



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Stanovení kalprotektinu u pacientů s autoimunitní chorobou

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [Specializace ve zdravotnictví](#)

Autor: Klára Zázvorková

Vedoucí práce: Mgr. David Benda

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „*Stanovení kalprotektinu u pacientů s autoimunitní chorobou*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 26.7.2022

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala mému vedoucí práce Mgr. Davidu Bendovi za pomoc při výběru tématu práce a cenné rady při zpracování. Také bych chtěla poděkovat celé své rodině a blízkým za podporu nejen při studiu.

Stanovení kalprotektinu u pacientů s autoimunitní chorobou

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá autoimunitními onemocnění GIT a laboratorním stanovením kalprotektinu metodou chemiluminiscence. V teoretické části jsem se zaměřila na jednotlivá onemocnění, jejich popis a možnosti léčby. Hlavní část práce je věnována laboratorní diagnostice kalprotektinu ze stolice, který je aktuálně jedním z hlavních diagnostických markerů IBD. Statisticky jsem zhodnotila 300 vzorků u pacientů, u kterých lékař má podezření na idiopatické střevní onemocnění. Cílem této práce bylo zjištění, zda IBD postihuje více určité věkové skupiny obyvatelstva, nebo pohlaví, dále korelace pozitivních výsledků kalprotektinu s metodami p-ANCA a ASCA.

Klíčová slova

idiopatické střevní onemocnění, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, celiakie kalprotektin, chemiluminiscence, ASCA, ANCA

Determination of calprotectin in patients with autoimmune disease

Abstract

Bachelor thesis deals with autoimmune GIT diseases and laboratory determination of calprotectin by chemiluminescence method. In the theoretical part I focused on individual diseases, their description and treatment options. The main part of the thesis is devoted to the laboratory diagnosis of calprotectin from stool, which is currently one of the main diagnostic markers of IBD. I statistically evaluated 300 samples in patients in whom the physician suspects idiopathic bowel disease. The aim of this work was to determine whether IBD affects more certain age groups or gender, as well as the correlation of positive calprotectin results with p-ANCA and ASCA methods.

Key words

idiopathic bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, celiacs, calprotectin, chemiluminescence, ASCA, ANCA

Obsah

ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1. AUTOIMUNITA	10
1.1. <i>Autoimunitní onemocnění GIT</i>	10
1.2. <i>Faktory vzniku</i>	11
1.3. <i>Rozdělení</i>	12
2. CROHNOVA CHOROBA	13
2.1. <i>Dělení Crohnovy choroby</i>	13
3. ULCERÓZNÍ KOLITIDA	16
3.1. <i>Dělení ulcerózní kolitidy</i>	16
4. CELIAKIE	18
4.1. <i>Formy celiakie</i>	18
5. NESPECIFICKÝ STŘEVNÍ ZÁNĚT	20
6. KOMPLIKACE IBD	21
6.1. <i>Lokální střevní komplikace</i>	21
6.1.1. <i>Toxický megakolon</i>	21
6.1.2. <i>Perianální absces a píštěl</i>	21
6.1.3. <i>Stenóza</i>	21
6.2. <i>Mimostřevní komplikace</i>	22
6.3. <i>Metabolické komplikace</i>	22
7. DIAGNOSTIKA	23
7.1. <i>Laboratorní diagnostika</i>	23

7.1.1.	Autoprotilátky	23
7.1.2.	Další laboratorní testy	25
7.2.	<i>Ultrasonografické vyšetření</i>	25
7.3.	<i>Kontrastní rentgenové a zobrazovací metody</i>	25
7.4.	<i>Endoskopická vyšetření</i>	26
7.4.1.	Kolonoskopie	26
7.4.2.	Kapslová endoskopie	26
7.4.3.	Enteroskopie	26
8.	LÉČBA	27
8.1.	<i>Medikamentózní léčba</i>	27
8.1.1.	Aminosalicyláty	27
8.1.2.	Imunosupresiva	27
8.2.	<i>Biologická léčba</i>	28
8.3.	<i>Chirurgická léčba</i>	28
8.4.	<i>Podpůrná a doplňková léčba</i>	29
8.4.1.	Enterální výživa	29
9.	CROHNOVA NEMOC A ULCERÓZNÍ KOLITIDA U DĚTÍ	30
9.1.	<i>Léčba u dětí</i>	30
10.	KALPROTEKTIN	31
10.1.	<i>Úloha kalprotektinu</i>	31
10.2.	<i>Metody stanovení</i>	32
10.2.1.	Kvalitativní měření kalprotektinu	32
10.2.2.	Kvantitativní měření kalprotektinu	32
10.2.3.	Point-of-Care Tests	32

PRAKTICKÁ ČÁST	34
1. CÍLE PRÁCE, VÝZKUMNÉ OTÁZKY A HYPOTÉZY	34
2. METODIKA	35
2.1. <i>Preanalytická fáze</i>	35
3. PRINCIP	37
4. STANOVENÍ KALPROTEKTINU	38
4.1. <i>Příprava analyzátoru</i>	38
4.2. <i>Reagencie</i>	39
4.3. <i>Kalibrace</i>	40
4.4. <i>Interní kontroly</i>	41
4.5. <i>Měření vzorků</i>	41
4.6. <i>Výsledky</i>	42
5. VÝSLEDKY A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ	43
5.1. <i>Základní statistické údaje</i>	43
5.2. <i>Výzkumné otázky a hypotézy</i>	44
6. DISKUZE	48
7. ZÁVĚR	51
Literatura	52
Seznam obrázků, grafů, tabulek a zkratk	59
Seznam obrázků	59
Seznam grafů	59
Seznam tabulek	60
Seznam zkratk	60

ÚVOD

Onemocnění trávicího traktu jsou čím dál častějším problémem současné populace. Idiopatické střevní záněty (IBD) patří mezi chronická zánětlivá onemocnění střev, u kterých není zcela známa příčina vzniku. Jako možné faktory přispívající k rozvoji těchto onemocnění můžeme považovat genetickou výbavu, skladbu potravin, infekce střevní sliznice, kouření atd. V poslední době lze již hovořit o globálním onemocnění vyskytujícím se převážně v průmyslově urbanizované společnosti, se stále se zvyšující incidencí. Mezi tyto onemocnění řadíme Crohnovu chorobu, která může postihnout jakoukoli část gastrointestinálního traktu, a ulcerózní kolitidu, jež je primárně lokalizována na sliznici tlustého střeva a konečníku. Včasné stanovení diagnózy, sledování akutního stavu pacienta a započetí léčby může výrazně zmírnit komplikace a následky vyplývající z těchto onemocnění. Toto se však zatím neobejde bez invazivních metod vyšetření, která nejsou pro pacienta vždy příjemná. Zavádění nových neinvazivních a snadněji dostupných vyšetřovacích metod je velmi přínosné pro pacienty i pro lékaře. Stanovení množství kalprotektinu ve vzorku stolice je jedním z nich. Z laboratorního hlediska je nutné zvolit dostatečně citlivou a správnou metodu stanovení, která bude korelovat s klinickými projevy těchto onemocnění. (Halling, M. L., 2017).

