vkládají veškeré nálezy pacientů) a tištěných archů.

6.1. První výběrový soubor – porovnání ABBA pozitivních IF vyšetření s histologickým nálezem endobiopsií

Z celkového počtu imunofluorescenčních vyšetření byly vybrány případy, které vycházely pozitivně na ABBA (semikvantitativně hodnoceno: +/++/+++). Z tohoto počtu jsem posuzovala pouze pacienty, kteří měli zároveň na FÚP vyšetřenu endobiopsii. Podle výsledku endobiopsie (histopatologického nálezu) jsem tyto pacienty dělila do skupin s CN, UK, SCN, SUK a NN. Součástí přílohy jsou tabulky hodnocení jednotlivých IF vyšetření a srovnání s endopiopsií. Následující tabulky a grafy zobrazují výsledky hodnocení v letech 2009-2011.

V roce 2009 bylo provedeno celkem 3531 imunofluorescenčních (IF) vyšetření, z toho 547 s pozitivním výsledkem na ABBA. Z tohoto počtu pacientů bylo 86 endobiopsicky vyšetřeno. Výsledky těchto endobiopsií ukazují na to, že z těchto 86 bylo 11,63% pacientům diagnostikována CN; 5,81% UK; 2,33% IBD; 11,63% SCN; 10,47% SUK a 58,14% pacientů s jiným morfologickým obrazem. V tabulce je dále uvedeno semikvantitativní hodnocení positivity ABBA a jejich četnost pro jednotlivé morfologické obrazy.

IF2009		3531																		
IF ABBA 2009		547		100%																
IF ABBA S ENDOBIPSÍÍ		86		15,72%																
ABBA CN			ABBA SCN			ABBA UK			ABBA SUK			ABBA IBD			ABBA NN					
10 11,63%			10 11,63%			5 5,81%			9 10,47%			2 2,33%			50 58,14%					
+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++			
1	2	7	2	2	6	0	3	1	8	1	1	2	0	0	19	15	16			

Tabulka 3: Počet pacientů s pozitivitou na ABBA (+/++/+++) u jednotlivých morfologických obrazů (CN, UK, IBD, SCN, SUK, NN) za rok 2009.

V roce 2010 z celkového počtu 2935 IF vyšetření bylo 925 s pozitivním výsledkem na ABBA. Z tohoto počtu pacientů bylo 153 endobioticky vyšetřeno. Histopatologické výsledky ukazují na to, že z těchto 153 bylo 3,27% pacientům diagnostikována CN; 6,54% UK; 0,00% IBD; 14,38% SCN; 1,31% SUK a 74,51% pacientů spadá do kategorie NN.

IF 2010			2935														
IF ABBA 2010			925			100%											
IF ABBA S ENDOBIPSIÍ			153			16,54%											
ABBA CN			ABBA SCN			ABBA UK			ABBA SUK			ABBA IBD			ABBA NN		
5 3,27%			22 14,38%			10 6,54%			2 1,31%			0 0,00%			114 74,51%		
+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
2	1	2	4	3	15	1	5	5	0	1	0	0	0	0	20	40	54

Tabulka 4: Počet pacientů s pozitivitou na ABBA (+/++/+++) u jednotlivých morfologických obrazů (CN, UK, IBD, SCN, SUK, NN) za rok 2010.

Ze 2584 IF vyšetření v roce 2011 bylo 780 s pozitivním výsledkem na ABBA a z toho 157 pacientů bylo současně endobiopsicky vyšetřeno. Z těchto 157 bylo 7,64% pacientům diagnostikována CN; 4,46% UK; 0,00% IBD; 7,64% SCN; 1,91% SUK a 78,34% pacientů s jiným histopatologickým obrazem.

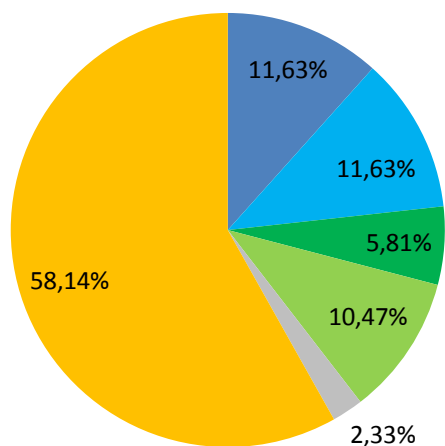
IF 2011		2584																		
IF ABBA 2011		780		100%																
IF ABBA S ENDOBIPSIÍ		157		20,13%																
ABBA CN			ABBA SCN			ABBA UK			ABBA SUK			ABBA IBD			ABBA NN					
12 7,64%			12 7,64%			7 4,46%			3 1,91%			0 0,00%			123 78,34%					
+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++			
0	4	8	4	2	6	1	3	3	1	1	1	0	0	0	27	38	57			

Tabulka 5: Počet pacientů s pozitivitou na ABBA (+/++/+++) u jednotlivých morfologických obrazů (CN, UK, IBD, SCN, SUK, NN) za rok 2011.

Následující výšečové grafy znázorňují procentuální zastoupení jednotlivých morfologických obrazů za roky 2009, 2010 a 2011. Pro přehlednost jsou řazeny vedle sebe. Zde si můžeme ověřit vzrůstající tendenci počtu nespecifických nálezů u ABBA pozitivních pacientů.

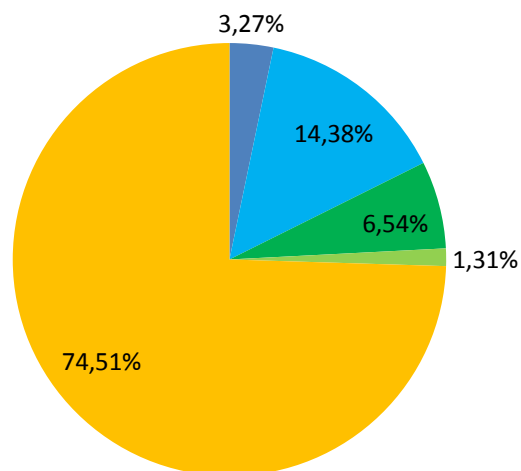
Zastoupení DG u ABBA pozitivních pacientů v r.2009

■ CN ■ SCN ■ UK ■ SUK ■ IBD ■ NN



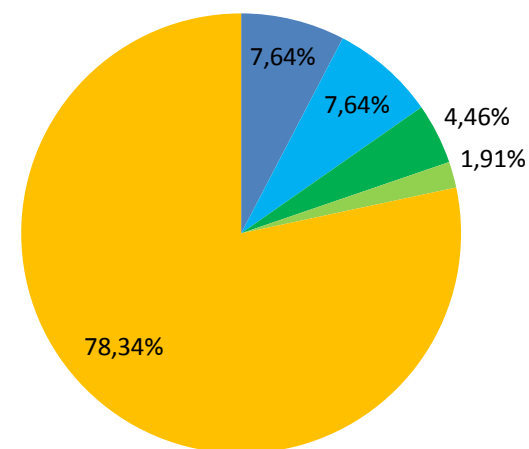
Zastoupení DG u ABBA pozitivních pacientů v r.2010

■ CN ■ SCN ■ UK ■ SUK ■ IBD ■ NN



Zastoupení DG u ABBA pozitivních pacientů v r.2011

■ CN ■ SCN ■ UK ■ SUK ■ IBD ■ NN



Grafy 2, 3, 4: Procentuální zastoupení jednotlivých histopatologických nálezů u ABBA pozitivních pacientů v letech 2009, 2010 a 2011.

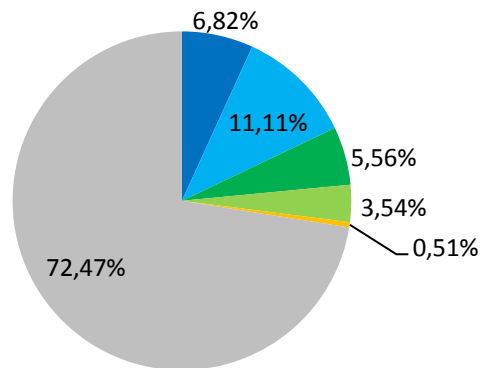
Následující tabulka a graf shrnují výsledky za celé sledované období (2009 - 2011). Z celkového počtu pacientů (396) pozitivních na ABBA, kteří mají i výsledek endobiopsie, má 6,82% morfologicky potvrzenu CN; 5,56% UK; 0,51% IBD; 11,11% SCN; 3,54% SUK a 72,47% pacientů jiný obraz.

	IF ABBA	ABBA CN		ABBA SCN		ABBA UK		ABBA SUK		ABBA IBD		NN	
		počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
2009	86	10	11,63	10	11,63	5	5,81	9	10,49	2	2,33	50	58,14
2010	153	5	3,27	22	14,38	10	6,54	2	1,31	0	0	114	74,51
2011	157	12	7,64	12	7,64	7	4,46	3	1,91	0	0	123	78,34
CELKEM	396	27	6,82	44	11,11	22	5,56	14	3,54	2	0,51	287	72,47

Tabulka 6: Počet pacientů s pozitivitou na ABBA (+/++/+++) u jednotlivých histopatologických nálezů (CN, UK, IBD, SCN, SUK, NN) za období 2009 - 2011.

Zastoupení DG u ABBA pozit.pacientů v r.2009-2011

■ ABBA CN ■ ABBA SCN ■ ABBA UK ■ ABBA SUK ■ ABBA IBD ■ NN



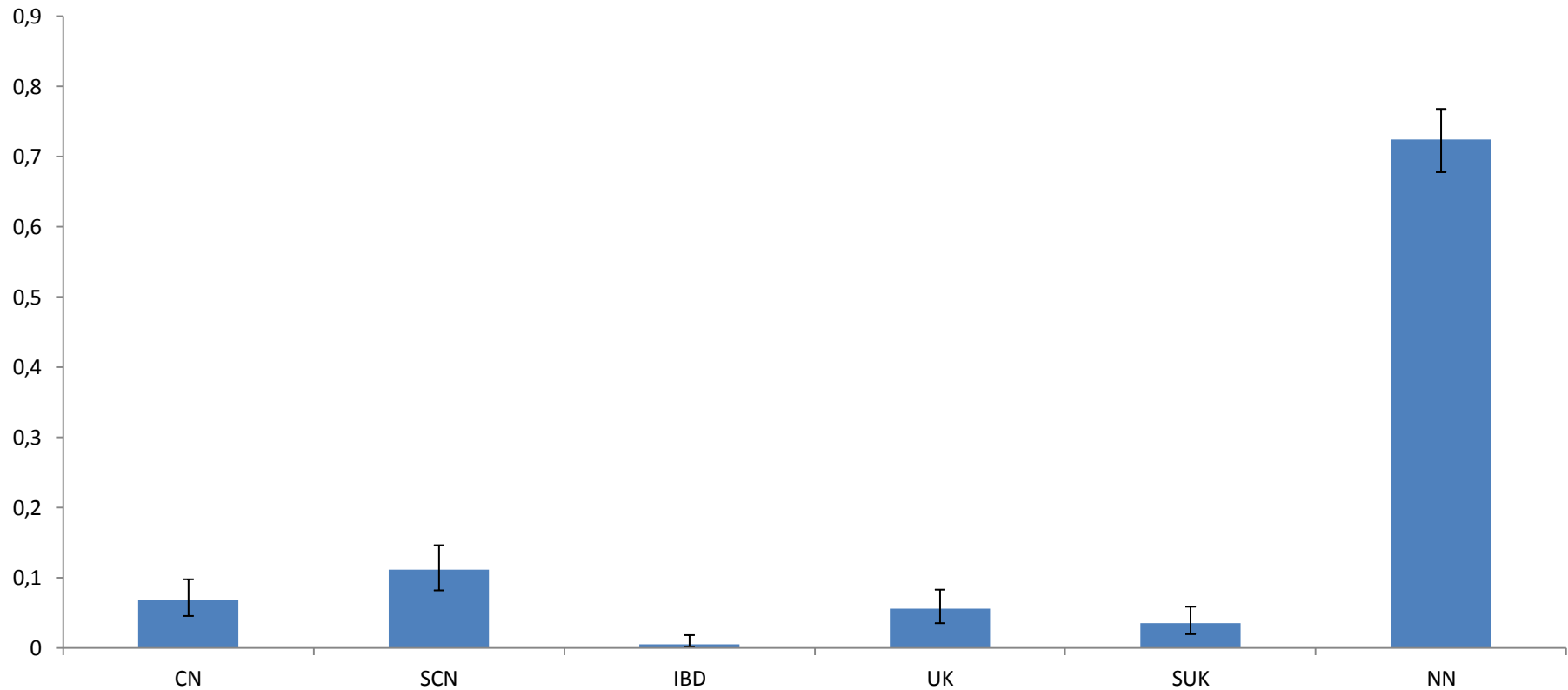
Graf 5: Celkové procentuální zastoupení jednotlivých morfologických obrazů u ABBA pozitivních pacientů za období 2009 – 2011.

