

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Porovnání biochemického stanovení elastasy, kalprotektinu  
a testů na detekci okultního krvácení ve stolici s využitím  
různých odběrových souprav na analyzátoru Siemens Atellica**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Pavla Mošnerová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Štěpán Kouřil, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2024

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Bc. Pavla Mošnerová
Název práce	Porovnání biochemického stanovení elastasy, kalprotektinu a testů na detekci okultního krvácení ve stolici s využitím různých odběrových souprav na analyzátoru Siemens Atellica
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Štěpán Kouřil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

### **Abstrakt**

Předložená diplomová práce se zabývá pankreatickou elastasou 1, kalprotektinem a fekálním hemoglobinem, které byly detekovány ze vzorků patientské stolice. Teoretická část byla zaměřena na charakteristiku těchto analytů včetně popisu jejich chemické struktury, funkce i různých faktorů působících na jejich fyziologické hladiny. Patologické koncentrace daných analytů mohou poukazovat na specifická onemocnění, především gastrointestinálního traktu. Pozornost byla věnována také vysvětlení, proč se právě tyto sloučeniny používají jako biomarkery.

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na kvantitativní analýzu elastasy, kalprotektinu a fekálního hemoglobinu z primárních patientských vzorků stolice. Ke stanovení jejich koncentrace byly využity nové soupravy, které by stanovení cílových biomolekul zefektivnily. Bylo provedeno porovnání nových souprav a interpretace získaných dat. Vybrané metody byly dle doporučených postupů verifikovány za účelem zavedení těchto metod do rutinního provozu na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc.

Klíčová slova	pankreatická elastasa 1, fekální hemoglobin, FIT, kalprotektin, laboratorní diagnostika
Počet stran	82
Počet příloh	2
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Bc. Pavla Mošnerová
Title of thesis	Comparison of biochemical determination of elastase, calprotectin, and assays for detection of occult bleeding in stool using various sampling kits at the Siemens Atellica analyzer
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Štěpán Kouřil, Ph.D.
The year of presentation	2024

### **Abstract**

The presented thesis deals with pancreatic elastase 1, calprotectin and fecal hemoglobin, which were detected from patient stool samples. The theoretical part was focused on the characteristics of these analytes, including the description of their chemical structure, function and various factors affecting their physiological levels. Pathological concentrations of analytes can indicate specific diseases, especially of the gastrointestinal tract. Attention was also focused on explaining why these compounds are used as biomarkers.

The experimental part of the thesis was focused on the quantitative analysis of elastase, calprotectin and fecal hemoglobin from primary patient stool samples. New kits were used to determine their concentration, which would make the determination of target biomolecules more efficient. A comparison of the new kits and an interpretation of the obtained data were carried out. The selected methods were verified according to recommended procedures in order to introduce these methods into routine operation at the Department of Clinical Biochemistry of the Olomouc University Hospital.

Keywords	pancreatic elastase 1, fecal hemoglobin, FIT, calprotectin, laboratory diagnostics
Number of pages	82
Number of appendices	2
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně  
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne: 9. 5. 2024

Bc. Pavla Mošnerová

### Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Štěpánu Kouřilovi, Ph. D., vedoucímu mojí diplomové práce, za trpělivost, vstřícnost a ochotu, také především za věnovaný čas a odborné vedení. Dále bych ráda poděkovala Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc za poskytnutí vybavení a zázemí, zvláště pak laborantce Evě Pospíšilové za pomoc při zpracování vzorků.

# OBSAH

Seznam symbolů a zkratk.....	9
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>11</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Pankreatická elastasa 1 .....</b>	<b>12</b>
3.1.1 Struktura elastasy .....	12
3.1.2 Funkce elastasy .....	12
3.1.3 Elastasa jako biomarker .....	13
3.1.4 Koncentrace elastasy .....	14
3.1.5 Vybraná onemocnění spjatá s patologickými koncentracemi elastasy .....	14
3.1.5.1 Cystická fibróza .....	15
3.1.5.2 Chronická pankreatitida.....	15
3.1.5.3 Syndrom dráždivého tračníku.....	15
3.1.6 Charakteristiky metod používaných ke stanovení elastasy .....	16
3.1.6.1 fPELA® turbo.....	16
3.1.6.2 Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo .....	16
3.1.6.3 Elaprest Turbo .....	17
<b>3.2 Kalprotektin.....</b>	<b>18</b>
3.2.1 Struktura kalprotektinu.....	18
3.2.2 Funkce kalprotektinu.....	19
3.2.3 Využití kalprotektinu jako biomarkeru .....	19
3.2.4 Koncentrace kalprotektinu .....	20
3.2.5 Vybraná onemocnění spjatá s patologickými koncentracemi kalprotektinu....	21
3.2.5.1 Nespecifické střevní záněty .....	21
3.2.6 Charakteristiky metod používaných ke stanovení kalprotektinu .....	22
3.2.6.1 fCAL® turbo.....	23
3.2.6.2 Calprotectin Turbilatex® Combo .....	23
3.2.6.3 Calprest Turbo .....	23
<b>3.3 Hemoglobin ve stolici .....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Struktura hemoglobinu.....	25
3.3.2 Testy na detekci okultního krvácení ve stolici.....	25
3.3.3 FIT jako biomarker .....	27
3.3.4 Koncentrace FIT.....	27

3.3.5	Vybraná onemocnění spjatá s patologickými koncentracemi FIT .....	28
3.3.5.1	Kolorektální karcinom .....	28
3.3.6	Charakteristiky metod používaných ke stanovení hemoglobinu .....	28
3.3.6.1	QuikRead go <sup>®</sup> iFOBT .....	29
3.3.6.2	FOB Turbilatex <sup>®</sup> Combo .....	29
3.3.6.3	FOB-Test Turbo.....	29
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIÁL.....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Biologický materiál.....	31
4.1.2	Komerční soupravy .....	31
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	33
4.1.4	Laboratorní pomůcky .....	33
4.1.5	Software .....	33
<b>4.2</b>	<b>METODY.....</b>	<b>34</b>
4.2.1	Distribuce patientských zkumavek.....	34
4.2.2	Odběr primárních patientských vzorků .....	35
4.2.3	Kalibrace analyzátoru a následné měření.....	37
4.2.4	Měření vzorků v analyzátoru .....	39
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>42</b>
5.1	Kalibrace před měřením .....	42
5.2	Porovnání patientských vzorků elastasy .....	44
5.3	Porovnání patientských vzorků kalprotektinu .....	45
5.4	Porovnání patientských vzorků FIT.....	51
5.5	Měření mezilehlé preciznosti .....	52
5.6	Měření opakovatelnosti .....	61
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>78</b>

## Seznam symbolů a zkratek

2PA	two-point analýza
CRC	colorectal carcinoma, kolorektální karcinom
CRP	C-reactive protein, C-reaktivní protein
CV	variační koeficient
DAMP	damage-associated molecular pattern, molekulární vzor asociovaný s poškozením
EHK	externí hodnocení kvality
EPA	end-point analýza
FD	fecal diagnostics, cyklus stanovení analytu ve stolici
FE1	faecal elastase 1, fekální elastasa 1
FIT	fecal immunochemical tests, fekální imunochemické testy
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
gFOBT	guaiac fecal occult blood test, kvalitativními testy s guajakovou pryskyřicí
GIT	gastrointestinální trakt
IBD	irritable bowel diseases, nespecifické střevní záněty
IBS	irritable bowel syndrome, syndrom dráždivého tračníku
MH	mucosal healing, slizniční hojení
OKB	Oddělení klinické biochemie
PETIA	particle-enhanced turbidimetric immunoassay, částicemi zdokonalená turbidimetrická imunoanalýza
RfB	Referenzinstitut für Bioanalytik, poskytovatel externího hodnocení kvality
SD	směrodatná odchylka
VKK	vnitřní kontrola kvality
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace



# 1 ÚVOD

V obecné rovině jsou biomarkery využívány pro svoje specifické vlastnosti, kterými disponují. Umožňují totiž neinvazivní vhlad do patofyziologických procesů odehrávajících se v cílených tkáních. Kvantitativní analýza daného markeru spjatého s určitými tkáňovými změnami, vlastnostmi či probíhajícími ději pak nabízí možnost detekce patologického stavu nebo přímé stanovení diagnózy pacienta.

V diplomové práci byla pozornost zaměřena na tři vybrané biomarkery, pankreatickou elastasu 1, kalprotektin a fekální hemoglobin, které již mnoho let patří mezi rutinně využívané biochemické markery. V případě uvedených analytů se jedná o fekální biomarkery, tedy markery přítomné ve stolici. Přirozeně tedy musí splňovat určité podmínky, a to vlastnost a schopnost procházet gastrointestinálním traktem (GIT) bez větších změn ve své struktuře. Případné změny zjištěných koncentrací takových biomolekul mohou poukazovat především na onemocnění právě GIT.

Pankreatická elastasa 1 je součástí pankreatického sekretu produkovaného do duodena, její syntéza probíhá v acinárních buňkách slinivky břišní. Tento enzym díky své schopnosti hydrolyzovat elastin, ale i mnoho dalších proteinů, přispívá ke zdravým zaživacím procesům. Aktivita elastasy ve vzorcích stolice odráží míru exokrinní funkce slinivky. Snížené hodnoty tohoto markeru proto mohou značit exokrinní pankreatickou nedostatečnost.

Kalprotektin je jako leukocytární cytosolový protein produkován především neutrofily a monocyty, z nichž se uvolňuje při jejich aktivaci nebo lýze. Kalprotektin je charakteristický vazností vápenatých kationtů, díky této schopnosti omezuje růst invazivních střevních bakterií. Hladina kalprotektinu uvolněného do stolice je úzce spjata s množstvím leukocytů aktivovaných ve střevním lumen. Zvýšené koncentrace kalprotektinu tak mohou signalizovat zánětlivá střevní onemocnění.

Fekální imunochemické testy (FIT, fecal immunochemical tests) umožňují stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici. Hemoglobin jako složka krve umožňuje transport krevních plynů a má v lidském organismu nezastupitelnou funkci. Ve stolici se může vyskytovat po úniku krve do GIT. Zvýšené hladiny fekálního hemoglobinu mohou poukazovat na přítomnost kolorektálního karcinomu či dalších onemocnění GIT spojených s hemoragií.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části mojí práce bylo popsat vybrané fekální biomarkery, jejichž koncentrace byla stanovována v praktické části práce. Konkrétně se jednalo o pankreatickou elastasu 1, kalprotektin a hemoglobin ve stolici. Uvedené biomarkery byly charakterizovány z hlediska jejich funkce, pozornost byla věnována také jejich chemické struktuře či fyziologické koncentraci. Další kapitoly si kladly za cíl vystihnout, proč právě tyto sloučeniny je vhodné využívat jako biomarkery, a v čem spočívají výhody jejich užívání. Pozornost byla věnována i různým faktorům, kterými jsou jejich koncentrace ovlivněny. Nejen fyziologicky, ale také patologicky, se snahou uvést onemocnění, spjatá právě se změnou koncentrací daného analytu. V závěru kapitol věnovaných elastase, kalprotektinu a fekálnímu hemoglobinu byl vymezen také prostor pro popis a parametry charakterizující reagenční soupravy využívané ke kvantitativní analýze v praktické části práce.

Experimentální část práce si kladla za cíl zavést do provozu Oddělení klinické biochemie (OKB) Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL) nové soupravy k testování elastasy, kalprotektinu a hemoglobinu ve stolici. Ty stávající nejsou především pro analýzu fekálního hemoglobinu optimální, protože ke stanovení jeho koncentrace vyžadují přístroj udržovaný v provozu výlučně pro tuto metodu. Stanovení elastasy a kalprotektinu je dosud prováděno z jedné testovací zkumavky, avšak daný výrobce neposkytuje soupravy ke stanovení fekálního hemoglobinu.

Hlavním cílem praktické části tedy bylo otestovat nové sady souprav od dvou různých výrobců. K tomu bylo nejprve nutné získat primární vzorky stolice od pacientů z oddělení FNOL, odkud bývají vzorky na analýzu těchto markerů zasílány k laboratorní analýze. Následně bylo třeba provést jejich zpracování a připravit tyto primární vzorky ke stanovení přesných koncentrací za využití biochemického analyzátoru. Výsledné získané koncentrace pak bylo třeba porovnat, provést statistickou analýzu a získaná data interpretovat. Jedním dalších z cílů byla verifikace nově zvolených metod pro stanovení daných biomarkerů, ideálně i jejich zavedení do rutinního provozu na OKB.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Pankreatická elastasa 1

Elastasy řadíme mezi proteasy, jež mohou mít různý biologický původ. Lze je izolovat z bakterií, hub i hadích jedů, u savců se vyskytují v leukocytech, makrofázích či v pankreatu (Werb *et al.*, 1982). Lidskou slinivku, jeden ze zdrojů elastasy, tvoří endokrinní a exokrinní tkáň. Endokrinní tkáň sestává z  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  a PP buněk, jež jsou organizovány do ostrůvků rozptýlených v exokrinní tkáni. Exokrinní tkáň, která formuje přibližně 90 % pankreatu, pak obsahuje buňky acinární a duktální. Funkcí buněk acinárních je syntéza a vylučování trávicích enzymů, úkolem duktálních vylučování tekutin za účelem transportu acinárních enzymů do duodena (Čihák *et Grim*, 2013). A právě mezi tyto enzymy patří i pankreatická elastasa, proteolytický enzym produkovaný pankreatickými acinárními buňkami (Seiler *et al.*, 2013). V literatuře bývá označována také jako pancreatopeptidasa E, často zkráceně nazývána elastasa (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

#### 3.1.1 Struktura elastasy

Elastasa byla poprvé izolována v 70. letech minulého století, konkrétně roku 1974 (Feinstein *et al.*, 1974). Tvoří ji 57 aminokyselin, s molekulární hmotností přibližně 6,1 kDa (uniprot.org). Gen pankreatické elastasy, *ELAI*, je v lidském genomu vysoce konzervován (Tani *et al.*, 1987), umístěn na 12. chromozomu (12q13) (O'Connell *et al.*, 1987).

#### 3.1.2 Funkce elastasy

Enzym elastasa byl obecně popsán již roku 1950. Výzkumy tehdy potvrdily, že sekret pankreatu vykazuje schopnost rozpouštět elastin, vláknitý protein tvořící pojivovou tkáň, který se dosud nedařilo nikomu rozštěpit ani anorganickými, ani organickými rozpouštědly. Nově objevený enzym s unikátní vlastností hydrolyzovat elastin byl pojmenován elastasa (Baló *et Banga*, 1950; Tani *et al.*, 1987).

Dle EC nomenklatury byl tento enzym díky své již zmíněné vlastnosti zařazen mezi hydrolasy (EC 3.-.-), konkrétně pak peptidasy (EC 3.4.-.-). Elastasu dále řadíme do rodiny serinových endopeptidas (EC 3.4.21.-), ke které mimo jiné patří také například trávicí enzymy trypsin (EC 3.4.21.4), chymotrypsin (EC 3.4.21.1), některé proteasy enzymatické kaskády krevní koagulace či proteasy komplementu. Primární a terciální struktura serinových proteas je z více než 40 % homologní (Dominici *et Franzini*, 2002).

Pankreatickou elastasu dle EC nomenklatury klasifikujeme jako EC 3.4.21.36, ve starší literatuře se ale můžeme setkat i s označením EC 3.4.4.7 a EC 3.4.21.11 (Feinstein *et al.*, 1974; Largman *et al.*, 1976; pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Acinární buňky slinivky syntetizují elastasu jako proelastasu. Tento neaktivní prekurzor se ve střevě díky působení trypsinu mění na aktivní enzym (Tani *et al.*, 1987), který kromě elastinu hydrolyzuje i mnoho dalších proteinů (Rosenbloom, 1984). V případě elastasy dochází ke štěpení peptidové vazby preferenčně za aminokyselinou alaninem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3.1.3 Elastasa jako biomarker

Při stanovení fekální elastasy 1 (FE1) bylo zjištěno, že její množství koreluje se skutečným množstvím exokrinní sekrece elastasy pankreatem (Domínguez-Muñoz *et al.*, 1995). Rovněž koncentrace FE1 odpovídají těm pro duodenální elastasu (Löser *et al.*, 1996). Tato skutečnost však u jiných pankreatických enzymů neplatí a podléhají degradaci (Stein *et al.*, 1996). Mezi pankreatickými enzymy a elastasou ale jistá podobnost existuje, konkrétně mezi jejich sekrečními vzorci. Koncentrace duodenální elastasy totiž korelují s množstvím produkce amylasy, lipasy i trypsinu, tyto korelace navíc platí i při porovnání produkce zmíněných pankreatických enzymů s koncentrací FE1 (Löser *et al.*, 1996).

Jak již bylo zmíněno, elastasa je během střevní pasáže vysoce stabilní a střevem prochází s minimální degradací. Důvodem je skutečnost, že se elastasa pojí v makromolekulární komplex s cholesterolem a žlučovými kyselinami (Seiler *et al.*, 2013; Sziegoleit *et al.*, 1989). I v případě opakované analýzy u vybraného pacienta nejsou hladiny FE1 v různých dnech stanovení analytu variabilní, nekolísají (Löser *et al.*, 1996). Koncentrace FE1 tak lze měřit na základě jediného vzorku stolice (Hamwi *et al.*, 2000). Při detekci FE1 se využívá monoklonálních protilátek. Tato metoda ve srovnání s jinými testy pankreatické funkce nevyžaduje přerušování léčby pacienta perorálními doplňky pankreatických enzymů, protože detekuje pouze lidskou formu elastasy. To je její obrovskou výhodou (Lévy *et al.*, 2006).

Při mírné exokrinní pankreatické nedostatečnosti sice stanovení FE1 vykazuje nižší citlivost, avšak u středně těžkých a těžkých forem je velmi vysoká. Vyšetření FE1 se ke zhodnocení funkčního poškození slinivky nabízí jako jednoduchá, široce dostupná, rychlá, ale také neinvazivní, vysoce klinicky proveditelná metoda s nízkou individuální každodenní variabilitou a vynikající stabilitou za různých podmínek skladování

analyzovaného materiálu. Co se tedy týče proveditelnosti analýzy, FE1 je výborným laboratorním biomarkerem (Krechler *et al.*, 2006; Löser *et al.*, 1996).

### **3.1.4 Koncentrace elastasy**

Koncentrace FE1 v porovnání s koncentrací v pankreatickém sekretu je 5× až 6× větší, důvodem je reabsorpce střevní vody (Sziegoleit *et al.*, 1989). Za fyziologických podmínek je koncentrace elastasy v pankreatické šťávě mezi 170 a 360 µg/ml, ona sama pak představuje asi 6 % všech vylučovaných pankreatických enzymů (Sziegoleit, 1984).

Výzkum prokázal, že na hladiny FE1 má zásadní vliv věk. U desítky starších osob (mezi 50 a 75 lety) klesá hladina tohoto analytu pod hodnotu 200 µg/g. Vliv má také pohlaví, kdy nižší koncentrace FE1 bývají pozorovány mužů. Negativní dopady s následným poklesem těchto hodnot způsobuje kouření (Rothenbacher *et al.*, 2005).

### **3.1.5 Vybraná onemocnění spjatá s patologickými koncentracemi elastasy**

Vyšetření koncentrace elastasy ve stolici umožňuje hodnocení funkčního poškození slinivky a zjištění případné zevní sekretorické insuficience (Krechler *et al.*, 2006). Onemocnění spojená se sekretorickou nedostatečností, exokrinní pankreatická onemocnění, jsou totiž častější, než je obecně vnímáno, a mohou být chybně spojována se zcela odlišnou diagnózou kvůli svým nespecifickým symptomům (Leeds *et al.*, 2011).

Mezi onemocnění s nízkými hladinami FE1 patří nespecifické střevní záněty (IBD, inflammatory bowel diseases) (Barthet *et al.*, 2006; Maconi *et al.*, 2008). Nízké hladiny FE1 byly pozorovány až u 30 % pacientů s Crohnovou chorobou (Barthet *et al.*, 2006) a až u 20 % pacientů s ulcerózní kolitidou (Maconi *et al.*, 2008). Pro IBD jsou však typické spíše vysoké koncentrace kalprotektinu, proto jim bude věnována kapitola 3.2.5.1 související s tímto biomarkerem. Hladiny FE1 pak také klesají přibližně u třetiny pacientů s celiakií trpících průjmy (Leeds *et al.*, 2007) či u HIV pozitivních, z nichž může mít nízké hladiny FE1 až polovina (Carroccio *et al.*, 1999).

K onemocněním, kde hladina FE1 může klesat výrazně (<100 µg/g), řadíme diabetes mellitus 1. i 2. typu. V případě pacientů s diabetem 1. typu hladina FE1 výrazně klesá až u 26 % z nich (Icks *et al.*, 2001), u těch s diabetem 2. typu až u 12 % nemocných (Rathmann *et al.*, 2001).

### **3.1.5.1 Cystická fibróza**

Jednou z příčin pankreatické insuficience může být cystická fibróza, u níž bývá snižená koncentrace FE1 častým symptomem. Jedná se o nejčastější autosomálně recesivně děděné onemocnění v evropské populaci. Cystická fibróza se projevuje poruchou funkce chloridových kanálů buněčných membrán. Ve velké míře jsou postiženy dýchací cesty pacienta, přičemž dochází k jejich obstrukci a k destrukci plicního parenchymu s chronicky nastupující bakteriální infekcí. Mezi další projevy patří také vysoká koncentrace iontů v potu nemocných, rozvoj diabetu, osteoporóza, ale i zmiňovaná porucha zevní sekrece pankreatu. Pro zavedení substituční léčby pankreatickými enzymy se často stanovuje právě koncentrace FE1 (Lebl *et al.*, 2012).

### **3.1.5.2 Chronická pankreatitida**

Chronická pankreatitida je závažné zánětlivé onemocnění slinivky břišní probíhající kontinuálně či v opakovaných akutních atakách. Způsobuje kalcifikaci a postupnou atrofizaci epitelí pankreatických vývodů, ve kterých dochází k precipitaci bílkovin. Parenchym je nahrazen fibrózní tkání a rozvíjí se zevní a později i vnitřní pankreatická insuficience (Lebl *et al.*, 2012).

### **3.1.5.3 Syndrom dráždivého tračníku**

K výraznému snížení hladiny FE1 může dojít u některých pacientů se syndromem dráždivého tračníku (IBS, irritable bowel syndrome) (Leeds *et al.*, 2010). IBS se řadí mezi skupinu nejčastěji diagnostikovaných onemocnění GIT. Je definován bolestmi břicha, změněnými vyprazdňovacími návyky či břišním nepohodlím při absenci jakékoli jiné nemoci, která by způsobila tento druh symptomů. IBS je nejrozšířenější v Jižní Americe, nejméně pacientů je v jihovýchodní Asii (Lovell *et Ford*, 2012). Při výběru vhodné léčby hraje důležitou roli určení převládajících symptomů, dle kterých rozlišujeme tři podskupiny IBS. Pacienti s IBS-D (diarrhea) trpí průjmy, pacienti s IBS-C (constipation) zácpou a pacienti s IBS-M (mixed) oběma uvedenými příznaky. Rozmanitost příznaků ztěžuje účinnou léčbu IBS, která je velmi individuální. Určitý léčebný postup, který vede ke zlepšení zdravotního stavu konkrétního pacienta, tak nemusí vykazovat výsledky u jiného pacienta se symptomy stejnými (Chey *et al.*, 2015; Guilera *et al.*, 2005).