V první části práce teoreticky popisují jednotlivé choroby idiopatických střevních zánětů, zaměřují se na hlavní rysy, projevy a lokalizaci. Dále se zabývám jednotlivými diagnostickými postupy nemocí IBD a jejich následnou léčbou. Závěr teoretické části se týká popisu kalprotektinu, jeho charakteristiky, významu v IBD a možností stanovení. V praktické části se budu zabývat laboratorním stanovením tohoto proteinu a statisticky vyhodnotím výsledky poskytnuté laboratoří Klinické imunologie a alergologie AeskuLab Praha.

Pro bakalářskou práci jsem si toto téma vybrala z důvodu, že problematika idiopatických střevních zánětů se mne dotýká, jelikož mám ve svém okolí několik osob trpících tímto onemocněním. Osobně jsem zažila, jak jim toto onemocnění komplikuje životy a jak náročné je s touto chorobou žít.

TEORETICKÁ ČÁST

1. AUTOIMUNITA

Imunitní systém je soubor mechanismů, kterými je organismus schopen rozpoznat a eliminovat vlastní, cizí a škodlivé struktury, a tím zajistit integritu organismu. Pokud je tato funkce narušena, imunitní systém začne rozeznávat vlastní tkáně a orgány, reaguje na ně, a tím je poškozuje. Tento děj se může objevit i fyziologicky, například u odstraňování poškozených buněk. (Hořejší V., 2013), (Ferenčík M., 2005) Diagnostika těchto stavů vyžaduje interakci klinické části s částí laboratorní praxe. (Kostelník A., 2018) Autoimunitní onemocnění se dělí především podle lokalizace postižené oblasti v těle. Základní rozdělení autoimunitního onemocnění je systémové, lokalizované a orgánově specifické. Na vzniku autoimunitních onemocnění se podílí několik vnějších i vnitřních faktorů. Můžeme tedy říci, že autoimunita má multifaktoriální charakter. (Hořejší V., 2013) K typicky lokalizovaným autoimunitním onemocněním patří nespecifická zánětlivá onemocnění střev – Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, které postihují gastrointestinální trakt a patří mezi tzv. nespecifické enteritidy. Kromě toho také celiakie, jež se vyznačuje nesnášenlivostí lepku v obilí. (Harris, J., 2016), (Závada F., 2010)

1.1. Autoimunitní onemocnění GIT

Stejně, jako u jiných autoimunitních onemocnění, není etiologie zcela jasná a liší se nemoc od nemoci. V důsledku autoimunitního procesu dochází k patologickým změnám v trávicím traktu, které mohou být slizniční (ulcerózní kolitida, celiakie), nebo transmurální (Crohnova choroba) a vedou ke vzniku píštělů, abscesů nebo vředů. (Keil, 2012) Kromě střev mohou být postiženy i další části trávicího traktu, od úst až po řitní otvor. Mohou se objevit i mimostřevní projevy, z nichž nejčastější jsou bolesti kloubů, otoky, kožní projevy, záněty očního pozadí, chudokrevnost, nebo poruchy kostního metabolismu. (Lata, 2010) Jedná se tedy o chronické poškozující záněty s případnou remisí onemocnění. Označujeme je jako idiopatické střevní záněty, nebo nespecifické

střevní záněty (inflammatory bowel disease – IBD). „Nespecifické“ – z dosud nepoznaných příčin a nezcela prozkoumané patogeneze.

1.2. Faktory vzniku

Za možnou příčinu vzniku idiopatických střevních zánětů můžeme považovat sníženou rozmanitost střevní mikroflóry, zejména některých druhů enterokoků, proteobakterií i kvasinek, zvláště u Crohnovy choroby. Lidé, kteří v minulosti prodělali bakteriální nebo virové infekce (např. hepatitida, mononukleóza), mají také vyšší pravděpodobnost rozvoje autoimunitních onemocnění. Další příčinou může být genetická predispozice pacienta, nebo pohlaví. Ženy jsou náchylnější k autoimunitním onemocněním než muži a někdy je u nich několikrát vyšší pravděpodobnost rozvoje onemocnění. (J.Ehrmann, M. Konečný, 2011), (J. Krejsek, 2016), (Kostelík A. 2018), (Lukáš M., 2020) Perorální antikoncepce může negativně ovlivnit výskyt IBD díky trombogenním vlastnostem.

Strava je důležitým aspektem, kdy vysoký příjem vlákniny, ovoce a zeleniny může chránit před rozvojem onemocnění. (E. V. Loftus ml, 2004) (T. Greuter, C. Manser, V. Pittet 2020)

Průměrná délka života lidí s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou se za poslední desetiletí výrazně prodloužila – o 6,2 %. Můžeme tedy říci, že délka života populace pacientů s IBD se ve výsledku neliší od průměrné délky života české populace. (Lukáš M. 2020)

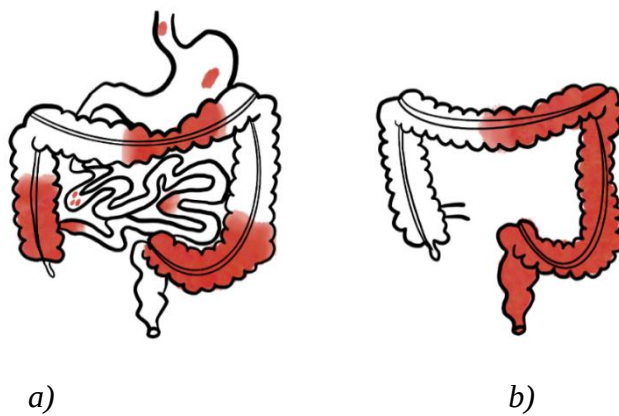
1.3. Rozdělení

Mezi autoimunitní choroby GIT můžeme zařadit:

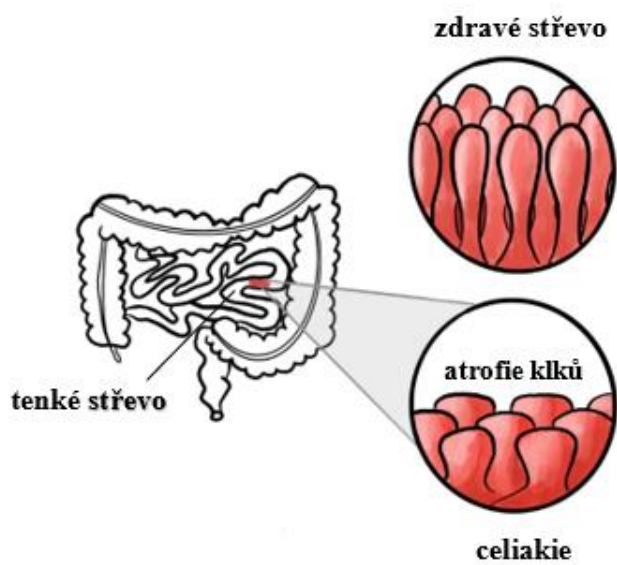
Crohnovu chorobu

Ulcerózní kolitidu

Celiakii



Obr. 1 a) Crohnova choroba, b) ulcerózní kolitida (vlastní ilustrace)



Obr. 2 Celiakie (vlastní ilustrace)