Výše uvedené výšečové grafy a tabulky sice znázorňují výsledky z námi zjištěného průzkumu, nemohou však zachytit skutečnou situaci v populaci. Aby výsledky průzkumu mohly být použity na celý základní soubor pacientů, musíme provést jejich korekci pomocí intervalového rozpětí (pravá a levá mez), které nám určí skutečné procento pacientů, kteří s 95% pravděpodobností budou spadat do jednotlivých morfologických obrazů. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7 a grafu 6, který zobrazuje také rozpětí chybových úseček. V tabulkách jsou uvedeny hodnoty bez převedení na procenta (např.: relativní četnost CN je 0,068182 \approx 6,82%).

počet vyšetření ABBA	396					
onemocnění	CN	SCN	UK	SUK	IBD	NN
počet biopsií	27	44	22	14	2	287
relativní četnost	0,068182	0,1111111	0,055556	0,0353535	0,005051	0,724747475
levá mez	0,04541	0,0819033	0,03514	0,0194604	0,000612	0,677921613
pravá mez	0,097653	0,1462814	0,082906	0,0586063	0,018124	0,768177497
horní odchylka	0,029471	0,0351703	0,027351	0,0232527	0,013074	0,043430022
dolní odchylka	0,022772	0,0292079	0,020415	0,0158931	0,004438	0,046825862

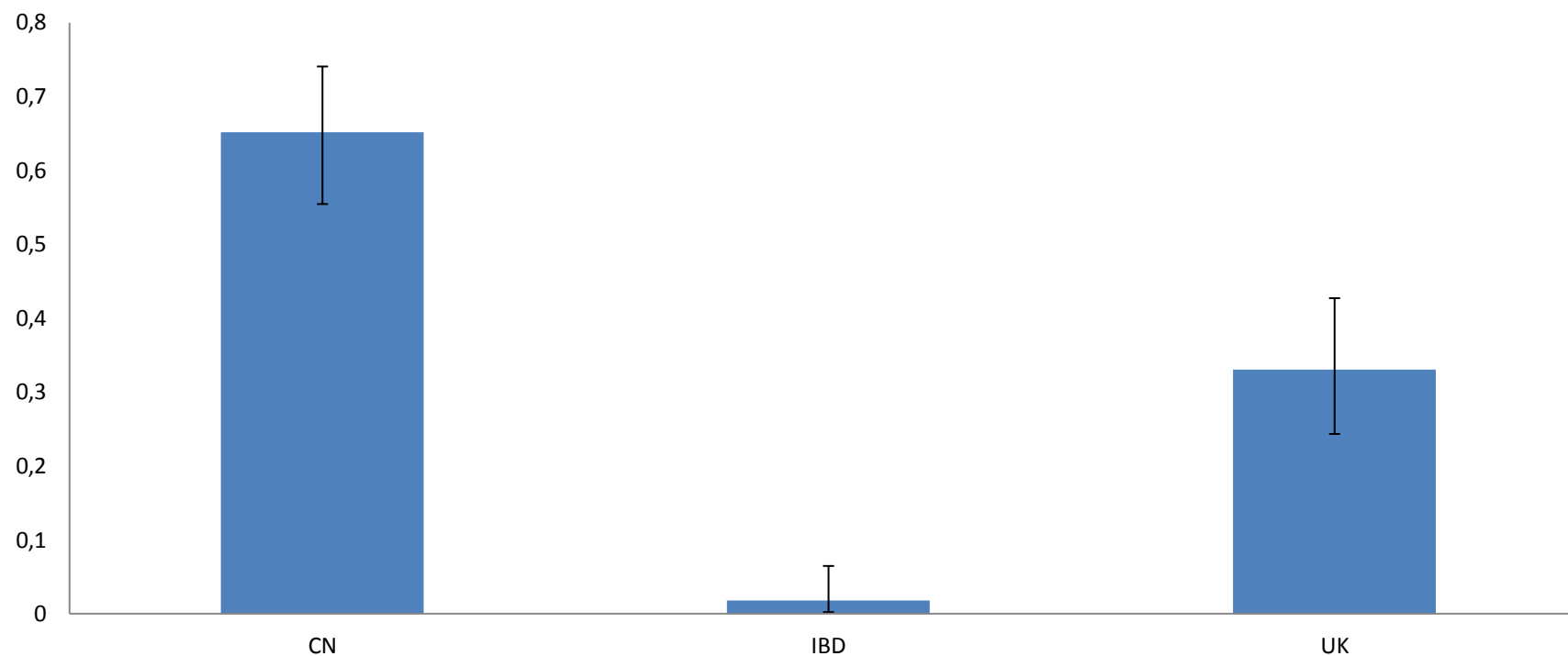
Tabulka 7: Relativní četnost výskytu sledovaných morfologií u ABBA pozitivních pacientů (2009-2011) s 95% intervalem spolehlivosti pro základní soubor.

Relativní četnost výskytu sledovaných morfologií u ABBA pozitivních pacientů (2009-2011)



Graf 6: Relativní četnost histologických nálezů (CN, UK, IBD, SCN, SUK, NN) u ABBA pozitivních pacientů v letech 2009 - 2011 s hladinou spolehlivosti 95%

Relativní četnost výskytu sledovaných morfologií u ABBA pozitivních pacientů (2009-2011)



Graf 7: relativní četnost histologických nálezů po sloučení jasné histologické diagnózy se suspektním nálezem (CN s SCN a UK s SUK) u ABBA pozitivních pacientů v letech 2009-2011 s hladinou spolehlivosti 95%

6.2. Druhý výběrový soubor – porovnání klinické diagnózy (DG CN – K50, DG UK – K51) s výsledkem ABBA vyšetření

V každém z let 2009 až 2011 jsme prověřovali přítomnost positivity (semikvantitativně rozdělené na +/++/+++) či negativity IF vyšetření u pacientů s diagnózou CN či UK. Výčet pacientů dle diagnózy a výsledek jejich IF vyšetření na ABBA je uveden v příloze. Tabulky a grafy uvádějí tuto závislost odděleně pro CN a UK.

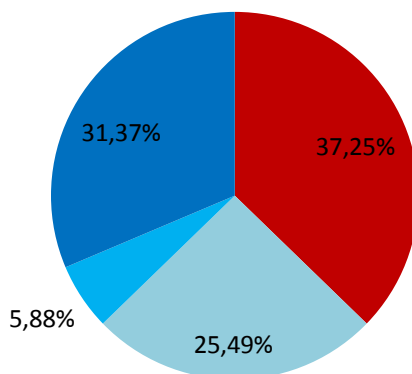
V roce 2009 bylo vyšetřeno 74 pacientů s diagnózou CN (diagnostické kódy – DK: K50.0 – K50.9). Z nich 51 bylo imunofluorescenčně vyšetřeno na ABBA na FÚP. Tabulka a graf 8 zachycují četnosti výsledků vyšetření na ABBA u těchto pacientů. U 37,25% bylo vyšetření negativní; u 25,49% je vyšetření pozitivní se semikvantitativním hodnocením +; u 5,88% pozitivní s hodnocením ++ a u 31,37% na +++.

VYHODNOCENÍ – DG CN (K50.0 – K50.9) (2009)			
POČET PACIENTŮ S DG CN		100%	74
POČET PACIENTŮ S DG CN A IF ABBA		68,92%	51
ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
19	13	3	16
37,25%	25,49%	5,88%	31,37%

Tabulka 8: četnost výsledků na ABBA u pacientů s CN v r.2009

DG Crohnova nemoc r.2009

■ ABBA - ■ ABBA + ■ ABBA ++ ■ ABBA +++



Graf 8: procentuální četnost výsledků na ABBA u pacientů s CN v r. 2009

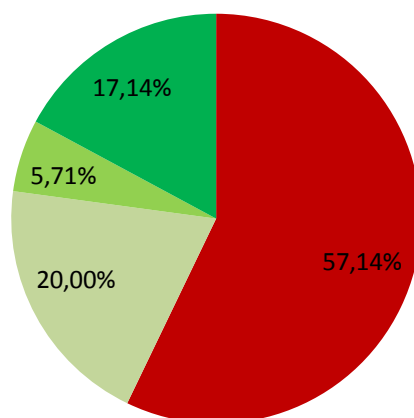
V roce 2009 bylo histologicky vyšetřeno 67 pacientů s diagnózou UK (diagnostické kódy – DK: K51.0 – K51.9) a z nich 35 imunofluorescenčně vyšetřeno na ABBA na FÚP. Tabulka a graf 9 zachycují četnosti výsledků vyšetření na ABBA u těchto pacientů. U 57,14% bylo vyšetření negativní; u 20,00% je vyšetření pozitivní se semikvantitativním hodnocením +; u 5,71% pozitivní s hodnocením ++ a u 17,14% na +++.

VYHODNOCENÍ – DG UK (K51.0 – K51.9) (2009)			
POČET PACIENTŮ S DG UK		100%	67
POČET PACIENTŮ S DG UK A IF ABBA		52,24%	35
ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
20	7	2	6
57,14%	20,00%	5,71%	17,14%

Tabulka 9: četnost výsledků na ABBA u pacientů s UK v r. 2009

DG Ulcerózní kolitida r.2009

■ ABBA - ■ ABBA + ■ ABBA ++ ■ ABBA +++



Graf 9: procentuální četnost výsledků na ABBA u pacientů s UK v r. 2009

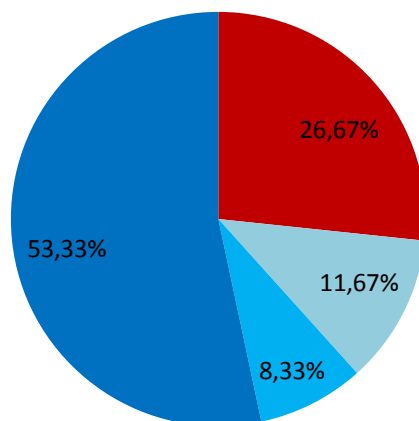
V roce 2010 bylo 101 pacientů s diagnózou CN histologicky vyšetřeno (diagnostické kódy – DK: K50.0 – K50.9) a 72 z nich bylo imunofluorescenčně vyšetřeno na FÚP. Tabulka a graf 10 zachycují četnosti výsledků vyšetření na ABBA u těchto pacientů. U 26,67% bylo vyšetření negativní; u 11,67% je vyšetření pozitivní se semikvantitativním hodnocením +; u 8,33% pozitivní s hodnocením ++ a u 53,33% na +++.

VYHODNOCENÍ – DG CN (K50.0 – K50.9) (2010)			
POČET PACIENTŮ S DG CN		100%	101
POČET PACIENTŮ S DG CN A IF ABBA		58,42%	59
ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
16	7	5	32
26,67%	11,67%	8,33%	53,33%

Tabulka 10: četnost výsledků na ABBA u pacientů s CN v r. 2010

DG Crohnova nemoc r.2010

■ ABBA - ■ ABBA + ■ ABBA ++ ■ ABBA +++



Graf 10: procentuální četnost výsledků na ABBA u pacientů s CN v r. 2010

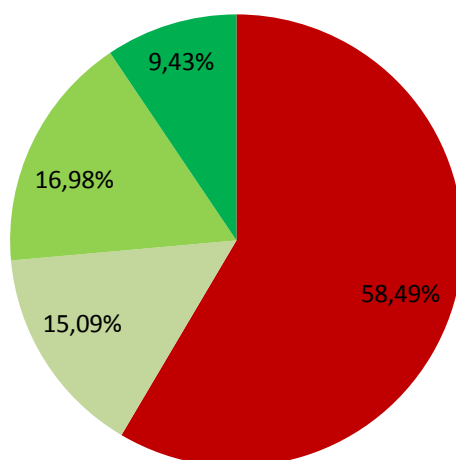
V roce 2010 bylo vyšetřeno 100 pacientů s diagnózou UK (diagnostické kódy – DK: K51.0 – K51.9), z nichž 55 bylo imunofluorescenčně vyšetřeno na FÚP. Tabulka a graf 11 zachycují četnosti výsledků vyšetření na ABBA u těchto pacientů. U 58,49% bylo vyšetření negativní; u 15,09% je vyšetření pozitivní se semikvantitativním hodnocením +; u 16,98% pozitivní s hodnocením ++ a u 9,43% na +++.

VYHODNOCENÍ – DG UK (K51.0 – K51.9) (2010)			
POČET PACIENTŮ S DG UK		100%	100
POČET PACIENTŮ S DG UK A IF ABBA		53%	53
ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
31	8	9	5
58,49%	15,09%	16,98%	9,43%

Tabulka 11: četnost výsledků na ABBA u pacientů s UK v r. 2010

DG Ulcerózní kolitida r.2010

■ ABBA - ■ ABBA + ■ ABBA ++ ■ ABBA +++



Graf 11: procentuální četnost výsledků na ABBA u pacientů s UK v r. 2010

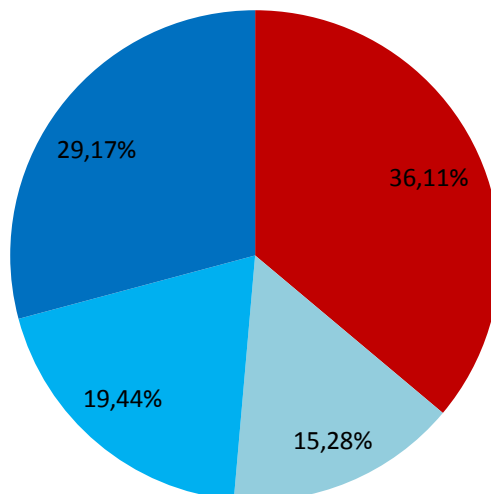
130 pacientů s diagnózou CN bylo vyšetřeno v roce 2011 (diagnostické kódy – DK: K50.0 – K50.9). Z nich 82 mělo imunofluorescenční vyšetření na FÚP. Tabulka a graf 12 zachycují četnosti výsledků vyšetření na ABBA u těchto pacientů. U 36,11% bylo vyšetření negativní; u 15,28% je vyšetření pozitivní se semikvantitativním hodnocením +; u 19,44% pozitivní s hodnocením ++ a u 29,17% na +++.

VYHODNOCENÍ – DG CN (K50.0 – K50.9) (2011)			
POČET PACIENTŮ S DG CN		100%	130
POČET PACIENTŮ S DG CN A IF ABBA		55,38%	72
ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
26	11	14	21
36,17%	15,28%	19,44%	29,17%

Tabulka 12: četnost výsledků na ABBA u pacientů s CN v r. 2011

DG Crohnova nemoc r.2011

■ ABBA - ■ ABBA + ■ ABBA ++ ■ ABBA +++



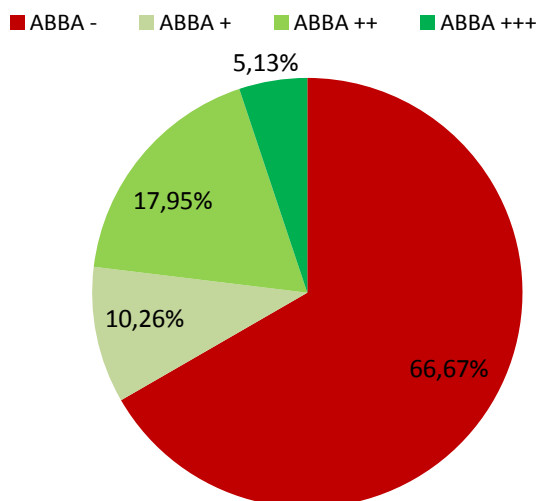
Graf 12: procentuální četnost výsledků na ABBA u pacientů s CN v r. 2011

V roce 2010 bylo provedeno histologické vyšetření endobiopsie u 86 pacientů s diagnózou UK (diagnostické kódy – DK: K51.0 – K51.9). Z nich 43 bylo i imunofluorescenčně vyšetřeno. Tabulka a graf 13 zachycují četnosti výsledků vyšetření na ABBA u těchto pacientů. U 66,67% bylo vyšetření negativní; u 10,26% je vyšetření pozitivní se semikvantitativním hodnocením +; u 17,95% pozitivní s hodnocením ++ a u 5,13% na +++.