### 3.1.6 Charakteristiky metod používaných ke stanovení elastasy

Ke stanovení elastasy lze používat různé přístupy. V diplomové práci byla ke stanovení tohoto markeru z pacientské stolice využívána kvantitativní analýza s využitím třech níže popsaných reagenčních souprav (Tab. 1). Ve všech případech se jedná o *in vitro* diagnostické testovací soupravy pro stanovení elastasy ze vzorku lidské stolice, určené k testování pomocí biochemických analyzátorů (příbalový leták fPELA<sup>®</sup> turbo, Bühlmann, v. A2; příbalový leták Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Combo, CerTest, v. 1020; příbalový leták Elaprest Turbo, Eurospital, ref. 9298).

Výsledky analýz FE1 vypovídají o funkci slinivky, konkrétně mohou informovat o případné exokrinní pankreatické insuficienci. Dané zjištění pak ve spojení s dalšími laboratorními a klinickými nálezy poukazuje na různá onemocnění, například chronickou pankreatitidu či cystickou fibrózu.

#### 3.1.6.1 fPELA<sup>®</sup> turbo

Princip stanovení FE1 s využitím fPELA<sup>®</sup> turbo reagenční soupravy je založen na turbidimetrické imunoanalýze se zvýšeným obsahem částic (PETIA, particle-enhanced turbidimetric immunoassay). Jako imunočástice jsou využívány polystyrenové nanočástice potažené králičími protilátkami proti lidské elastase (příbalový leták fPELA<sup>®</sup> turbo, Bühlmann, v. A2).

Co se týče interpretace výsledků měření, hodnoty FE1 >200 µg/g stolice signalizují normální pankreatickou funkci, hodnoty <200 µg/g stolice exokrinní pankreatickou nedostatečnost.

#### 3.1.6.2 Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Combo

Principem stanovení FE1 s využitím Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Combo reagenční soupravy je turbidimetrická imunoanalýza, imunočásticemi jsou polystyrenové latexové částice potažené monoklonálními protilátkami proti lidské elastase (příbalový leták Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Combo, CerTest, v. 1020).

Návod k interpretaci výsledků měření určuje jako cut-off hodnotu FE1 200 µg/g stolice. Negativní, tedy vyšší hodnoty, signalizují normální funkci slinivky. Hodnoty v rozmezí 100–200 µg/g stolice značí mírnou až střední pankreatickou nedostatečnost, při koncentraci <100 µg/g stolice se jedná o nedostatečnost těžkou.

### 3.1.7 Elaprest Turbo

Principem stanovení FE1 s využitím reagenční soupravy Elaprest Turbo je založen na turbidimetrické imunoanalýze PETIA. Jako imunočástice jsou využity polystyrenové latexové částice potažené protilátkami proti lidské elastase (příbalový leták Elaprest Turbo, Eurospital, ref. 9298).

Návod k interpretaci výsledků měření určuje jako cut-off hodnotu stejnou koncentraci jako u předešlých souprav, tedy 200 µg/g stolice. Vyšší hodnoty detekované FE1 signalizují normální funkci slinivky, hodnoty 100–200 µg/g stolice jsou interpretovány jako šedá zóna. Koncentraci <100 µg/g stolice signalizuje pankreatickou nedostatečnost.

**Tab. 1:** Porovnání základních parametrů reagenčních souprav používaných ke stanovení FE1.

Reagenční souprava	Senzitivita [%]	Specificita [%]	Hodnota cut-off [µg/g stolice]	Rozsah hodnot [µg/g stolice]	Interpretace výsledků
fPELA® turbo	-	-	200	>200 <200	Normální funkce pankreatu Pankreatická insuficience
Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo	95	>99	200	>200 100–200 <100	Normální funkce pankreatu Mírná až střední pankreatická insuficience Těžká pankreatická insuficience
Elaprest Turbo	100	93	200	>200 100–200 <100	Normální funkce pankreatu Šedá zóna Pankreatická insuficience



## 3.2 Kalprotektin

Kalprotektin, nazývaný také L1 protein, je hlavní leukocytární protein a biomarker aktivity střevního zánětu (Fagerhol *et al.*, 1980; Lukáš *et al.*, 2018). Jedná se o zásadní složku cytosolu neutrofilů, kalprotektin zde tvoří přibližně 60 % cytosolických proteinů. Jeho exprese jsou dále schopny eozinofily ilea, monocyty, makrofágy (Vatn *et Sandvik*, 2015), případně dendritické buňky (Kumar *et al.*, 2003). Z buněk nepatřících mezi imunitní pak dlaždicové slizniční epitelu (Wilkinson *et al.*, 1988), enterocyty (Lukáš *et al.*, 2021) či keratinocyty (Mørk *et al.*, 2003).

### 3.2.1 Struktura kalprotektinu

Kalprotektin náleží do jedné z největších podrodin proteinů vázajících vápník, rodiny proteinů S100. Ty charakterizuje právě vaznost vápníku (konkrétně tyto proteiny obsahují dvě místa vázající vápník), relativně nízká molekulová hmotnost a tkáňově specifická exprese. S100 proteiny se účastní různých buněčných funkcí například buněčné diferenciaci, progresu buněčného cyklu či modulací při interakcích mezi buněčnou membránou a cytoskeletem. Mezi zástupce této proteinové rodiny řadíme například troponin C či kalmodulin (Kligman *et Hilt*, 1988; Niki *et al.*, 1996; Vogl *et al.*, 1999). Proteiny rodiny S100 nalézáme pouze u obratlovců (a tedy i u člověka) (Moore, 1965).

Konkrétně kalprotektin je tvořen proteiny S100A8 a S100A9. Monomer S100A8, nazývaný také MRP-8 či kalgranulin A, je lehkou podjednotkou tohoto komplexu. Skládá se z 93 aminokyselin s molekulovou hmotností 10,8 kDa. Monomer S100A9, nazývaný také MRP-14 či kalgranulin B, je těžkou podjednotkou tohoto komplexu. Skládá se ze 114 aminokyselin s molekulovou hmotností 13,2 kDa (Andersson *et al.*, 1988; Konikoff *et Denson*, 2006; uniprot.org; Vatn *et Sandvik*, 2015). S100A8 a S100A9 jsou u člověka kódovány na chromozomu 1 (q21) (Schäfer *et al.*, 1995).

Monomery S100A8 a S100A9 se mohou shlukovat do komplexů (Vogl *et al.*, 1999). Ostatně jako většina S100 proteinů mají i ony tendenci tvořit homodimery (S100A8/S100A8, S100A9/S100A9) (Potts *et al.*, 1996). Vytváří však i heterokomplexy, v těchto případech se pak jedná o heterodimery S100A8/S100A9 či heterotetramery (S100A8/S100A9)<sub>2</sub>, produkty dimerizace heterodimerů (Korndorfer *et al.*, 2007; Vogl *et al.*, 1999).

Nejen, že se kalprotektin řadí mezi proteiny vázající vápník, ale vytváření těchto proteinových komplexů je kalcium-dependentní, proto vznik kalprotektinu přímo

vyžaduje přítomnost tohoto iontu (Vatn *et* Sandvik, 2015). Monomery S100A8 a S100A9 obsahují 2 vazebná místa pro vápenaté kationty, dimery vážou 4 tyto kationty, tetramery pak 8 vápenatých kationtů (Vogl *et al.*, 1999).

Výše jmenované komplexy S100 proteinů, jmenovitě S100A8/S100A8, S100A9/S100A9, S100A8/S100A9 a (S100A8/S100A9)<sub>2</sub>, tedy vykazují vysokou variabilitu a v organismu je nacházíme paralelně ve všech uvedených podobách (Ishikawa *et al.*, 2000; Itou *et al.*, 2002).

### 3.2.2 Funkce kalprotektinu

Kalprotektin byl identifikován a charakterizován v 80. letech minulého století (Andersson *et al.*, 1988). Vykazuje antibakteriální a antifungální účinky. Extracelulární komplexy, které tento protein vytváří, umožňují chelataci dvojmocných kovových iontů (kromě zmiňovaných vápenatých kationtů také kationtů zinečnatých, železnatých či nikelnatých) (Vatn *et* Sandvik, 2015; Zygiel *et* Nolan, 2018). Tím kalprotektin omezuje růst invazivních střevních bakterií, pro něž jsou uvedené ionty klíčové (Waldron *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2020). Název kalprotektin tak opět jen zdůrazňuje jeho tehdy zjištěné charakteristické vlastnosti, konkrétně antimykotickou aktivitu proti *Candida albicans* a schopnost vázat vápenaté kationty (Steinbakk *et al.*, 1990).

Kalprotektin se účastní zánětlivé reakce (Jukic *et al.*, 2021). V případě poškození tkáně dochází k pasivnímu uvolňování kalprotektinu jako tzv. molekulárního vzoru asociovaného s poškozením (DAMP, damage-associated molecular pattern) do extracelulárního prostředí. Tyto DAMP molekuly se jako endogenní stimuly uvolňují z umírajících nebo poškozených buněk a slouží jako včasné varovné signály k aktivaci imunitního systému s cílem podpořit reparaci tkáně (Bianchi, 2007; Rammes *et al.*, 1997). Molekuly DAMP, a tedy i kalprotektin, aktivují receptory lokalizované na imunitních buňkách (Ma *et al.*, 2017). Do imunitní regulace je kalprotektin zapojen také v roli chemotaktického faktoru a spouští chemotaxi neutrofilů (Ryckman *et al.*, 2003).

### 3.2.3 Využití kalprotektinu jako biomarkeru

I přesto, že kalprotektin tvoří nekovalentně spojené molekuly, vyznačuje se značnou stabilitou a odolností vůči bakteriálním proteasám, což je zásadní pro možnost laboratorní diagnostiky. Stabilita tohoto analytu tak umožňuje odběr pacientem v domácích podmínkách a bezproblémové doručení vzorku k analýze do laboratoře (Lukáš *et al.*, 2021; Vogl *et al.*, 1999).

Dříve byly využívány k posouzení střevního zánětu hodnoty C-reaktivního proteinu (CRP, C-reactive protein) a rychlost sedimentace erytrocytů. Ty jsou však zvýšené i v reakci na různé nezápětlivé procesy, a tedy špatně korelují jak se symptomy pacienta, tak i aktivitou jeho střevního onemocnění (Desai *et al.*, 2007).

Kalprotektin se může vyskytovat ve stolici díky schopnosti neutrofilů procházet střevní stěnou (Vatn *et Sandvik*, 2015). Jeho obsah ve stolici je tak přímo úměrný míře průniku neutrofilů do GIT a hodnoty koncentrací fekálního kalprotektinu velmi dobře korelují se stupněm zápětlivého postižení střeva (Galgut *et al.*, 2018; Konikoff *et Denson*, 2006). Díky analýze tohoto biomarkeru můžeme účinně rozlišovat mezi zápětlivým a nezápětlivým onemocněním GIT, a tedy zajišťovat diferenciální diagnostiku mezi IBD a IBS (Lebl *et al.*, 2012). U pacientů s potvrzeným IBD dále pak můžeme provádět monitorování, klinické rozhodování či případnou optimalizaci terapie bez nutnosti invazivního vyšetření. Analytické stanovení fekálního kalprotektinu však nevyklučuje možnost využívat jej v kombinaci s dalšími parametry (klinické endoskopické, histologické či radiologické), což poté umožňuje komplexní zhodnocení pacienta. Tyto výhody činí z kalprotektinu dnes již celosvětově užívaný biomarker pro rutinní laboratorní diagnostiku zápětu *in situ*, ve střevě (Chew *et Mansfield*, 2018; Jukic *et al.*, 2021; Konikoff *et Denson*, 2006; Lukáš *et al.*, 2021).

### **3.2.4 Koncentrace kalprotektinu**

Fyziologické hodnoty fekálního kalprotektinu se pro dospělou populaci mohou lišit v závislosti na regionu, hygienických standardech, stravovacích návycích. Hladiny tohoto biomarkeru ale kolísají i během dne (Lukáš *et al.*, 2021). U zdravého člověka je exprese kalprotektinu velmi omezena na produkci několika málo specializovanými buňkami a bývá indukována až při zápětlivých procesech (Kunz *et al.*, 1992; Lügering *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 1995).

Mírné zvýšení lze zaznamenat při užívání některých léčiv (nesteroidní antiflogistika) či při nutričním deficitu (Lienau *et al.*, 2018; Tibble *et al.*, 1999). Expresi S100A8 pak pozitivně regulují glukokortikoidy (Hsu *et al.*, 2005). Interpretace výsledků laboratorního vyšetření by tedy měla být opatrná, neboť hodnoty analytu mohou být ovlivněny skutečně mnoha faktory (Jukic *et al.*, 2021).

### 3.2.5 Vybraná onemocnění spjatá s patologickými koncentracemi kalprotektinu

Koncentrace kalprotektinu v krevním séru je zvýšená v situacích, při kterých stoupá aktivita neutrofilů (Vatn *et al.*, 2015). S ohledem na tuto skutečnost přirozeně musíme zvýšené hladiny kalprotektinu (ve vzorcích krevního séra, tkání apod.) u pacientů očekávat i z jiných příčin, než jsou pouze onemocnění střev (Jukic *et al.*, 2021).

Na zvýšení kalprotektinu mohou mít vliv například virové infekce (Tibbles *et al.*, 1999), konkrétně při srovnání se zdravými patientskými vzorky dochází k mírnému zvýšení hladiny kalprotektinu (~90 µg/g) při infekci rotaviry či noroviry (Chen *et al.*, 2012).

Naopak během bakteriálních infekcí je často pozorována silně zvýšená koncentrace kalprotektinu ve stolici (Tibbles *et al.*, 1999), konkrétně při infekci *Salmonella* (~765 µg/g) či *Campylobacter* (~690 µg/g) dochází k podstatnému zvýšení koncentrace fekálního kalprotektinu, přičemž tyto hladiny korelují se závažností infekce (Chen *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2013).

Zvýšené koncentrace můžeme dále zaznamenat také u revmatoidní artritidy (Jarlborg *et al.*, 2020), psoriázy (Qian *et al.*, 2018) či paradontózy (Lira-Junior *et al.*, 2017). Z řad maligních onemocnění u karcinomu prsu (Bao *et al.*, 2016), prostaty (Grebhardt *et al.*, 2014), slinivky (Nedjadi *et al.*, 2018), kolorektálního karcinomu (Lehmann *et al.*, 2014) a dalších.

#### 3.2.5.1 Nespecifické střevní záněty

Samostatnou kapitolou jsou IBD, konkrétně Crohnova choroba či ulcerózní kolitida, kdy se koncentrace kalprotektinu zvyšuje velmi výrazně (Vatn *et al.*, 2015). Při vzplanutí nemoci může zjištěná koncentrace ve stolici dosahovat dokonce až 50× vyšších hodnot oproti fyziologické hladině kalprotektinu (Lukáš *et al.*, 2018).

Mezi IBD řadíme ulcerózní kolitidu a Crohnovu chorobu. Jedná se o nespecifická zánětlivá střevní onemocnění chronického charakteru. Důležitým léčebným cílem různých poruch GIT (včetně IBD) je slizniční hojení (MH, mucosal healing) (Frøslie *et al.*, 2007). Příznaky IBD mohou být často atypické a nenápadné. Tato skutečnost vede ke zpoždění diagnózy (zejména Crohnovy choroby) (Ruscio *et al.*, 2017).

## **Crohnova choroba**

Crohnovou chorobou je nejčastěji postiženo terminální *ileum*, onemocnění se však může rozvinout v jakékoli části GIT včetně úst. Dochází k charakteristickému střídání nepostižených segmentů se segmenty zánětlivými, tzv. skip lesions. V těch se tvoří zánětlivá transmurální ložiska, postihuje tedy nejen sliznici, ale všechny vrstvy střevní stěny. Zánět vede ke tvorbě fisur, abscesů a hlubokých vředů, často aftů v dutině ústní. Nemoc se také projevuje horečkami, bolestmi břicha, přítomností krve ve stolici nebo průjmy s úbytkem hmotnosti. Příčina onemocnění stále nebyla objasněna, mezi rizikové faktory se však řadí například vysoký hygienický standard v dětství (Lebl *et al.*, 2012).

## **Ulcerózní kolitida**

Ulcerózní kolitida postihuje pouze *colon*, často ale celé. Projevy se zhoršují v distálním směru, jeho největší rozvoj tak bývá pozorován v *rectu*. Onemocnění se sice týká pouze střevní sliznice, ta je snadno zranitelná a tvoří se na ní eroze a vředy. Zánět je kontinuální, bez segmentů. Pacienti trpí bolestmi břicha a průjmy s obsahem hnisavého hlenu a krve, její ztráty mohou vést k anémii. Léčebná strategie spočívá v úspěšné indukci remise a jejím následném udržení. Dosažení MH se tak stalo důležitým klinickým cílem. Příčina onemocnění stále zůstává z velké části neznámá (Lebl *et al.*, 2012; Nakarai *et al.*, 2013; Takashima *et al.*, 2015).

### **3.2.6 Charakteristiky metod používaných ke stanovení kalprotektinu**

Ke stanovení kalprotektinu je možné využití různých přístupů. V diplomové práci byla ke stanovení tohoto markeru z patientské stolice využívána kvantitativní analýza s využitím třech níže popsaných reagenčních souprav, které se některými svými charakteristikami mírně liší (Tab. 2). Ve všech případech se jedná o *in vitro* diagnostické testovací soupravy pro stanovení kalprotektinu ze vzorku lidské stolice, určené k testování pomocí biochemických analyzátorů (příbalový leták fCAL<sup>®</sup> turbo, Bühlmann, v. A4; příbalový leták Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo, CerTest, v. 0220; příbalový leták Calprest Turbo, Eurospital, ref. 9300).

Výsledky analýz vypovídají o možné přítomnosti střevního zánětu a případných onemocněních s ním spojených. Dané zjištění pak informuje o možné přítomnosti IBD či může sloužit k diferenciaci diagnostice mezi IBD a IBS.

### **3.2.6.1 fCAL<sup>®</sup> turbo**

Principem stanovení kalprotektinu s využitím fCAL<sup>®</sup> turbo reagenční soupravy je turbidimetrická imunoanalýza PETIA, imunočásticemi jsou polystyrenové částice pokryté ptačími protilátkami proti lidskému kalprotektinu.

Návod k interpretaci výsledků měření určuje jako cut-off hodnotu 80 µg/g stolice. Nižší hodnoty kalprotektinu neindikují zánět v GIT a pacienti tak nepotřebují invazivní vyšetření. Koncentrace v rozmezí 80–160 µg/g stolice se označuje jako šedá zóna. Není indikován přímo aktivní zánět, ale jeho přítomnost nelze vyloučit, proto se stanovení doporučuje opakovat za 4–6 týdnů. Koncentrace >160 µg/g stolice svědčí o přítomnosti aktivního zánětu a indikuje další vyšetření k určení diagnózy pacienta (příbalový leták fCAL<sup>®</sup> turbo, Bühlmann, v. A4).

### **3.2.6.2 Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo**

Principem stanovení kalprotektinu s využitím Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo reagenční soupravy je turbidimetrická imunoanalýza, imunočásticemi jsou polystyrenové latexové částice potažené protilátkami proti kalprotektinu.

Návod k interpretaci výsledků měření určuje jako cut-off hodnotu 50 µg/g stolice. Hodnoty kalprotektinu <50 µg/g stolice jsou považovány za fyziologické a nesvědčí o zánětu v GIT. Koncentrace kalprotektinu v rozmezí 50–200 µg/g stolice poukazují na mírný zánět GIT, proto je v daném případě doporučeno sledování a následná kontrola pacienta. Koncentrace >200 µg/g stolice svědčí o závažném zánětu GIT (příbalový leták Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo, CerTest, v. 0220).

### **3.2.6.3 Calprest Turbo**

Principem stanovení kalprotektinu s využitím Calprest Turbo reagenční soupravy je turbidimetrická imunoanalýza PETIA. Imunočásticemi jsou polystyrenové latexové částice potažené protilátkami proti lidskému kalprotektinu.

Návod k interpretaci výsledků měření určuje jako cut-off hodnotu 50 µg/g stolice, jako v předešlém testu. Hodnoty kalprotektinu <50 µg/g stolice jsou považovány za negativní a fyziologické. Koncentrace v rozmezí 50–120 µg/g stolice spadají do šedé zóny a měly by být opakovaně přehodnoceny po 4–6 týdnech. Výsledky testu jsou pozitivní při koncentraci kalprotektinu >120 µg/g stolice a svědčí o zánětu GIT. Pacienti jsou indikováni k dalšímu vyšetření a diagnostice přesné patologie (příbalový leták Calprest Turbo, Eurospital, ref. 9300).

**Tab. 2:** Porovnání základních parametrů reagenčních souprav používaných ke stanovení kalprotektinu.

Reagenční souprava	Senzitivita [%]	Specifická [%]	Hodnota cut-off [µg/g stolice]	Rozsah hodnot [µg/g stolice]	Interpretace výsledků
fCAL® turbo	-	-	80	<80	Bez patologie
				80–160	Šedá zóna
				>160	Zánět GIT
Calprotectin Turbilatex® Combo	94,0	>99,0	50	<50	Bez patologie
				50–200	Mírný zánět GIT
				>200	Závažný zánět GIT
Calprest Turbo	97,1	87,9	50	<50	Bez patologie
				50–120	Šedá zóna
				>120	Zánět GIT

### 3.3 Hemoglobin ve stolici

Hemoglobin se ve stolici může vyskytovat při ztrátě gastrointestinální krve. Taková krev se po úniku do GIT vylučuje se stolicí, přičemž případná detekce fekálního hemoglobinu závisí na míře jeho degradace. Stolice může obsahovat kombinaci neporušeného či téměř intaktního hemoglobinu, tyto složky velmi spolehlivě detekují imunochemické techniky. V případě výskytu takových analytů ve stolici se většinou jedná o krvácení ze spodních částí GIT, neboť krev ještě není v takové míře degradována. Stolice může dále obsahovat hemoglobin již natrávený, konkrétně neporušený hem či porfyriny od hemu odvozené. Konkrétní výskyt zmiňovaných analytů a míru úspěšnosti detekce pak ovlivňuje místo krvácení, jeho intenzita, v neposlední řadě také celková doba průchodu krve skrze GIT (Ransohoff *et* Lang, 1997).

#### 3.3.1 Struktura hemoglobinu

Přesná struktura hemoglobinu byla objasněna na konci 50. let minulého století. Jeho molekula se skládá ze čtyř podjednotek, přičemž každou z nich tvoří proteinová a prostetická část. Bílkovinnou složkou je globin, nejčastěji sestávající ze dvou globinových podjednotek typu  $\alpha$  a dvou typu  $\beta$ . Nebílkovinnou složkou je molekula hemu, připojená ke každé z těchto podjednotek. Co se týče struktury hemu, jedná se o tetrapyrolový kruh obsahující centrální atom železa. Železo je přítomné v redukovaném stavu, jako železnatý kation, což hraje zásadní roli pro vznik jeho vazby s kyslíkem. Stavba molekuly hemoglobinu tedy poskytuje celkem čtyři vazebná místa pro čtyři molekuly kyslíku a díky jejich vazbě může docházet k zásobení tkání právě nepostradatelným kyslíkem. Hemoglobin umožňující transport krevních plynů tak má v lidském organismu nezastupitelnou funkci (Ganz *et* Nemeth, 2012; Perutz *et al.*, 1960).