2. CROHNOVA CHOROBA

Crohnova choroba je chronické onemocnění, jež postihuje gastrointestinální trakt. Je charakterizováno transmurálním granulomatózním zánětem, který probíhá diskontinuálně a má tendenci vytvářet píštěle. Způsobuje léze od úst až po konečník a může vyústit i v mimostřevní komplikace. Většina případů je omezena na distální část tenkého a tlustého střeva. (Veauthier B, 2018) Crohnova choroba bývá nejčastěji diagnostikována u mladých lidí ve věku 18–35 let, jde však pouze o orientační věk, onemocnění se může objevit v kterékoli fázi života. Zhruba 15 % všech diagnostikovaných případů se poprvé objeví ve vyšším věku. Výskyt starších dospělých s nově diagnostikovanou Crohnovou chorobou v posledních letech neustále stoupá, ročně se zvyšuje o 5 % a celková prevalence je 1 ze 160 starších dospělých. Příznaky onemocnění jsou velice odlišné a záleží na místě zánětu v trávicí trubici. Můžeme však pozorovat tři hlavní příznaky: bolest břicha, průjem (může obsahovat hlen a krev) a hubnutí. Bolest je křečovitá a objevuje se především po jídle do 30–60 minut. (Ranasinghe I.R., 2020) (Nachand D. 2020)

Zánět na tlustém střevě provází krvácivé průjmy, hnisavé projevy konečníku, ale i mimostřevní projevy, jako je artritida, záněty rohovky a erytém. U zánětu tenkého střeva chybí průjmy i mimostřevní projevy, avšak může dojít k neprůchodnosti. V oblasti konečníku a řitního otvoru můžeme zaznamenat hnisavé projevy, abscesy, píštěle, vředy a bolestivé výrůstky v konečníku. (Lukáš M. 2009), (Ranasinghe I.R., 2020)

2.1. Dělení Crohnovy choroby

Ileokolitida – zánět, který postihuje terminální ileum a tlusté střevo. Je to nejčastější forma. Mezi příznaky řadíme krvácení, perforace a obstrukce, tvorba píštěl a abscesů. Často může dojít i k orálnímu poškození.

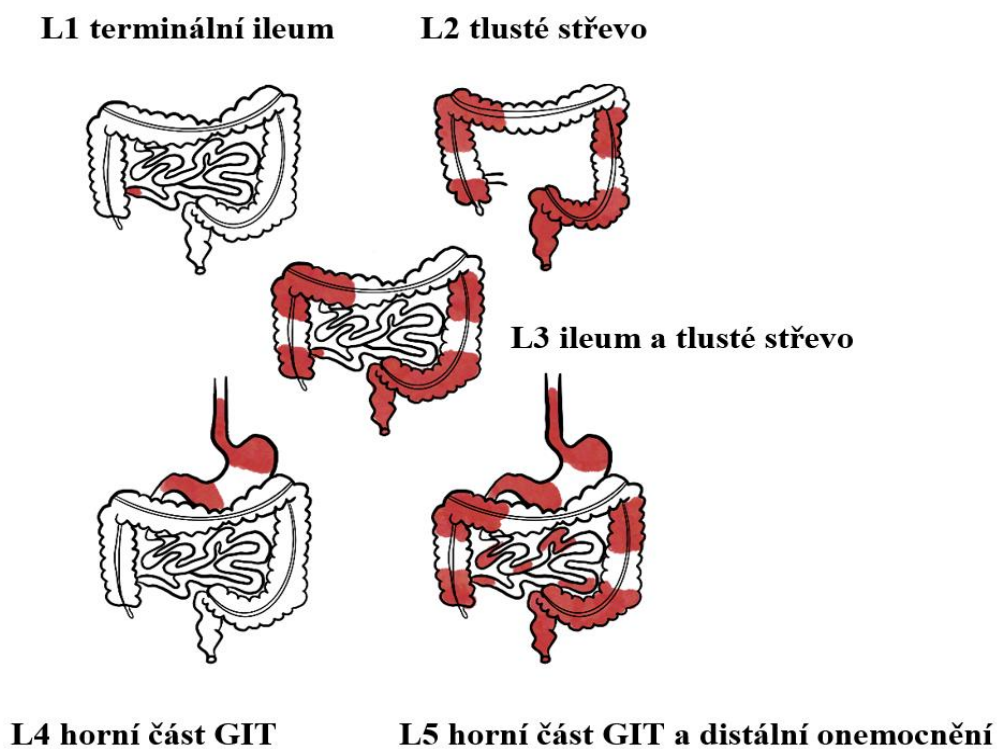
Ileitida – zánět postihující konec ilea, vyskytuje se v 25–35 % případů. Příznaky jsou velmi silné křeče, perforace střeva, abscesy a tvorba píštělí.

Apendicitida – je často spojena s ileitidou. Probíhá v 50 % případů.

Kolitida – zánět vyskytující se ve 30 % případů, často doprovázený perianálními a mimo gastrointestinálními projevy.

Jejunoileitida – zánět, který postihuje ileum i jejunum. Nastává pouze v 5 % případů. Chirurgická léčba je zde nejčastější volbou při léčbě píštělů a abscesů.

Gastroduodenální postižení – onemocnění žaludku a dvanáctníku, při kterém se na stěně objeví jeden či více vředů. Tato forma vzniká u 0,5 až 4 % případů. (Lukáš M., 2007)



Obr.3 Montrealská klasifikace (vlastní ilustrace)

U pacientů velmi často dochází ke střídání relapsů a remisí onemocnění. Příčina není známa, ale může záviset na interakci mezi genetickou predispozicí, faktory prostředí a slizniční imunitou. Pacienti s Crohnovou chorobou jsou vystaveni zvýšenému riziku rakoviny, osteoporózy, anémie, nedostatků ve výživě, deprese, infekce a trombotických příhod. (Wofl J.H., 2020), (Veauthier B. 2018)

Po stanovení diagnózy Crohnovy choroby by měli být pacienti fenotypizováni podle Montrealské klasifikace (obr. 3) a vyšetřeni na mimostřevní projevy a přidružená autoimunitní onemocnění. Hodnocení aktivity onemocnění v kombinaci s fenotypem a endoskopickými znaky umožňuje lékařům zvolit nejlepší možný léčebný režim, protože tyto faktory jsou důležitými prediktory průběhu onemocnění a komplikací. (Baumgart D.C. 2012)

Pacienti s Crohnovou chorobou mají dnes vynikající prognózu dlouhodobého přežití a přijatelné kvality života. Nové léky, nutriční terapie, pokroky ve vývoji chirurgické techniky, lepší pooperační péče a rozpoznání rizika rakoviny zlepšily vyhlídky. (Cohen R.D., 2002)

3. ULCERÓZNÍ KOLITIDA

Ulcerózní kolitida (dříve zvaná Idiopatická proktolitida) je chronické zánětlivé onemocnění sliznice tlustého střeva, které začíná v konečníku a postupuje proximálně kontinuálním způsobem částí nebo celým tlustým střechem. Je to vyčerpávající, celoživotní, recidivující a remitentní onemocnění s nepředvídatelným průběhem. (Ordas I. 2012) Zkušenosti lékařů ukazují, že pro chování a rozvoj onemocnění jsou kritické první tři roky po diagnóze.

Klinický obraz je určen třemi hlavními faktory. Nejdůležitější je celkový stupeň zánětu, na druhém místě je proměnlivá intenzita zánětu a na třetím je přidružená dysfunkce střev. Jejich kombinace vytváří u každého pacienta klinické obtíže různé intenzity, i když povaha obtíží ulcerózní kolitidy je na rozdíl od Crohnovy choroby velmi stereotypní. (Lukáš M. 2009) Ulcerózní kolitida se může objevit v různých formách.