VYHODNOCENÍ – DG UK (K51.0 – K51.9) (2011)			
POČET PACIENTŮ S DG UK		100%	86
POČET PACIENTŮ S DG UK A IF ABBA		45,35%	39
ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
26	4	7	2
66,67%	10,26%	17,95%	5,13%

Tabulka 13: četnost výsledků na ABBA u pacientů s UK v r. 2011

DG Ulcerózní kolitida r.2011



Graf 13: procentuální četnost výsledků na ABBA u pacientů s UK v r. 2011

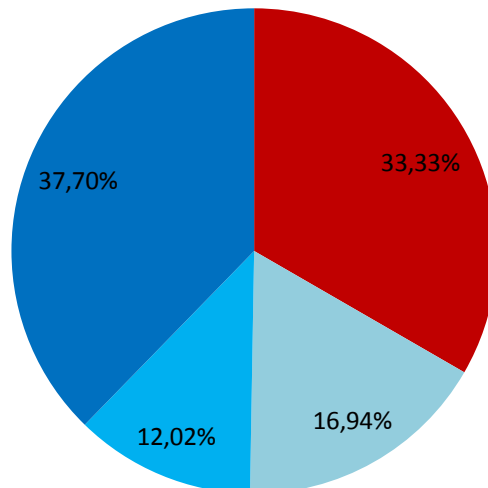
Z výše uvedeného můžeme tedy shrnout výsledky do tabulky 14 a grafu 13. V letech 2009 až 2011 bylo na FÚP imunofluorescenčně vyšetřeno 183 pacientů s endobiopsií a diagnózou CN. Z tohoto počtu bylo průměrně 33,33% negativních, 16,94% pozitivních - semikvantitativně hodnoceno na +; 12,02% na ++ a 37,70% na +++.

	IF ABBA	ABBA -		ABBA +		ABBA ++		ABBA +++	
		počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
2009	51	19	33,93	13	23,21	3	5,36	16	28,57
2010	60	16	21,92	7	9,59	5	6,85	32	43,84
2011	72	26	31,71	11	13,41	14	17,07	21	25,61
CELKEM	183	61	33,33	31	16,94	22	12,02	69	37,7

Tabulka 14: Srovnání pacientů s diagnózami CN (K50.0 – K50.9) s výsledky IF v letech 2009-2011

DG Crohnova nemoc r.2009 - 2011

■ ABBA - ■ ABBA + ■ ABBA ++ ■ ABBA +++



Graf 14: srovnání procentuálního zastoupení výsledků testu (- negativní, +/++/+++ semikvantitativní hodnocení positivity) na ABBA u pacientů s CN v letech 2009 – 2011

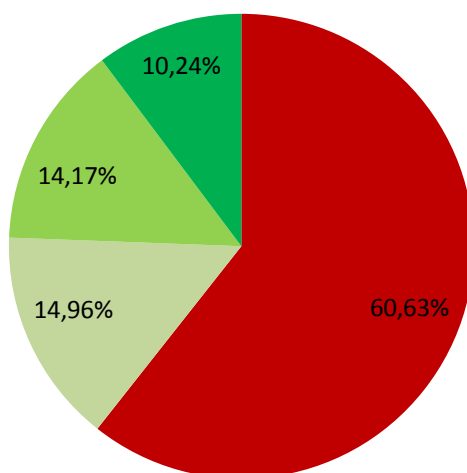
Stejně tak i pro UK můžeme tedy shrnout výsledky do tabulky 15 a grafu 14. V letech 2009 až 2011 bylo na FÚP imunofluorescenčně vyšetřeno 127 pacientů s endobiopsií a diagnózou UK. Z tohoto počtu bylo průměrně 60,63% negativních, 14,96% pozitivních - semikvantitativně hodnoceno na +; 14,17% na ++ a 10,24% na +++.

	IF ABBA	ABBA -		ABBA +		ABBA ++		ABBA +++	
		počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
2009	35	20	54,05	7	18,92	2	5,41	6	16,22
2010	53	31	56,36	8	14,55	9	16,36	5	9,09
2011	39	26	60,47	4	9,30	7	16,28	2	4,65
CEL.	127	77	60,63	19	14,96	18	14,17	13	10,24

Tabulka 15: Srovnání pacientů s diagnózami UK (K51.0 – K51.9) s výsledky IF v letech 2009-2011

DG Ulcerózní kolitida r.2009 - 2011

■ ABBA - ■ ABBA + ■ ABBA ++ ■ ABBA +++



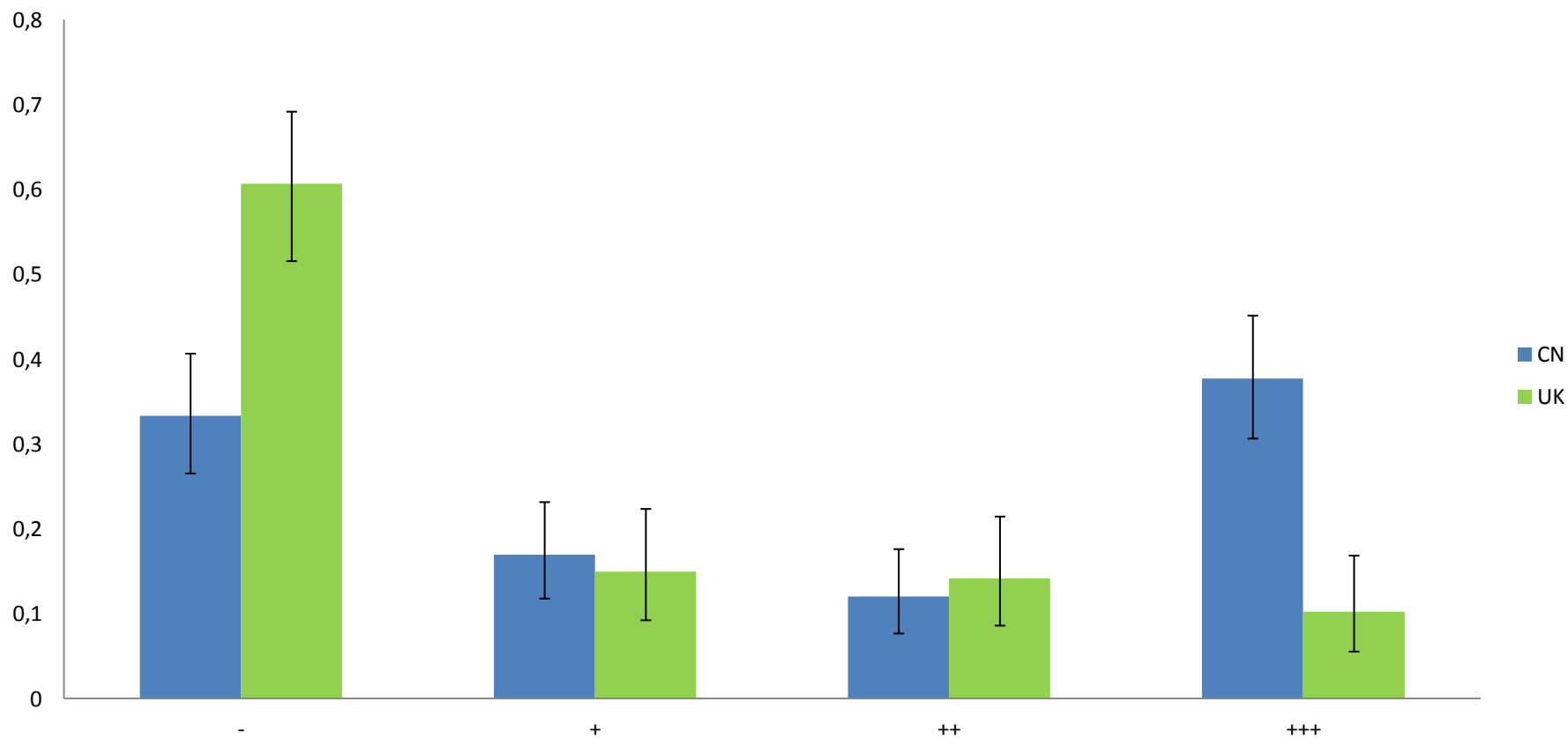
Graf 15: srovnání procentuálního zastoupení výsledků testu (- negativní, +/++/+++ semikvantitativní hodnocení positivity) na ABBA u pacientů s UK v letech 2009 – 2011

Jako i u prvního pohledu, i zde musíme výše uvedené výsledky korigovat tak, abychom je mohli použít pro celý základní soubor. Při použití hladiny spolehlivosti 95% jsem určila intervaly pro jednotlivá zastoupení výsledků testů ABBA u pacientů s CN a UK. Tabulka ukazuje vedle rozlišení diagnózy celkový počet vyšetřených pacientů s touto diagnózou, relativní četnost (po vynásobení 100x zobrazuje procentuální zastoupení jednotlivých sledovaných jevů), levou a pravou mez (určují interval, ve kterém se nachází 95% výsledků ze základního souboru) a horní a dolní odchylku (je zde pouze jako pomocná hodnota pro zobrazení chybových úseček zobrazených v grafech 15 a 16). Pro přehlednost zde byla vypuštěna skupina nevyšetřených pacientů.

Stupeň positivity ABBA	-	+	++	+++	všechny pozitivní
CN 183					
počet vyšetření dle výsledku	61	31	22	69	122
relativní četnost	0,3333333	0,169399	0,1202186	0,377049	0,666666667
levá mez	0,2655151	0,118095	0,0768956	0,306615	0,593347413
pravá mez	0,4066526	0,231747	0,1763401	0,451536	0,73448495
horní odchylka	0,0733193	0,062348	0,0561215	0,074487	0,067818283
dolní odchylka	0,0678183	0,051304	0,043323	0,070434	0,073319254
UK 127					
počet vyšetření dle výsledku	77	19	18	13	50
relativní četnost	0,6062992	0,149606	0,1417323	0,102362	0,393700787
levá mez	0,5157262	0,092541	0,086215	0,055639	0,308203454
pravá mez	0,6917965	0,22373	0,2147197	0,168681	0,484273751
horní odchylka	0,0854973	0,074124	0,0729875	0,066319	0,090572964
dolní odchylka	0,090573	0,057065	0,0555173	0,046723	0,085497334

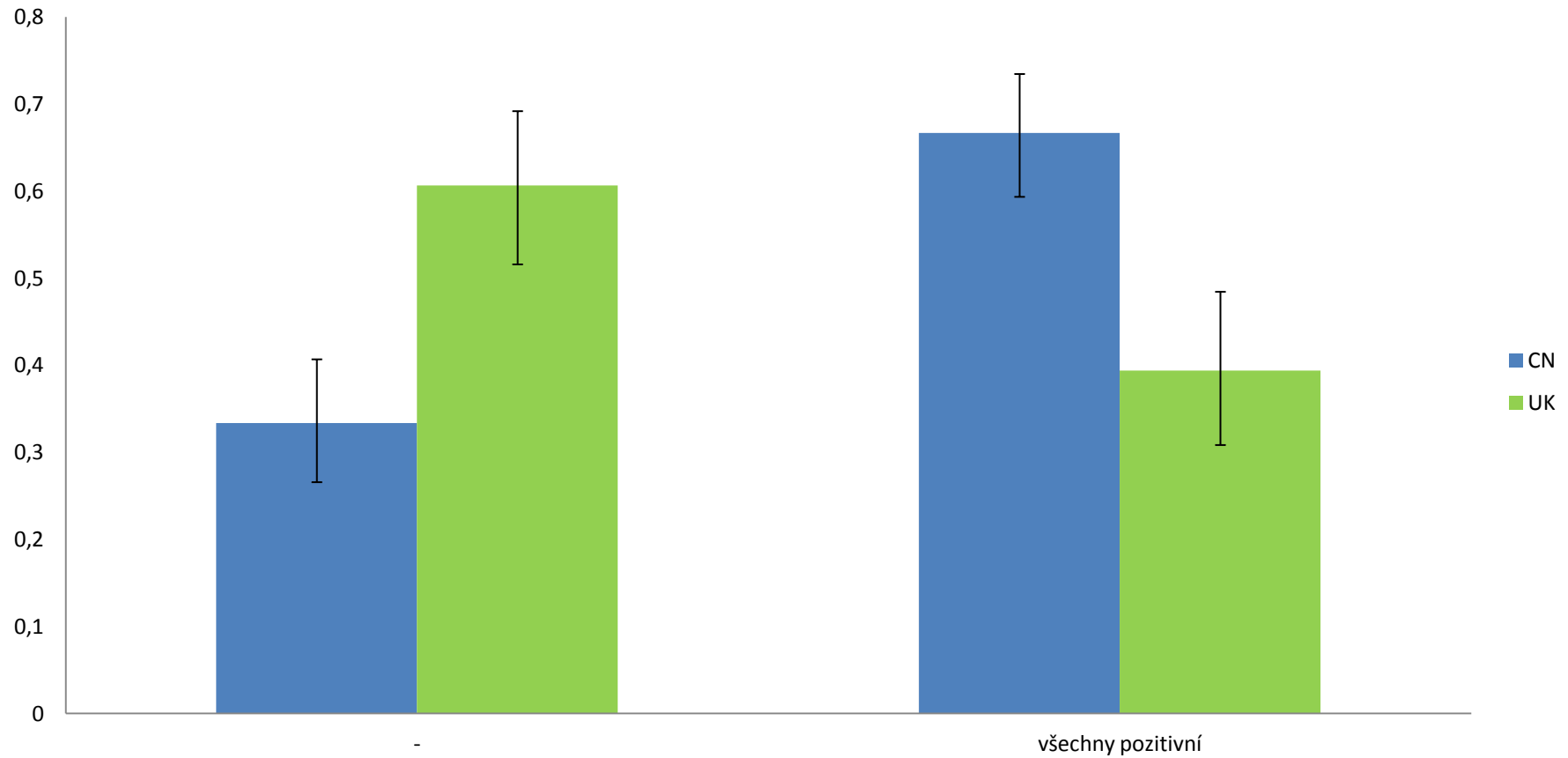
Tabulka 16: Výsledky testů na ABBA (- negativní, +/++/+++ semikvantitativní hodnocení pozitivních výsledků) u CN a UK v letech 2009-2011

Výsledky IF na ABBA u CN/UK (2009-2011)



Graf 16: Přehledné hodnocení jednotlivých zastoupení výsledků testu na ABBA u pacientů s CN (modře) a UK (zeleně) v letech 2009 až 2011 (- negativní, +/++/+++ semikvantitativní hodnocení pozitivních výsledků)

Výsledky testů na ABBA u CN/UK (2009-2011)



Graf 17: Přehledné hodnocení jednotlivých zastoupení výsledků testu na ABBA u pacientů s CN (modře) a UK (zeleně) v letech 2009 až 2011 (- negativní, všechny pozitivní výsledky bez ohledu na semikvantitativní hodnocení)

7. Diskuze

Z prvního výběrového souboru z 2 252 ABBA vyšetřených pacientů s pozitivním výsledkem v letech 2009 až 2011 mělo pouze 396 provedenu endobiopsii. U těchto pacientů jsme sledovali výsledky jejich histologického vyšetření a zařazovali do skupin. Hlavními sledovanými diagnostickými skupinami byli Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida.