Globin, který formuje převážnou část heterotetramerické struktury hemoglobinu, je, jak již bylo zmíněno, zastoupen ve dvou formách. Podjednotku typu  $\alpha$  tvoří 142 aminokyselin, jejich molekulová hmotnost dosahuje 15,3 kDa. Sekvence tohoto proteinu je kódována na 16. chromozomu. Podjednotka typu  $\beta$  obsahuje 147 aminokyselin s molekulovou hmotností 16,0 kDa. Její sekvence je kódována na 11. chromozomu (uniprot.org).

#### 3.3.2 Testy na detekci okultního krvácení ve stolici

Testování okultního tedy skrytého krvácení z GIT má v ČR dlouhou tradici. Již od roku 1979 byly prováděny pilotní studie, tehdy s využitím guajakového testu (Frič, 1986).



Detekce okultního krvácení kvalitativními testy s guajakovou pryskyřicí (gFOBT, guaiac fecal occult blood test) byla spjata s dietními omezeními. Přesto, vlivem přítomnosti oxidačně-redukčních látek ve stolici, vedla tato metoda se senzitivitou okolo pouhých cca 30 % k falešně negativním či falešně pozitivním výsledkům (Digby *et al.*, 2013; Pitkäniemi *et al.*, 2015).

FIT jsou testy na okultní krvácení umožňující detekovat hemoglobin pocházející z erytrocytů ve stolici. Principem je imunochemická reakce hemoglobinu s monoklonální protilátkou proti lidskému globinu. Vzhledem k této specifické interakci je možno vyloučit ovlivnění výsledku testu jiným zdrojem hemoglobinu, například ze stravy, a není tedy nutné, aby pacient před testováním podstupoval speciální dietní omezení. Imunochemické testy tak oproti těm guajakovým dosahují mnohokrát vyšší citlivosti (Kato *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2015).

První z variant FIT vyšetření okultního krvácení jsou kvalitativní rapid testy. Na ně byla zaměřena studie, která probíhala po dobu deseti let ve Vojenské fakultní nemocnici v Praze. V rámci tohoto poměrně rozsáhlého výzkumu byla porovnávána kolonoskopická data právě s různými kvalitativními FIT rapid-testy. Uvedená studie je nikdy nedoporučila jako důvěryhodné, neboť jejich výsledky často vykazují falešnou pozitivitu, za což byly vícekrát kritizovány, přesto jsou stále dostupné v mnohých lékárnách (Dvořák *et al.*, 2002).

Druhou variantou FIT jsou testy kvantitativní, umožňující dosahovat přesných koncentrací hemoglobinu obsaženého ve vzorku stolice (Kato *et al.*, 2016). Tyto testy bývají také někdy označovány jako FIT testy třetí generace (Dvořák *et al.*, 2002), přičemž disponují mnoha výhodami. Kvantitativní analýza je totiž automatizovatelná a umožňuje tak s využitím analyzátorů měřit koncentrace FIT v mnoha vzorcích najednou (Takashima *et al.*, 2015). Posuzování výsledku testu navíc nepodléhá subjektivnímu zhodnocení. Naopak, optimalizace spočívající v definování kritéria positivity (cut-off hodnoty) umožňuje případnou indikaci dalšího, invazivního vyšetření (Kocna, 2017). Právě díky možnosti nastavení příslušné mezní hodnoty doporučují použití kvantitativních imunologických testů mnohé evropské směrnice (Duffy *et al.*, 2011). Také dle Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization) je kvantitativní analýza fekálního hemoglobinu optimální metodou (Holland *et al.*, 2006). Ve většině zemí již nahradila testování pomocí gFOBT (Kocna, 2017). Také Česká společnost klinické biochemie doporučila jednotný postup, který by zajistil srovnatelnost výsledků testování: (1) stanovení okultního krvácení ve stolici provádět výhradně

kvantitativními FIT testy, (2) výsledky vyjadřovat v jednotkách  $\mu\text{g/g}$  stolice (Kocna *et Zima*, 2015a; Kocna *et Zima*, 2015b).

### 3.3.3 FIT jako biomarker

U pacientů trpících některými onemocněními GIT jsou nutná hodnocení stavu sliznic a MH. Invazivní hodnocení jsou však pro tyto pacienty zatěžující. Kromě nezbytné přípravy střev, které je nucen pacient podstoupit, a samotného vyšetřovacího postupu, není endoskopie vždy dobře tolerována nebo přijímána, zejména dětskými pacienty nebo pacienty s klinicky neaktivním onemocněním. Navíc existují rizika zhoršení onemocnění po zákroku. Pro dlouhodobé potvrzení MH je nutné podstupovat vyšetření opakovaně, opakovaná endoskopie se následně stává nepraktickou, ale i finančně a časově náročnou (Di Ruscio *et al.*, 2017; Nakarai *et al.*, 2013).

Díky vyšetření okultního krvácení pomocí FIT je ale možno informace o stavu sliznice GIT získávat i neinvazivní cestou. Skrytá krev může být obzvláště přítomna ve výkalech pacientů s onemocněním v klinické remisi, avšak bez zhojení sliznice. Vzhledem ke skutečnosti, že hodnoty tohoto biomarkeru spolu s MH silně korelují, může negativní výsledek FIT účinně predikovat MH a odrážet tak stav sliznice. Tato snadná a rychlá metoda, která se při srovnání s jinými fekálními markery, včetně kalprotektinu, vyjímá velmi nízkými náklady, tak může přispívat ke snižování zátěže pacientů spojené s kolonoskopií a v mnoha situacích může určovat léčebnou strategii bez nutnosti podstupovat vyšetření invazivně (Nakarai *et al.*, 2013; Takashima *et al.*, 2015).

### 3.3.4 Koncentrace FIT

Přítomnost hemoglobinu ve stolici může ovlivňovat více faktorů. Mezi ně patří věk i pohlaví. U mužů bývá koncentrace FIT obecně vyšší, u obou pohlaví se pak zvyšuje spolu s rostoucím věkem (McDonald *et al.*, 2011). Příčinou stanovení zvýšené koncentrace FIT v analyzovaném vzorku může být také jiný zdroj krvácení. Zjištěný hemoglobin může pocházet z menstruační krve, pacientky by v případě tohoto druhu krvácení neměly podstupovat vyšetření daného biomarkeru, neboť jeho výsledky mohou být falešně pozitivní. Podobnou situaci s případným rizikem chybného stanovení diagnózy pacienta mohou zapříčinit také krvácející hemoroidy nebo výskyt krve v moči (Nakarai *et al.*, 2013; Ransohoff *et Lang*, 1997).

### 3.3.5 Vybraná onemocnění spjatá s patologickými koncentracemi FIT

Koncentrace FIT se výrazně zvyšují při IBD (již popsanych v kapitole 3.2.5.1), kdy u pacientů s aktivním onemocněním dosahují výrazných rozdílů oproti pacientům v klinické remisi (Saitoh *et al.*, 1995). K výrazným vzestupům hodnot FIT dochází u pacientů s velkými polypy, závažnou příčinou může být kolorektální karcinom (Quirke *et al.*, 2011). Jeho stadium, závažnost a velikost lézí je spjata právě s tímto biomarkerem (Digby *et al.*, 2013).

#### 3.3.5.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC, colorectal carcinoma) je závažné onemocnění, které je ročně diagnostikováno přibližně u 1,1 milionu nových pacientů. To z něj ve světovém měřítku činí čtvrté nejčastější nádorové onemocnění a pátou nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění (Sung *et al.*, 2021). Přeměna zdravé střevní sliznice na karcinom trvá u tohoto druhu malignity poměrně dlouhou dobu, uvádí se 8–15 let. Incidenci CRC a s ním spojenou mortalitu lze přitom významně snížit systematickými screeningovými programy. Díky včasné detekci a následnému odstranění maligní tkáně je možné téměř stoprocentně snížit riziko dalšího rozvoje CRC. Screening CRC umožňuje s úspěchem zachytit již premaligní stadia tohoto nebezpečného nádorového onemocnění (Kocna, 2017; Quirke *et al.*, 2011).

V České republice byl Národní program screeningu CRC zahájen roku 2000, ve světovém měřítku se tak ČR stala druhou zemí, v níž byl takový program přijat (Frič, 1986). V současné době nabízí pro asymptomatické osoby ve věku 50–54 let každoroční testování okultního krvácení metodou FIT, od 55 let varianty dvě, screeningovou kolonoskopii nebo FIT ve dvouletém intervalu. Při pozitivním výsledku FIT se samozřejmě přistupuje k vyšetření kolonoskopií (Kocna, 2017).

### 3.3.6 Charakteristiky metod používaných ke stanovení hemoglobinu

Jak již bylo uvedeno výše, ke stanovení přítomnosti hemoglobinu ve stolici existují různé přístupy. V diplomové práci byla ke stanovení tohoto markeru z patientské stolice využívána kvantitativní analýza s využitím třech níže popsanych reagenčních souprav, přičemž některé charakteristiky mezi současně používanou a dvěma nově testovanými soupravami jsou značně odlišné (Tab. 3). Ve všech případech se jedná o *in vitro* diagnostické testovací soupravy. Ovšem zde se výjimečně liší také způsob měření vzorku. První z testů určen pouze k měření na přístroji QuikRead go<sup>®</sup>, u ostatních dvou metod se již opět k testování využívá biochemických analyzátorů (příbalový leták

QuikRead go<sup>®</sup> iFOBT, Aidian, v. 152486-5; příbalový leták FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo, CerTest, v. 0220; příbalový leták FOB-Test Turbo, Eurospital, ref. 9297).

Tyto analýzy poskytují možnost detekce okultního krvácení v dolních částech GIT, výsledky měření poukazují na případnou přítomnost hemoglobinu ve stolici. Průkaz hemoglobinu pak informuje o možné přítomnosti onemocnění jako IBD či CRC.

#### **3.3.6.1 QuikRead go<sup>®</sup> iFOBT**

Principem stanovení FIT s využitím QuikRead go<sup>®</sup> iFOBT reagenční soupravy je turbidimetrická imunoanalýza, imunočásticemi jsou mikročástice pokryté prasečím antisérem proti lidskému hemoglobinu (příbalový leták QuikRead go<sup>®</sup> iFOBT, Aidian, v. 152486-5).

U tohoto testu je cut-off hodnotou 10 µg/g stolice, koncentrace hemoglobinu <10 µg/g stolice jsou považovány za fyziologické. Interpretace pro hodnoty v rozmezí 10–200 µg/g stolice není v příbalovém letáku uvedena. Koncentrace hemoglobinu >200 µg/g stolice již signalizuje krvácení do GIT. OKB však stanovilo jako cut-off hodnotu koncentraci 15 µg/g stolice.

#### **3.3.6.2 FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo**

Principem stanovení hemoglobinu s využitím FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo reagenční soupravy je turbidimetrická imunoanalýza, imunočásticemi jsou polystyrenové latexové částice potažené protilátkami proti lidskému hemoglobinu (příbalový leták FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo, CerTest, v. 0220).

Návod k interpretaci výsledků určuje jako cut-off hodnotu 50 ng/ml (5 µg/g). Hodnoty hemoglobinu <50 ng/ml (<5 µg/g) stolice jsou považovány za negativní a fyziologické. Koncentrace v rozmezí 50–200 ng/ml (5–20 µg/g) stolice svědčí o mírném krvácení do GIT, doporučuje se sledování a následná kontrola pacienta. Výsledky testu při koncentraci hemoglobinu >200 ng/ml (>20 µg/g) stolice značí silné krvácení do GIT. OKB však stanovilo jako cut-off hodnotu koncentraci 15 µg/g stolice také pro tuto nově testovanou soupravu.

#### **3.3.6.3 FOB-Test Turbo**

Principem stanovení hemoglobinu s využitím FOB-Test Turbo reagenční soupravy je turbidimetrická imunoanalýza PETIA, imunočásticemi jsou polystyrenové latexové částice potažené protilátkami proti lidskému hemoglobinu (příbalový leták FOB-Test Turbo, Eurospital, ref. 9297).

Návod k interpretaci výsledků určuje jako cut-off hodnotu 50 ng/ml (5 µg/g). Hodnoty hemoglobinu <50 ng/ml (<5 µg/g) stolice jsou považovány za fyziologické. Koncentrace v rozmezí 50–200 ng/ml (5–20 µg/g) stolice svědčí o mírném krvácení do GIT, doporučuje se sledování pacienta. Výsledky testu při koncentraci hemoglobinu >200 ng/ml (>20 µg/g) stolice signalizují gastrointestinální krvácení a vyžadují další diagnostická vyšetření. I v tomto případě zvolilo OKB jako cut-off hodnotu koncentraci 15 µg/g stolice.

**Tab. 3:** Porovnání základních parametrů reagenčních souprav používaných ke stanovení FIT. Pro hodnoty označené \* byla stanovena cut-off hodnota odlišná oproti příbalovému letáku.

Reagenční souprava	Senzitivita [%]	Specificita [%]	Hodnota cut-off [µg/g stolice]	Rozsah hodnot [µg/g stolice]	Interpretace výsledků
QuikRead go <sup>®</sup> iFOBT	97,6	91,5	15	<10	Bez patologie
				10–200	Nespecifikováno
				>200	Krvácení do GIT
FOB Turbilatex <sup>®</sup> Combo	96,0	>99,0	15*	<5	Bez patologie
				5–20	Mírné krvácení do GIT
				>20	Silné krvácení do GIT
FOB-Test Turbo	100,0	97,5	15*	<5	Bez patologie
				5–20	Mírné krvácení do GIT
				>20	Krvácení do GIT

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 MATERIÁL**

#### **4.1.1 Biologický materiál**

- Vzorky externího hodnocení kvality (EHK), cyklus FD1/23 (Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB), Německo)
  - RfB A – lyofilizovaná stolice
  - RfB B – lyofilizovaná stolice
- Vzorky patientské stolice

#### **4.1.2 Komerční soupravy**

##### **Odběrové zkumavky**

- Calex<sup>®</sup> Cap, LOT 40216 (Bühlmann, Švýcarsko)
- EasyCal FOB, LOT 220411 (Eurospital, Itálie)
- EasyCal Turbo, LOT 13858 (Eurospital, Itálie)
- QuikRead<sup>®</sup> iFOB Sampling Set, LOT 1910469 (Aidian, Finsko)
- Universal Turbilatex Sample Collection Vial, LOT 120822U (CerTest, Biotec, Španělsko)

##### **Reagenční soupravy**

- Calprest Turbo, LOT 13850 (Eurospital, Itálie)
  - Calprest Turbo Reagent 1
  - Calprest Turbo Reagent 2
  - Calprest Turbo Calibrator 0–5
  - Calprest Turbo Control 1, 2
- Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo, LOT 100EDCP102 (CerTest, Biotec, Španělsko)
  - Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Reagent 1
  - Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Reagent 2
  - Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Calibrator 0–5
  - Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Control 1, 2
- Elaprest Turbo, LOT 13846 (Eurospital, Itálie)
  - Elaprest Turbo Reagent 1
  - Elaprest Turbo Reagent 2

- Elaprest Turbo Calibrator 0–5
- Elaprest Turbo Control 1, 2
- FOB-Test Turbo, LOT 13516 (Eurospital, Itálie)
  - FOB-Test Turbo Reagent 1
  - FOB-Test Turbo Reagent 2
  - FOB-Test Turbo Calibrator 0–5
  - FOB-Test Turbo Control 1,2
- FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo, LOT 100EDFB081 (CerTest, Biotec, Španělsko)
  - FOB Turbilatex<sup>®</sup> Reagent 1
  - FOB Turbilatex<sup>®</sup> Reagent 2
  - FOB Turbilatex<sup>®</sup> Calibrator 0–5
  - FOB Turbilatex<sup>®</sup> Control 1, 2
- fCAL<sup>®</sup> turbo, LOT 3326 (Bühlmann, Švýcarsko)
  - fCAL<sup>®</sup> turbo Reagent 1
  - fCAL<sup>®</sup> turbo Reagent 2
  - fCAL<sup>®</sup> turbo Calibrator 1–6
  - fCAL<sup>®</sup> turbo Control 1, 2
- fPELA<sup>®</sup> turbo, LOT 0412 (Bühlmann, Švýcarsko)
  - fPELA<sup>®</sup> turbo Reagent 1
  - fPELA<sup>®</sup> turbo Reagent 2
  - fPELA<sup>®</sup> turbo Calibrator 1–6
  - fPELA<sup>®</sup> turbo Control 1, 2
- Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Combo, LOT 100EDEL037 (CerTest, Biotec, Španělsko)
  - Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Reagent 1
  - Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Reagent 2
  - Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Calibrator 0–5
  - Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Control 1, 2
- QuikRead go<sup>®</sup> iFOBT, LOT 1910469 (Aidian, Finsko)
  - Víčka s reagensy FOB
  - Pufr v předplněných kyvetách

### **4.1.3 Přístrojové vybavení**

- Analyzátor Atellica CH930 (Siemens, Německo)
- Centrifuga Multifuge X1R (ThermoFisher Scientific, USA)
- Fotometr automatický QuikRead go<sup>®</sup> (Orion Diagnostica, Finsko)
- Chladnička Danfus (Liebherr, Německo)
- Chladnička (Equitec, Španělsko)
- Laminární box Clean Air (Schoeller Instruments, Česká republika)
- Mraznička (Arctiko, Dánsko)
- Vortex V1 plus (BioSan, Lotyšsko)
- Vortex SA8 (Stuart, Velká Británie)

### **4.1.4 Laboratorní pomůcky**

- Reagenční nádobky Empty 1, LOT 120230 (Siemens, Německo)
- Reagenční nádobky Empty 2, LOT 123469 (Siemens, Německo)
- Sada automatických pipet Research plus (Eppendorf, Německo)
- Špičky
- Zkumavky
- Zkumavky se špachtlí pro odběr stolice, LOT 22C1719 (FL Medical, Itálie)

### **4.1.5 Software**

- Atellica Solution v. 1.25.4.4480001 SP3, ovládací software
- Microsoft Excel
- OpenLims v. 6.00.79.00, laboratorní systém
- Statistics Kingdom, statistický online webový nástroj ([statskingdom.com](http://statskingdom.com))



## 4.2 METODY

### 4.2.1 Distribuce patientských zkumavek

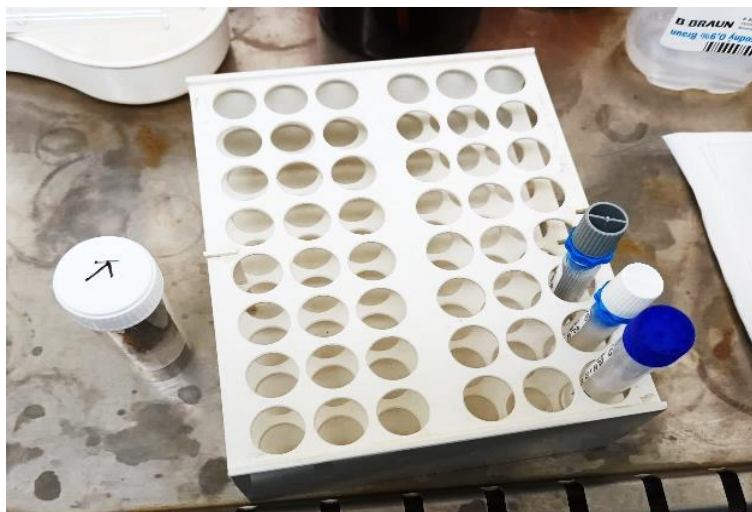
Z databáze analýz provedených na OKB byly získány konkrétní počty cílových markerů. Jejich statistickým zpracováním v software Microsoft Excel bylo zjištěno, odkud vzorky nejčastěji pochází – jednalo se o Dětskou kliniku, 2. Interní a 3. Interní kliniku FNOL (Tab. 4). Na tyto kliniky bylo distribuováno celkem 60 zkumavek pro odběr primárních vzorků stolice, 20 označených písmenem „E“, 20 „K“ a 20 „F“. Budoucí vzorky stolice tak byly určeny pro následnou analýzu elastasy (zkumavky „E“), kalprotektinu („K“) či FIT („F“).

**Tab. 4:** Zjednodušená kontingenční tabulka obsahující data o počtu vzorků odeslaných na OKB v období od 1. 5. 2022 do 31. 10. 2022 k analýze výše zmiňovaných markerů. Celá tabulka je k dispozici v Příloze A.

Pracoviště	Počet analýz elastasy	Počet analýz kalprotektinu	Počet analýz FIT
<b>FNOL</b>	<b>185</b>	<b>1292</b>	<b>296</b>
1. Chirurgická klinika		2	
2. Chirurgická klinika		1	
2. Interní klinika	137	751	14
3. Interní klinika	1	16	187
Dětská klinika	41	510	21
Geriatric	3	4	7
Hemato-onkologická klinika			36
Klinika plicních nemocí a tuberkulózy	3	3	19
Klinika psychiatrie		1	
Klinika urologie			1
Kožní klinika		3	5
Neurologická klinika			4
Oddělení klinické biochemie		1	2
<b>Externí</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Nemocnice AGEL Přerov	1		
Nemocnice AGEL Šternberk	6		
Gastroenterologická ordinace	1	1	
Praktický lékař			3
SPEA, s.r.o.	1		
Tormová Eleonóra MUDr., s.r.o.			1
Vojenská nemocnice	2	2	
<b>Celkový součet</b>	<b>196</b>	<b>1295</b>	<b>300</b>

#### 4.2.2 Odběr primárních patientských vzorků

Primární vzorky stolice byly postupně zasílány zpět na OKB, kde byly vždy v co nejkratším časovém intervalu prováděny odběry. Běžnou praxí je, že vzorky stolice pacienti zasílají k analýze přímo v odběrových zkumavkách, tedy po již provedeném odběru z primárního vzorku. Aby však byl minimalizován vliv preanalytických chyb spojených s vlastními odběry, probíhaly všechny až na OKB (Obr. 1).



**Obr. 1:** Primární vzorek stolice (vlevo) spolu s odběrovými zkumavkami (vpravo) umístěné v laminárním boxu před odběrem stolice pro analýzu kalprotektinu. Foto: Pavla Mošnerová.

Odběrové zkumavky i samotné patientské zkumavky s primárním vzorkem byly řádně označeny štítkem s identifikačními údaji příslušného pacienta. Z vyšetřovaného vzorku stolice byl odběr prováděn vždy do třech zkumavek různých výrobců, prvního druhu již rutinně používaného a dvou nově testovaných (Obr. 2). V laminárním boxu byla otevřena odběrová zkumavka i zkumavka se vzorkem stolice. Následně byla tyčinka obsažená v odběrové zkumavce vložena do několika míst odebíraného materiálu tak, aby byly naplněny všechny její drážky. Přebytná stolice poté byla otřena o stěnu patientské zkumavky, odběrová tyčinka vložena zpět do pufu v odběrové zkumavce a ta uzavřena.