3.1. *Dělení ulcerózní kolitidy*

Proktitida – zánět, který postihuje poslední část tlustého střeva – konečník. Nástup zánětlivých změn na normální sliznici je náhlý. Jedním z rysů této formy onemocnění je časté nutkání na stolic.

Levostranná kolitida – postihuje levou stranu tlustého střeva a konečník. Mezi příznaky patří průjmovitá stolice a krvácení z konečníku, bolesti břicha na levé straně a silný úbytek hmotnosti. Tuto formu může doprovázet zvýšená teplota a bolesti břicha. Postihuje až 45 % případů

Fulminantní kolitida – nejhorší forma, postihuje již zmíněné části střeva, ale také příčný tračník a v některých případech i celé tlusté střevo. Projevuje se jako silná bolest, která může vést až k dehydrataci a šoku. Pacienti jsou tak v ohrožení i dalšími komplikacemi, jako je fulminantní průběh nemoci, toxický megakolon nebo dokonce perforace střeva. (Kohout, Pavlíčková, 2006), (Lukáš M. 2009)

Průběh onemocnění je charakterizován epizodami relapsů a remisí. Po atace následuje dlouhodobá remise, které se vyskytuje asi u 5 % nemocných. Během remise se relapsy obvykle vyskytují více než dvakrát ročně, u zřídka intermitujícího průběhu jednou a méně krát do roka. (Gabalec L. 2009) Není známo, co způsobuje relaps ulcerózní kolitidy, gastroenterologové se domnívají, že důležitou roli v recidivách hraje psychický stres, také užívání širokospektrých antibiotik a virové respirační infekce. Jako poslední možnost jsou například nedávné infekce salmonelou nebo kampylobakterem. (Pravda J. 2019) U některých žen tělo negativně reaguje na těhotenství a hormonální antikoncepci. Na jaře a na podzim je frekvence recidiv výrazně vyšší. Otázkou zůstává, zda to ovlivňuje roční období, nebo spíše v létě neprožíváme tolik stresu. (Lukáš M. 2009)

Pacienti s ulcerózní kolitidou mají zvýšené riziko vzniku rakoviny tlustého střeva a měli by pravidelně podstupovat kolonoskopii, počínaje osmi až deseti lety po stanovení diagnózy.

4. CELIAKIE

Celiakii řadíme mezi multifaktoriální onemocnění, tedy způsobují ji nejen vlivy prostředí, ale i řada imunitních a genetických faktorů. (Therrien A. 2020)

Geny lokalizované na 6. chromozomu HLA DQ1 a DQB1 kódující histokompatibilní antigeny II. třídy DQ2 a DQ8 a stejně jako tkáňová transglutamináza mají rozhodující vliv na patogenezi celiakie. (Lukáš M., 2020) Tento HLA epitop s kombinací zbytků lepku v potravinách (deaminoglidin) vede k patologické reakci organismu, která má za následek zánět sliznice tenkého střeva s následnou enteropatií a atrofií střevních klků.

Lepek je obecné označení pro bílkoviny rozpustné v alkoholu, které jsou přítomny v různých obilovinách, včetně pšenice, žita, ječmene. Podstatou poškození střevní sliznice je metabolismus gliadinu, který je součástí lepku. Gliadin je trávicími šťávami přeměněn na peptid, který je po vstupu do střevních klků redukován tkáňovou transglutaminázou a následně zachycen buňkou prezentující antigen.

Prevalence celiakie je v populaci vysoká, uvádí se od 1:200 do 250. Odhaduje se, že na každého pacienta s diagnózou celiakie připadá 5–7 neznámých. (Giacomo C. 2019)

4.1. *Formy celiakie*

V současné době rozlišujeme několik forem celiakie na základě příznaků a nálezů na biopsii střeva. Nejčastějším projevem je objev pozitivních autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze a protilátek proti endomysiu.

Klasická forma (gluten-senzitivní enteropatie) – postihuje asi 1 z 10 pacientů. Projevuje se typickými příznaky, jako jsou průjem, řídká stolice, nadýmání, bolesti břicha, nevolnost nebo změny na střevní sliznici. Děti mohou zaznamenat vývojové opoždění – souvisí s poruchami osifikace a svalovou slabostí. Plně vyvinutá forma se projevuje malabsorpcí tuku a vitamínů rozpustných v tucích.

Subklinická (atypická) forma – charakterizována přítomností neobvyklých symptomů. Typické příznaky se většinou neprojevují v tenkém střevě, ale postihují spíše jiné části těla a mohou v podstatě ovlivnit jakýkoli orgán. Je to například autoimunitní tyreoiditida,

diabetes I. typu, mohou se objevit i neurologické a psychické problémy (deprese, úzkosti, migréna) a poruchy reprodukce. Ženy mohou být náchylné k potratu a předčasnému porodu.

Tichá forma – žádné příznaky celiakie, proto ji velmi těžko rozpoznáme. Vyznačuje se pozitivními protilátkami v krvi a můžeme pozorovat histologické změny na střevní sliznici.

Latentní forma – bývá bez příznaků. Nejsou viditelné ani změny na střevní sliznici. Jediným znakem této formy je často pozitivní protilátka proti tkáňové transglutamináze. (Frič, Mengerová, 2008), (Suchá V. 2015), (Kostelík A. 2018)

Stanovení správné diagnózy může být někdy zdlouhavé kvůli široké škále příznaků. Střevní příznaky jsou častější u dětí kolem 3 let (zácpa, zvracení, bolesti břicha), extraintestinální příznaky (Duhringova dermatitida, anémie, deprese) jsou častější u dospělých. Příznaky mohou kolem puberty ustoupit nebo dokonce úplně vymizet (v dospělosti se však vrací). Tato skutečnost komplikuje včasnou diagnostiku a v důsledku toho je typ onemocnění často objeven až roky po objevení symptomů. (Medicína pro praxi [online], 2011), (Kostelík A. 2018)

Při podezření na celiakii se testování provádí ve dvou fázích. První je detekce přítomnosti protilátek proti tkáňové transglutamináze (antiTTG) a endomysiu (EMA), které jsou klíčovými markery onemocnění. Pokud se potvrdí negativní výsledek ve třídách IgA a IgG (tím eliminujeme případný imunodeficit imunoglobulinu A), lze téměř vyloučit diagnózu celiakie. Pozitivní výsledky anti-TTG se mohou vzácně objevit u chronických stavů, jako je onemocnění jater či ledvin. Další fází po sérologickém vyšetření může následovat slizniční biopsie tenkého střeva. Standardní histologické vyšetření biopsie sliznice, odebrané z proximální oblasti tenkého střeva, je nejspolehlivější metodou pro diagnostiku celiakie. Dalšími nespecifickými markery ke kontrole mohou být například snížené hodnoty folátu nebo vitamínu B12 indikující malabsorpci. (Lukáš M., 2020), (Kostelík A. 2018), (Medicína pro praxi [online], 2011)

5. NESPECIFICKÝ STŘEVNÍ ZÁNĚT

Nespecifické zánětlivé střevní onemocnění (IBDU) je nejvzácnější z podskupin IBD. Jedná se o chronické onemocnění gastrointestinálního traktu. IBDU je charakterizována klinickými a endoskopickými příznaky chronické kolitidy bez specifických znaků pro ulcerózní kolitidu nebo Crohnovu chorobu, ale má spíše rysy obou. (Dignass, 2012)

IBDU u dětí je dvakrát častější než onemocnění dospělých.