Z výše uvedených tabulek a grafů vyplývá, že na ABBA vyšetřený pacient s pozitivním výsledkem má 72,47% pravděpodobnost, že trpí jiným onemocněním než je CN nebo UK či je zdravý. O diagnóze CN bychom mohli uvažovat s 17,92%, o UK s 9,08% a o IBD s 0,50% pravděpodobností.

Právě ona početná skupina 72,5% ABBA pozitivních pacientů, u kterých nebylo idiopatické střevní onemocnění morfologicky prokázáno, se ukazuje být problémem. Můžeme pouze polemizovat o tom, z jakého důvodu je procento ABBA pozitivních pacientů, u kterých nebyla zjištěna ani jedna z hledaných jednotek idiopatického střevního zánětu, tak vysoké. Vystává zde otázka, zda je vyšetření ABBA k průkazu idiopatického střevního zánětu dostatečně specifické, nebo zda je natolik specifické a citlivé, že vychytává i pacienty, kterým se onemocnění ještě morfologicky neprojeví.

V úvahu připadá možná nedostatečná specifita IF vyšetření na přítomnost ABBA protilátky u těchto pacientů, která může být zapříčiněna interferencí jiné nemoci, u které se vyskytuje ABBA a jejíž četnost je dostatečně vysoká.

Možnost, že se zde vyskytuje tak velké procento „falešně pozitivních“ pacientů považujeme za nepravděpodobné. Proto je vyšetřována negativní kontrola zároveň s ostatními vzorky v každé sérii, která by měla zamezit chybnému výsledku. Negativní kontrola musí vždy vycházet negativně, jinak se vyšetření musí opakovat.

V ideálním případě by se v této četné skupině mohli nacházet pacienti, u kterých se prozatím onemocnění klinicky neprojevovalo, a nenacházíme tedy v jejich endoskopickém vzorku histopatologické známky idiopatického střevního zánětu, ale ABBA již exprimují. Měli bychom proto ABBA pozitivní pacienty s negativním morfologickým nálezem na idiopatický střevní zánět dále imunofluorescenční sledovat, zda u nich bude i do budoucna přetrvávat pozitivita na ABBA. Pokud ano, doporučili bychom klinikovi s odstupem času opakovat kolonoskopii a tím monitorovat, zda se toto onemocnění rozvine, či nikoliv. Tím bychom sice potvrdili vysokou specifitu tohoto vyšetření a přínosnost pro diagnostiku, ale ovlivnění kliniků není v naší kompetenci.

Řešením tohoto problému by mohlo být i blíže specifikovat histologické diagnózy, u kterých se vyskytuje pozitivita na ABBA. Jak již pan prof. MUDr. Nožička, CSc. (1991) ve své práci naznačil, tímto velmi početným interferujícím onemocněním by mohlo být onemocnění jater, jehož výskyt jsme mohli taktéž pozorovat, avšak tento jev nebyl součástí sledované problematiky a tudíž nebyl zaznamenáván.

Pokud by byl problém s vysokou četností positivity ABBA u pacientů bez morfologického obrazu idiopatického střevního zánětu vyřešen, mohlo by se uvažovat o vyšetření na ABBA jako o jakémsi pomocném vodítku při diagnostice a rozlišení Crohnovy nemoci od ulcerózní kolitidy.

Současně jsme v druhém výběrovém souboru sledovali výsledky imunofluorescenčních vyšetření u pacientů, kterým byl proveden histopatologický rozbor endobiopsie zaslané k vyšetření na FÚP s klinickou diagnózou Crohnovy nemoci nebo ulcerózní kolitidy v letech 2009 až 2011. Z celkového souboru 346 pacientů s těmito diagnózami bylo 310 vyšetřeno na přítomnost ABBA. Až na jeden případ se klinická diagnóza shodovala s morfologickým nálezem.

Pokud již tušíme, že se u pacienta vyskytuje jedno z idiopatických střevních onemocnění a jeho test na ABBA vyjde pozitivní, můžeme předpokládat výskyt CN s 66,67% pravděpodobností a UK s 39,37% pravděpodobností. Tedy s vyšší pravděpodobností trpí CN než UK. Pokud však jeho test vyšel negativně, s vyšší pravděpodobností trpí spíše UK než CN, jelikož u CN je procento negativních výsledků 33,33% a u UK 60,63%.

Tímto náš průzkum potvrzuje výsledky pánů Skogha (1982) a Nožičky (1991), že se cca u 60% pacientů s Crohnovou chorobou vyskytuje ABBA protilátka.

8. Závěr

Podarilo se nám zpracovat výsledky imunofluorescenčních vyšetření na ABBA a porovnat je s histologickým nálezem endobiopsie u jednotlivých pacientů vyšetřených během let 2009 až 2011 ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

Hlavním cílem bylo prokázat souvislost mezi přítomností ABBA v séru pacienta a Crohnovou chorobou. Běžně se toto levné vyšetření spolu s ostatními (biochemické testy, RTG, ultrazvukem) používá pouze k odlišení idiopatického střevního zánětu od těch s infekční etiologií, ne k odlišení Crohnovy choroby od ulcerózní kolitidy.

Po shrnutí všech výsledků můžeme konstatovat, že jsme prokázali určitou souvislost Crohnovy nemoci s přítomností ABBA. 66,67% pacientů trpících tímto onemocněním má v krvi přítomnou ABBA. Pro srovnání je to 1,7x častěji, než u pacientů trpících ulcerózní kolitidou. Stejně jako četnost positivity ABBA u Crohnovy choroby je i nezanedbatelně vyšší stupeň positivity na tuto protilátku. Nejvýraznější rozdíl sledujeme u nejvyššího stupně semikvantitativního hodnocení (+++), kde takový výsledek byl zjištěn u 37,71% pacientů s Crohnovou nemocí a u 10,24% s ulcerózní kolitidou.

9. Zkratky:

- Ab – antibody (protilátka)
- ABBA – anti brush border antibody (protilátka proti kartáčovému lemu resopčního epitelu ledvin)
- ACCA – anti-chitobiosid
- Ag – antigen
- ALCA – anti-laminaribiosid
- AMCA – anti-mannobiosid
- ANA – anti nuclear antibody (protilátka proti nukleárnímu antigenu)
- ANCA / pANCA – anti neutrophil cytoplasmatic antibody (protilátka proti cytoplasmě neutrofilů)
- ANF – anti nuclear factor (protilátka proti nukleárnímu faktoru)
- Anti-C – anti-chitin
- Anti-L – anti-laminarin
- ASCA – anti-*Saccharomyces cerevisce* antibody
- ASMA – anti smooth muscle antibody (protilátka proti hladkému svalu)
- BCR – B lymphocyte receptor (receptor B lymfocytu)
- CD – povrchové znaky buněk (číselné označení značí typ)
- C_L / C_{H1-4} – konstatní část lehkého/těžkého řetězce imunoglobulinu
- CN – Crohnova nemoc
- CRF 2 – corticotropin releasing factor 2 (kortikotropin stimulující faktor 2)
- CRP – C reaktivní protein
- DFA – direct fluorescent antibody (přímá imunofluorescence)
- FCM – flow cytometry (průtoková cytometrie)
- FIA – fluoro immuno assay (imunofluorescence)
- FISH – fluorescent in situ hybridization
- FITC – fluorescein isothiocyanát (fluorescenční barvivo)
- FNHK – fakultní nemocnice Hradec Králové
- FÚP – Fingerlandův ústav patologie
- GFP – green fluorescence protein (fluorescenční barvivo)
- H řetězec – těžký řetězec
- IBD – idiopathic bowel disease (nespecifický idiopatický střevní zánět)

IF – imunofluorescence
IFA – indirrect fluorescent antibody (nepřímá fluorescence)
IgA/G/D/E/M – imunoglobulin (protilátka) A/G/D/E/M
IL – interleukin
INF – interferon
L řetězec – lehký řetězec
LTD₄ – chemotaktický faktor
NIS – nemocniční informační systém
NK buňky – natural killers (přirozeně cytotoxické buňky)
PAE – peripheral antigen expressing cell
PAF – chemotaktický faktor
PBS – fosfátový puf s chloridem sodným
RTG – radioisotope thermoelectric generátor (rentgenové vyšetření)
SLE – systémový lupus erythematosus
T_C lymfocyt – T cytotoxický lymfocyt
TCR – T lymphocyte receptor (receptor T lymfocytu)
T_{H1/H2} lymfocyt – T helper 1/2 lymphocyt (pomocný T lymfocyt)
TNF – tumor necrosis factor
UK – ulcerózní kolitida
V_H/ V_L – variabilní část lehkého/těžkého řetězce imunoglobulinu

10. Literatura:

- Amanzada a spol.: Identification of CD68(+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease, *Int J Clin Exp Pathol.*, 2013; 6(4), str. 561-570
- Barnich a spol.: E. coli-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients, *Pathol Biol (Paris)*, 2010, doi:10.1016/j.patbio.2010.01.004
- Betteridge a spol.: Inflammatory Bowel Disease Prevalence by Age, Gender, Race, and Geographic Location in the U.S. Military Health Care Population, *Inflamm Bowel Dis.*, 2013 Mar 20, [Epub ahead of print]
- Brandhorst a spol.: CD4+ immune response as a potential biomarker of patient reported inflammatory bowel disease (IBD) activity, *Clin Chim Acta.*, 2013 Feb 26, 421C str. 31-33
- Chatzaki a spol.: Corticotropin-releasing factor receptor subtype 2 in human colonic mucosa: Down-regulation in ulcerative colitis, *World J Gastroenterol.*, 2013 Mar 7;19(9), str. 1416-1423
- Chermesh a Eliakim: Capsule endoscopy in Crohn's disease — Indications and reservations 2008, *Journal of Crohn's and Colitis*, 2/2008, str. 107-113
- El-Tawil: Epidemiology and inflammatory bowel diseases, *World J Gastroenterol.*, 2013 Mar 14; 19(10), str. 1505-7
- FARLEX - The free dictionary, 30.1.2012: (<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/immunofluorescence>)
- Gerling a spol.: Aneuploidy-Associated Gene Expression Signatures Characterize Malignant Transformation in Ulcerative Colitis, *Inflamm Bowel Dis.*, 2013 Mar;19(4), str. 691-703
- Goel a spol.: Video capsule retention in inflammatory bowel disease: an unusual presentation and discussion of retrieval methods, *Case Rep Gastrointest Med.*, 2013, 2013:607142
- Granlund a spol.: Whole genome gene expression meta-analysis of inflammatory bowel disease colon mucosa demonstrates lack of major differences between Crohn's disease and ulcerative colitis, *PLoS One.* 2013;8(2):e56818

- Hořejší, Bartůňková: Základy imunologie, 4. Vydání, 2009, ISBN 978-80-7387-280-9
- Konrádová, Uhlíř, Vajner: Funkční histologie, 2000, ISBN 80-86022-3
- Krejsek, Kopecký: Klinická imunologie, Nucleus 2004, ISBN 80-86225-50-X, str. 587
- Kuna a spol.: Serological markers of inflammatory bowel disease, Biochem Med (Zagreb), 2013, 23(1), str. 28-42
- Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy – svazek 1, 3rd edition, Springer, 2006, ISBN 0-387-31278-1
- Lemmens a spol.: Correlation Between the Endoscopic and Histologic Score in Assessing the Activity of Ulcerative Colitis, Inflamm Bowel Dis., 2013 Mar 20. [Epub ahead of print]
- Lukáš: Idiopatické střevní záněty, Mladá fronta Zdravotnické noviny, 10/2011, str. 28
- Lukáš a spol.: Idiopatické střevní záněty, 2. Vydání, Triton, 1999, ISBN 80-7254-051-3
- Marinov: Průtoková cytometrie, 2. Přepřacované a rozšířené vydání, Triton 2008, ISBN 978-80-7387-143-7
- Mařatka: Klinická gastroenterologie, Avicenum 1988, ISBN
- Nikolov: Imunofluorescence, 2011, 1.11.2012:
(www.fnhk.cz/fingerland/aktivity-ustavu/diagnostika/imunofluorescence)
- Nožička: Patologicko-anatomický příspěvek k protilátkové diagnostice imunopatologických onemocnění, 1991, ISBN 80-04-92054-3
- Papi a spol.: Evolution of clinical behaviour in Crohn's disease: predictive factors of penetrating complications, Digestive and Liver Disease 37, 2005, str. 247–253
- Perrin: Doctoral thesis, Paris, 1929, Annales de Pysique, 12:2252-2254
- Plevy a spol.: Combined Serological, Genetic, and Inflammatory Markers Differentiate Non-IBD, Crohn's Disease, and Ulcerative Colitis Patients, Inflamm Bowel Dis., 2013 Mar 20. [Epub ahead of print]
- Rameshshanker a Arebi: Endoscopy in inflammatory bowel disease when and why, World J Gastrointest Endosc., 2012 June 16; 4(6), str. 201–211

- Selwin a spol.: Effect of phenotype on health care costs in Crohn's disease: A European study using the Montreal classification, Journal of Crohn's and colitis, 1/2007, str. 87 - 96
- Shoenfeld, Fučíková, Bartůňková: Autoimunita – vnitřní nepřítel, Grada, 2007, ISBN 978-80-247-2044-9
- Skogh a spol.: Anti-brush border antibodies (ABBA) in Crohn's disease, Journal of clinical & laboratory immunology, Dec.1982, 9(3) str. 147-150
- Slavík: Fluorescence microscopy and fluorescent probes, Plenum Press New York, 1998, ISBN 0-306-46021-1
- Valeur, Brochon a spol.: New Trends in Fluorescence Spectroscopy – Applications to Chemical and Life Sciences, Springer, 2001, ISBN 3-540-67779-8