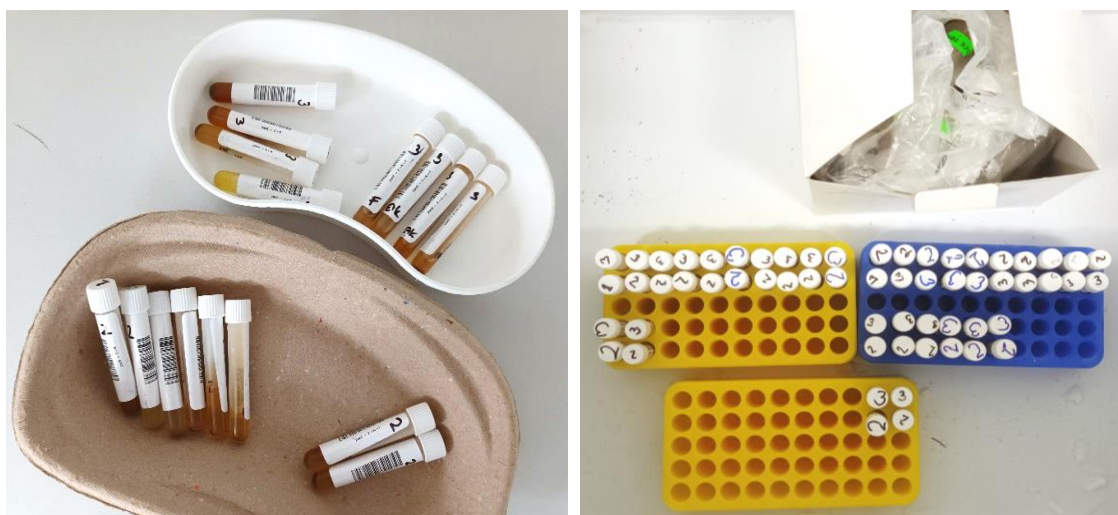
Zkumavky s odebranými vzorky byly následně po dobu 1 min promíchávány vortexem. V případě, že i poté zůstala stolice přítomna v drážkách, bylo promíchávání vortexem opakováno, opět 1 min.

V následujícím kroku byly vzorky rozděleny na 2 skupiny. Současně užívané odběrové zkumavky s patientskými vzorky byly umístěny do chladničky k pozdějšímu měření koncentrace personálem OKB, zatímco nově testované zkumavky byly podrobeny dalšímu zpracování.

Z nově testovaných odběrových zkumavek došlo k vyjmutí odběrové tyčinky (i s případnými zbytky stolice v ní) a zkumavky s pufrem, nyní již obsahujícím uvolněnou stolicí, byly uzavřeny víčky. Nakonec proběhla centrifugace (10 min, 3600 rpm). Všechny takto připravené zkumavky nově testovaných souprav včetně primárních patientských vzorků ve zkumavkách byly vkládány do mrazničky a mrazeny na teplotu  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Takto byly uskladněny pro pozdější měření (či pro případnou potřebu opakovaného odběru stolice) (Obr. 3).



**Obr. 2:** Stávající i nově testované odběrové zkumavky, zespod: QuikRead® iFOB Sampling Vial (stávající), Calex® Cap (stávající), Universal Turbilatex Sample Collection Vial (nově testovaná), EasyCal Turbo (nově testovaná), EasyCal FOB (nově testovaná). Foto: Pavla Mošnerová.



**Obr. 3:** Ošitkové zkumavky opatřené víčky a připravené k uskladnění v mrazničce (vlevo). Uskladnění odebraných i primárních vzorků stolice v mrazničce (vpravo). Foto: Pavla Mošnerová.

### 4.2.3 Kalibrace analyzátoru a následné měření

Před měřením koncentrací příslušných analytů pomocí analyzátoru bylo třeba provést kalibraci, a to právě z důvodu využití nově testovaných, tedy dosud nevyužitých odběrových zkumavek. V závislosti na využitých odběrových zkumavkách byly ke kalibraci využity příslušné reagenční soupravy (Tab. 5).

**Tab. 5:** Přehled stanovovaných biomarkerů spolu s příslušnými soupravami jednotlivých výrobců. Reagenční soupravy a odběrové zkumavky označené \* byly nově testované, reagenční soupravy a odběrové zkumavky takto neoznačené jsou na OKB původně používané.

Biomarker	Výrobce zkumavek a souprav	Odběrová zkumavka	Reagenční souprava	Měřicí přístroj
Elastasa	Bühlmann	Calex® Cap	fPELA® turbo	Analyzátor Atellica CH930
Kalprotektin			fCAL® turbo	
FIT	Aidian	QuikRead® iFOB Sampling Set	QuikRead go® iFOBT	Fotometr QuikRead go®
Elastasa	CerTest	Universal Turbilatex Sample Collection Vial *	Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo *	Analyzátor Atellica CH930
Kalprotektin			Calprotectin Turbilatex® Combo *	
FIT			FOB Turbilatex® Combo *	
Elastasa	Eurospital	EasyCal Turbo *	Elaprest Turbo *	Analyzátor Atellica CH930
Kalprotektin			Calprest Turbo *	
FIT			EasyCal FOB *      FOB-Test Turbo *	

Reagenční souprava vždy obsahovala reagenční roztok R1 a R2, reagenzie R1 byla pipetována do pravé poloviny („Well 1“) reagenční nádoby Empty 1 a reagenzie R2 do pravé poloviny („Well 2“) reagenční nádoby Empty 2. Následně byly obě Empty nádoby umístěny do analyzátoru. Pro všechny reagenční soupravy byl tento postup stejný, lišily se však pipetované objemy.

Pro soupravu Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo bylo do příslušných nádobek pipetováno 15,8 ml reagenzie R1 a 4,0 ml reagenzie R2, pro soupravu Calprotectin Turbilatex® Combo 17,0 ml reagenzie R1 a 4,0 ml reagenzie R2, pro soupravu FOB Turbilatex® Combo 17,0 ml reagenčního roztoku R1 a 6,9 ml reagenčního roztoku R2 (Obr. 4).

Pro soupravu Elaprest Turbo bylo pipetováno 13,4 ml reagenzie R1 a 4,1 ml reagenzie R2, pro soupravu Calprest Turbo 23,5 ml reagenzie R1 a 6,2 ml reagenzie R2, pro soupravu FOB-Test Turbo pak 20,0 ml reagenčního roztoku R1 a 7,9 ml reagenčního roztoku R2 (Obr. 5).



**Obr. 4:** Nově testované reagenční soupravy od výrobce CerTest, Biotec, zleva: FOB Turbilatex® Combo, Calprotectin Turbilatex® Combo, Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo. Foto: Pavla Mošnerová.



**Obr. 5:** Nově testované reagenční soupravy od výrobce Eurospital, zleva: FOB-Test Turbo, Calprest Turbo, Elaprest Turbo. Foto: Pavla Mošnerová.



Každá reagenční souprava dále obsahovala sadu 6 kalibrátorů (Obr. 6). Z každé z těchto vial bylo pipetováno 200  $\mu$ l. Pro malé objemy vzorku byly využity nástavce na zkumavky zajišťující minimální mrtvý objem (tzv. capy). Zkumavky byly vždy označeny příslušným štítkem a vkládány do přístroje, který naměřenou koncentraci analytů využil k sestavení šestibodové kalibrační křivky. V tomto případě byl postup včetně pipetovaných objemů pro všechny reagenční soupravy stejný.

Spolu s kalibrátory byly k měření koncentrace do přístroje vkládány také dvě zkumavky pro kontrolní vzorky (Obr. 6), přičemž do první bylo pipetováno 200  $\mu$ l kontrolního vzorku 1 (Control 1), do druhé 200  $\mu$ l kontrolního vzorku 2 (Control 2). Obě kontroly byly také součástí dané reagenční soupravy. I v tomto případě byly postup i pipetované objemy pro všechny reagenční soupravy totožné.



**Obr. 6:** Nově testované reagenční sady FOB Turbilatex® Combo (vpravo nahoře) a FOB-Test Turbo (vlevo nahoře) spolu s oštitkovánými zkumavkami připravenými k pipetování příslušných kalibrátorů a kontrolních vzorků. Dále pak reagenční nádobky Empty 1 a 2 (vlevo dole) připravené k pipetování reagií R1 a R2. Foto: Pavla Mošnerová.

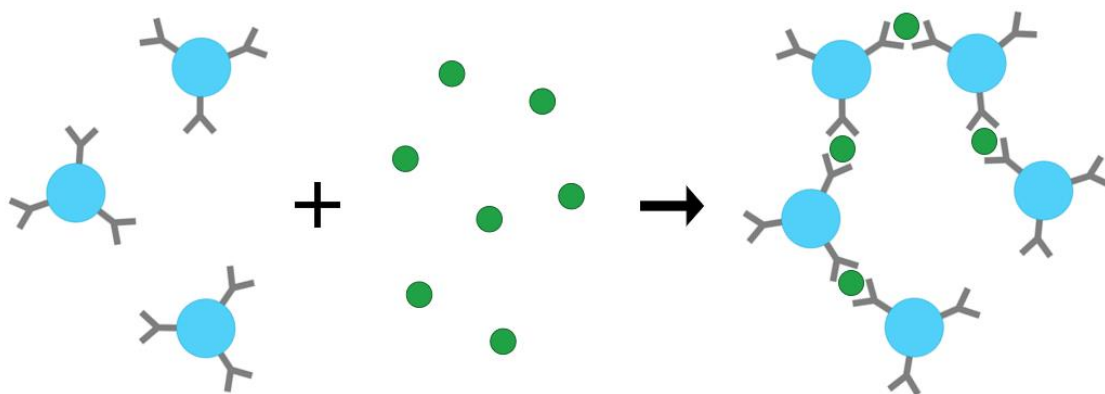
#### 4.2.4 Měření vzorků v analyzátoru

Pacientské vzorky postupně získané jejich odběrem a shromažďováním v mrazničce z ní byly vyjmuty a rozmrazeny při pokojové teplotě. Pro zajištění homogenizace jejich obsahu bylo provedeno opětovné promíchání pomocí vortexu po dobu 1 min a centrifugace (10 min, 3600 rpm). Zkumavkám byla odňata víčka a byly vkládány do přístroje k měření.

Konkrétní postup pipetování daných vzorků se lišil v závislosti na druhu odběrové zkumavky, a tedy závisel na příslušné reagenční soupravě a její charakteristice. Do reakčních zkumavek umístěných v měřicím úseku analyzátoru byly poté pomocí pipetovacího ramene přístroje dávkovány příslušné objemy po definovaných časových úsecích, které byly, narozdíl od objemů, pro všechny soupravy shodné (Tab. 6). Nejprve byla v 0. sekundě pipetována reagencie R1, ve 12. sekundě byl pipetován vzorek (V), ve 273. sekundě, reagencie R2. Tímto postupem byly zajištěny optimální podmínky pro případnou aglutinační reakci mezi antigenem a protilátkou s následným měřením vzniklého zákalu (Obr. 7).

**Tab. 6:** Přehled parametrů pipetování jednotlivých reagenčních souprav a příslušných vzorků. (R1, R2 – reagencie R1, reagencie R2; V – vzorek)

Reagenční souprava	Pipetování přístroje					
	Objemy [μl]			Časy [s]		
	R1	V	R2	R1	V	R2
fPELA® turbo	100	2	17	0	12	273
fCAL® turbo	65	12	13			
Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo	100	5	9			
Calprotectin Turbilatex® Combo	100	3	8	0	12	273
FOB Turbilatex® Combo	100	10	28			
Elaprest Turbo	100	3	14			
Calprest Turbo	100	3	13	0	12	273
FOB-Test Turbo	100	8	28			



**Obr. 7:** Znázornění principu imunoturbidimetrické reakce využívané ke stanovení koncentrace biomarkerů. V reagenzii R2 jsou přítomny imunočástice (modře) potažené protilátkami (šedě). V závislosti na množství antigenu (zeleně), v tomto případě elastasy, kalprotektinu či FIT, obsaženého v roztoku, dochází k aglutinační reakci (vpravo). Vzniká zákal, jehož intenzita odpovídá množství antigenu. To umožňuje stanovení přesné koncentrace antigenu.

Konkrétní postup měření koncentrace daného vzorku se opět lišil v závislosti na druhu odběrové zkumavky a závisel na charakteristikách příslušné reagenční soupravy. Měření probíhalo v časech 1 a 2, metodami end-point analýzy (EPA) či two-point analýzy (2PA) s využitím požadované vlnové délky (Tab. 7). Výsledné koncentrace stanovovaných biomarkerů byly poté vyhodnoceny přístrojem, data podrobena statistickému zpracování a interpretaci. V závěru proběhla verifikace nových metod.

**Tab. 7:** Přehled parametrů měření jednotlivých stanovovaných koncentrací.

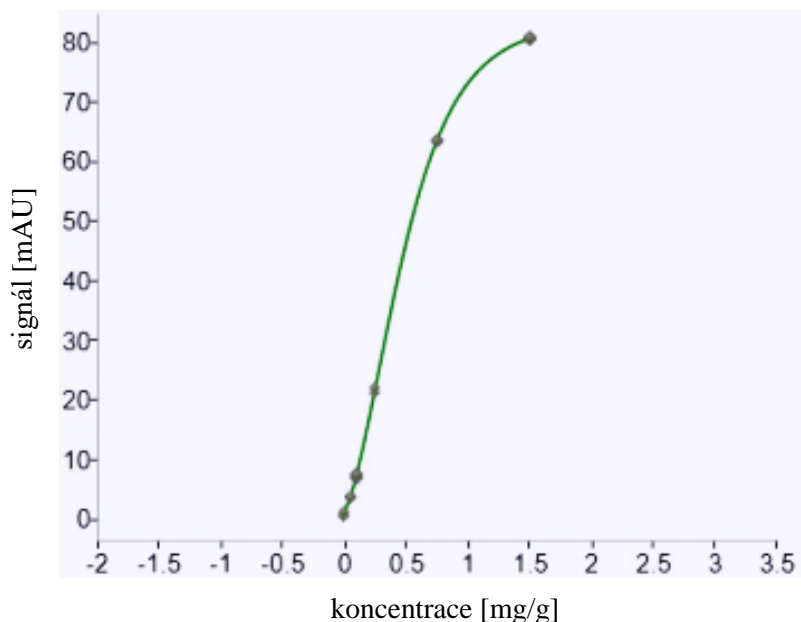
Reagenční souprava	Časy měření [s]		Vlnová délka měření [nm]	Metoda měření
	1.	2.		
fPELA® turbo	286	579	545	EPA
fCAL® turbo	286	427	545	2PA
Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo	312	552	451	EPA
Calprotectin Turbilatex® Combo	312	552	451	
FOB Turbilatex® Combo	312	552	505	
Elaprest Turbo	286	552	451	EPA
Calprest Turbo	312	552	451	
FOB-Test Turbo	286	552	505	



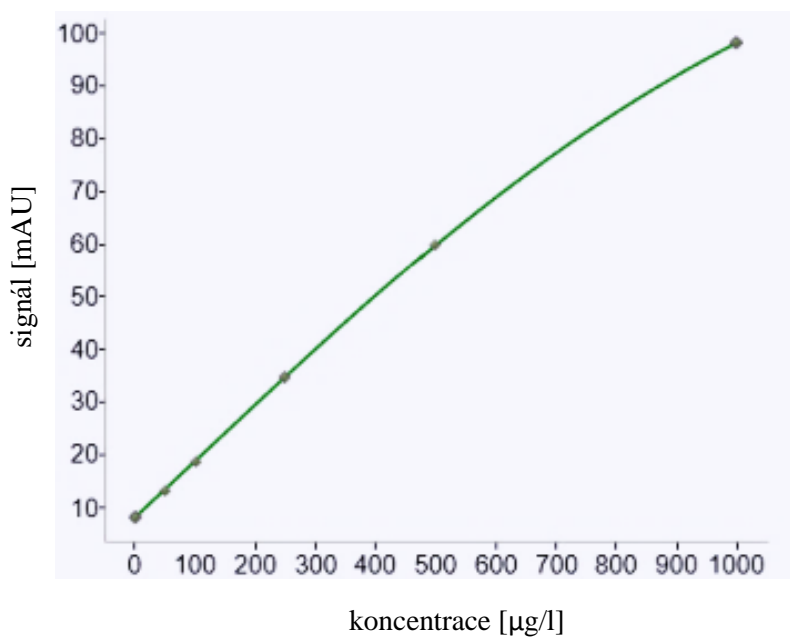
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Kalibrace před měřením

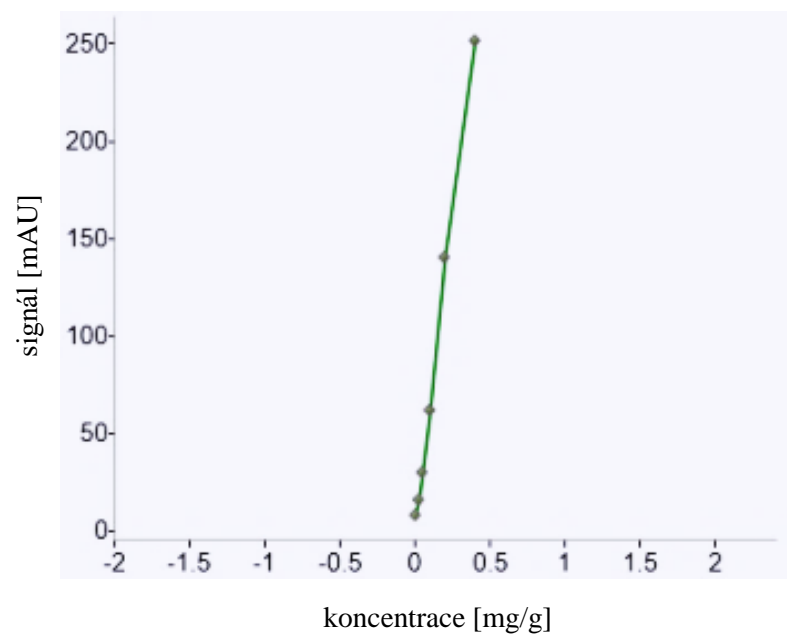
Před měřením patientských vzorků bylo třeba provést kalibraci příslušných souprav. Uvedené kalibrační křivky byly získány pomocí software Atellica Solution (Grafy 1–3).



**Graf 1:** Šestibodová kalibrační křivka udávající závislost mezi naměřenými koncentracemi kalibrátorů fCAL® turbo Calibrator 1–6 a příslušnou odezvou (signálem) měřicího přístroje.



**Graf 2:** Šestibodová kalibrační křivka udávající závislost mezi naměřenými koncentracemi kalibrátorů FOB Turbilatex® Calibrator 0–5 a příslušnou odezvou (signálem) měřicího přístroje.



**Graf 3:** Šestibodová kalibrační křivka udávající závislost mezi naměřenými koncentracemi kalibrátorů Elaprest Turbo Calibrator 0–5 a příslušnou odezvou (signálem) měřicího přístroje.

## 5.2 Porovnání patientských vzorků elastasy

Koncentrace elastasy byla stanovována z 18 primárních patientských vzorků stolice, z nichž bylo odebráno celkem 54 zkumavek k měření (Tab. 8). Z důvodu nedostatku testovacích reagentů již bohužel nemohly být stanoveny koncentrace vzorků č. 17 a 18 u souprav Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo a koncentrace tedy byla stanovena pouze u 52 měření. Jeden ze všech měřených patientských vzorků vycházel ve všech testovaných soupravách jako pozitivní (vzorek č. 2), pozitivní výsledek vykazoval také vzorek č. 6, ale pouze u soupravy fPELA® turbo. Ostatní vzorky byly negativní.

**Tab. 8:** Výsledky všech měření patientských vzorků pro elastasu s využitím současně užívané soupravy fPELA® turbo i dvou nově testovaných souprav Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo a Elaprest Turbo. Pozitivní vzorky jsou značeny červeně.

Číslo vzorku	Výsledky měření [µg/g]		
	fPELA® turbo	Pancreatic Elastase Turbilatex® Combo	Elaprest Turbo
1	>500	377	>500
2	142	105	93
3	>500	>400	>500
4	>500	266	483
5	>500	>400	>500
6	92	>400	341
7	>500	>400	>500
8	439	>400	>500
9	>500	346	>500
10	>500	>400	>500
11	>500	>400	>500
12	>500	>400	>500
13	>500	>400	>500
14	>500	210	>500
15	>500	>400	>500
16	>500	244	>500
17	485	-	480
18	>500	-	>500

### 5.3 Porovnání patientských vzorků kalprotektinu

Koncentrace kalprotektinu byla stanovována z 23 primárních patientských vzorků stolice, z nichž bylo odebráno celkem 69 zkumavek k měření (Tab. 9). Z měřených patientských vzorků vycházelo 13 vzorků jako pozitivních ve všech testovaných soupravách (vzorky č. 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 16, 17, 21, 23). Ve dvou testovaných soupravách vykazovaly pozitivní výsledek jeden vzorek (č. 11), v jedné testované soupravě poté vzorků pět (č. 3, 7, 10, 12, 20). Ostatní vzorky byly negativní.

**Tab. 9:** Výsledky všech měření patientských vzorků pro kalprotektin s využitím současně užívané soupravy fCAL<sup>®</sup> turbo i dvou nově testovaných souprav Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo a Calprest Turbo. Pozitivní vzorky jsou značeny červeně.

Číslo vzorku	Výsledky měření [μg/g]		
	fCAL <sup>®</sup> turbo	Calprotectin Turbilatex <sup>®</sup> Combo	Calprest Turbo
1	131	228	179
2	127	156	69
3	166	20	0
4	139	54	62
5	460	435	291
6	81	128	50
7	45	79	0
8	206	112	77
9	462	426	160
10	100	48	25
11	55	70	69
12	56	65	43
13	137	124	85
14	216	310	175
15	44	26	0
16	4507	>1500	1065
17	3641	>1500	>1500
18	<20	<10	0
19	<20	33	11
20	<20	69	14
21	2165	>1500	1265
22	<20	49	23
23	876	>1500	476

Pro výsledné koncentrace vzorků z každé testované soupravy byla zjišťována normalita těchto dat pomocí Shapiro-Wilkova testu. Využit k tomu byl online webový nástroj Statistics Kingdom (statskingdom.com). Pro všechny soupravy, tedy fCAL<sup>®</sup> turbo, Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo i Calprest Turbo byla výsledná data klasifikována jako data s nenormálním rozložením.

Dále byl proveden F-test o rovnosti dvou rozptylů, který porovnával vždy stávající a nově testovanou soupravu (Tab. 10). Test byl proveden pomocí software Microsoft Excel. Při porovnání souprav fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo byla hodnota P rovna 0,46. To značilo pravděpodobnost 46 %, že hodnota  $F \leq F_{krit}$ , avšak hodnota  $0,94 > 0,40$  a tedy  $F > F_{krit}$ . Při porovnání fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprest Turbo byla hodnota  $P < 0,01$ . To značilo pravděpodobnost 1 %, že hodnota  $F \leq F_{krit}$ , i v tomto případě hodnota  $9,34 > 2,27$  a tedy  $F > F_{krit}$ . V obou případech je tedy  $F > F_{krit}$ , zamítáme tedy nulovou hypotézu o rovnosti rozptylů.

**Tab. 10:** Dvouvýběrový F-test pro rozptyl provedený ze souborů získaných dat, tedy z koncentrací testovaných souprav, a výsledné stanovené charakteristiky porovnání těchto souprav.