Termín IBDU se používá v případech kolitidy, kdy endoskopický a histologický nález neumožňuje rozlišit ulcerózní kolitidu od Crohnovy choroby. (Thurgate L.E, 2019)

6. KOMPLIKACE IBD

Je známo, že jakákoli nemoc může vést ke komplikacím, a Crohnova choroba ani ulcerózní kolitida nejsou výjimkou. (Nair M., 2015) Mezi komplikace můžeme zařadit těžké záněty střeva, nebo imunitní reakce, případně malabsorpce některých živin či žlučových kyselin. (Lukáš M. 2009)

6.1. Lokální střevní komplikace

Střevní komplikace zahrnují pouze ty, které se vyskytují v gastrointestinálním traktu, od dutiny ústní až po konečník.

6.1.1. Toxický megakolon

Jedná se o velmi vzácnou komplikaci, při které se tlusté střevo zvětšuje a vzniká neprůchodnost střev. Objevuje se pouze u 2 až 4 % pacientů s ulcerózní kolitidou. (Lukáš M. 2009)

6.1.2. Perianální absces a píštěl

V případě úniku obsahu střeva do pobřišnice vzniká tzv. absces. Pokud je střevní obsah přítomen v blízkých orgánech nebo proniká do břišní stěny, vytvoří se píštěl. (Lukáš K., Hoch J., 2018) Tyto dvě typické komplikace Crohnovy choroby postihují tlusté střevo. Jsou tak běžné, že je někteří odborníci považují za charakteristický znak určitého podtypu onemocnění. (Lukáš M. 2009)

6.1.3. Stenóza

Zúžení průsvitu střeva se vyskytuje u 30 až 40 % lidí s Crohnovou chorobou. Výrazná stenóza průsvitu střeva vede k obstrukci střevní průchodnosti, která se projevuje křečovitými bolestmi břicha, zvracením a výraznými střevními zvuky. Často postihuje tenké střevo. (Lukáš M. 2009)

6.2. *Mimostřevní komplikace*

Nejčastější problémy jsou v oblastech kůže, očí, jater a kloubů. Na kůži se tvoří erytém zvaný nodózní a hluboké rány. Pacienti jsou také citliví na záněty spojivek, rohovky, duhovky, řasnatého tělíska a očního bělma. Jedná se o viditelnou a bolestivou komplikaci, ale nezanechává žádné trvalé následky. (Červenková R., 2009), (Lukáš M. 2009)

6.3. *Metabolické komplikace*

Jsou způsobeny poruchou vstřebávání živin nebo vedlejším účinkem užívaných léků (zejména kortikosteroidů). Mezi metabolické komplikace můžeme zařadit osteoporózu (řídnutí) kostí, která je způsobena zvýšenou degradací anorganických látek díky dlouhodobé léčbě kortikosteroidy. Chudokrevnost, zvýšená ztráta krve a snížená absorpce železa vedou k anémii, což je charakteristický znak zvýšené zánětlivé činnosti střev. Po resekci tenkého střeva může dojít k narušení vstřebávání žlučových kyselin, a tím k výskytu žlučových kamenů (Lukáš M. 2009)

7. DIAGNOSTIKA

Diagnostiku lze rozdělit do čtyř skupin:

- laboratorní vyšetření;
- ultrasonografické vyšetření;
- kontrastní rentgenové a zobrazovací vyšetření;
- endoskopické vyšetření.

7.1. *Laboratorní diagnostika*

Laboratorní diagnostika je dnes nezbytnou součástí medicíny, je s ní neodmyslitelně spjata a často určuje rychlost diagnózy a zahájení správné léčby. (Kostelík A. 2018) V následujícím odstavci představíme některé laboratorní metody diagnostiky vybraných autoimunitních onemocnění a uvedeme jejich výhody a nevýhody.

7.1.1. *Autoprotilátky*

Protilátky, které korelují se zánětlivými střevními onemocněními, se hledají již více než 30 let, avšak teprve v posledních 10 letech se začaly objevovat markery specifické pro dané onemocnění. První informace u zánětlivých střevních onemocnění zahrnovaly souvislost mezi podtypem antineutrofilních cytoplazmatických protilátek (ANCA) a pacienty s ulcerózní kolitidou. Tento podtyp ANCA, známý jako pANCA, nereaguje na stejné antigeny jako ANCA spojené s Wegenerovou granulomatózou a jinými vaskulitidami. (Weiner M. 2016)

ANCA protilátky

Antineutrofilní cytoplazmatické protilátky (ANCA) jsou nejvíce zkoumanými protilátkami u IBD. Vzhledem k jejich vzorům barvení v imunoflorescenci lze ANCA protilátky rozdělit na pANCA – perinukleární, cANCA – cytoplazmatická a xANCA nazývané „atypické ANCA“, jedná se o formu p-ANCA, která není reaktivní na myeloperoxidázu a obvykle vykazuje vzorec kombinovaného perinukleárního a cytoplazmatického barvení. (Al Obaidy T.M.M. 2021)

Protilátky pANCA, které vykazují specifické barvení při nepřímé imunofluorescenci, se vyskytují u 60–70 % pacientů s ulcerózní kolitidou a u 15–20 % pacientů s Crohnovou chorobou. (Vermeire S. 2001)

ASCA protilátky

Protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) namířené proti oligomannosidovým epitopům buněčné stěny jsou sérologickým markerem pro Crohnovu chorobu. Jedna studie také uvádí produkci ASCA protilátek u části nepostižených příbuzných pacientů s Crohnovou chorobou. Mohou se však vyskytovat i u pacientů s ulcerózní kolitidou (5–15 %) a také u pacientů s celiakií. ASCA pozitivita u ulcerózní kolitidy může upozorňovat na možný neúspěch anti-TNF terapie. (Vermeire S. 2001), (Sendid B. 1998), (Gabalec L. 2009)

Diferenciální diagnostika Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy

Tabulka 1: Crohnova choroba

ASCA	+
ASCA IgA	+
ASCA IgG	+
pANCA	-
Senzitivita	50-70 %
Specifita	100 %

Tabulka 2: Ulcerózní kolitida

ASCA	-
pANCA	+
Senzitivita	82 %
Specifita	83 %

7.1.2. Další laboratorní testy

Mezi další testy laboratorní diagnostiky můžeme zařadit odběr krevního obrazu s diferencíálem pro záchyt anémie. A také C-reaktivní protein, který je marker akutního zánětu, nebo můžeme použít i krev na sedimentaci.

Také je nutné vyloučit jiné příčiny průjmu, bolesti břicha a kolitidy, jež mohou vyvolat virové nebo bakteriální infekce, paraziti či jiné chronické stavy. Vzorek se odesílá na mikrobiologické či parazitologické vyšetření. (Holubová A. 2013)

7.2. Ultrasonografické vyšetření

Jde o nejméně invazivní metodu, kterou lze vyšetřit břišní dutinu. Na základě vyšetření může lékař určit rozsah infekce a předejít tak pozdějším komplikacím, což je velmi důležité pro správnou volbu terapie a sledování. Využíváme ji zejména u pacientů s Crohnovou chorobou, jelikož zde můžeme sledovat celou tloušťku střevní cesty. (Lukáš M. 2009)

7.3. Kontrastní rentgenové a zobrazovací metody

Kontrastní rentgenové metody se primárně používají při Crohnově chorobě, kdy bylo postihnuto tenké střevo. Používáme kontrastní látku, jedná se tedy o tzv. enteroklýzu. Kontrastní látka (nejčastěji roztok barya a metylcelulózy) projasní stenózy, praskliny a píštěle, které se tvoří v jednotlivých částech gastrointestinálního traktu. (Holubová A. 2013), (Lukáš M. 2009)

Rentgenové snímání může nahradit i počítačová tomografie (CT) se spojením s enteroklýzou. Lékař tímto způsobem získá celkový obraz dutiny břišní. Velkou výhodou je podrobné prohlédnutí sliznice i celé střevní stěny.