Obrázky:

- Obrázek 1: struktura molekuly imunoglobulinu <http://www.virology.ws/wp-content/uploads/2009/07/antibody2.jpg> (26.10.2012)
- Obrázek 2: přehled imunoglobulinů <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/lifescience/generalbiology/physiology/LymphaticSystem/Antibodymediated/AntiBtypes.gif> (26.10.2012)
- Obrázek 3 - 6: fotografie z fluorescenčního mikroskopu – ABBA pozitivní nález na řezu z krysí ledviny (16.4.2013 - FÚP FNHK)
- Obrázek 7: aftoidní léze <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/endoimag/e031112a.jpg> (3.11.2012)
- Obrázek 8: anastomóza s dilatačním balónem a píštěl <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/endoimag/e051014a.jpg> (3.11.2012)
- Obrázek 9: mikroskopický obraz Crohnovy choroby <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/idiopaticke-strevni-zanety-447153> (5.4.2013)
- Obrázek 10: katarálně hemorhagický zánět sliznice <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/endoimag/e041001b.jpg> (3.11.2012)
- Obrázek 11 a 12: mikroskopický obraz ulcerózní kolitidy – kryptitida (10.4.2013 - FÚP FNHK)
- Obrázek 13: schéma epifluorescenčního mikroskopu http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1c/FluorescenceFilters_2008-09-28.svg (12.2.2013)
- Obrázek 14: epifluorescenční detekce – glomerulus <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/FITC.jpg> (12.2.2013)
- Obrázek 15: schéma konfokálního mikroskopu http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Minsky_Confocal_Reflection_Microscope.png (12.2.2013)
- Obrázek 16: zobrazení buněčných struktur – konfokální imunofluorescence <http://www.proteopedia.org/wiki/images/0/09/FluorescentCells.jpg> (12.2.2013)
- Obrázek 17 a 18: přímá a nepřímá fluorescence - Toman M. a spol. – Imunologie pro farmaceuty VÚVeL Brno, 2004, ISBN 80-902963-9-8

11. Přílohy:

První výběrový soubor - Srovnání IF vyšetření s bioptickým nálezem

LEGENDA:

- IFČ Imunofluorescenční číslo vyšetření
ABBA Stupeň positivity na ABBA (+/++/+++)
DGK Diagnostický kód (K500-509 CN, K510-519 UK)
BČ Bioptické číslo
CN Morfologicky potvrzená Crohrova nemoc
UK Morfologicky potvrzená ulcerózní kolitida
IBD Morfologicky - nespecifikovaný idiopatický zánět (idiopathic bowel disease)
SCN Suspektní nález pro Crohnovu nemoc
SUK Suspektní nález pro ulcerózní kolitidu
Nespecifický zánět / morfologicky potvrzená jiná nemoc (např.: celiakie) / norm.
NN nález
Č Pořadové číslo
R.NAR. Rok narození (19**, roky po 2000 jsou celé)

Rok 2009

Č.	R. NAR.	DGK	IFČ	ABBA	BČ	CN	SCN	UK	SUK	IBD	NN
1	53	K59.9	3529	++	28140/09	0	0	0	0	0	1
2	68	K51.0	3511	+	22479/07 - 5231/10	0	0	0	1	0	0
3	62	K30	3510	+	1199/10	0	0	0	0	0	1
4	46	K63.5	3409	+	5024/10	0	0	0	0	0	1
5	86	K50.9	3386	+++	26933/09	0	1	0	0	0	0
6	79	K51.9	3379	+	785/10	0	0	1	0	0	0
7	37	K30	3303	+	21499/10 - 21961/11	0	0	0	0	0	1
8	77	K50.9	3272	+++	15815/07 - 2385/11	0	0	0	0	0	1
9	55	K59.0	3270	+++	1173/10	0	0	0	0	0	1
10	52	K51.9	3202	+++	2531/06 - 66/07	0	0	0	0	0	1
11	72	K36	3199	+++	22799/09	0	0	0	0	0	1
12	53	Z12.1	3175	++	25046/09	0	0	0	0	0	1
13	72	C18.7	3135	+	22384/10	0	0	0	0	0	1
14	91	K50.8	3111	+++	24197/09 - 3983/10	1	0	0	0	0	0
15	90	K52.3	3109	+	23081/12	0	0	0	0	1	0
16	64	D12.6	3095	++	16935/11	0	0	0	0	0	1
17	53	K35.9	3093	+	14302/06	0	0	0	0	0	1
18	87	K50.1	3073	+++	5673/09 - 19650/09	1	0	0	0	0	0
19	52	C20	3018	++	977/08	0	0	0	0	0	1
20	67	K63.5	3011	++	10921/09	0	0	0	0	0	1
21	61	K50.1	2982	+++	3082/10 - 10363/12	0	0	0	0	0	1
22	59	K35.9	2952	+++	22854/06	0	0	0	0	0	1
23	65	B18.1	2930	+	12617/07	0	0	0	0	0	1

24	56	J30.1	2917	++	6177/10 - 8688/10	0	0	0	0	0	1
25	79	K30	2882	+++	5759/04	0	0	0	0	0	1
26	78	K50.9	2865	+++	22528/09	1	0	0	0	0	0
27	74	K30	2863	+	1888/09 - 24870/09	0	0	0	0	0	1
28	85	K51.2	2852	++	24480/09	0	0	0	1	0	0
29	73	K63.5	2818	+	24514/09	0	0	0	0	0	1
30	53	K50.0	2811	+++	21906/09 - 6053/11	0	0	0	0	0	1
31	2002	Z01.9	2787	++	1285/10	0	0	0	0	0	1
32	67	K51.9	2651	+++	5058/09 - 21391/09	1	0	0	0	0	0
33	35	K50.9	2621	+++	22225/09	0	0	0	0	0	1
34	58	Z03.8	2618	+++	5043/04	0	0	0	0	0	1
35	89	K30	2558	++	794/10	0	0	0	0	0	1
36	79	R10.4	2556	+	22938/07	0	0	0	0	0	1
37	69	K51.8	2551	+	16497/09	0	0	0	1	0	0
38	49	K58.0	2527	+	21678/07	0	0	0	0	0	1
39	48	K51.9	2498	++	19529/09	0	0	1	0	0	0
40	91	R10.4	2491	+	22663/09	0	0	0	0	0	1
41	74	K50.9	2472	+	7039/11	0	1	0	0	0	0
42	71	K30	2456	++	23336/08	0	0	0	0	0	1
43	42	K30	2440	+	1742/07 - 4262/10	0	0	0	0	0	1
44	80	K63.9	2366	++	16315/04	0	0	0	0	0	1
45	52	K51.9	2359	+	16707/12	0	0	0	1	0	0
46	33	K51.2	2333	++	2989/99	0	0	0	0	0	1
47	90	K30	2325	+++	22338/09	0	0	0	0	0	1
48	81	K90.0	2305	+++	1236/07	0	0	0	0	0	1
49	50	K51.8	2293	+++	17738/09	0	0	0	1	0	0
50	36	K30	2247	+	17881/09	0	0	0	0	0	1
51	87	K30	2225	+++	18304/09	0	1	0	0	0	0
52	55	N30.1	2151	+	13432/03	0	1	0	0	0	0
53	71	K92.2	2125	++	17083/09	0	1	0	0	0	0
54	94	K50.8	2123	+++	17754/09	0	1	0	0	0	0
55	87	K50.9	1934	++	2777/11	0	0	0	0	0	1
56	81	K51.0	1918	+	13807/11	0	0	0	1	0	0
57	44	K52.3	1896	++	26330/10	0	0	1	0	0	0
58	67	M45.0	1887	++	14245/09	0	0	0	0	0	1
59	84	K51.0	1862	+	10233/06	0	0	0	1	0	0
60	62	D12.5	1781	+++	25164/08	0	0	0	0	0	1
61	67	K30	1679	+++	9863/07	0	0	0	0	0	1
62	52	D12.3	1577	+	24603/10	0	0	0	0	0	1
63	38	D51.9	1543	+++	22367/09	0	0	0	0	0	1
64	64	K51.9	1511	++	739/06	0	0	1	0	0	0
65	70	K36	1387	+	4948/08	0	0	0	0	0	1
66	64	K52.3	1308	+	362/09	0	0	0	0	1	0
67	54	K29.8	1248	++	22026/06	0	0	0	0	0	1
68	78	K50.9	1224	++	24345/06	1	0	0	0	0	0

69	55	K50.8	1220	+	6886/09	1	0	0	0	0	0
70	65	R55	1094	+++	6972/09	0	0	0	0	0	1
71	75	K50.9	903	+	15683/01	0	0	0	0	0	1
72	43	D50.9	760	+	23672/06	0	0	0	0	0	1
73	91	K50.9	661	++	16106/10	0	0	0	0	0	1
74	85	K50.9	648	++	4286/09	1	0	0	0	0	0
75	39	I84.0	570	+	1222/07	0	0	0	0	0	1
76	32	K50.0	564	++	13584/10	0	1	0	0	0	0
77	74	O26.9	526	+++	12501/08	1	0	0	0	0	0
78	56	K51.9	509	+++	13003/07 - 3069/09	0	0	1	0	0	0
79	89	K51.9	508	+	9387/09	0	0	0	1	0	0
80	45	K50.9	401	+++	4868/09	0	1	0	0	0	0
81	89	K50.8	373	+++	25395/07	1	0	0	0	0	0
82	55	R10.4	331	+	13363/11	0	0	0	0	0	1
83	82	K60.5	151	+++	682/09	0	1	0	0	0	0
84	82	K50.0	148	+++	782/09	0	1	0	0	0	0
85	83	K30	95	+	10097/09	0	0	0	1	0	0
86	92	K50.8	19	+++	16291/08	1	0	0	0	0	0
86	CELKEM					10	10	5	9	2	50

Rok 2010

Č.	R. NAR.	DGK	IFČ	ABBA	BČ	CN	SCN	UK	SUK	IBD	NN
1	41	D50.0	2935	+++	15552/08 - 14864/09	0	0	0	0	0	1
2	85	K50.0	2934	+++	30048/10	0	0	0	0	0	1
3	59	K50.9	2933	+++	30147/10	0	1	0	0	0	0
4	41	K51.9	2928	++	29511/10	0	0	1	0	0	0
5	58	K50.9	2927	+++	9873/10 - 5869/10	0	0	0	0	0	1
6	85	K50.0	2926	++	30048/10	0	0	0	0	0	1
7	48	K51.2	2914	+	28549/10	0	0	1	0	0	0
8	88	K62.8	2909	+++	24226/08	0	0	0	0	0	1
9	91	K52.9	2906	+	2936/11	0	0	0	0	0	1
10	50	K50.9	2893	+++	1459/11	0	0	0	0	0	1
11	75	K30	2852	++	26125/10 - 21733/11	0	0	0	0	0	1
12	28	K51.9	2846	++	15671/11	0	0	1	0	0	0
13	77	K50.9	2767	+	2228/11 - 8645/12	1	0	0	0	0	0
14	84	K30	2762	++	28437/10	0	0	0	0	0	1
15	72	K59.9	2732	++	4533/07	0	0	0	0	0	1
16	76	K52.3	2730	+++	26103/10	0	0	0	0	0	1
17	89	K51.9	2722	+++	9387/09 - 20981/09	0	0	0	1	0	0
18	77	K50.9	2712	++	15815/07 - 2385/11	0	0	0	0	0	1
19	44	K52.3	2682	+++	26330/10	0	0	1	0	0	0
20	74	D12.7	2637	+++	2365/07	0	0	0	0	0	1
21	76	K51.9	2636	+++	981/07 - 1788/07	0	1	0	0	0	0
22	62	K30	2634	++	670/11	0	0	0	0	0	1

23	64	K50.9	2622	+	764/11 - 29404/11	1	0	0	0	0	0
24	72	K51.8	2594	+++	27568/08 - 2809/10	0	0	0	0	0	1
25	45	D12.6	2581	++	27492/08 - 27170/11	0	0	0	0	0	1
26	37	Z94.0	2568	++	17833/12	0	0	0	0	0	1
27	86	K36	2560	++	22186/10	0	0	0	0	0	1
28	79	K50.9	2554	++	29175/02	0	0	0	0	0	1
29	91	K50.9	2551	+++	27045/10 - 16044/11	0	0	0	0	0	1
30	85	K50.0	2547	+++	28160/10	0	0	0	0	0	1
31	91	K58.0	2546	+++	25394/07	0	0	0	0	0	1
32	75	I84.1	2544	++	25938/10	0	0	1	0	0	0
33	91	K30	2539	+	24182/10	0	0	0	0	0	1
34	76	K52.3	2730	+++	26103/10	0	0	0	0	0	1
35	45	K29.6	2681	+	18049/09	0	0	0	0	0	1
36	88	R10.3	2402	+++	21024/10	0	0	0	0	0	1
37	41	K51.8	2429	++	25445/10	0	0	0	1	0	0
38	69	K63.5	2415	+++	29704/10	0	0	0	0	0	1
39	89	K63.5	2373	++	30168/10	0	0	0	0	0	1
40	55	K51.9	2372	++	22446/11	0	0	1	0	0	0
41	79	K50.9	2355	+	3813/05	0	0	0	0	0	1
42	93	K50.0	2351	+++	25415/10	0	0	0	0	0	1
43	77	K51.2	2350	+++	21219/10	0	0	0	0	0	1
44	74	K52.9	2332	++	24695/10	0	0	0	0	0	1
45	36	D51.0	2323	+++	20728/09	0	0	0	0	0	1
46	75	K30	2317	++	9354/10	0	0	0	0	0	1
47	64	K50.8	2315	+++	28730/10	0	1	0	0	0	0
48	90	K90.0	2310	++	15183/09	0	1	0	0	0	0
49	92	K90.0	2294	+++	14560/02	0	0	0	0	0	1
50	52	D12.6	2284	+++	19062/08 - 12376/12	0	0	0	0	0	1
51	66	K50.9	2259	+++	22365/10	0	1	0	0	0	0
52	80	K52.2	2249	+++	12877/11	0	0	0	0	0	1
53	78	K50.0	2212	+++	22826/10 - 4078/11	1	0	0	0	0	0
54	31	D50.0	2207	++	19120/06	0	0	1	0	0	0
55	92	K90.0	2183	++	2013/08 - 6595/12	0	0	0	0	0	1
56	68	K57.3	2177	+++	20612/10	0	0	0	0	0	1
57	57	D12.0	2169	+++	21509/10	0	0	1	0	0	0
58	85	R10.4	2165	+	25858/09 - 28969/10	0	0	0	0	0	1
59	73	K35.9	2138	++	6240/05	0	0	0	0	0	1
60	92	K50.9	2116	+++	21215/10	0	1	0	0	0	0
61	71	K90.0	2105	+	23441/10	0	0	0	0	0	1
62	75	K52.9	2104	+++	19505/10 - 4090/11	0	0	0	0	0	1
63	83	K50.9	2090	+++	21726/10 - 26005/11	0	1	0	0	0	0
64	49	K50.9	2078	+++	20609/10	0	1	0	0	0	0
65	29	K29.4	2057	+	5627/07	0	0	0	0	0	1
66	90	R10.4	2010	+++	20351/10 - 23048/10	0	0	0	0	0	1
67	81	K30	2009	++	16021/07	0	0	0	0	0	1