Porovnání	Střední hodnota	Rozptyl	Pozorování	Rozdíl	F	P ( $F \leq F_{krit}$ ) (1)	F krit (1)
fCAL <sup>®</sup> turbo vs. Calprotectin Turbilatex <sup>®</sup> Combo	161,67	17693	15	14	0,94	0,46	0,40
fCAL <sup>®</sup> turbo vs. Calprest Turbo	554,06	1228341	18	17	9,34	<0,01	2,27

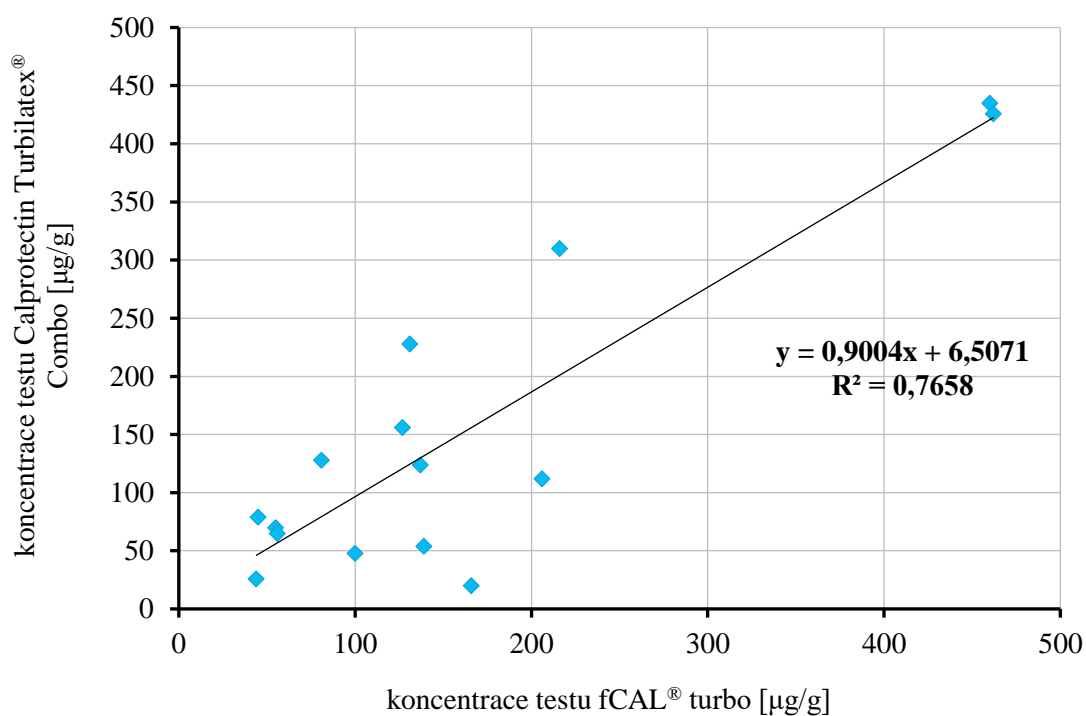
Data byla dále podrobena párovému neparametrickému Wilcoxonovu testu, s využitím online nástroje Statistics Kingdom (statskingdom.com). Při vzájemném porovnání souprav fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo byl zjištěn nevýznamný rozdíl s hodnotou  $P = 0,69$ , naopak porovnání souprav fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprest Turbo prokázalo vysoce významný rozdíl mezi těmito soupravami ( $P < 0,01$ ) (Tab. 11).

**Tab. 11:** Výsledky párového neparametrického Wilcoxonova testu.

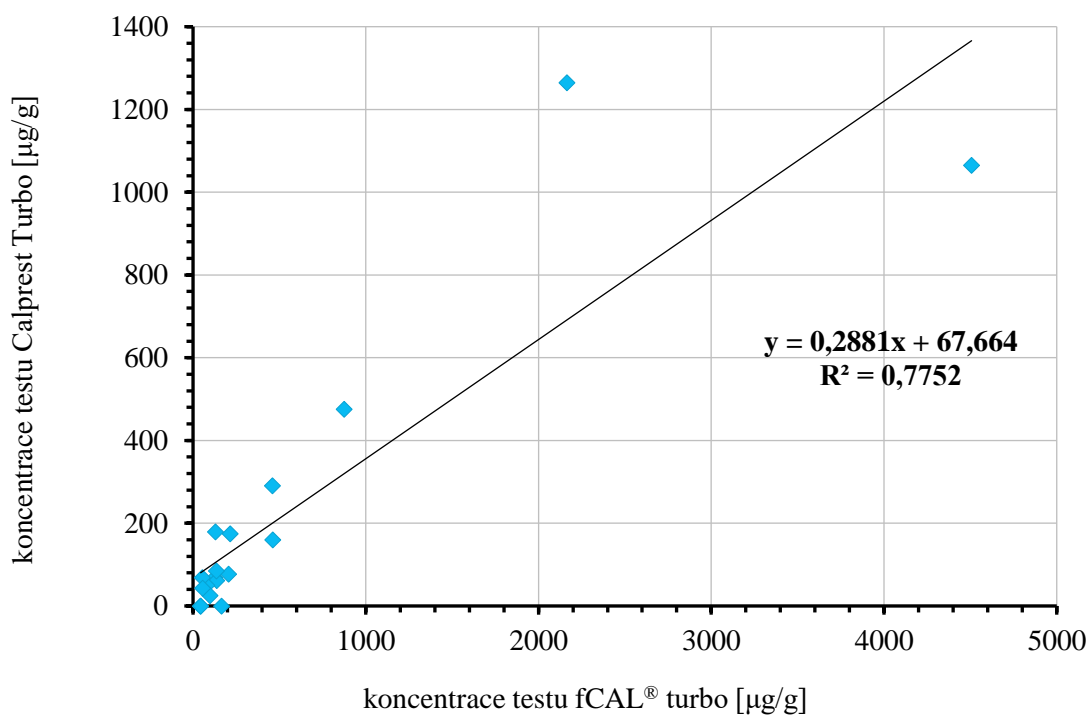
<b>Porovnání</b>	<b>Medián</b>	<b>Pozorování</b>	<b>P</b>
fCAL <sup>®</sup> turbo vs. Calprotectin Turbilatex <sup>®</sup> Combo	131 112	15 15	0,69
fCAL <sup>®</sup> turbo vs. Calprest Turbo	138 73	18 18	<0,01

Zjištěné koncentrace testovaného kalprotektinu byly porovnány také graficky pomocí lineární regresní analýzy vůči naměřeným hodnotám stávajícího testu fCAL<sup>®</sup> (Graf 4, 5). Zjištěné hodnoty spolehlivosti  $R^2$  byly 0,7658 (referenční souprava vs. Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo), respektive 0,7752 (referenční souprava vs. Calprest Turbo). Porovnání směrnice přímky „ $y = ax + b$ “ těchto grafů však již signalizovalo, že užší vztah je mezi stávajícím testem fCAL<sup>®</sup> turbo oproti soupravě Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo, neboť hodnota „ $a$ “ rovna 0,9004 byla výrazně vyšší než hodnota „ $a$ “ (0,2881) charakterizující vztah mezi zbylými dvěma porovnávanými soupravami (Graf 4, 5).

Zmíněné testy byly porovnány také s využitím Bland-Altmanova grafu, který znázorňuje závislost průměrných koncentrací zvolených testů na rozdílu koncentrací těchto testů. Také v tomto případě je patrný užší vztah mezi stávajícím testem fCAL<sup>®</sup> turbo oproti soupravě Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo (Graf 6). Při vzájemném porovnání Bland-Altmanových grafů lze také pozorovat, že na Grafu 6 jsou jednotlivé body rovnoměrně rozloženy okolo nulové hodnoty na ose x, zatímco na Grafu 7 se naprostá většina jednotlivých bodů nachází nad osou x. Z toho lze vyvodit, že zatímco soupravy fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo měří srovnatelně, test fCAL<sup>®</sup> turbo nadhodnocuje oproti testu Calprest Turbo.

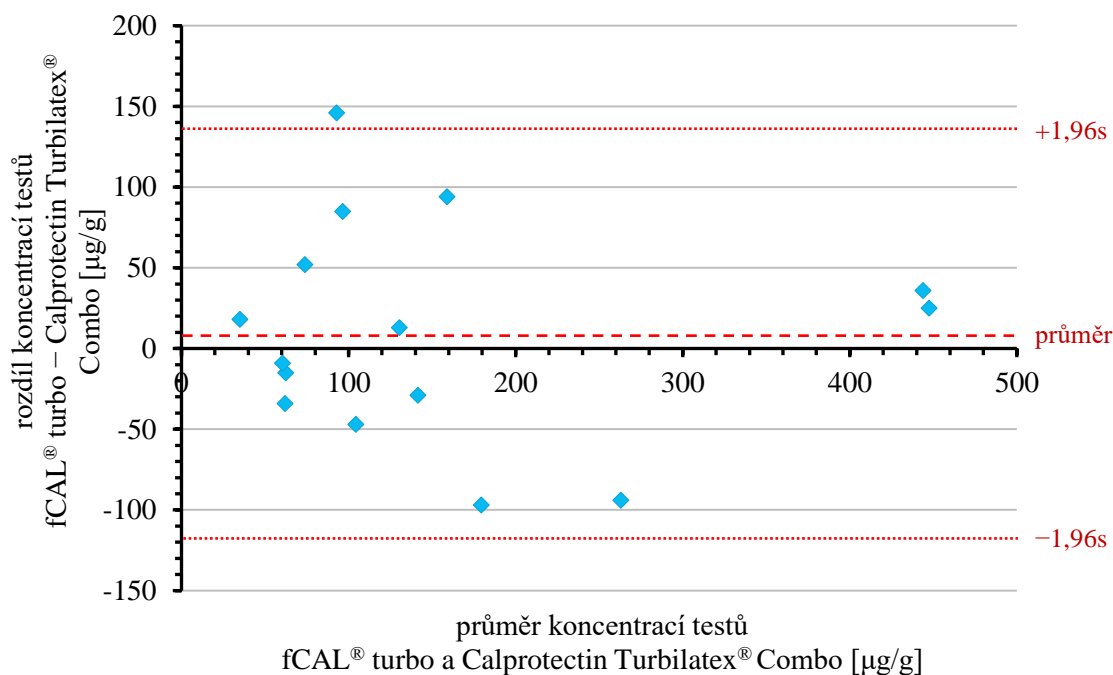


**Graf 4:** Graf zobrazující závislost koncentrace testu fCAL® turbo a koncentrace testu Calprotectin Turbilatex® Combo.

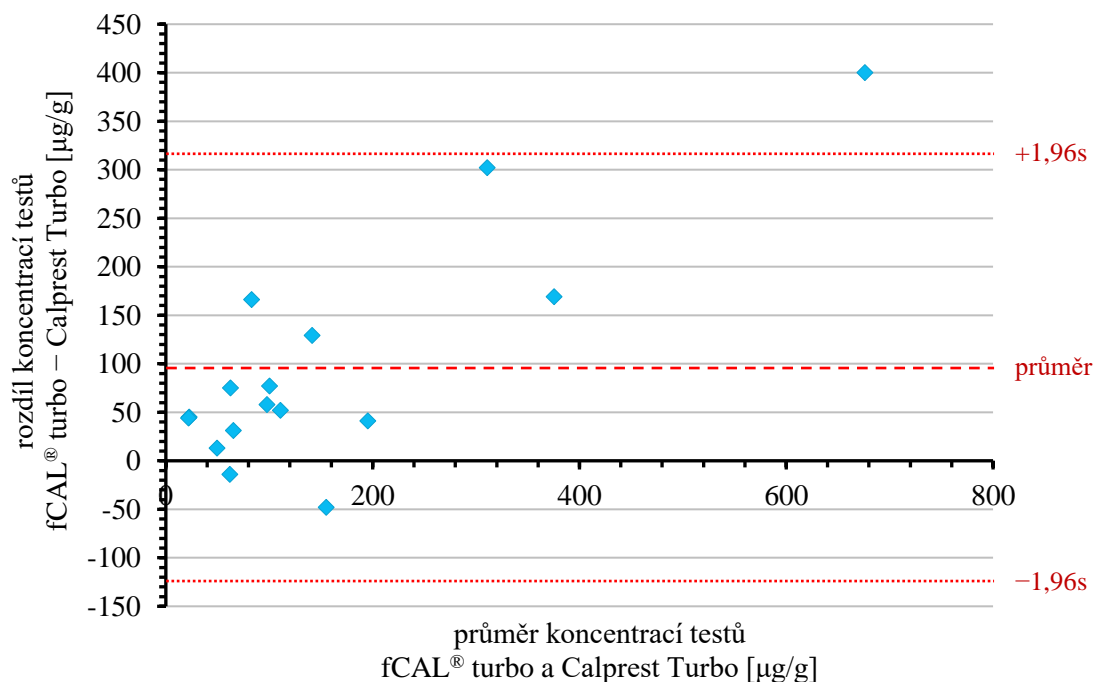


**Graf 5:** Graf zobrazující závislost koncentrace testu fCAL® turbo a koncentrace testu Calprotectin Turbo.





**Graf 6:** Bland-Altmanův graf zobrazující závislost průměrných koncentrací testů fCAL<sup>®</sup> turbo a Turbilatex<sup>®</sup> Combo na rozdíl koncentrací těchto testů. V grafu je vyznačen průměr hodnot a hodnoty +1,96s a -1,96s, které určují hranice intervalu, v jehož rozmezí lze očekávat 95% hodnot.



**Graf 7:** Bland-Altmanův graf zobrazující závislost průměrných koncentrací testů fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprest Turbo na rozdíl koncentrací těchto testů. V grafu je vyznačen průměr hodnot a hodnoty +1,96s a -1,96s, které určují hranice intervalu, v jehož rozmezí lze očekávat 95% hodnot.

## 5.4 Porovnání patientských vzorků FIT

Koncentrace FIT byla stanovována z 18 primárních patientských vzorků stolice, z nichž bylo odebráno celkem 54 zkumavek k měření (Tab. 12). Ze všech měřených patientských vzorků vycházely ve všech testovaných soupravách jako pozitivní pouze 2 vzorky (vzorek č. 7 a 12), pozitivní výsledek vykazoval také vzorek č. 1, ale pouze u soupravy FOB-Test Turbo. Ostatní vzorky byly negativní.

**Tab. 12:** Výsledky všech měření patientských vzorků pro FIT s využitím současně užívané soupravy QuikRead go<sup>®</sup> iFOBT a i dvou nově testovaných souprav FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo a FOB-Test Turbo. Pozitivní vzorky jsou značeny červeně.

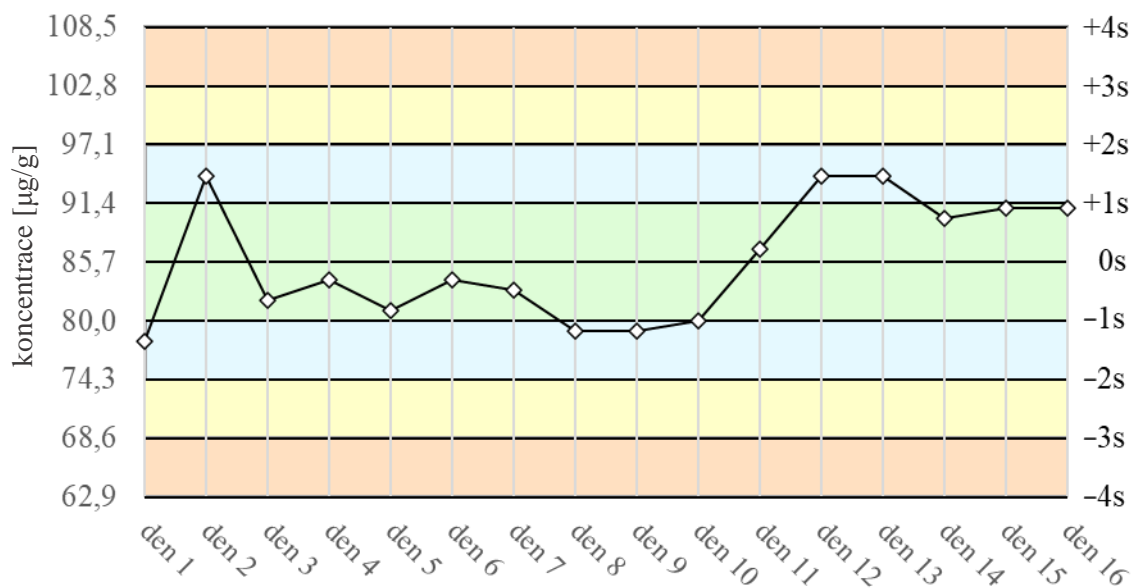
Číslo vzorku	Výsledky měření [µg/g]		
	QuikRead go <sup>®</sup> iFOBT	FOB Turbilatex <sup>®</sup> Combo	FOB-Test Turbo
1	<10	10,2	19,7
2	10	1,1	8,2
3	<10	2,6	6,8
4	<10	5,3	7,3
5	<10	7,3	13,6
6	<10	5,4	13,4
7	21	16,2	32,3
8	<10	4,0	11
9	<10	5,3	7,2
10	<10	4,8	9,7
11	<10	11,5	13,7
12	17	17,4	16,4
13	<10	10,0	14,7
14	<10	3,9	8,4
15	<10	6,6	8,7
16	<10	5,8	4,2
17	<10	3,0	3,6
18	<10	5,9	12,6

## 5.5 Měření mezilehlé preciznosti

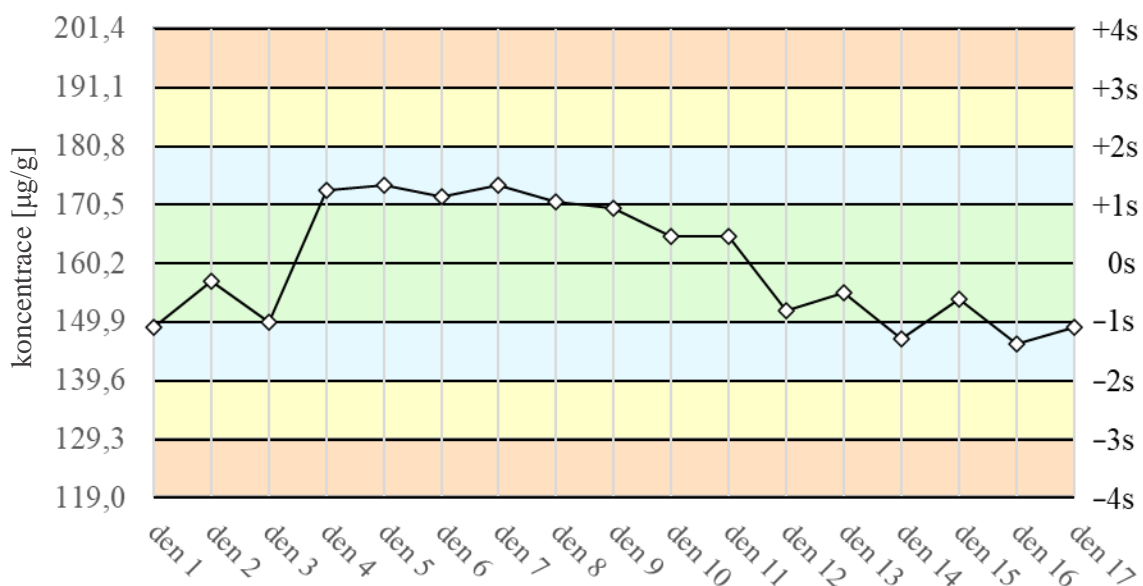
Pro všechny nově testované soupravy bylo provedeno měření mezilehlé preciznosti, tedy měření koncentrace kontrolních vzorků Control 1 a 2 obsažených v příslušné reagenční soupravě v několika dnech po sobě. Obecně bývá měření prováděno 20 po sobě následujících dní, avšak vzhledem k nedostatku testovacích roztoků bylo měření u některých vzorků prováděno po kratší dobu. Konkrétní výsledky měření mezilehlé preciznosti poté shrnují Levey-Jenningsovy grafy níže (Grafy 8–19). Hodnoty SD (v grafech jako 1s, 2s, 3s, 4s.) jsou vypočítané na základě naměřených dat mezilehlé preciznosti.

Stanovené hodnoty se u většiny testů pohybují převážně v rozmezí mezi +1s a -1s, přičemž některé hodnoty vybočují do zóny +1s až +2s či -1s až -2s. Tento trend se vyskytuje u všech stanovení mezilehlých precizností, vyjma testů Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Control 2, Calprest Turbo Control 1 a 2 a FOB-Test Turbo Control 1 a 2, u nichž se hodnoty dostávají za hranici +2s či -2s.

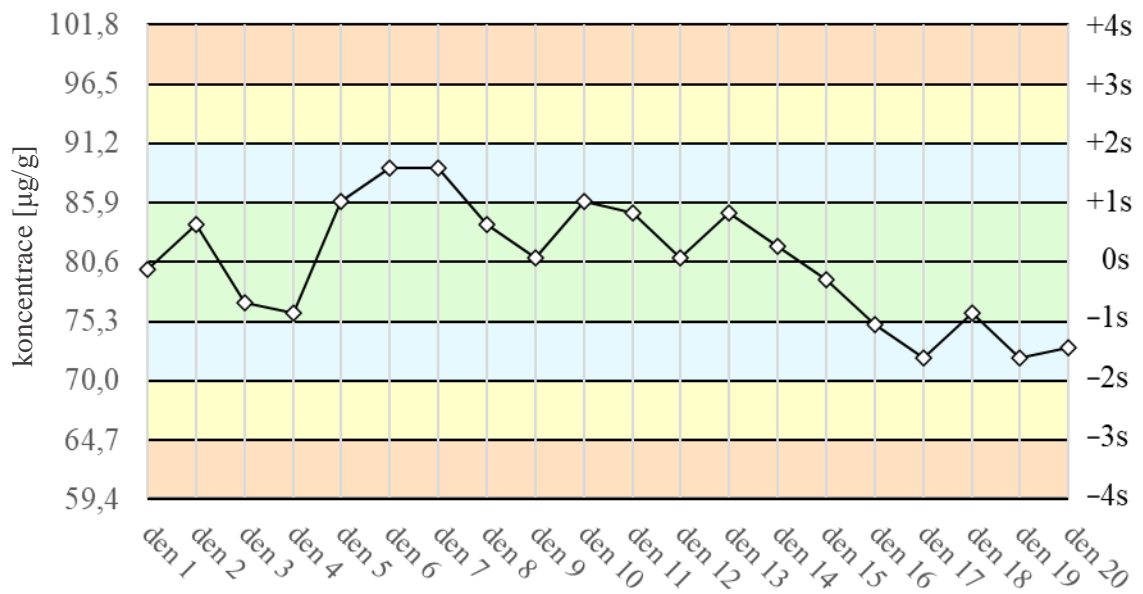
Rozložení hodnot v jednotlivých dnech je v normě, pouze u testů FOB Turbilatex<sup>®</sup> Control 1, FOB Turbilatex<sup>®</sup> Control 2 a FOB-Test Turbo Control 2 je patrná klesající tendence výsledné koncentrace s přibývajícím dny měření.



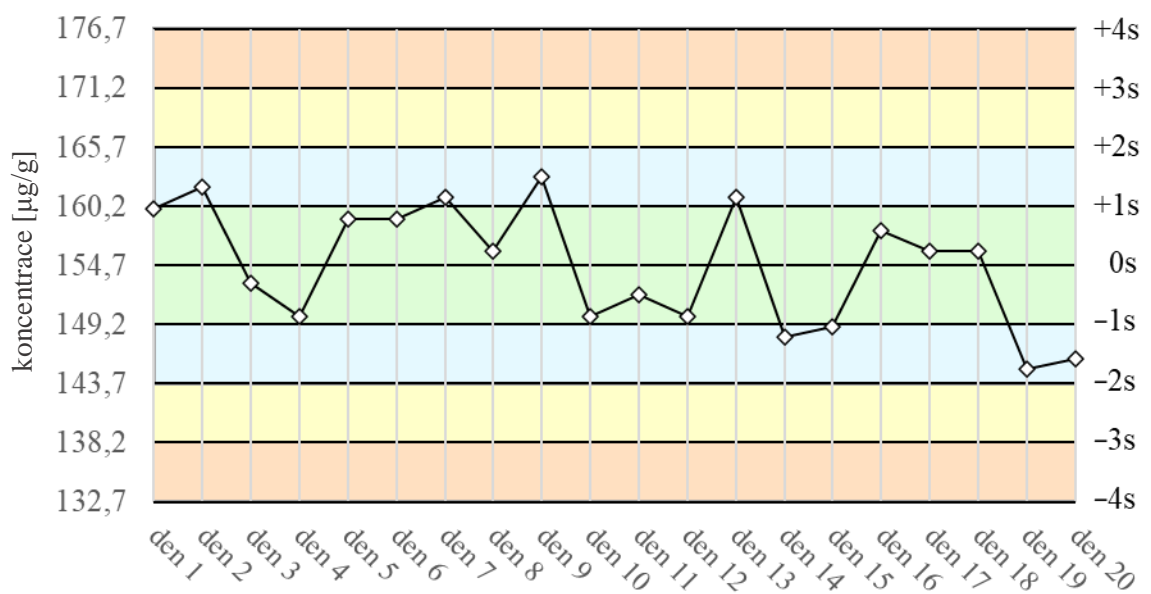
**Graf 8:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Pancreatic Elastase Turbilatex® Control 1 ve dnech 1–16. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .



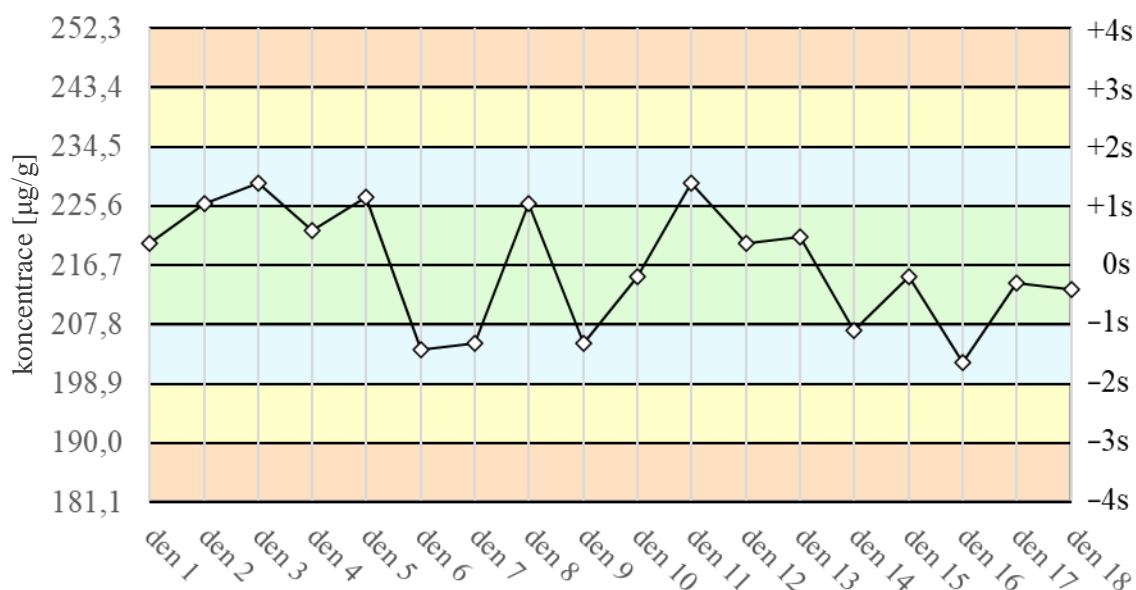
**Graf 9:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Pancreatic Elastase Turbilatex® Control 2 ve dnech 1–17. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .



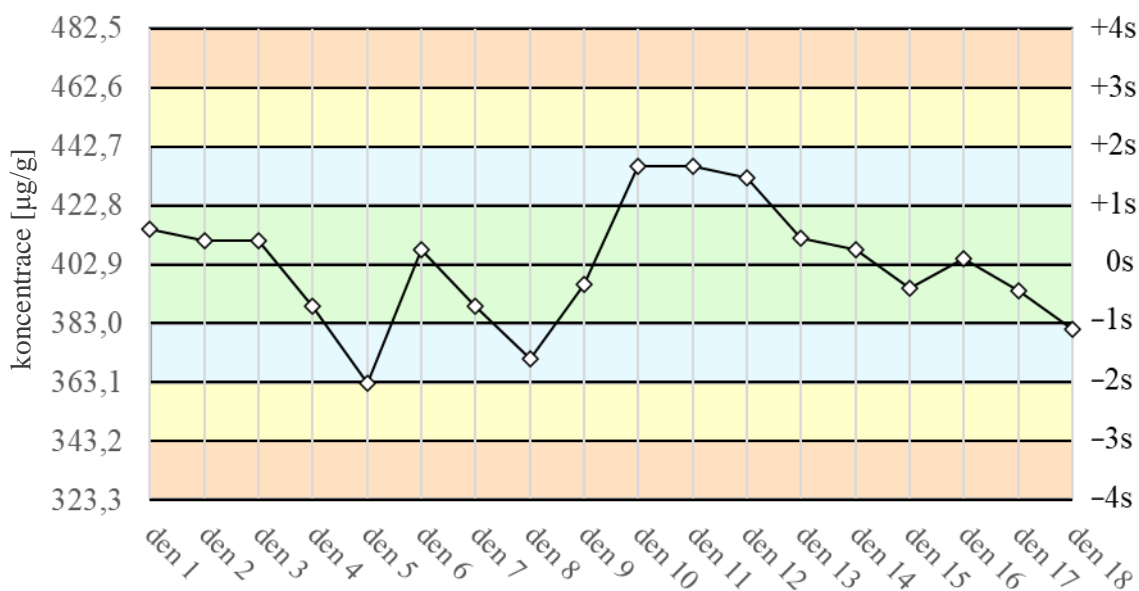
**Graf 10:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Elaprest Turbo Control 1 ve dnech 1–20. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .



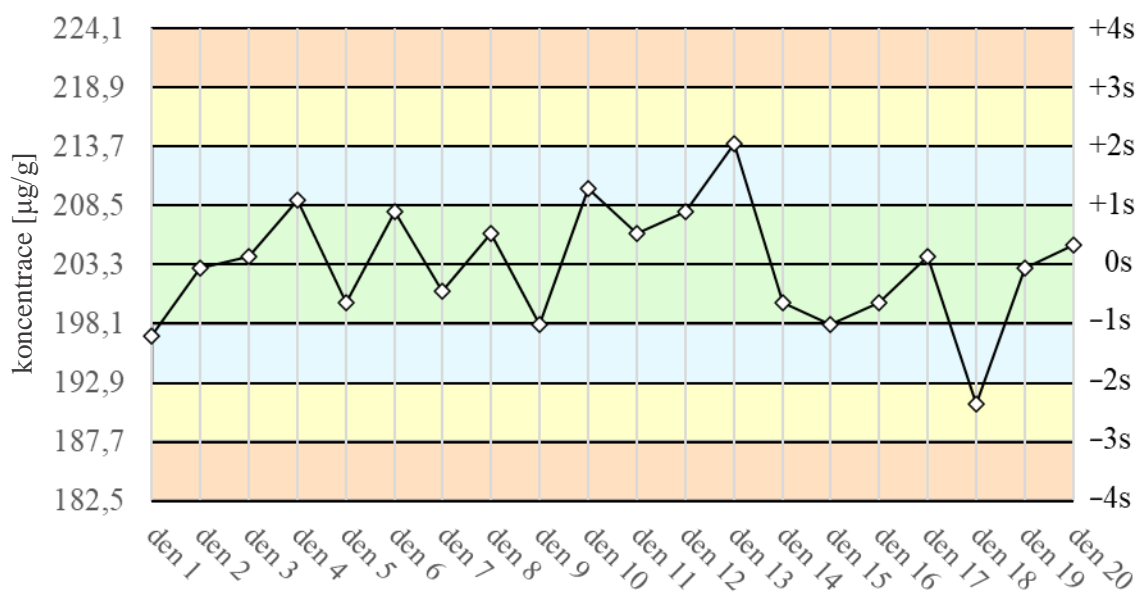
**Graf 11:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Elaprest Turbo Control 2 ve dnech 1–20. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .



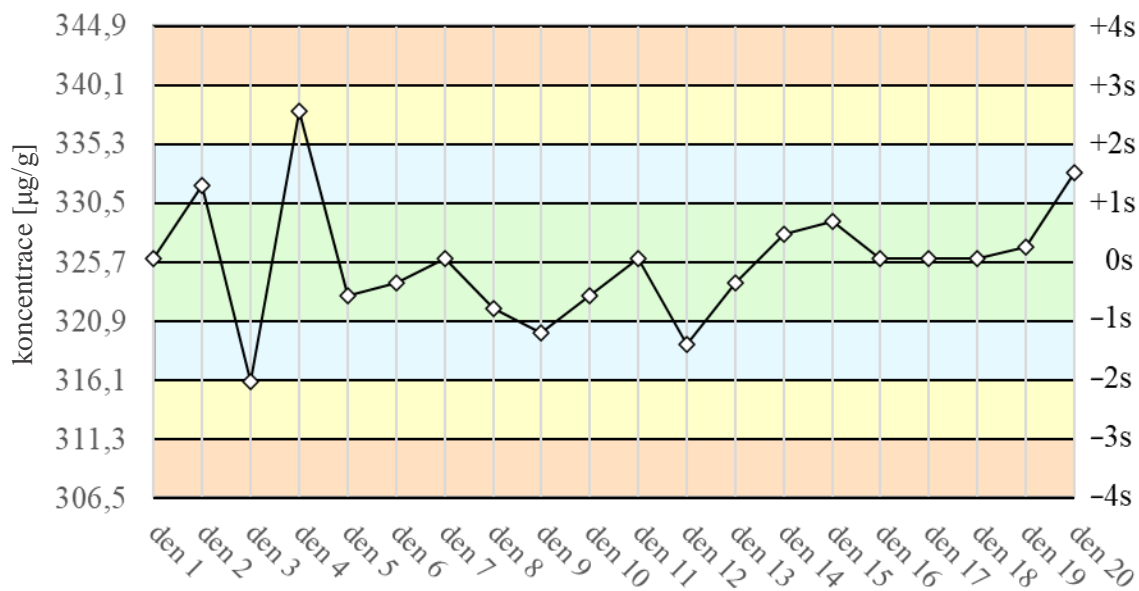
**Graf 12:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Calprotectin Turbilatex® Control 1 ve dnech 1–18. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako +/- s.



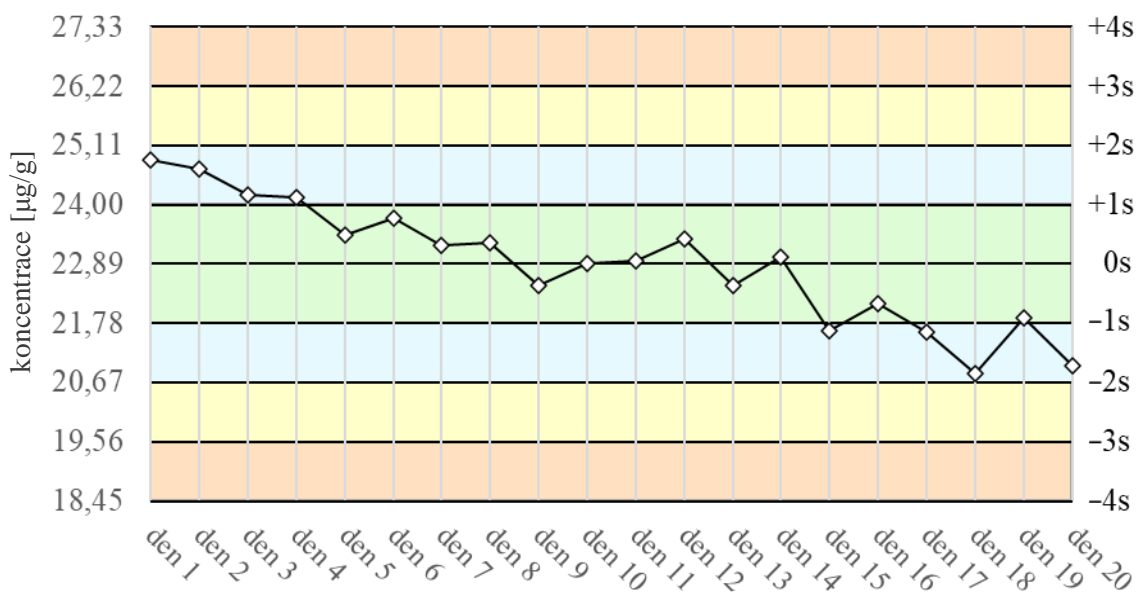
**Graf 13:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Calprotectin Turbilatex® Control 2 ve dnech 1–18. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako +/- s.



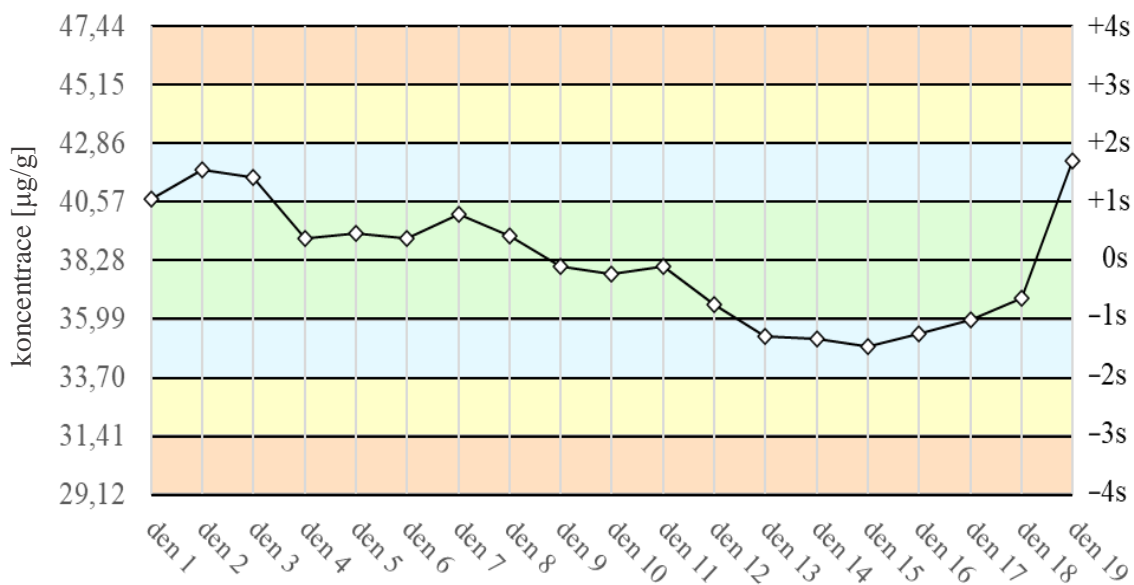
**Graf 14:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Calprest Turbo Control 1 ve dnech 1–20. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .



**Graf 15:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti Calprest Turbo Control 2 ve dnech 1–20. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .

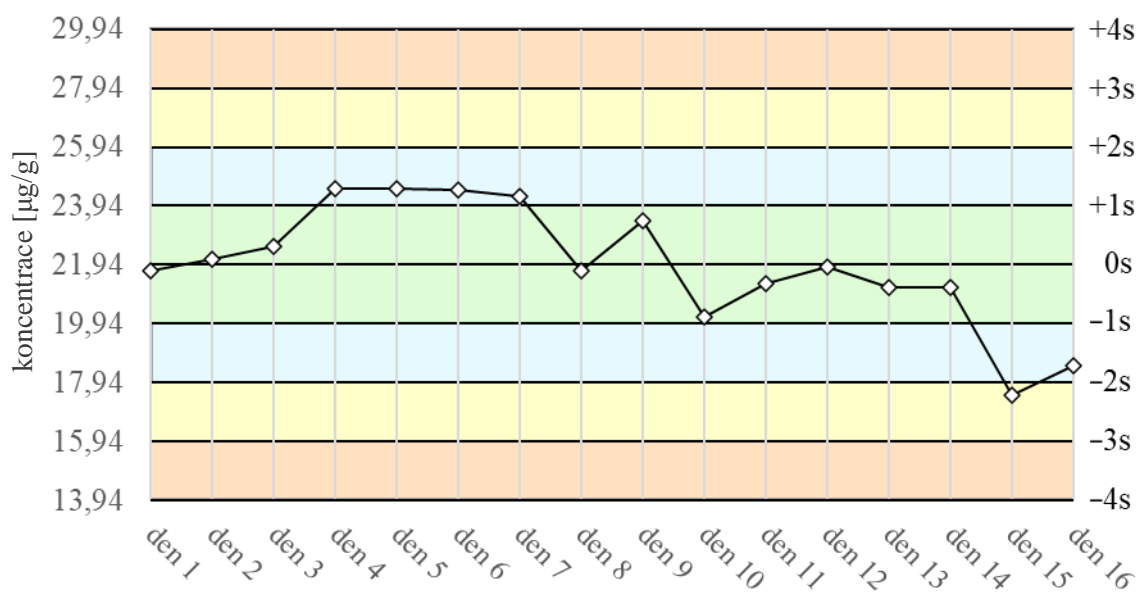


**Graf 16:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti FOB Turbilatex® Control 1 ve dnech 1–20. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymezující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .

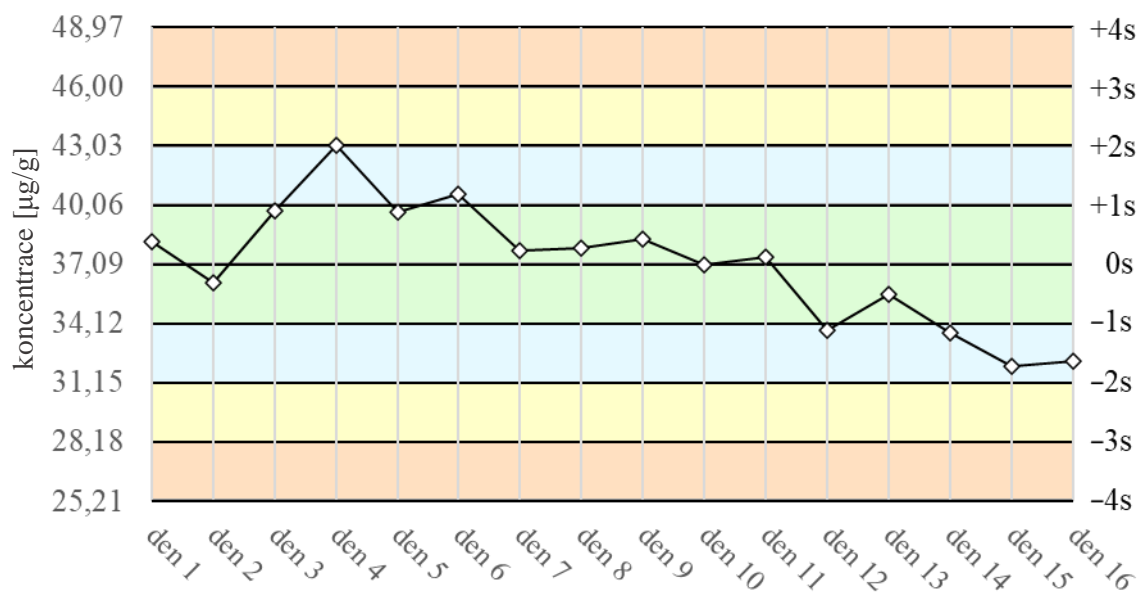


**Graf 17:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti FOB Turbilatex® Control 2 ve dnech 1–19. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymezující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .





**Graf 18:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti FOB-Test Turbo Control 1 ve dnech 1–16. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .



**Graf 19:** Levey-Jenningsův graf zobrazující výsledky měření mezilehlé preciznosti FOB-Test Turbo Control 2 ve dnech 1–16. V pravé části grafu jsou barevně vyznačeny oblasti vymežující hodnoty SD, označené jako  $\pm s$ .

Pro vzorky vnitřní kontroly kvality (VKK) byly ze všech stanovených koncentrací vypočteny průměry, včetně směrodatné odchylky (SD). Všechny průměry stanovené výrobcem byly vyjma vzorku Calprest Turbo Control 2 a vzorku Elaprest Turbo Control 2 nižší než u vzorků VKK. Hodnoty SD stanovené výrobcem byly naopak vyšší, vyjma jediného vzorku FOB-Test Turbo Control 1.

Z průměru a SD vzorků byla stanovena hodnota variačního koeficientu (CV), která je z uvedených statistických parametrů pro stanovení preciznosti měření nejvíce vypovídající. Ta byla pro všechny ze stanovovaných mezilehlých precizností daných testů v normě. Nejlepších výsledků dosahovala pro Calprest Turbo Control 1 a 2, naopak největší chybu vykazovaly FOB-Test Turbo Control 1 a 2 (Tab. 13). I přesto však byly hodnoty CV pro všechny vzorky VKK nižší než hodnoty CV udávané výrobcem (někdy i výrazně) a měření tak splnilo veškeré požadované parametry.

**Tab. 13:** Průměr, SD a CV stanovené z koncentrací kontrolních vzorků Control 1 a Control 2 všech nově testovaných souprav získaných měření jejich mezilehlé preciznosti. Pro porovnání jsou tato data uvedena nejen pro vzorky VKK, ale také i data cílových parametrů výrobce.

Kontrolní materiál		VKK			Cílové parametry výrobce		
		Průměr [µg/g]	SD	CV [%]	Průměr [µg/g]	SD	CV [%]
Pancreatic Elastase Turbilatex®	Control 1	85,69	5,66	6,61	71,0	7,00	10,0
	Control 2	160,18	10,34	6,45	148,0	15,00	10,0
Elaprest Turbo	Control 1	80,60	5,29	6,56	74,0	7,33	10,0
	Control 2	154,70	5,51	3,56	156,0	15,67	10,0
Calprotectin Turbilatex®	Control 1	216,67	8,89	4,10	203,0	20,33	10,0
	Control 2	402,89	19,89	4,94	357,0	35,67	10,0
Calprest Turbo	Control 1	203,25	5,19	2,56	187,0	18,67	10,0
	Control 2	325,70	4,84	1,49	327,0	32,67	10,0
FOB Turbilatex®	Control 1	22,89	1,11	4,86	20,7	2,07	10,0
	Control 2	38,28	2,29	5,97	35,9	3,60	10,0
FOB-Test Turbo	Control 1	21,94	1,99	9,11	19,0	1,90	10,0
	Control 2	37,09	2,97	8,02	34,7	3,47	10,0

Pro všechny nově testované soupravy byla stanovena rozšířená nejistota měření ( $U_C$ ) dle doporučení České společnosti klinické biochemie (Bartoš *et al.*, 2021), v tomto případě podle vzorce  $U_C = 2 CV$  (Tab. 14). Nejvyšší  $U_C$  byly zjištěny pro FOB-Test Turbo Control 1 a 2, vyšší nejistota měření pak byla zaznamenána také u FOB Turbilatex<sup>®</sup> Control 2, Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Control 1 a 2 a Elaprest Turbo Control 1.

**Tab. 14:** Hodnoty nejistot měření ( $U_C$ ) stanovené pro všechny nově testované soupravy z hodnot CV.

Kontrolní materiál		CV [%]	$U_C$ [%]
Pancreatic Elastase Turbilatex <sup>®</sup>	Control 1	6,61	13,22
	Control 2	6,45	12,90
Elaprest Turbo	Control 1	6,56	13,12
	Control 2	3,56	7,12
Calprotectin Turbilatex <sup>®</sup>	Control 1	4,10	8,20
	Control 2	4,94	9,88
Calprest Turbo	Control 1	2,56	5,12
	Control 2	1,49	2,98
FOB Turbilatex <sup>®</sup>	Control 1	4,86	9,72
	Control 2	5,97	11,94
FOB-Test Turbo	Control 1	9,11	18,22
	Control 2	8,02	16,04

## 5.6 Měření opakovatelnosti

Pro nově testované soupravy bylo provedeno také měření opakovatelnosti. Narozdíl od měření mezilehlé preciznosti se měření opakovatelnosti provádí v jeden den, 10× po sobě. Měřeny byly koncentrace vzorků EHK pro elastasu, kalprotektin i FIT. Konkrétně se jednalo o vzorky lyofilizované stolice kontrolního materiálu z cyklu FD1/23 (RfB A, RfB B). Před měřením byly vzorky rozpuštěny ve 200 µl destilované vody.