Magnetická rezonance má největší vliv na diagnostiku u pacientů se zánětem konečníku. Nevýhodou může být pocit úzkosti, který se může dostavit během vyšetření, jelikož vše probíhá v „ocelovém tunelu“. Proto lidé s cizorodým kovovým materiálem (např. endoprotézou) na magnetickou rezonanci nesmí. (Lukáš M. 2009)

7.4. Endoskopická vyšetření

Endoskopické vyšetření slouží k optickému vyšetření sliznice trávicího traktu pomocí endoskopu. Při tomto vyšetření může být odebrán vzorek z postižené oblasti k histologickému vyšetření pomocí bioptických kleští. Užitečné endoskopické metody zahrnují enteroskopii, gastroskopii, kolonoskopii a rektoskopii. (Lukáš M. 2010)

7.4.1. Kolonoskopie

Kolonoskopie čeká pacienty s ulcerózní kolitidou, Crohnovou chorobou nebo celiakií opakovaně. Týden před plánovaným vyšetřením by pacienti měli vysadit železo a upravit stravu. Tři dny před kolonoskopií pacient dodržuje tzv. bezodpadovou dietu. Dieta zahrnuje omezení vlákniny a nesmí se konzumovat ovoce ani zelenina. Den před vyšetřením by měl mít pacient lehkou snídani bez mléka a mléčných výrobků a k obědu čistý vývar. Dále je zapotřebí střevo zbavit veškerých zbytků potravy, proto se pacientům dává projímadlo obsahující látku makrogol. Je nutné vypít 4 litry během 4 hodin, což je pro některé velmi obtížné. (Lukáš M. 2019) Toto vyšetření je jedno ze základních a nejdůležitějších, jelikož dokáže odlišit i jiné střevní onemocnění.

7.4.2. Kapslová endoskopie

Pacient pozře kapsli s mini fotoaparátem, který zhotoví snímky v průběhu 6 až 8 hodin. Můžeme pozorovat oblast jejunu a ilea. Nevýhodou je možné uvíznutí kapsle v trávicím traktu a následné odstranění enteroskopicky. (Lukáš M. 2019)

7.4.3. Enteroskopie

Umožňuje vyšetření celého tenkého střeva, při kterém lze odebrat vzorky tkáně a následně je odeslat na příslušné dovyšetření. (Lukáš M. 2019)

8. LÉČBA

Léčba IBD je dlouhodobý proces, jelikož se střevní zánět může nacházet v období klidu i v aktivní fázi. Možnost vymizení nemoci či úplné vyléčení onemocnění momentálně spíše neexistuje. Léčba se dělí na chirurgickou a nechirurgickou. Ta zahrnuje medikamentózní léčbu a podávání správné výživy, stejně jako některé endoskopické postupy. (Lukáš M. 2009)

8.1. *Medikamentózní léčba*

Medikamentózní terapií lze zejména potlačit příznaky onemocnění, předejít komplikacím a zajistit odpovídající kvalitu života. Podle léčebných cílů a vybraných léků dělíme medikamentózní terapii na indukční a dlouhodobou udržovací. Indukční terapie má za cíl snížit zánětlivou aktivitu onemocnění a potlačit klinické, laboratorní a endoskopické příznaky onemocnění. K léčbě se používají aminosalicyláty, glukokortikoidy a antibiotika. Udržovací terapie je zaměřena na prevenci recidivy onemocnění a následných komplikací. Aminosalicyláty a imunosupresiva se používají k léčbě remise. (Pavelka K., 2014)

8.1.1. *Aminosalicyláty*

Používají se především u mírné Crohnovy choroby s poškozením v ileokolonické oblasti. Při terapii je nutné zhodnotit účinnost nejpozději do 2–4 týdnů. Pokud toto nefunguje, je potřeba léčbu změnit. (Zbořit V., 2018) Mesalazin je lék používaný hlavně u pacientů s ulcerózní kolitidou a obecně se podává v tabletách, čípcích nebo klystýru. Můžeme jej zařadit mezi nejbezpečnější ze všech léků. (Lukáš M. 2009)

8.1.2. *Imunosupresiva*

Jsou to látky, jež snižují násilnou reakci imunitních orgánů na antigenní stimulaci. Léčba musí být dlouhodobá. Pro příznivé účinky je nutné počkat 3 až 6 měsíců. Tyto léky tedy nejsou vhodné pro úlevu od akutního zánětu, ale jsou vhodné pro udržení klidové fáze onemocnění, nebo když chce lékař omezit či ukončit užívání kortikosteroidů. Nežádoucí

účinky jsou tři: intolerance, alergické reakce a poruchy krvetvorby. Léčba neovlivňuje schopnost otěhotnět nebo vývoj plodu. (Lukáš M. 2009)

8.2. *Biologická léčba*

Biologická léčba je úspěchem moderní medicíny, která se v budoucnu promění v trvalou léčbu IBD. Tato léčba je vhodná zejména pro pacienty s vysokou zánětlivou aktivitou, kteří nereagovali na standardní léčbu kortikosteroidy, imunosupresivy, antibiotiky a aminosalicyláty. Jde o moderní a vysoce účinnou terapii s rychlým nástupem a někdy i výraznými protizánětlivými účinky. Z širšího pohledu rozumíme biologickou terapií aplikaci přirozeně se vyskytujících látek k blokování konkrétních míst zánětlivé reakce. Jde o použití anti-TNF protilátek. Infliximab a Adalimumab jsou v ČR registrovány pro léčbu Crohnovy choroby. K léčbě pacientů s ulcerózní kolitidou je schválen pouze Infliximab, Adalimumab schválen nebyl. (Lukáš M. 2009), (Lukáš M. 2013) Reálná rizika biologické léčby lze shrnout do tří bodů: alergie, infekce, a další abnormální reakce imunitního systému. Nejvýznamnějším rizikem je zvýšený výskyt infekce dýchacích nebo močových cest. (Bortík M. 2019) Největší hrozbou je vyvolání latentní tuberkulózní infekce. Každému pacientovi proto musí před zahájením biologické léčby provést základní vyšetření – rentgenogram hrudníku či tuberkulinový kožní test. Alergické reakce se mohou objevit během infuze nebo 2 až 10 dní po infuzi, proto kvůli nim lékaři pacientům předepisují antihistaminika. (Lukáš M. 2009) Biologická léčba je sice nejúčinnější dostupnou léčbou, ale je extrémně nákladná, a proto je dostupná pouze na vybraných pracovištích. V současné době existuje 23 center po celé zemi. (Lukáš M. 2009)

8.3. *Chirurgická léčba*

U Crohnovy choroby podstoupí operaci každý pacient alespoň jednou za život, ale až u 80 % pacientů se nemoc časem rozvine znovu tak, že dochází k opakovanému chirurgickému zákroku. Léčbu můžeme rozdělit na ileocékální resekci a strikturoplastiku.