68	50	D12.8	2001	++	18637/09 - 26007/11	0	0	0	0	0	1
69	40	D64.9	1978	+	19299/10	0	0	0	0	0	1
70	68	D12.4	1931	++	10409/10	0	0	0	0	0	1
71	46	K63.5	1917	+++	28873/10	0	0	0	0	0	1
72	91	K50.9	1889	+++	19001/10	1	0	0	0	0	0
73	46	K29.9	1884	++	25369/07	0	0	0	0	0	1
74	62	K50.9	1858	+++	18313/10 - 28622/10	0	0	0	0	0	1
75	76	K50.9	1827	+	17974/10	0	1	0	0	0	0
76	84	K51.9	1822	+++	17861/10	0	0	1	0	0	0
77	85	R10.3	1798	+++	20863/10	0	0	0	0	0	1
78	56	K35.9	1767	+++	6879/01	0	0	0	0	0	1
79	42	K29.9	1731	+++	16867/10	0	0	0	0	0	1
80	89	K50.9	1679	+	9356/10	0	1	0	0	0	0
81	91	K52.8	1648	+++	13988/10	0	1	0	0	0	0
82	74	K50.9	1625	+	16788/10	0	0	0	0	0	1
83	60	K30	1614	++	14960/10	0	1	0	0	0	0
84	69	K55.0	1679	+	10022/00	0	0	0	0	0	1
85	76	K29.6	1582	++	19713/10 - 12879/10	0	0	0	0	0	1
86	47	K51.0	1581	+++	14821/10 - 19975/10	0	0	1	0	0	0
87	29	K51.0	1561	+++	29113/00	0	0	0	0	0	1
88	66	K29.6	1540	+++	7596/04	0	0	0	0	0	1
89	88	K52.8	1530	+++	18437/10 - 13054/10	0	0	0	0	0	1
90	80	K59.9	1461	++	17670/10	0	0	0	0	0	1
91	50	K63.5	1453	+	10143/09	0	0	0	0	0	1
92	87	K51.2	1442	+++	17077/06	0	0	0	0	0	1
93	87	K30	1371	+++	13696/10	0	0	0	0	0	1
94	92	K50.0	1370	++	3225/10	0	0	0	0	0	1
95	37	K30	1361	+++	21499/10 - 16433/09	0	0	0	0	0	1
96	85	K50.0	1319	++	12234/11	0	1	0	0	0	0
97	49	I25.2	1293	+++	24360/11	0	0	0	0	0	1
98	33	K29.9	1292	++	11370/06	0	0	0	0	0	1
99	59	K30	1243	+++	11741/10 - 11895/10	0	0	0	0	0	1
100	90	K36	1217	++	18269/03	0	0	0	0	0	1
101	77	D50.9	1214	+++	16665/10	0	0	0	0	0	1
102	87	K30	1187	++	24218/09	0	0	0	0	0	1
103	50	K30	1175	+++	21784/07	0	0	0	0	0	1
104	81	K30	1152	+++	1253/08	0	0	0	0	0	1
105	41	K92.2	1148	++	27963/09	0	0	0	0	0	1
106	61	K30	1145	+++	7184/00	0	0	0	0	0	1
107	61	K30	1144	+	10687/10	0	0	0	0	0	1
108	85	K50.8	1143	++	7935/99	0	0	0	0	0	1
109	83	K50.9	1133	++	2770/08	0	0	0	0	0	1
110	65	K50.9	1108	+++	11070/10 - 17520/10	0	1	0	0	0	0
111	83	K30	1061	+	22097/09	0	0	0	0	0	1
112	44	D50.9	1045	+++	12080/12	0	0	0	0	0	1

113	81	K50.0	992	+++	9355/	0	1	0	0	0	0
114	22	D12.6	940	+	28777/04	0	0	0	0	0	1
115	91	K51.9	924	++	24899/04	0	0	0	0	0	1
116	88	K30	923	++	9376/10	0	0	0	0	0	1
117	57	K92.2	868	+	19105/10	0	0	0	0	0	1
118	90	K90.0	864	+	15183/09	0	1	0	0	0	0
119	65	K52.3	847	+	8298/10	0	0	0	0	0	1
120	33	K30	827	+	8249/04	0	0	0	0	0	1
121	77	K70.1	743	+	6879/10	0	0	0	0	0	1
122	84	I81	715	++	16368/06	0	0	0	0	0	1
123	35	K57.9	696	+++	24675/09	0	0	0	0	0	1
124	42	K63.5	688	++	13982/09	0	0	0	0	0	1
125	72	D50.0	677	+++	13983/10	0	0	0	0	0	1
126	78	K76.9	647	+++	4249/10	0	0	0	0	0	1
127	75	K30	643	++	9354/10	0	0	0	0	0	1
128	90	K51.9	617	+++	5457/10 - 13986/10	0	0	0	0	0	1
129	42	D12.9	603	+	23320/06	0	0	0	0	0	1
130	74	K50.9	580	+++	5073/10	0	1	0	0	0	0
131	76	K50.9	577	+++	11959/11	0	1	0	0	0	0
132	38	K63.1	576	+++	2184/10	0	0	0	0	0	1
133	73	K50.9	558	+	6241/07 - 6667/11	0	1	0	0	0	0
134	84	K50.9	538	+++	3479/10	0	1	0	0	0	0
135	75	O86.8	524	+++	12706/00	0	0	0	0	0	1
136	33	K51.2	522	+++	2989/99	0	0	0	0	0	1
137	72	K60.1	518	+++	2743/10	0	1	0	0	0	0
138	41	K26.9	517	+++	3320/10	0	0	0	0	0	1
139	88	R09.8	510	+++	3938/10	0	0	0	0	0	1
140	39	K62.9	508	+++	25983/08	0	0	0	0	0	1
141	83	D12.5	485	++	4683/10	0	0	0	0	0	1
142	68	K50.0	482	++	13699/10 - 15443/12	1	0	0	0	0	0
143	37	K30	448	+++	2120/11	0	0	0	0	0	1
144	72	M35.2	442	+	4320/10	0	0	0	0	0	1
145	84	R10.4	422	++	10556/10	0	0	0	0	0	1
146	29	D50.9	358	++	4814/10 - 7762/10	0	0	0	0	0	1
147	60	K51.9	314	+	6896/10	0	0	0	0	0	1
148	90	K50.8	300	+++	13987/06	0	0	0	0	0	1
149	62	D50.9	296	++	4812/10	0	0	0	0	0	1
150	39	D51.9	230	+++	1117/11 - 1462/11	0	0	0	0	0	1
151	42	C18.9	164	++	3879/03	0	0	0	0	0	1
152	76	K36	48	++	4600/07	0	0	0	0	0	1
153	89	K50.9	15	+++	28134/09 - 23202/10	0	1	0	0	0	0
153	CELKEM					5	22	10	2	0	114

Rok 2011

Č.	R. NAR.	DGK	IFČ	ABBA	BČ	CN	SCN	UK	SUK	IBD	NN
1	70	K52.3	2544	++	8073/11	0	0	0	0	0	1
2	64	K30	2508	+++	16841/11	0	0	0	0	0	1
3	96	R10.4	2457	+	6651/12	0	0	0	0	0	1
4	78	K51.2	2448	+	18860/12	0	0	0	0	0	1
5	49	D12.6	2417	+++	1330/11 - 209/12	0	0	0	0	0	1
6	92	K90.0	2371	++	3979/08	0	0	0	0	0	1
7	85	K30	2364	++	13469/12	0	0	0	0	0	1
8	81	K20	2380	+	24691/11	0	0	1	0	0	0
9	91	K52.3	2315	+	25157/11	0	1	0	0	0	0
10	76	R10.4	2305	++	3131/12	0	0	0	0	0	1
11	85	K36	2293	+++	15652/00	0	0	0	0	0	1
12	35	K30	2283	+	10647/04	0	0	0	0	0	1
13	68	K36	2270	++	2624/04	0	0	0	0	0	1
14	97	K35.9	2253	+	23324/11	0	1	0	0	0	0
15	90	K50.9	2225	+++	1263/12	1	0	0	0	0	0
16	81	K50.9	2177	+++	13992/11 - 14994/11	1	0	0	0	0	0
17	92	R10.4	2087	+++	14571/08	0	0	0	0	0	1
18	75	K30	2067	++	9354/10	0	0	0	0	0	1
19	50	D37.5	2049	+++	17905/03	0	0	0	0	0	1
20	67	K58.9	2041	+	21204/09	0	0	0	0	0	1
21	80	E78.2	1984	+++	23106/11 - 23206/11	0	0	0	0	0	1
22	71	K30	1964	+++	12498/12	0	0	0	0	0	1
23	44	E78.9	1939	+++	23484/09	0	0	0	0	0	1
24	92	K30	1931	+	21645/11 - 21966/11	0	0	0	0	0	1
25	42	K63.5	1863	+++	9357/10 - 13877/10	0	0	0	0	0	1
26	88	K30	1827	+++	21302/11	0	0	0	0	0	1
27	92	K90.0	1822	+++	14560/02	0	0	0	0	0	1
28	66	K57.3	1820	++	25762/11	0	0	0	0	0	1
29	69	K50.8	1810	+++	18380/03	0	0	0	0	0	1
30	67	K56.6	1807	+++	18150/11 - 19016/11	1	0	0	0	0	0
31	63	K51.2	1783	+++	20215/11	0	0	1	0	0	0
32	89	K51.0	1741	++	19458/11	0	0	1	0	0	0
33	67	K51.3	1724	++	11288/11 - 1903/12	0	0	1	0	0	0
34	72	K30	1720	+++	13366/11	0	0	0	0	0	1
35	52	D50.0	1717	+++	6506/11	0	0	0	0	0	1
36	91	K63.3	1715	+	20846/11 - 22598/11	0	1	0	0	0	0
37	87	K30	1714	+	20436/11	0	0	0	0	0	1
38	57	K50.9	1676	+++	22647/00	0	0	0	0	0	1
39	92	K50.9	1665	++	24146/11	1	0	0	0	0	0
40	44	K29.9	1656	+++	18903/11	0	0	0	0	0	1
41	89	K50.9	1634	+++	18665/11	0	1	0	0	0	0
42	89	K51.5	1632	++	2940/12 - 9469/12	0	0	1	0	0	0

43	55	K63.9	1621	++	27314/11	0	0	0	0	0	1
44	32	K90.0	1615	++	18441/11 - 20010/11	0	0	0	0	0	1
45	58	K51.9	1591	+++	17348/11	0	1	0	0	0	0
46	57	K29.1	1570	++	8319/11	0	0	0	0	0	1
47	39	K50.9	1568	++	11412/11	1	0	0	0	0	0
48	47	K63.2	1561	+++	19445/09	0	0	0	0	0	1
49	44	K63.5	1559	+++	11485/12	0	0	0	0	0	1
50	75	K30	1539	+++	17801/11	0	0	0	0	0	1
51	37	K30	1532	+	27568/03	0	0	0	0	0	1
52	41	D64.9	1510	+++	14864/09 - 3060/12	0	0	0	0	0	1
53	90	K35.9	1488	+++	11242/02	0	0	0	0	0	1
54	90	K52.9	1487	++	12971/11 - 18236/11	0	0	0	0	0	1
55	93	K50.9	1474	+++	16564/11	0	1	0	0	0	0
56	49	K30	1444	+++	16173/12	0	0	0	0	0	1
57	62	K29.4	1432	+++	19793/08	0	0	0	0	0	1
58	92	K50.0	1427	+++	16227/11	0	1	0	0	0	0
59	54	A41.9	1426	+++	16710/11	0	0	0	0	0	1
60	80	K63.5	1413	+++	21264/11 - 26430/11	0	0	0	0	0	1
61	95	K83.0	1384	++	19391/08	0	0	0	0	0	1
62	45	K52.9	1381	++	12368/11 - 15774/11	0	0	0	0	0	1
63	91	K90.0	1368	+++	11633/11	0	0	0	0	0	1
64	80	K51.2	1351	+	12753/11	0	0	0	0	0	1
65	39	K52.3	1350	+++	13140/11	0	0	0	0	0	1
66	90	K52.3	1318	++	11725/11	0	0	0	0	0	1
67	73	K52.3	1304	+	19013/11	0	1	0	0	0	0
68	57	K57.3	1262	+++	26731/04	0	0	0	0	0	1
69	87	K30	1256	++	16795/11	0	0	0	0	0	1
70	92	K90.0	1246	++	14414/11	0	0	0	0	0	1
71	56	K52.3	1187	++	1779/11	0	0	0	0	0	1
72	44	K51.9	1175	++	12011/11	0	0	0	0	0	1
73	74	K50.8	1174	++	10964/11	0	1	0	0	0	0
74	83	K30	1141	+++	5816/12	0	0	0	0	0	1
75	53	D37.4	1126	+++	28710/10	0	0	0	0	0	1
76	49	K35.9	1116	+++	25278/98	0	0	0	0	0	1
77	76	K52.3	1115	+++	10874/11 - 17095/11	0	0	0	0	0	1
78	60	I84.9	1105	+	28987/10	0	0	0	0	0	1
79	86	K50.9	1071	++	12211/11	0	1	0	0	0	0
80	87	K30	1059	++	17199/12	0	0	0	0	0	1
81	68	K51.9	1048	+++	10504/11	0	0	0	0	0	1
82	75	K30	1017	++	16863/11	0	0	0	0	0	1
83	80	K30	1014	+++	11226/11	0	0	0	0	0	1
84	78	K63.9	1006	++	13522/11	0	0	0	0	0	1
85	50	K29.9	961	++	27444/10	0	0	0	0	0	1
86	86	K30	932	+++	13010/11	0	0	0	0	0	1
87	71	Z03.8	931	+	16278/04	0	0	0	0	0	1