Výsledky uskutečněných měření opakovatelnosti včetně základních statistických parametrů jsou shrnuty níže (Tab. 15–18). Tabulky obsahují také hodnoty cílových parametrů, kterých dle dokumentace k výsledkům vyhodnocení daného cyklu EHK mělo být dosaženo.

Pro soupravu Calprotectin Turbilatex® Combo byl, kvůli nedostatku vzorku RfB B, měřen pouze vzorek RfB A. Povolené rozmezí nebylo výrobcem stanoveno, cílová hodnota pak byla uvedena jako 20 µg/g, naměřená koncentrace tak byla v povoleném rozmezí (Tab. 15). Pro soupravu FOB Turbilatex® Combo byly k dispozici oba vzorky EHK. Pro vzorek RfB A byl průměr naměřených koncentrací v povoleném intervalu udávaném výrobcem. Vzorku RfB B byl nedostatek, a proto byly výsledky měření koncentrace podhodnocené a nebyly v povoleném rozmezí (Tab. 16).

Pro soupravu Elaprest Turbo byly k dispozici oba vzorky EHK. Pro vzorek RfB A nebylo povolené rozmezí výrobcem stanoveno a průměr naměřených koncentrací tak byl přijatelný. Při měření vzorku RfB B byl mimo pracovní rozsah měření, avšak v povoleném rozmezí 234–702 µg/g (Tab. 17). Pro FOB-Test Turbo byl, opět vlivem nedostatku vzorku RfB B, stanovován pouze vzorek RfB A. Průměr jeho stanovených koncentrací byl v povoleném intervalu udávaném výrobcem (Tab. 18).

**Tab. 15:** Výsledky měření opakovatelnosti pro kontrolní vzorky RfB A pro soupravu Calprotectin Turbilatex® Combo, spolu s cílovou hodnotou EHK vzorku.

Kontrolní materiál	Výsledky měření [µg/g]		Průměr [µg/g]	SD	CV [%]	Cílové parametry	
						Cílová hodnota [µg/g]	Povolené rozmezí [µg/g]
RfB A	<10	<10	-	-	-	20	-
	<10	<10					
	<10	<10					
	<10	<10					
	<10	<10					

**Tab. 16:** Výsledky měření opakovatelnosti pro kontrolní vzorky RfB A a RfB B pro soupravu FOB Turbilatex® Combo, spolu s jejich průměrnou hodnotou, SD a CV a cílovými parametry těchto EHK vzorků.

Kontrolní materiál	Výsledky měření [µg/g]		Průměr [µg/g]	SD	CV [%]	Cílové parametry	
						Cílová hodnota [µg/g]	Povolené rozmezí [µg/g]
RfB A	3,14	3,11	3,11	0,05	1,77	2,7	1,34 – 4,04
	3,15	3,04					
	3,07	3,21					
	3,11	3,13					
	3,01	3,08					
RfB B	5,24	6,07	5,92	0,29	4,91	21,2	10,60 – 31,80
	6,26	6,12					
	5,59	6,00					
	6,15	6,00					
	5,96	5,76					

**Tab. 17:** Výsledky měření opakovatelnosti pro kontrolní vzorky RfB A a B pro soupravu Elaprest Turbo, spolu s průměrnou hodnotou, SD a CV pro vzorek RfB A a cílovými parametry těchto EHK vzorků.

Kontrolní materiál	Výsledky měření [µg/g]		Průměr [µg/g]	SD	CV [%]	Cílové parametry	
						Cílová hodnota [µg/g]	Povolené rozmezí [µg/g]
RfB A	46	46	47,11	3,28	6,96	20	-
	47	47					
	45	50					
	44	55					
	44	-					
RfB B	>500	>500	-	-	-	468	234–702
	>500	>500					
	>500	>500					
	>500	>500					
	>500	>500					

**Tab. 18:** Výsledky měření opakovatelnosti pro kontrolní vzorky RfB A pro soupravu FOB-Test Turbo spolu s průměrnou hodnotou, SD a CV a cílovými parametry.

Kontrolní materiál	Výsledky měření [µg/g]		Průměr [µg/g]	SD	CV [%]	Cílové parametry	
						Cílová hodnota [µg/g]	Povolené rozmezí [µg/g]
RfB A	3,05	3,46	2,83	0,60	21,31	2,7	1,34–4,04
	3,09	3,27					
	2,94	3,02					
	2,81	1,86					
	1,51	3,27					

## 6 DISKUZE

Při porovnávání patientských vzorků je jako správný postup volen výběr vhodných vzorků z celého měřicího rozsahu nově testované metody a jejich porovnávání proti vzorkům z metody referenční. Vzhledem ke složitosti organizace odběru vzorků a k tomu, že byly vzorky odebírány náhodně vybraným pacientům bez předchozí znalosti koncentrace testovaných analytů, byla po vyhodnocení měřicím přístrojem koncentrace velké části z nich mimo měřicí rozsah metody anebo byly vzorky dle cut-off hodnot klasifikovány jako negativní. V diplomové práci byl také limitován počet dostupných testů v soupravě (poskytnuty k otestování zdarma dodavatelem) a nebylo tak možno postupovat dle tohoto doporučeného způsobu.

Vzorky, jejichž získaná koncentrace nebyla v rozsahu použité metody, přirozeně musely být vyloučeny z případné statistické analýzy stanovovaných biomarkerů. Konkrétně k této skutečnosti došlo u naměřených koncentrací elastasy a FIT. Z uvedených důvodů nebylo pro elastasu ani FIT provedeno statistické zpracování, jako u souprav pro stanovení kalprotektinu ve stolici. Z naměřených dat je ovšem patrné, že u stanovení elastasy dochází ke shodě ve výsledku (pozitivní/negativní) ve všech případech, kromě vzorku č. 6, kde by byl výsledek stanovení pomocí soupravy fPELA<sup>®</sup> turbo interpretován jako pozitivní, zatímco u zbylých testovaných souprav by vycházel negativní (Tab. 8). Obdobně je to u porovnání souprav pro stanovení hemoglobinu ve stolici. V 17 z 18 případů by byly výsledky interpretovány shodně, pouze u vzorku č. 1 by výsledek měřený pomocí soupravy FOB-Test Turbo byl interpretován jako pozitivní, zatímco u zbylých testovaných souprav by byl označen jako negativní (Tab. 12).

Ke statistickému porovnání mezi stávající soupravou a soupravami novými mohlo dojít u kalprotektinu, a to díky dostatku vzorků v rozsahu požadované metody. Mezi soupravami fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo bylo z 69 provedených analýz porovnáváno 15 dvojic stanovených koncentrací. Mezi soupravami fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprest Turbo pak bylo porovnáváno 18 dvojic koncentrací.

Uvedené závislosti byly znázorněny graficky, neboť základní charakteristiky variability vztahu navzájem srovnávaných metod je možno odhalit například za využití bodových a rozdílových grafů (norma EP09c, 2018).

Uvedené závislosti byly tedy znázorněny nejprve bodovými grafy, kdy na ose x byly vyneseny koncentrace souprav původních a na ose y souprav srovnávaných.

Porovnání rovnic „ $y = ax + b$ “ těchto grafů signalizovalo užší vztah mezi stávajícím testem fCAL<sup>®</sup> turbo oproti prvnímu novému testu, Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo, kdy hodnota „a“ rovna 0,9004 byla výrazně vyšší než hodnota „a“ (0,2881) zjištěná ze vztahu mezi stávajícím testem fCAL<sup>®</sup> turbo oproti druhému novému testu, Calprest Turbo.

Jak již bylo výše uvedeno, stejné soupravy byly porovnány také s využitím rozdílového, konkrétně Bland-Altmanova grafu, který znázorňuje závislost průměrných koncentrací zvolených testů na rozdílu koncentrací těchto testů (Altman *et* Bland, 1983). Také v tomto případě byl patrný užší vztah mezi stávajícím testem fCAL<sup>®</sup> turbo oproti prvnímu novému testu, Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo, neboť jednotlivé body grafu byly rovnoměrně rozloženy okolo nulové hodnoty na ose x. U druhého Bland-Altmanova grafu, který znázorňoval vztah průměrných koncentrací a jejich rozdílů s využitím stávajícího testu fCAL<sup>®</sup> turbo oproti druhému novému testu Calprest Turbo, již rozložení jednotlivých bodů signalizovalo, že test fCAL<sup>®</sup> turbo nadhodnocuje oproti testu Calprest Turbo. V Bland-Altmanových grafech byly vyznačeny hodnoty  $+1,96s$  a  $-1,96s$  obecně určující hranice intervalu, v jehož rozmezí lze očekávat 95% vynesných dat. Data obou grafů toto tvrzení splňovala.

Pro výsledné koncentrace kalprotektinu ze všech užívaných souprav, tedy stávající i nově testovaných byla pomocí Shapiro-Wilkova testu zjišťována normalita těchto dat (Ambrožová, 2022). Pro všechny soupravy, tedy fCAL<sup>®</sup> turbo, Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo i Calprest Turbo byla výsledná data klasifikována jako data s nenormálním rozložením. Toto zjištění potvrdilo předpokládané výsledky stanovení normality.

Data byla dále podrobena párovému neparametrickému Wilcoxonovu testu, jehož použití je vhodné volit právě v situaci, kdy vykazují soubory dat nenormální rozložení (Ambrožová, 2022). Při vzájemném porovnání souprav fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo byl zjištěn nevýznamný rozdíl charakterizovaný hodnotou  $P = 0,69$ , naopak vysoce významný rozdíl ( $P < 0,01$ ) prokázalo porovnání souprav fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprest Turbo. Zjištění, že původní a nově testovaná souprava Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo mezi sebou vykazují nevýznamný rozdíl pak podporuje tvrzení, že se jedná o vhodnější soupravu oproti soupravě Calprest Turbo.

Dále byl proveden F-test o rovnosti dvou rozptylů (Ambrožová, 2022), který opět porovnával vždy stávající a nově testovanou soupravu pro kalprotektin. Při porovnání souprav fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo byla hodnota  $P$  rovna 0,46, při porovnání fCAL<sup>®</sup> turbo a Calprest Turbo byla hodnota  $P < 0,01$ . Hodnoty  $F$  a  $F$  krit jsou však v obou případech ve vztahu  $F > F$  krit a nezapadají tak do hypotézy, že stávající



a nově testované soupravy vykazují shodný rozptyl dat. Je třeba ale dodat, že testování proběhlo na malém statistickém souboru, navíc po vyloučení hodnot mimo pracovní rozsah metod, což může značně zkreslovat výsledky tohoto testu.

Výše shrnuté výsledky získané srovnáním stávající a nově testovaných souprav pro kalprotektin jednoznačně vedly k přesvědčení, že lepších výsledků bylo dosaženo pro soupravu Calprotectin Turbilatex® Combo, a to při všech porovnáních, tedy bodovém grafickém znázornění, znázornění pomocí Bland-Altmanova grafu, Wilcoxonovým testem i F-testem. Díky těmto zjištěním bylo možno provést verifikaci metody využívající soupravu Calprotectin Turbilatex® Combo, verifikační protokol je k dispozici v Příloze B.

Pro zjištění preciznosti měření, která je mimo jiné i součástí procesu verifikace, pak byla provedena měření opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti (Plzák *et al.*, 2021), a to již pro všechny testované biomarkery, tedy elastasu, kalprotektin i FIT.

Výsledné koncentrace při měření opakovatelnosti bohužel nebylo možné stanovit pro všechny nově testované soupravy, neboť vzorky EHK byly primárně potřebné k rutinnímu testování stávajících souprav, a byly proto k dispozici pouze v omezeném množství. Pro některé soupravy tak nebyla měření opakovatelnosti provedena vůbec nebo byly výsledky měření podhodnocené, neboť daného vzorku EHK již nebyl dostatek. Z tohoto důvodu nebylo možné stanovit ani hodnoty bias. Soupravy, pro které byly výsledky měření opakovatelnosti uvedeny jsou Elaprest Turbo, Calprotectin Turbilatex® Combo, FOB Turbilatex® Combo a FOB-Test Turbo.

Měření mezilehlé preciznosti bylo provedeno pro kontrolní vzorky Control 1 a 2 ze všech nově testovaných souprav. Rozložení výsledných koncentrací v jednotlivých dnech je v normě. Sice některé stanovené hodnoty zasahují do žlutých zón Levey-Jenningsových grafů, které byly k vyjádření mezilehlé preciznosti využity, ale důvodem jsou přísnější výchozí podmínky, podle nichž byly dané zóny vymezovány. Povolené limity byly dle výrobců souprav 10 % CV, avšak zde byly ve všech případech použity nižší hodnoty CV (dle výpočtu pro danou soupravu). U testů FOB Turbilatex® Control 1, FOB Turbilatex® Control 2 a FOB-Test Turbo Control 2 je pak patrná klesající tendence výsledné koncentrace s přibývajícím dnem měření, proto by bylo v pozdější praxi vhodné pro tyto soupravy provádět častější kalibraci.

Pro všechny nově testované soupravy byla dle požadavků pro správnou verifikaci stanovena rozšířená nejistota měření ( $U_C$ ) (Plzák *et al.*, 2021). V ideálním případě by měla být vypočtena dle vzorce  $U_C = k \sqrt{CV^2 + u_{cal}^2}$ , kde  $k = 2$  a  $u_{cal}$  je nejistota

kalibrátoru (Bartoš *et al.*, 2021). Vzhledem k tomu, že výrobce neposkytl hodnoty  $u_{cal}$ , byla nejistota stanovována po zjednodušení rovnice, a tedy dle vzorce  $U_C = 2 CV$ . Nejistotu měření poskytuje laboratoř k výsledku daného analytu na vyžádání.

## 7 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše pojednávající o stanovovaných biomolekulách. Pozornost byla věnována také charakteristice souprav, využívaných k jejich analýze. V rámci praktické části práce byl proveden sběr vzorků stolice od pacientů z Fakultní nemocnice Olomouc a pomocí biochemického analyzátoru byla stanovena koncentrace cílových biomarkerů – elastasy, kalprotektinu a FIT. Primární vzorky stolice byly odebírány za využití stávající a dvou nově testovaných souprav za účelem srovnání těchto souprav. Z naměřených dat, jejich zpracování, interpretace a porovnání se stávající soupravou vyplynulo, že souprava Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo dosahovala oproti soupravě Calprest Turbo jednoznačně lepších výsledků. Výsledky dosažené stanovením pomocí této soupravy byly srovnatelnější s aktuálně využívanou metodou. Tato souprava disponovala také nespornou výhodou, a to možností testovat všechny biomarkery (elastasu, kalprotektin i FIT) z jedné odběrové zkumavky. Dalšími benefity pak byly nejen lepší aplikační podpora poskytovaná výrobcem, ale také nižší pořizovací cena.

Z výše uvedených důvodů bylo OKB navrženo nově využívat pro další analýzy soupravy Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Combo, Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo a FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo. Pro tyto soupravy byla provedena verifikace metody dle doporučených postupů.

## 8 LITERATURA

Altman D. G., Bland J. M. (1983): Measurement in medicine: the Analysis of method comparison studies. *The Statistician* 32, 307-317.

Ambrožová J. (2022): Srovnatelnost výsledků vyšetření – možné postupy. *Klinická biochemie a metabolismus* 30(51), 37-47.

Andersson K. B., Sletten K., Berntzen H. B., Dale I., Brandtzaeg P., Jeilum E., Fagcrhol M. K. (1988): The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. *Scandinavian Journal of Immunology* 28, 241-245.

Baló J., Banga I. (1950): The elastolytic activity of pancreatic extracts. *Biochemical Journal* 46(4), 384-387.

Bao Y. I., Wang A., Mo J. (2016): S100A8/A9 is associated with estrogen receptor loss in breast cancer. *Oncology Letters* 11, 1936-1942.

Barthet M., Lesavre N., Desplats S., Panuel M., Gasmi M., Bernard J.-P., Dagorn J.-C., Grimaud J.-C. (2006): Frequency and characteristics of pancreatitis in patients with inflammatory bowel disease. *Pancreatology* 6, 464-471.

Bartoš V., Budina M., Friedecký B., Kratochvíla J., Springer D., Šafarčík K. (2021): Doporučení k vyjadřování nejistot kvantitativních výsledků měření ve zdravotnických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus* 29(50), 84-93.

Bianchi M. E. (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 81, 1-5.

Carroccio A., Di Prima L., Di Grigoli C., Soresi M., Farinella E., Di Martino D., Guarino A., Notarbartolo A., Montalto G. (1999): Exocrine pancreatic function and fat malabsorption in human immunodeficiency virus-infected patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 34, 729-734.

Chen C.-C., Huang J.-L., Chang C.-J., Kong M.-S. (2012): Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 55, 541-547.

Chew T. S., Mansfield J. C. C. (2018): Can faecal calprotectin predict relapse in inflammatory bowel disease: a mini review. *Frontline Gastroenterology* 9(1), 23-28.

Chey W. D., Kurlander J., Eswaran S. (2015): Irritable bowel syndrome: a clinical review. *Journal of the American Medical Association* 313(9), 949-958.

Čihák R., Grim M. (2013): *Anatomie 2*, pp. 135-138, Grada Publishing, Praha, Česká republika.

Desai D., Faubion W. A., Sandborn W. J. (2007): Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 25, 247-255.

Di Ruscio M., Vernia F., Ciccone A., Frieri G., Latella G. (2017): Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin? *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(1), 78-92.

Digby J., Fraser C. G., Carey F. A., McDonald P. J., Strachan J. A., Diament R. H., Balsitis M., Steele R. J. C. (2013): Faecal haemoglobin concentration is related to severity of colorectal neoplasia. *Journal of Clinical Pathology* 66, 415-419.

Domínguez-Muños J. E., Hyeronimus C., Sauerbruch T., Malfertheiner P. (1995): Fecal elastase test: Evaluation of new non-invasive pancreatic function test. *American Journal of Gastroenterology* 90, 1834-1837.

Dominici R., Franzini C. (2002): Fecal Elastase-1 as a Test for Pancreatic Function: a Review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40(4), 325-332.

Duffy M. J., Van Rossum L. G. M., Van Turenhout S. T., Malminiemi O., Sturgeon C., Lamerz R., Nicolini A., Haglund C., Holubec L., Fraser C. G., Halloran S. P. (2011): Use of faecal markers in screening for colorectal neoplasia: a European group on tumor markers position paper. *International Journal of Cancer* 128(1), 3-11.

Dvořák M., Kocna P., Vaníčková Z. (2002): Okultní krvácení ve stolici – srovnání imunochemického a biochemického testu stanovení. *Časopis lékařů českých* 141, 217-219.

Fagerhol M. K., Dale I., Andersson T. (1980): Release and quantitation of a leukocyte derived protein (L1). *Scandinavian Journal of Haematology* 24, 393.

Feinstein G., Hofstein R., Koifmann J., Sokolovsky M. (1974): Human pancreatic proteolytic enzymes and protein inhibitors. *European Journal of Biochemistry* 43, 569-581.

Frič P. (1986): The use of Haemoccult test in the early diagnosis of colorectal cancer – experience from six pilot studies in Czechoslovakia. In *Haemoccult screening for the early detection of colorectal cancer* (Hardcastle J. V., ed.), pp. 73-74, Schattauer, Stuttgart, Německo.

Frøslie K. F., Jahnsen J., Moum B. A., Vatn M. H., IBSEN Group (2007): Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 133, 412-422.

Galgut B. J., Lemberg D. A., Day A. S., Leach S. T. (2018): The value of fecal markers in predicting relapse in inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Pediatrics* 5, 292.

Ganz T., Nemeth E. (2012): Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(5), a011668.

Grebhardt S., Müller-Decker K., Bestvater F., Hershinkel M., Mayer D. (2014): Impact of S100A8/A9 expression on prostate cancer progression *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cellular Physiology* 229, 661-671.

Guilera M., Balboa A., Mearin F. (2005): Bowel habit subtypes and temporal patterns in irritable bowel syndrome: systematic review. *The American Journal of Gastroenterology* 100(5), 1174-1184.

Hamwi A., Veitl M., Maenner G., Vogelsang H., Szekeres T. (2000): Pancreatic elastase 1 in stool: variations within one stool passage and individual changes from day to day. *Wiener Klinische Wochenschrift* 112, 32-35.

Holland W., Stewart S., Masseria C. (2006): Screening in Europe-Policy Brief. European Observatory on Health Systems and Policies, WHO European Centre for Health Policy, 1-72.

Hsu K., Passey R.J., Endoh Y., Rahimi F., Youssef P., Yen T., Geczy C. L. (2005): Regulation of S100A8 by glucocorticoids. *The Journal of Immunology* 174, 2318-2326.

Icks A., Haarstert B., Giani G., Rathmann W. (2001): Low fecal elastase-1 in type 1 diabetes mellitus. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie* 39, 823-830.

Ishikawa K., Nakagawa A., Tanaka I., Suzuki M., Nishihira J. (2000): The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 56, 559-566.

Itou H., Yao M., Fujita I., Watanabe N., Suzuki M., Nishihira J., Tanaka I. (2002): The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca<sup>2+</sup>-dependent regulator protein in inflammatory process. *Journal of Molecular Biology* 316, 265-276.

Jarlborg M., Courvoisier D.S., Lamacchia C., Prat L. M., Mahler M., Bentow C., Finckh A., Gabay C., Nissen M. J. (2020): Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 22, 105.

Jukic A., Bakiri L., Wagner E. F., Tilg H., Adolph T. E. (2021): Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut* 70, 1978-1988.

Kato J., Hiraoka S., Nakarai A., Takashima S., Inokuchi T., Ichinose M. (2016): Fecal immunochemical test as a biomarker for inflammatory bowel diseases: can it rival fecal calprotectin? *Intestinal Research* 14, 5-14.

Kligman D., Hilt D. C. (1988): The S100 protein family. *Trends in Biochemical Sciences* 13, 437-443.

Kocna P. (2017): Quantitative analysis of haemoglobin in stool – importance for colorectal cancer screening. *Onkol Revue* 2, 6-10.

Kocna P., Zima T. (2015a): Stanovisko ke stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou. *Clinical Biochemistry and Metabolism* 23(2), 78-81.

Kocna P., Zima T. (2015b): Doporučení České společnosti klinické biochemie ke správnému používání metody stanovení okultního krvácení ve stolici. *Tempus Medicorum* 24(10), 30-31.

Konikoff M. R., Denson L. A. (2006): Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel disease* 12(6), 524-534.

Korndorfer I. P., Brueckner F., Skerra A. (2007): The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)<sub>2</sub> heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting  $\alpha$ -helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *Journal of Molecular Biology* 370, 887-898.

Krechler T., Kocna P., Vaničková Z., Švestka T., Lukáš M., Doseděl J., Kohout P., Žák A. (2006): Stanovení elastázy I ve stolici – využití v diagnostice chronické pankreatitidy. *Časopis lékařů českých* 145, 480-483.

Kumar A., Steinkasserer A., Berchtold S. (2003): Interleukin-10 influences the expression of MRP8 and MRP14 in human dendritic cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 132, 40-47.