Ulcerózní kolitida se chirurgicky řeší ve třech situacích. Pokud medikamentózní léčba nevede ke zklidnění zánětu. Dojde k dysplazii na sliznici tlustého střeva, nebo je průběh zánětu prudký a pacient nereaguje na intenzivní léčbu. Při operaci ulcerózní kolitidy by

mělo být vždy odstraněno celé tlusté střevo, i když je postiženo jen částečně. (Lukáš M. 2009)

8.4. *Podpůrná a doplňková léčba*

Zdravý životní styl a dodržování dietních opatření je jedním z kroků k úspěšné léčbě, a tím k prevenci recidivy. (Mitrová K., 2016) V případě aktivního zánětu je nesmírně důležitá správně nastavená dieta, tedy strava přísně bezezbytková, oproštěná od nerozpustné vlákniny. Pacienti by neměli jíst to, co nemohou strávit, tedy nestrávitelné potraviny, včetně semen, ořechů, ovoce a zeleninových slupek. Během neaktivní fáze není potřeba dietu příliš dodržovat. U velmi závažných chorobných stavů se výživa podává enterální formou nebo parenterálně. (Lukáš M. 2009)

8.4.1. *Enterální výživa*

Tato výživa zcela, nebo částečně nahrazuje běžnou stravu u pacientů s vleklým a aktivním zánětlivým procesem. Důležitou roli hraje u pacientů trpících poruchou růstu a malnutricí a také u dětí a adolescentů, kde se jedná o první volbu v nutriční podpoře. Pokud je u pacienta zvolena enterální výživa, musí být zachována funkce gastrointestinálního traktu. Strava je podávána pomocí sondy, nejčastěji nazogastrickou sondou. Dále můžeme využít perkutánní jejunostomii (PEJ) nebo perkutánní endoskopickou gastrostomii (PEG). (Holubová, Novotná, Marečková, 2013)

9. CROHNOVA NEMOC A ULCERÓZNÍ KOLITIDA U DĚTÍ

Před propuknutí onemocnění obvykle předchází určitý ukazatel. Dítě přestává růst, méně přibývá na váze, samozřejmě pozorujeme i klasické příznaky, jako je bolest břicha, průjmy, ale objevují se až v pozdější fázi. Lékaři často chybně předpokládají, že se jedná o zánět slepého střeva. (Lukáš M. 2009)

9.1. *Léčba u dětí*

Největší roli hraje u dětí strava, převážně u Crohnovy nemoci, jelikož při dodržování dané správně nastavené diety může docházet k remisi onemocnění. Nevýhodou je podávání výživy pomocí nasojejunální sondy.

Kortikoidová léčba se u dětí nedoporučuje a každý pediatr by ji měl důkladně zvážit, jelikož může docházet k zástavě růstu či dalším negativním účinkům, jako je osteopenie, hypertenze atd. Proto musí být podání kortikoidů velice kontrolováno, musí být předepsáno v přesné dávce a podání by mělo být v tom čase, v jakém jej lékař předepsal.

Velkou novinkou v léčbě IBD u dětí je biologická léčba, která je sice přístupná pro děti od šesti let, ale u těžkých forem onemocnění je výhodná natolik, že převyšuje její rizika. (Lukáš M. 2009), (Bortík M. 2019) Anti-TNF terapie je indikována u dětí se střední až vysokou aktivitou onemocnění, jež nereagují na konvenční imunosupresivní léčbu. Léčba dětských pacientů s IBD pomocí biologické léčby musí být přísně individualizovaná a rodiče a pacienti musí být před zahájením léčby řádně informováni o možných rizicích léčby a podepsat informovaný souhlas. (Bronský J., 2013)

10. KALPROTEKTIN

Kalprotektin je protein patřící do rodiny proteinů S-100.1 o velikosti 36,5 KDa vázající na sebe vápník a zinek. Je složen z jednoho lehkého a dvou těžkých řetězců. Uvolňuje se postupně z leukocytů během jejich aktivace, nebo po rozpadu v době buněčného stresu, či poškození sliznice. (Khaki-Khatibi F. 2020) Kalprotektin má několik biologických vlastností, včetně antimikrobiálních, imunomodulačních a antiproliferačních aktivit.

Akumulace neutrofilů ve sliznici, což je vlastnost zánětlivého vzplanutí, má za následek uvolňování fekálního kalprotektinu do stolice, kde může být snadno měřen. Zejména přítomnost kalprotektinu ve stolici kvantitativně souvisí s migrací neutrofilů do gastrointestinálního traktu. Je to užitečný marker střevního zánětu také proto, že na rozdíl od jiných systémových zánětlivých markerů není jeho hladina ovlivněna jinými příčinami zánětu, než jsou střevní. Mnoho studií prokázalo souvislost mezi hladinami kalprotektinu s mírou zánětu, což může být použito jako prostředek ke sledování odpovědi na léčbu a případně k včasné detekci rizika recidivy. (Caviglia GP, 2018), (Okuyama Y., 2016)

10.1. Úloha kalprotektinu

Funkčnost fekálního kalprotektinu jako laboratorního markeru byla studována v různých oblastech diagnostiky i u léčby idiopatických střevních zánětů, včetně odlišení IBD od syndromu dráždivého tračníku. (Khaki F., 2020), (Pathirana W.G. 2018)

Používá se k diagnostice, sledování aktivity onemocnění, vedení léčby a předpovědi relapsu onemocnění a pooperační recidivy u IBD. (Khaki F., 2020), (Pathirana W.G. 2018)

Stanovení kalprotektinu je neinvazivní prediktivní test s vysokou účinností a vysokou citlivostí pro zánětlivé střevní onemocnění, ale i jako marker kolorektálního karcinomu. Kromě toho má mnoho klinických využití, například jeho zvýšená hladina v séru značí různé imunologické a imunopatologické stavy. Hladiny kalprotektinu v séru se rychle zvyšují v reakci na bakteriální infekce ledvin a srdce nebo při odmítnutí transplantátu. Kalprotektin v séru u pacientů s IBD přímo koreluje s hladinami kalprotektinu ve stolici, tím pádem je diagnostice IBD kalprotektinem účinnější ve srovnání s CRP a albuminem. I když je citlivý, není specifický, protože může být zvýšený mimo jiné i u rakoviny

tlustého střeva, divertikulitidy, infekční kolitidy a ischemické kolitidy. (Sridhar M. 2019), (Edith Pérez de Arce 2020)

Při akutním zánětu je hodnota kalprotektinu ve stolici větší než 1000 µg/g. stolice.

U zdravých osob je hodnota fekálního kalprotektinu nulová.

10.2. *Metody stanovení*

Měření fekálního kalprotektinu lze provádět kvalitativně i kvantitativně.