88	89	D12.4	912	++	7677/11	0	0	0	0	0	1
89	71	K59.0	897	++	13887/11	0	0	0	0	0	1
90	55	N94.9	870	+++	2004/99	0	0	0	0	0	1
91	54	K29.1	869	++	8384/07	0	0	0	0	0	1
92	30	K52.3	866	+	8343/11	0	0	0	0	0	1
93	16	K30	856	++	4486/10	0	0	0	0	0	1
94	77	K30	853	+	5249/11	0	0	0	0	0	1
95	36	C18.0	841	++	11565/11	0	0	0	0	0	1
96	62	K50.9	837	+++	18313/10 - 21622/10	0	0	0	0	0	1
97	56	K59.0	829	+++	24674/08	0	0	0	0	0	1
98	67	K30	828	+	10848/11 - 10847/11	0	0	0	0	0	1
99	70	K52.3	825	+++	8366/11	0	0	0	0	0	1
100	27	K52.3	790	+	1859/11	0	0	0	0	0	1
101	44	D12.6	759	++	15764/11	0	0	0	0	0	1
102	90	K31.8	733	+	2772/11	0	0	0	0	0	1
103	80	K52.9	724	+	8644/11	0	0	0	0	0	1
104	54	D12.9	695	++	10761/11	0	0	0	0	0	1
105	90	D50.0	690	+	16737/11	0	0	0	0	0	1
106	48	D50.0	686	+++	16224/11	0	1	0	0	0	0
107	70	K51.3	674	+	5732/12	0	0	0	1	0	0
108	72	K50.8	672	+++	635/10	1	0	0	0	0	0
109	72	K90.0	650	+	17093/10	0	0	0	0	0	1
110	63	K21.0	646	+	8843/09	0	0	0	0	0	1
111	75	K51.9	632	+++	14743/04	0	0	1	0	0	0
112	50	D37.5	629	+++	17905/03	0	0	0	0	0	1
113	36	K57.3	614	+++	1350/07	0	0	0	0	0	1
114	51	K63.5	606	+++	5608/11	0	0	0	0	0	1
115	32	K90.0	600	+++	20010/11	0	0	0	0	0	1
116	78	K50.1	549	+++	5738/12 - 5331/11	1	0	0	0	0	0
117	51	K29.9	545	+++	10369/11	0	0	0	0	0	1
118	69	K52.3	534	+++	7803/11	0	0	0	0	0	1
119	77	K50.9	509	++	5738/11 - 20437/11	0	0	0	0	0	1
120	75	K36	500	+	17215/00	0	0	0	0	0	1
121	65	E10.7	491	+	21971/12	0	0	0	0	0	1
122	86	R10.4	490	++	6660/11	0	0	0	0	0	1
123	85	D69.6	484	+++	18049/12	0	0	0	0	0	1
124	84	K30	472	+	22972/10	0	0	0	0	0	1
125	70	K30	462	++	13619/04	0	0	0	0	0	1
126	87	K50.8	461	+++	2567/09	1	0	0	0	0	0
127	54	K52.9	448	+++	14536/11	0	0	0	0	0	1
128	64	K51.3	439	+++	739/06	0	0	1	0	0	0
129	61	E03.9	432	++	15986/10	0	0	0	0	0	1
130	66	K51.0	413	+	4443/11	0	0	0	0	0	1
131	59	K30	386	+	7605/11	0	0	0	0	0	1
132	38	K52.9	356	+	11993/03	0	0	0	0	0	1

133	90	K50.9	349	+++	2895/11	0	1	0	0	0	0
134	59	B18.1	348	+++	7074/11	0	0	0	0	0	1
135	91	K52.3	335	+++	5752/11 - 10362/11	0	0	0	0	0	1
136	66	K63.5	332	++	25337/10	0	0	0	0	0	1
137	40	K50.9	326	+++	2563/11	1	0	0	0	0	0
138	46	K52.3	303	+++	29618/10	0	0	0	0	0	1
139	78	K50.1	291	++	5738/12	1	0	0	0	0	0
140	71	K83.0	271	+++	1793/11 - 3307/11	0	0	0	1	0	0
141	82	K52.3	268	+++	6169/11	0	0	0	0	0	1
142	91	K36	248	++	10500/11	0	0	0	0	0	1
143	39	D50.9	156	+++	2156/11	0	0	0	0	0	1
144	91	K58.9	149	++	10867/11	0	0	0	0	0	1
145	59	E11.9	145	+++	6266/11	0	0	0	0	0	1
146	45	K36	133	+++	2911/00	0	0	0	0	0	1
147	46	K56.6	109	+++	2976/11	0	0	0	0	0	1
148	41	K50.9	97	++	26983/11	1	0	0	0	0	0
149	77	K30	96	++	2837/05	0	0	0	0	0	1
150	56	K52.3	93	+	29881/10	0	0	0	0	0	1
151	76	K50.0	89	++	192/11	0	0	0	0	0	1
152	64	K60.3	69	+++	815/11	1	0	0	0	0	0
153	64	K52.8	53	+	5754/11	0	0	0	0	0	1
154	70	K90.0	51	+++	12760/11	0	0	0	0	0	1
155	77	K90.0	30	+++	8753/12	0	0	0	0	0	1
156	86	K51.0	20	++	16061/12	0	0	0	1	0	0
157	76	K50.0	15	++	192/11	0	0	0	0	0	1
157	CELKEM					12	12	7	3	0	123

Druhý výběrový soubor - Srovnání pacientů s DG CN (K50.0-K50.9) s výsledky IF v letech 2009-2011

Legenda

- Č pořadové číslo
 R.NAR. Rok narození (19**, roky po 2000 jsou celé)
 IF Imunofluorescenční vyšetření (podstoupili - IF 1/ nepodstoupili - IF 0)
 ABBA 0 Vyšetření ABBA nevyšetřeno
 ABBA - Vyšetření ABBA negativní
 ABBA +/+/+++ Semikvantitativní hodnocení positivity na ABBA (+/+/+++)

CN - Rok 2009

Č.	R.NAR.	IF	ABBA 0	ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
1	51	0	0	0	0	0	0
2	74	1	0	0	0	0	1
3	82	1	0	0	0	0	1
4	79	1	0	0	1	0	0
5	82	1	0	0	0	0	1
6	80	1	0	0	0	0	1
7	91	1	1	0	0	0	0
8	2005	1	1	0	0	0	0
9	63	1	0	1	0	0	0
10	92	0	0	0	0	0	0
11	92	0	0	0	0	0	0
12	87	1	0	0	1	0	0
13	79	1	0	0	1	0	0
14	72	1	0	1	0	0	0
15	53	0	0	0	0	0	0
16	80	1	0	0	0	1	0
17	76	1	0	0	1	0	0
18	92	1	0	1	0	0	0
19	79	1	0	1	0	0	0
20	87	1	0	0	0	0	1
21	83	1	0	0	0	0	1
22	63	0	0	0	0	0	0
23	55	1	0	0	1	0	0
24	80	1	0	0	0	0	1
25	67	0	0	0	0	0	0
26	91	1	1	0	0	0	0
27	56	0	0	0	0	0	0

28	48	1	0	0	0	0	1
29	84	1	0	1	0	0	0
30	33	0	0	0	0	0	0
31	36	1	0	1	0	0	0
32	48	1	0	0	1	0	0
33	85	1	0	1	0	0	0
34	85	1	0	1	0	0	0
35	79	1	0	0	1	0	0
36	50	1	0	1	0	0	0
37	31	0	0	0	0	0	0
38	90	1	0	1	0	0	0
39	76	1	0	1	0	0	0
40	87	1	0	1	0	0	0
41	80	1	0	0	0	0	1
42	81	1	0	1	0	0	0
43	77	0	0	0	0	0	0
44	91	1	0	0	0	0	1
45	71	1	0	1	0	0	0
46	90	1	0	0	0	1	0
47	66	0	0	0	0	0	0
48	86	0	0	0	0	0	0
49	55	1	0	0	1	0	0
50	71	1	0	0	0	1	0
51	82	1	0	1	0	0	0
52	80	1	0	0	1	0	0
53	72	0	0	0	0	0	0
54	55	1	0	0	1	0	0
55	89	1	0	1	0	0	0
56	94	1	0	0	0	0	1
57	87	1	0	0	0	0	1
58	62	0	0	0	0	0	0
59	76	1	0	1	0	0	0
60	98	0	0	0	0	0	0
61	54	1	0	0	1	0	0
62	79	1	0	0	1	0	0
63	50	1	0	0	0	0	1
64	94	1	1	0	0	0	0
65	51	1	0	0	0	0	1
66	71	1	0	1	0	0	0
67	78	1	0	0	0	0	1
68	93	1	1	0	0	0	0
69	52	1	0	1	0	0	0
70	89	0	0	0	0	0	0
71	73	0	0	0	0	0	0
72	63	1	0	0	1	0	0

73	74	0	0	0	0	0	0
74	89	1	0	0	0	0	1
74	CELKEM	56	5	19	13	3	16

CN - Rok 2010

Č.	R.NAR.	IF	ABBA 0	ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
1	77	0	0	0	0	0	0
2	88	1	0	1	0	0	0
3	79	0	0	0	0	0	0
4	93	1	1	0	0	0	0
5	83	1	0	0	0	0	1
6	84	0	0	0	0	0	0
7	98	1	1	0	0	0	0
8	94	0	0	0	0	0	0
9	98	1	0	0	0	0	1
10	89	0	0	0	0	0	0
11	91	1	0	0	0	0	1
12	77	1	0	0	1	0	0
13	54	1	0	1	0	0	0
14	69	1	0	0	0	0	1
15	92	1	0	0	0	0	1
16	83	1	0	0	0	0	1
17	68	1	0	1	0	0	0
18	71	1	0	0	0	0	1
19	76	1	0	0	0	0	1
20	77	0	0	0	0	0	0
21	68	1	0	1	0	0	0
22	75	1	0	1	0	0	0
23	88	0	0	0	0	0	0
24	2001	1	1	0	0	0	0
25	96	1	0	0	0	0	1
26	73	0	0	0	0	0	0
27	95	1	1	0	0	0	0
28	81	1	0	0	0	0	1
29	89	1	0	0	1	0	0
30	58	1	0	0	0	0	1
31	86	1	0	0	1	0	0
32	67	1	0	0	0	0	1
33	88	1	0	0	0	0	1
34	76	1	0	1	0	0	0
35	51	1	0	1	0	0	0
36	65	1	0	0	0	0	1
37	99	1	0	1	0	0	0

38	69	1	0	0	0	0	1
39	89	0	0	0	0	0	0
40	51	0	0	0	0	0	0
41	76	0	0	0	0	0	0
42	80	1	1	0	0	0	0
43	73	1	0	1	0	0	0
44	99	0	0	0	0	0	0
45	32	1	0	0	0	1	0
46	85	1	0	1	0	0	0
47	91	1	0	0	0	0	1
48	92	1	0	0	1	0	0
49	93	1	0	0	0	0	1
50	94	1	1	0	0	0	0
51	60	1	0	0	0	1	0
52	92	1	0	0	0	1	0
53	66	0	0	0	0	0	0
54	73	1	0	1	0	0	0
55	76	0	0	0	0	0	0
56	87	0	0	0	0	0	0
57	47	1	1	0	0	0	0
58	65	1	0	0	0	0	1
59	63	0	0	0	0	0	0
60	87	0	0	0	0	0	0
61	93	1	0	1	0	0	0
62	76	1	0	0	1	0	0
63	91	1	0	0	0	0	1
64	83	1	0	0	0	0	1
65	49	1	0	0	0	0	1
66	47	1	1	0	0	0	0
67	92	1	0	0	0	0	1
68	76	0	0	0	0	0	0
69	58	0	0	0	0	0	0
70	57	1	0	0	0	0	1
71	2001	1	1	0	0	0	0
72	92	0	0	0	0	0	0
73	78	1	0	0	0	1	0
74	66	1	0	0	0	0	1
75	92	1	1	0	0	0	0
76	80	0	0	0	0	0	0
77	91	0	0	0	0	0	0
78	78	1	0	0	0	0	1
79	86	1	0	1	0	0	0
80	56	1	0	0	0	0	1
81	76	1	0	0	1	0	0
82	89	1	0	0	0	0	1

83	51	0	0	0	0	0	0
84	67	1	0	0	0	0	1
85	64	1	0	0	1	0	0
86	98	0	0	0	0	0	0
87	94	1	0	1	0	0	0
88	87	1	0	1	0	0	0
89	51	0	0	0	0	0	0
90	61	0	0	0	0	0	0
91	93	1	1	0	0	0	0
92	91	0	0	0	0	0	0
93	65	0	0	0	0	0	0
94	96	1	1	0	0	0	0
95	83	1	0	0	0	1	0
96	98	1	1	0	0	0	0
97	64	1	0	0	0	0	1
98	89	1	0	1	0	0	0
99	76	1	0	0	0	0	1
100	91	1	0	0	0	0	1
101	59	1	0	0	0	0	1
101	CELKEM	73	13	16	7	5	32

CN - Rok 2011

Č.	R.NAR.	IF	ABBA 0	ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
1	73	1	0	1	0	0	0
2	78	1	0	0	0	0	1
3	41	0	0	0	0	0	0
4	76	0	0	0	0	0	0
5	68	1	0	1	0	0	0
6	79	1	1	0	0	0	0
7	69	0	0	0	0	0	0
8	64	1	0	1	0	0	0
9	94	1	1	0	0	0	0
10	64	1	0	0	1	0	0
11	64	1	0	0	0	0	1
12	48	1	0	0	0	0	1
13	99	1	1	0	0	0	0
14	76	1	0	1	0	0	0
15	97	1	0	0	0	1	0
16	74	1	0	0	0	0	1
17	60	0	0	0	0	0	0
18	77	1	0	0	1	0	0
19	40	1	0	0	0	0	1
20	96	1	1	0	0	0	0