Kunz M., Roth J., Sorg C., Kolde G. (1992): Epidermal expression of the calcium binding surface antigen 27E10 in inflammatory skin diseases. *Archives of Dermatological Research* 284, 386-390.

Lebl J., Janda J., Pohunek P., Starý J., Bláhová K., Bronský J., Černá O., Černý M., Doležalová P., Fencel F., Hadačová I., Hoza J., Chaloupecký V., Koloušková S., Kotalová R., Koutek J., Němcová D., Nevorál J., Pelikán L., Petrtýlová K., Pomahačová R., Seeman T., Svobodová T., Šedivá A., Šnajderová M., Šulc J., Šumník Z., Vančíková Z., Vávrová V., Vobruba V., Zeman J., Zoban P. (2012): *Klinická pediatrie*, pp. 311-442, Galén, Praha, Česká republika.

Leeds J. S., Hopper A. D., Hurlstone D. P., Edwards S. J., McAlindon M. E., Lobo A. J., Donnelly M. T., Morley S., Sanders D. S. (2007): Is exocrine pancreatic insufficiency in adult coeliac disease a cause of persisting symptoms? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 25, 265-271.

Leeds J. S., Hopper A. D., Sidhu R., Simmonette A., Azadbakht N., Hoggard N., Morley S., Sanders D. S. (2010): Some patients with irritable bowel syndrome may have exocrine pancreatic insufficiency. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 8, 433-438.

Leeds J. S., Oppong K., Sanders D. S. (2011): The role of fecal elastase-1 in detecting exocrine pancreatic disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 8, 405-415.

Lehmann F.S., Trapani F., Fueglistaler I., Terracciano L. M., Flüe M., Cathomas G., Zettl A., Benkert P., Oertli D., Beglinger C. (2014): Clinical and histopathological correlations of fecal calprotectin release in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 20, 4994-4999.

Lévy P., Barthet M., Mollard B.R., Amouretti M., Marion-Audibert A.M., Dyard F. (2006): Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 30, 838-844.

Lienau S., Rink L., Wessels I. (2018): The role of zinc in calprotectin expression in human myeloid cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 49, 106-112.

Lira-Junior R., Öztürk V. Ö., Emingil G., Bostanci N., Boström E. A. (2017): Salivary and serum markers related to innate immunity in generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* 88, 1339-1347.

Löser C., Möllgaard A., Fölsch U. R. (1996): Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test. *Gut* 39, 580-586.

Lovell R. M., Ford A. C. (2012): Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10(7), 712-721.

Lügering N., Stoll R., Kucharzik T., Schmid K. W., Rohlmann G., Burmeister G., Sorg C., Domschke W. (1995): Immunohistochemical Distribution and Serum Levels of the Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins MRP8, MRP14 and Their Heterodimeric Form MRP8/14 in Crohn's Disease. *Digestion* 56, 406-414.

Lukáš K., Hoch J., Ambrožová H., Balihar K., Coubalová Š., Douda L., Dušek T., Hrabák P., Hrabák P., Jech Z., Jirásek V., Keil R., Kocián P., Kocna P., Kohout P., Kohoutová M., Kojecký V., Kotlas J., Kotyza J., Koželuhová J., Kučera M., Lahoda Brodská H., Lambert L., Machala L., Malíčková K., Nevoral J., Němec L., Nováková Z., Novotný A., Novotný V., Örhalmi J., Pařízek A., Pazdírek F., Pokorný J., Prokopová L., Stejskal F., Šípek A., Škába R., Špičák J., Vagnerová R., Vejmelka J., Vidim T., Zádorová Z., Zavoral M., Zdeňková A. (2018): *Nemoci střev*, pp. 134-336, Grada Publishing, Praha, Česká republika.

Lukáš M., Anders M., Brichová M., Černá K., Ďuricová D., Heissigerová J., Horák M., Kohout P., Kolář M., Machková N., Šenkyřík M., Šenolt L., Teplan V., Vašátko M., Vítková I. (2021): *Idiopatické střevní záněty II: nové trendy a mezioborové souvislosti*, pp. 77-78, Grada Publishing, Praha, Česká republika.

Ma L., Sun P., Zhang J.-C., Zhang Q., Yao S.-L. (2017): Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *International Journal of Molecular Medicine* 40, 31-38.

Maconi G., Dominici R., Molteni M., Ardizzone S., Bosani M., Ferrara E., Gallus S., Panteghini M., Porro G. B. (2008): Prevalence of pancreatic insufficiency in inflammatory bowel diseases. Assessment by fecal elastase-1. *Digestive Diseases and Sciences* 53, 262-270.

McDonald P. J., Strachan J. A., Digby J., Steele R. J. C., Fraser C. G. (2011): Faecal haemoglobin concentrations by gender and age: implications for population-based screening for colorectal cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 50(5), 935-940.

Moore B. W. (1965): A soluble protein characteristics of nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19, 739-744.

Mørk G., Schjerven H., Mangschau L., Søyland E., Brandtzaeg P. (2003): Proinflammatory cytokines upregulate expression of calprotectin (L1 protein, MRP-8/MRP-14) in cultured human keratinocytes. *British Journal of Dermatology* 149, 484-491.

Nakarai A., Kato J., Hiraoka S., Kuriyama M., Akita M., Hirakawa T., Okada H., Yamamoto K. (2013): Evaluation of Mucosal Healing of Ulcerative Colitis by a Quantitative Fecal Immunochemical Test. *The American Journal of Gastroenterology* 108(1), 83-89.



Nedjadi T., Evans A., Sheikh A., Barerra L., Al-Ghamdi S., Oldfield L., Greenhalf W., Neoptolemos J. P., Costello E. (2018): S100A8 and S100A9 proteins form part of a paracrine feedback loop between pancreatic cancer cells and monocytes. *BMC Cancer* 18, 1255.

Nielsen H. L., Engberg J., Ejlersen T., Nielsen H. (2013): Evaluation of fecal calprotectin in *Campylobacter concisus* and *Campylobacter jejuni/coli* gastroenteritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 48, 633-635.

Niki I., Yokokura H., Sudo T., Kato M., Hidaka H. J. (1996): Ca<sup>2+</sup> Signaling and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Binding Proteins. *Journal of Biochemistry* 120, 685-698.

Norma CLSI EP09c (2018): Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, 3. edice, Clinical and Laboratory Standards Institute.

O'Connell, P., Lathrop G. M., Law M., Leppert M., Nakamura Y., Hoff M., Kumlin E., Thomas W., Elsner T., Ballard L. (1987): A primary genetic linkage map for human chromosome 12. *Genomics* 1, 93-102.

Perutz M., Rossman M., Cullis A., Muirhead H., Will G., North A. (1960): Structure of haemoglobin: Three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* 185, 416-422.

Pitkaniemi J., Seppä K., Hakama M., Malminiemi O., Palva T., Vuoristo M.-S., Järvinen H., Paimela H., Pikkarainen P., Anttila A., Elovainio L., Hakulinen T., Karjalainen S., Pylkkänen L., Rautalahti M., Sarkeala T., Vertio H., Malila N. (2015): Effectiveness of screening for colorectal cancer with a faecal occult-blood test, in Finland. *BMJ Open Gastroenterology* 2(1), e000034.

Plzák Z., Kratochvíla J., Friedecký B., Šprongl L. (2021): Doporučení pro validace a verifikace postupů laboratorních vyšetření ve zdravotnických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus* 29(50), 78-83. Ambrožová J. (2022): Srovnatelnost výsledků vyšetření – možné postupy. *Klinická biochemie a metabolismus* 30(51), 37-47.

Potts B. C., Carlstrom G., Okazaki K., Hidaka H., Chazin W. J. (1996): <sup>1</sup>H NMR assignments of apo calcyclin and comparative structural analysis with calbindin D9k and S100 beta. *Protein Science* 5, 2162-2174.

Qian M., Song N.-J. (2018): Serum calprotectin correlates with risk and disease severity in psoriasis patients and the decrease of calprotectin predicts better response to tumor necrosis factor inhibitors. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22, 4299-4309.

Quirke P., Risio M., Lambert R., Von Karsa L., Vieth M. (2011): Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis—European recommendations. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 458(1), 1-19.

Rammes A., Roth J., Goebeler M., Klempt M., Hartmann M., Sorg C. (1997): Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272, 9496-9502.

Ransohoff D. F., Lang C. A. (1997): Screening for Colorectal Cancer with the Fecal Occult Blood Test: A Background Paper. *Annals of Internal Medicine* 126(10), 811-822.

Rathmann W., Haastert B., Icks A., Giani G., Hennings S., Mitchell J., Curran S., Wareham N. J. (2001): Low faecal elastase 1 concentrations in type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 36, 1056-1061.

Rosenbloom J. (1984): Elastin: Relation of protein and gene structure to disease. *Laboratory Investigation* 51, 605-623.

Rothenbacher D., Löw M., Hardt P. D., Klör H.-U., Ziegler H., Brenner H. (2005): Prevalence and determinants of exocrine pancreatic insufficiency among older adults: results of a population-based study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 40, 697-704.

Ryckman C., Vandal K., Rouleau P., Talbot M., Tessier P. A. (2003): Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *Journal of Immunology* 170, 3233-3242.

Saitoh O., Sugi K., Matsuse R., Uchida K., Matsumoto H., Nakagawa K., Takada K., Yoshizumi M., Hirata I., Katsu K. (1995): The forms and the levels of fecal PMN-elastase in patients with colorectal diseases. *The American Journal of Gastroenterology* 90, 388-393.

Seiler C. M., Izbicki J., Varga-Szabó L., Czakó L., Fiók J., Sperti C., Lerch M. M., Pezzilli R., Vasileva G., Pap A., Varga M., Friess H. (2013): Randomised clinical trial: a 1-week, double-blind, placebo-controlled study of pancreatin 25 000 Ph. Eur. minimicrospheres (Creon 25000 MMS) for pancreatic exocrine insufficiency after pancreatic surgery, with a 1-year open-label extension. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 37, 691-702.

Schäfer B. W., Wicki R., Engelkamp D., Mattei M., Heizmann C. W., (1995): Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25, 638-643.

Schmid K. W., Lügering N., Stoll R. (1995): Immunohistochemical demonstration of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 and their heterodimer (27E10 antigen) in Crohn's disease. *Human Pathology* 26, 334-337.

Stein J., Jung M., Sziegoleit A, Zeuzem S., Caspary W. F., Lembcke B. (1996): Immunoreactive elastase I: clinical evaluation of a new noninvasive test of pancreatic function. *Clinical Chemistry* 42(2), 222-226.

Steinbakk M., Naess-Andresen C. F., Lingaas E., Dale I., Brandtzaeg P. (1990): Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *The Lancet* 336, 763-765.

Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 71(3), 209-249.

- Sziegoleit A. (1984). A novel proteinase from human pancreas. *Biochemical Journal*, 219(3), 735-742.
- Sziegoleit A., Krause E., Klör H.-U., Kanacher L., Linder D. (1989): Elastase 1 and chymotrypsin B in pancreatic juice and feces. *Clinical Biochemistry* 22, 85-89.
- Takashima S., Kato J., Hiraoka S., Nakarai A., Takei D., Inokuchi T., Sugihara Y., Takahara M., Harada K., Okada H., Tanaka T., Yamamoto K. (2015): Evaluation of Mucosal Healing in Ulcerative Colitis by Fecal Calprotectin Vs. Fecal Immunochemical Test. *The American Journal of Gastroenterology* 110(6), 873-880.
- Tani T., Kawashima I., Furukawa H., Ohmine T., Takiguchi Y. (1987): Characterization of a Silent Gene for Human Pancreatic Elastase I: Structure of the 5'-Flanking Region. *Journal of Biochemistry* 101(3), 591-599.
- Tibble J. A., Sigthorsson G., Foster R., Scott D., Fagerhol M. K., Roseth A., Bjarnason I. (1999): High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut* 45, 362–366.
- Vatn M. H., Sandvik A. K. (2015): Inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 50(6), 748-762.
- Vogl T., Roth J., Sorg C., Hillenkamp F., Strupat K. (1999): Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 detected by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 10, 1124-1130.
- Waldron K. J., Rutherford J. C., Ford D., Robinson N. J. (2009): Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 460, 823-830.
- Wang C., Zhang R., Wei X., Lv M., Jiang Z. (2020): Metalloimmunology: the metal ion-controlled immunity. *Advances in Immunology* 145, 187-241.
- Werb Z., Randa M. J., McKerrow J. H., Sandhaus R. A. (1982): Elastases and elastin degradation. *Journal of Investigative Dermatology* 79, 154-159.
- Wilkinson M. M., Busuttill A., Hayward C., Brock D. J. H., Dorin J. R., Heyning V. V. (1988): Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *Journal of Cell Science* 91 (2), 221-230.
- Young G. P., Symonds E. L., Allison J. E., Cole S. R., Fraser C. G., Halloran S. P., Kuipers E. J., Seaman H. E. (2015): Advances in Fecal Occult Blood Tests: the FIT revolution. *Digestive Diseases and Sciences* 60, 609-622.
- Zygiel E. M., Nolan E. M. (2018): Transition metal sequestration by the host-defense protein calprotectin. *Annual Review of Biochemistry* 87, 621-643.

## Seznam použitých internetových zdrojů

PubChem, National Center for Biotechnology Information [online] U.S. National Library of Medicine. [cit. 2023-10-10] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EC:3.4.21.-#section=Enzymes>.

PubChem, National Center for Biotechnology Information [online] U.S. National Library of Medicine. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EC:3.4.21.36>.

Statistics Kingdom, Statistics online [online] [cit. 2024-4-20] Dostupné z: [https://www.statskingdom.com/175wilcoxon\\_signed\\_ranks.html](https://www.statskingdom.com/175wilcoxon_signed_ranks.html).

Statistics Kingdom, Statistics online [online] [cit. 2024-4-20] Dostupné z: <https://www.statskingdom.com/shapiro-wilk-test-calculator.html>.

UniProt, The Universal Protein Resource [online] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Protein Information Resource (PIR). [cit. 2023-12-31] Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q14237/entry>.

UniProt, The Universal Protein Resource [online] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Protein Information Resource (PIR). [cit. 2024-2-29] Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P69905/entry>.

UniProt, The Universal Protein Resource [online] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Protein Information Resource (PIR). [cit. 2024-2-29] Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P68871/entry>.

## Seznam použitých příbalových letáků

příbalový leták Calprest Turbo, ref. 9300, Eurospital SpA

příbalový leták Calprotectin Turbilatex<sup>®</sup> Combo, v. 0220, Certest Biotec, S.I.

příbalový leták Elaprest Turbo, ref. 9298, Eurospital SpA

příbalový leták fCAL<sup>®</sup> turbo, v. A4, BÜHLMANN Laboratories AG

příbalový leták FOB Turbilatex<sup>®</sup> Combo, v. 0220, Certest Biotec, S.I.

příbalový leták FOB-Test Turbo, ref. 9297, Eurospital SpA

příbalový leták fPELA<sup>®</sup> turbo, v. A2, BÜHLMANN Laboratories AG

příbalový leták Pancreatic Elastase Turbilatex<sup>®</sup> Combo, v. 1020, Certest Biotec, S.I.

příbalový leták QuikRead go<sup>®</sup> iFOBT, v. 152486-5, Aidian Oy

## 9 PŘÍLOHY

**Příloha A:** Kontingenční tabulka vytvořená ze všech vzorků odeslaných na OKB k analýze elastasy, kalprotektinu či FIT v období od 1. 5. 2022 do 31. 10. 2022.

Pracoviště	Počet analýz elastasy	Počet analýz kalprotektinu	Počet analýz FIT
<b>FNOL</b>	<b>185</b>	<b>1292</b>	<b>296</b>
<b>1. Chirurgická klinika</b>		<b>2</b>	
Ambulance		1	
Poradna pro choroby tlustého střeva		1	
<b>2. Chirurgická klinika</b>		<b>1</b>	
Ambulance		1	
<b>2. Interní klinika</b>	<b>137</b>	<b>751</b>	<b>14</b>
Ambulance gastroenterologie		1	
Gastroenterologická ambulance	43	605	2
Nutriční poradna		9	
Oddělení 30C odbornost 1F1		4	
Oddělení 30D JIP		2	
Oddělení 30M odbornost 1F1		10	
Všeobecná ambulance	94	120	12
<b>3. Interní klinika</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>187</b>
Endokrinologie		1	
Hemodialyzační středisko – dolní sál			3
Kardiologická poradna		1	4
Lipidová poradna		2	3
Nefrologická poradna			6
Obezitologická poradna	1	2	3
Oddělení 39A		1	24
Oddělení 39B			1
Oddělení 39B – Diabetologie		2	14
Oddělení 39C		1	12
Oddělení 39D – JIP			2
Oddělení 39R		6	101

Revmatologická poradna			1
Transplantační poradna			12
Všeobecná ambulance			1
<b>Dětská klinika</b>	<b>41</b>	<b>510</b>	<b>21</b>
Ambulance alergologie	2	5	
Ambulance ENDO		4	
Ambulance GIT	17	300	10
Ambulance hematologie		4	4
Ambulance hepatologie	3	2	
Ambulance chirurgická		1	
Ambulance pneumologie	10	1	
Ambulance pohotovost		3	
Ambulance praktického lékaře		3	
Ambulance revmatologie		1	
Ambulance všeobecná – dospívání	2	103	3
Ambulance všeobecná 1	2	28	
Ambulance všeobecná 2	1	4	
Nefrologie		2	
Oddělení 21A – větší děti	1	37	
Oddělení 21B – hematologické		1	
Oddělení 21B – JIP	1		
Oddělení 21C – JIP	2	4	
Oddělení 28B – lůžkové		5	
Oddělení 28C – pooperační		1	1
Oddělení 28D – lůžkové		1	3
<b>Geriatric</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>
Ambulance odbornost 106	2		1
Interní ambulance		1	
Oddělení 46	1	2	3
Oddělení 48		1	3
<b>Hemato-onkologická klinika</b>			<b>36</b>
Ambulance			23
Oddělení 5A			13

<b>Klinika plicních nemocí a tuberkulózy</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>19</b>
Kartotéka		1	1
Oddělení 24A – JIP			1
Oddělení 25	1		4
Oddělení 26	2	2	13
<b>Klinika psychiatrie</b>		<b>1</b>	
Ambulance		1	
<b>Klinika urologie</b>			<b>1</b>
Oddělení 20			1
<b>Kožní klinika</b>		<b>3</b>	<b>5</b>
Oddělení 10		3	5
<b>Neurologická klinika</b>			<b>4</b>
JIP A			1
Oddělení 31A			3
<b>Oddělení klinické biochemie</b>		<b>1</b>	<b>2</b>
Ambulance		1	2
<b>Externí</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Nemocnice AGEL Přerov</b>	<b>1</b>		
<b>Nemocnice AGEL Šternberk</b>	<b>6</b>		
<b>Gastroenterologická ordinace</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
<b>Praktický lékař</b>			<b>3</b>
<b>SPEA, s.r.o.</b>	<b>1</b>		
<b>Tormová Eleonóra MUDr., s.r.o.</b>			<b>1</b>
<b>Vojenská nemocnice</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	
Interní oddělení	2	1	
Vojenská nemocnice		1	
<b>Celkový součet</b>	<b>196</b>	<b>1295</b>	<b>300</b>

## Příloha B: Verifikační protokol pro testovanou soupravu Calprotectin Turbilatex® Combo

Oddělení klinické biochemie FN  
Olomouc

Verifikační protokol		
Formuláře/ Formuláře systému kvality s hlavičkami reduk.		
číslo	:	FM-040
verze	:	02
kopie č.	:	
strana	:	1 z 2
platí od	:	06.06.2016
přílohy	:	
datum tisku	:	12.07.2023

## Verifikační protokol pro kvantitativní metody

**Metoda:** U\_KALPR (µg/g)

**Přístroj:** automatický analyzátor  
**Atellica CH**

**Použitá diagnostika:** souprava Calprotectin Turbilatex®, firmy CerTest BIOTEC.  
Calprotectin Turbilatex® je latexový turbidimetrický test určený pouze pro kvantitativní detekci kalprotektinu ve vzorcích lidské stolice

**Návaznost kalibračních standardů:** Neení uvedena

### Cíl verifikace:

Dosáhnout analytických znaků, které jsou deklarovány výrobcem nebo stanoveny jako 1/3 TEa povolené poskytovatelem EHK nebo vypočteny z biologických variabilit.

Opakovatelnost: **není uvedeno výrobcem (10 %)**

Mezilehlá preciznost: **není uvedeno výrobcem (10 %)**

Vychýlení (bias): **8,33 %** (1/3 povolené TEa dle EHK)

### Verifikační parametry:

#### **Opakovatelnost a vychýlení (bias):**

Pravdivost a opakovatelnost metody byla vyhodnocena na základě opakovaného měření referenčního kontrolního materiálu FD1/23 firmy RfB. Vzhledem k nedostatečnému množství kontrolního materiálu nebyly výsledky měření validní. Bias bude ověřen po nasazení metody do provozu při měření dalšího cyklu EHK.

#### **Mezilehlá preciznost:**

Mezilehlá preciznost metody byla vyhodnocena z výsledků vnitřní kontroly kvality na 2 koncentračních hladinách, po vyloučení odlehlých výsledků.  
Data a vyhodnocení viz příloha 1.

#### **Rozšířená relativní kombinovaná nejistota:**

Výrobce neuvádí nejistotu kalibrátoru, rozšířená nejistota vypočtena jako dvojnásobek CV.  
 $U_C = 9,88 \%$

### Shrnutí a závěr:

Cíle verifikace byly splněny. Metoda byla verifikována, byl vypracován postup na provádění VKK při rutinním použití a definována kritéria pro reverifikaci.

**Verifikace prokázala, že všechna kritéria byla splněna.**

Bylo také provedeno srovnání výsledků na 23 patientských vzorcích změřených na původní reagenti (Buhlmann) a novou reagentii (CerTest) na analyzátoru Atellica. Byl vypočten korelační koeficient a sestaven Bland-Altmanův graf, viz příloha. Výsledky spolu vzájemně korelují, metody jsou srovnatelné.



Verifikační protokol	
Formuláře/ Formuláře systému kvality s hlavičkami reduk.	
číslo	: FM-040
verze	: 02
kopie č.	:
strana	: 1 z 2
platí od	: 06.06.2016
přílohy	:
datum tisku	: 12.07.2023

### Postup pro kontrolu metody při rutinním použití – kontrola způsobilosti systému

Frekvence kontroly:

Kontrolní materiál na 1-2 koncentračních hladinách je vyšetřován minimálně jednou během 24 hodin s výjimkou víkendu (v pondělí obě, pak se střídají, o víkendu se kontroly neměří). Je hodnocen regulační diagram a jsou sledována Westgardova pravidla. Pokud je výsledek v mezích, je metoda použitelná. Pokud ne, je třeba najít příčinu problému a odstranit ji.

### Kritéria pro reverifikaci metody:

- Při podezření na změnu parametrů metody – změna postupu dodavatele při zachování CE
- Při přetrvávajícím problému vnitřní kontroly kvality
- Po uplynutí doby platnosti předchozí verifikace (1 rok)
- Neshoda výsledků v EHK – provede se opakovanost a bias.
- Při rozšíření použití stávající metody (př. o další druh biolog. materiálu)

Další poznámky:

.....  
.....

Datum: 7. 6. 2023

Verifikaci provedl:

Schválili: .....

MK

Vedoucí úseku

Zástupce vedoucího pro lab. č.

---

Příloha 1: výpočty a grafy

Příloha 2: dokumentace k použitému kontrolnímu materiálu z EHK

Příloha 3: primární data z analyzátoru – evidováno elektronicky