21	65	1	0	0	0	1	0
22	68	1	0	0	0	1	0
23	90	1	0	0	0	0	1
24	68	1	0	1	0	0	0
25	83	1	0	1	0	0	0
26	87	1	0	0	0	0	1
27	78	1	0	0	0	0	1
28	58	1	0	0	0	0	1
29	64	0	0	0	0	0	0
30	69	1	0	0	0	0	1
31	95	0	0	0	0	0	0
32	93	0	0	0	0	0	0
33	83	0	0	0	0	0	0
34	74	1	0	0	1	0	0
35	93	1	0	0	0	0	1
36	94	0	0	0	0	0	0
37	83	0	0	0	0	0	0
38	89	1	0	1	0	0	0
39	54	1	0	0	1	0	0
40	88	1	0	1	0	0	0
41	81	1	0	1	0	0	0
42	95	1	0	0	1	0	0
43	96	1	1	0	0	0	0
44	72	1	0	0	0	1	0
45	87	1	0	0	0	0	1
46	81	1	0	1	0	0	0
47	72	1	0	1	0	0	0
48	71	1	0	0	0	1	0
49	83	0	0	0	0	0	0
50	93	1	0	0	1	0	0
51	87	1	0	1	0	0	0
52	88	1	0	0	0	0	1
53	68	1	0	1	0	0	0
54	65	1	0	0	0	1	0
55	94	1	0	0	0	0	1
56	50	1	0	1	0	0	0
57	73	0	0	0	0	0	0
58	76	0	0	0	0	0	0
59	81	0	0	0	0	0	0
60	77	1	0	0	0	1	0
61	2003	0	0	0	0	0	0
62	74	1	0	0	0	1	0
63	72	0	0	0	0	0	0
64	59	0	0	0	0	0	0
65	76	1	0	1	0	0	0

66	69	0	0	0	0	0	0
67	75	1	0	1	0	0	0
68	86	1	0	0	0	1	0
69	61	0	0	0	0	0	0
70	85	1	0	0	0	1	0
71	50	1	0	1	0	0	0
72	97	1	0	1	0	0	0
73	36	0	0	0	0	0	0
74	76	1	0	1	0	0	0
75	47	0	0	0	0	0	0
76	75	1	0	1	0	0	0
77	53	0	0	0	0	0	0
78	81	1	0	0	0	0	1
79	76	1	0	0	1	0	0
80	86	0	0	0	0	0	0
81	93	1	1	0	0	0	0
82	88	1	0	0	0	0	1
83	53	1	0	1	0	0	0
84	92	1	0	0	0	0	1
85	48	1	0	0	0	0	1
86	27	1	1	0	0	0	0
87	93	0	0	0	0	0	0
88	51	0	0	0	0	0	0
89	75	0	0	0	0	0	0
90	73	1	0	0	1	0	0
91	67	1	0	0	0	0	1
92	2000	0	0	0	0	0	0
93	69	0	0	0	0	0	0
94	2001	1	1	0	0	0	0
95	91	1	0	0	1	0	0
96	45	0	0	0	0	0	0
97	89	0	0	0	0	0	0
98	80	1	0	1	0	0	0
99	63	0	0	0	0	0	0
100	47	1	0	1	0	0	0
101	61	0	0	0	0	0	0
102	85	0	0	0	0	0	0
103	95	1	1	0	0	0	0
104	63	0	0	0	0	0	0
105	90	0	0	0	0	0	0
106	81	0	0	0	0	0	0
107	34	0	0	0	0	0	0
108	73	1	0	0	1	0	0
109	60	0	0	0	0	0	0
110	90	0	0	0	0	0	0

111	92	1	0	0	0	1	0
112	89	1	0	1	0	0	0
113	78	0	0	0	0	0	0
114	91	0	0	0	0	0	0
115	48	0	0	0	0	0	0
116	91	1	0	0	1	0	0
117	77	1	0	0	0	0	1
118	56	0	0	0	0	0	0
119	79	0	0	0	0	0	0
120	83	1	0	0	0	0	1
121	70	0	0	0	0	0	0
122	95	1	1	0	0	0	0
123	41	1	0	0	0	1	0
124	71	0	0	0	0	0	0
125	72	1	0	0	0	1	0
126	85	1	0	1	0	0	0
127	77	0	0	0	0	0	0
128	64	0	0	0	0	0	0
129	82	1	0	0	0	1	0
130	73	1	0	1	0	0	0
130	CELKEM	82	10	26	11	14	21

Druhý výběrový soubor - Srovnání pacientů s DG UK (K51.0 - 51.9) s výsledky IF v letech 2009-2011

UK – Rok 2009

Č.	R.NAR.	IF	ABBA 0	ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
1	86	0	0	0	0	0	0
2	68	1	0	1	0	0	0
3	80	1	0	1	0	0	0
4	92	1	0	1	0	0	0
5	69	0	0	0	0	0	0
6	82	1	0	0	0	0	1
7	81	1	0	1	0	0	0
8	65	1	1	0	0	0	0
9	59	1	1	0	0	0	0
10	40	1	0	0	0	1	0
11	55	1	0	0	1	0	0
12	40	0	0	0	0	0	0
13	36	1	0	1	0	0	0
14	56	1	0	0	0	0	1
15	81	0	0	0	0	0	0
16	83	1	0	0	0	0	1
17	31	0	0	0	0	0	0
18	79	1	0	1	0	0	0
19	81	1	0	1	0	0	0
20	58	1	0	0	0	0	1
21	42	0	0	0	0	0	0
22	62	1	0	1	0	0	0
23	72	1	0	1	0	0	0
24	56	0	0	0	0	0	0
25	75	1	0	1	0	0	0
26	86	0	0	0	0	0	0
27	74	1	0	0	1	0	0
28	51	0	0	0	0	0	0
29	46	0	0	0	0	0	0
30	76	1	0	1	0	0	0
31	32	0	0	0	0	0	0
32	87	0	0	0	0	0	0
33	67	1	0	0	0	0	1
34	39	0	0	0	0	0	0
35	36	1	0	1	0	0	0
36	94	0	0	0	0	0	0
37	68	1	0	0	1	0	0
38	56	1	0	1	0	0	0

39	42	0	0	0	0	0	0
40	46	0	0	0	0	0	0
41	35	0	0	0	0	0	0
42	46	0	0	0	0	0	0
43	81	1	0	0	1	0	0
44	73	0	0	0	0	0	0
45	70	1	0	1	0	0	0
46	74	1	0	1	0	0	0
47	69	1	0	0	1	0	0
48	67	1	0	1	0	0	0
49	34	1	0	0	0	0	1
50	76	0	0	0	0	0	0
51	60	1	0	1	0	0	0
52	48	1	0	0	1	0	0
53	35	0	0	0	0	0	0
54	80	1	0	1	0	0	0
55	56	0	0	0	0	0	0
56	82	0	0	0	0	0	0
57	74	1	0	0	0	1	0
58	84	0	0	0	0	0	0
59	68	1	0	1	0	0	0
60	51	0	0	0	0	0	0
61	70	1	0	1	0	0	0
62	56	0	0	0	0	0	0
63	70	1	0	0	1	0	0
64	80	0	0	0	0	0	0
65	76	0	0	0	0	0	0
66	96	0	0	0	0	0	0
67	46	0	0	0	0	0	0
67	CELKEM	37	2	20	7	2	6

UK –Rok 2010

Č.	R.NAR.	IF	ABBA 0	ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
1	97	1	1	0	0	0	0
2	79	1	0	0	1	0	0
3	70	0	0	0	0	0	0
4	2001	1	0	1	0	0	0
5	79	0	0	0	0	0	0
6	56	0	0	0	0	0	0
7	55	1	0	0	1	0	0
8	77	1	0	0	1	0	0
9	76	1	0	0	0	0	1
10	80	0	0	0	0	0	0
11	36	0	0	0	0	0	0
12	67	1	0	1	0	0	0
13	61	0	0	0	0	0	0
14	86	1	0	1	0	0	0
15	58	1	0	1	0	0	0
16	77	1	0	1	0	0	0
17	77	0	0	0	0	0	0
18	75	0	0	0	0	0	0
19	82	0	0	0	0	0	0
20	69	1	0	1	0	0	0
21	63	0	0	0	0	0	0
22	95	1	0	1	0	0	0
23	46	0	0	0	0	0	0
24	71	1	0	1	0	0	0
25	56	0	0	0	0	0	0
26	61	0	0	0	0	0	0
27	47	0	0	0	0	0	0
28	56	1	0	0	0	1	0
29	85	1	0	1	0	0	0
30	84	1	0	1	0	0	0
31	36	1	0	0	0	1	0
32	78	1	0	1	0	0	0
33	52	0	0	0	0	0	0
34	85	1	0	1	0	0	0
35	75	1	0	1	0	0	0
36	57	1	0	0	1	0	0
37	58	1	0	1	0	0	0
38	74	1	0	1	0	0	0
39	71	1	0	0	1	0	0
40	47	0	0	0	0	0	0
41	39	0	0	0	0	0	0

42	41	0	0	0	0	0	0
43	64	0	0	0	0	0	0
44	92	0	0	0	0	0	0
45	35	0	0	0	0	0	0
46	58	1	0	1	0	0	0
47	38	0	0	0	0	0	0
48	76	0	0	0	0	0	0
49	74	1	0	0	0	1	0
50	50	0	0	0	0	0	0
51	64	0	0	0	0	0	0
52	86	1	0	0	0	1	0
53	56	0	0	0	0	0	0
54	71	1	0	0	0	0	1
55	94	1	0	1	0	0	0
56	60	1	0	1	0	0	0
57	76	0	0	0	0	0	0
58	41	1	0	0	0	1	0
59	25	0	0	0	0	0	0
60	92	0	0	0	0	0	0
61	75	1	0	0	0	1	0
62	71	1	0	0	0	0	1
63	80	1	0	1	0	0	0
64	44	1	0	0	0	0	1
65	83	1	0	1	0	0	0
66	93	0	0	0	0	0	0
67	65	1	0	1	0	0	0
68	54	1	0	1	0	0	0
69	41	1	0	0	0	1	0
70	54	1	0	1	0	0	0
71	63	0	0	0	0	0	0
72	76	0	0	0	0	0	0
73	74	1	0	1	0	0	0
74	26	1	0	1	0	0	0
75	75	1	0	1	0	0	0
76	80	1	0	1	0	0	0
77	66	1	0	0	1	0	0
78	39	0	0	0	0	0	0
79	83	1	0	0	0	1	0
80	48	0	0	0	0	0	0
81	58	1	0	0	0	0	1
82	80	1	0	1	0	0	0
83	62	1	0	0	1	0	0
84	62	0	0	0	0	0	0
85	48	0	0	0	0	0	0
86	96	0	0	0	0	0	0

87	73	1	1	0	0	0	0
88	56	0	0	0	0	0	0
89	76	0	0	0	0	0	0
90	63	0	0	0	0	0	0
91	90	1	0	1	0	0	0
92	75	0	0	0	0	0	0
93	71	0	0	0	0	0	0
94	79	1	0	1	0	0	0
95	62	1	0	0	1	0	0
96	91	0	0	0	0	0	0
97	49	0	0	0	0	0	0
98	75	1	0	1	0	0	0
99	86	1	0	0	0	1	0
100	60	0	0	0	0	0	0
100	CELKEM	55	2	31	8	9	5

UK – Rok 2011

Č.	R.NAR.	IF	ABBA 0	ABBA -	ABBA +	ABBA ++	ABBA +++
1	89	1	0	0	0	1	0
2	23	0	0	0	0	0	0
3	97	1	0	1	0	0	0
4	64	0	0	0	0	0	0
5	52	1	0	1	0	0	0
6	55	1	0	0	1	0	0
7	74	0	0	0	0	0	0
8	2002	1	1	0	0	0	
9	64	0	0	0	0	0	0
10	37	0	0	0	0	0	0
11	68	1	0	1	0	0	0
12	73	1	0	0	1	0	0
13	55	0	0	0	0	0	0
14	81	1	0	1	0	0	0
15	69	1	0	1	0	0	0
16	57	0	0	0	0	0	0
17	70	1	0	1	0	0	0
18	71	0	0	0	0	0	0
19	62	1	0	1	0	0	0
20	49	1	0	1	0	0	0
21	35	0	0	0	0	0	0
22	44	0	0	0	0	0	0
23	22	0	0	0	0	0	0
24	66	0	0	0	0	0	0
25	46	0	0	0	0	0	0

26	65	0	0	0	0	0	0
27	66	1	0	1	0	0	0
28	71	1	0	1	0	0	0
29	73	0	0	0	0	0	0
30	97	0	0	0	0	0	0
31	50	0	0	0	0	0	0
32	34	1	0	0	0	0	1
33	67	1	0	0	0	1	0
34	83	1	0	1	0	0	0
35	78	0	0	0	0	0	0
36	41	0	0	0	0	0	0
37	73	1	0	0	1	0	0
38	80	0	0	0	0	0	0
39	86	0	0	0	0	0	0
40	80	0	0	0	0	0	0
41	76	0	0	0	0	0	0
42	50	1	0	1	0	0	0
43	83	1	0	1	0	0	0
44	58	0	0	0	0	0	0
45	89	1	0	1	0	0	0
46	71	0	0	0	0	0	0
47	51	0	0	0	0	0	0
48	49	1	0	1	0	0	0
49	42	0	0	0	0	0	0
50	50	1	0	1	0	0	0
51	81	1	0	1	0	0	0
52	89	1	0	0	0	1	0
53	36	0	0	0	0	0	0
54	27	0	0	0	0	0	0
55	77	1	0	1	0	0	0
56	62	1	0	1	0	0	0
57	89	1	0	0	0	1	0
58	63	1	0	0	0	0	1
59	69	0	0	0	0	0	0
60	57	1	0	1	0	0	0
61	80	1	0	1	0	0	0
62	82	1	0	1	0	0	0
63	58	1	0	1	0	0	0
64	78	0	0	0	0	0	0
65	41	0	0	0	0	0	0
66	85	0	0	0	0	0	0
67	55	1	0	0	0	1	0
68	87	0	0	0	0	0	0
69	81	0	0	0	0	0	0
70	25	0	0	0	0	0	0

71	76	0	0	0	0	0	0
72	32	0	0	0	0	0	0
73	81	1	0	0	1	0	0
74	88	1	0	1	0	0	0
75	74	1	0	0	0	1	0
76	50	0	0	0	0	0	0
77	56	0	0	0	0	0	0
78	49	0	0	0	0	0	0
79	2001	1	1	0	0	0	0
80	67	1	1	0	0	0	0
81	72	1	0	0	0	1	0
82	85	1	0	1	0	0	0
83	86	0	0	0	0	0	0
84	40	0	0	0	0	0	0
85	90	1	0	1	0	0	0
86	97	1	1	0	0	0	0
86	CELKEM	43	4	26	4	7	2