10.2.1. *Kvalitativní měření kalprotektinu*

Při kvalitativním měření se k detekci fekálního kalprotektinu používají monoklonální protilátky a při pozitivním výsledku se zjišťuje, zda je fekální kalprotektin pozitivní. Pozitivní výsledky jsou charakterizovány výskytem barevných čar na testu či kazetě. Při kvalitativním měření se však uvádí pouze pozitivní či negativní výsledky. (Khaki-Khatibi F. 2020)

10.2.2. *Kvantitativní měření kalprotektinu*

Pro kvantitativní hodnocení kalprotektinu lze použít různé metody, většina z nich je založena na enzymovém imunosorbčním testu (ELISA); byly také zavedeny chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA), fluoroenzymové imunoanalýzy (FEIA) a turbidimetrické imunoanalýzy se zvýšeným obsahem částic (PETIA). (Mumolo M.G.,2018)

10.2.3. *Point-of-Care Tests*

Vzhledem k tomu, že test ELISA má řadu nevýhod, jako je časová náročnost, přístrojové vybavení, dlouhá doba provedení a potřeba vědeckých znalostí, staly se v klinických podmínkách populárními testy na kalprotektin point-of-care (POC), i když stále vyžadují odběr vzorku stolice, což snižuje uživatelský komfort. Metodou často používanou v POC testech je sendvičová metoda laterální průtokové imunochromatografie. Vše je dodáváno se softwarovou aplikací pro měření fekálního kalprotektinu, která mění fotoaparát chytrého telefonu ve čtečku výsledků. Tento rychlý test umožňuje pacientům měřit si

hodnoty kalprotektinu ve stolici doma. Výsledky měření se automaticky dostávají také do online databáze monitorovaných pacientů zdravotnického zařízení. (Pathirana W.G.W.,2018), (Maličková K. a kol., 2019)



Obr.4 Diagnostická sada pro domácí měření koncentrace fekálního kalprotektinu (zdroj: Maličková K. a kol., 2019)

PRAKTICKÁ ČÁST

1. CÍLE PRÁCE, VÝZKUMNÉ OTÁZKY A HYPOTÉZY

Cílem bakalářské práce je zmapovat problematiku idiopatických střevních zánětů a přidružených autoimunitních chorob. Jako úkol byl stanoven popis a celkové vyšetření kalprotektinu metodou chemiluminiscence na přístroji LIAISON® XL.

Dále jsme se zabývali vzorky, u kterých byly pomocí imunofluorescence změřeny ANCA protilátky a ASCA protilátky ve třídě IgG i IgA. Díky tomu jsme mohli zmapovat a srovnat pozitivitu kalprotektinu s protilátkami.

Vše jsem mohla také prakticky vyzkoušet na vzorcích z oddělení imunologie společnosti Aeskulab k.s. Praha.

Výzkumnou otázkou je, jak velká je korelace u výsledků kalprotektinu vůči výsledkům stanovení p-ANCA a ASCA protilátek.

Hypotéza se zabývá vyšším výskytem pozitivních nálezů u žen a jeho porovnáním s muži.

2. METODIKA

V praktické části vyzkoušíme práci s analyzátozem LIAISON® XL, na kterém budeme měřit vzorky pacientů a stanovovat hladinu kalprotektinu. V případě pozitivního nálezu budu dále vzorky srovnávány s výsledky u metod ANCA fluorescenčně a ASCA pomocí metody ELISA.

2.1. Preanalytická fáze

Preanalytická fáze v zásadě podmiňuje spolehlivost testu. Nedodržení všech požadavků na preanalytickou fázi má často za následek chybné výsledky, které jsou běžně nedetekovatelné laboratorním kontrolním systémem, přitom přibližně 60 % odchylek od správné hodnoty vzniká v preanalytické fázi.

Preanalytickou fázi můžeme rozdělit na následující části:

Mimolaboratorní fáze

Příprava pacienta před odběrem vzorků závisí na informacích, které pacient dostal od svého ošetřujícího lékaře a jeho disciplíně. Odběr stolice na vyšetření kalprotektinu zvládne pacient sám doma po poučení lékařem, popřípadě pomocí návodu, jež dostane v ordinaci.

Vzorek, nejlépe první ranní stolice, odebírá pacient do prázdné speciální nádoby, jakékoliv jiné čisté nádoby nebo na suchý čistý odběrový papír. Odebíraná stolice nesmí přijít do kontaktu s biologickými či chemickými látkami, například v připravené nádobě, a také s vodou z toalety. Dostačující vzorek je velikosti lískového oříšku.

Stabilita nativní stolice je 5 dní při 2–8 °C, při delším skladování -20 °C.

Laboratorní fáze

U příjmu a identifikace biologického materiálu je třeba dbát na to, aby nedošlo k záměně pacienta, např. při označování zkumavek laboratorními etiketami. Na odběrovou zkumavku je nutné nalepit štítek se jménem a rodným číslem pacienta. Stejně údaje musí obsahovat žádanka. Ta musí obsahovat i datum a čas odběru, kód zdravotnického pracoviště (IČP), diagnózu pacienta a pojišťovnu pacienta.

Při skenování žádanky jsou požadavky na vyšetření automaticky načteny a jsou ověřeny pracovníky na příjmu. Kontrolu je třeba brát vážně, aby nedošlo k vynechání nebo případnému zadání nechtěné metody.

3. PRINCIP

Soupravu LIAISON kalprotektin můžeme zařadit mezi principy sendvičového stanovení. Jedná se o chemiluminiscenční imunoanalytické stanovení (CLIA) *in vitro* určené pro kvantitativní měření fekálního kalprotektinu v lidské stolici. Při tomto stanovení se inkubuje extrahovaný vzorek stolice s paramagnetickými částicemi potaženými monoklonální protilátkou, která se specificky váže na kalprotektinový heterokomplex. Po inkubaci pomocí promývacího cyklu se odstraní nenavázaný materiál. Do reakce se přidá monoklonální protilátka konjugovaná s isoluminolem, která se váže na jiné vazebné místo kalprotektinu a provede se inkubace. Nenavázaný konjugát se odstraní druhým promytím. Poté se přidají startovací činidla, čímž se spustí prudká chemiluminiscenční reakce. Světelný signál se měří fotonásobičem v relativních světelných jednotkách. Množství přítomného kalprotektinu je určeno kalibrační křivkou, která je měřena pomocí kalibračních roztoků před začátkem měření a určuje závislost mezi světelnými jednotkami a koncentrací kalprotektinu přítomného ve vzorcích.

Mezi výhody stanovení kalprotektinu metodami CLIA můžeme zařadit vysokou citlivost, která je důležitým faktorem diagnostické schopnosti měření kalprotektinu pro screeningové účely. Další výhodou je vysoký průchod vzorků analyzátozem, z tohoto důvodu nejsme omezeni počtem pacientů, kteří by se vešli na destičku. Podstatný je i krátký čas detekce.

Nevýhody stanovení jsou vysoké nároky na čistotu samotné analýzy – možná kontaminace vody či reagensů.

4. STANOVENÍ KALPROTEKTINU

4.1. Příprava analyzátoru

Po zapnutí počítače na přístroji a následném spojení s LIS (laboratorní informační systém) se musíme přihlásit do systému analyzátoru. Než budeme pokračovat, musíme analyzátor inicializovat. Toto provedeme stisknutím „STOP“ → „INIT“ (probíhá 15 minut).

Před zahájením práce zkontrolujeme množství pracovních roztoků (starter 1 a 2), stav pevného a tekutého odpadu, kyvet, špiček, vody a promývacího pufru. V případě potřeby či po otevření nové šarže integrálu musíme provést kalibraci.

Denní údržba se provádí vždy až po ukončení všech testů. Integrál *Cleaning tool* vložíme do prostoru pro reagentie, lahvičku v racku L, do prostoru pro vzorky.

„SCHEDULE“ → přiřadit metodu *Clean*.



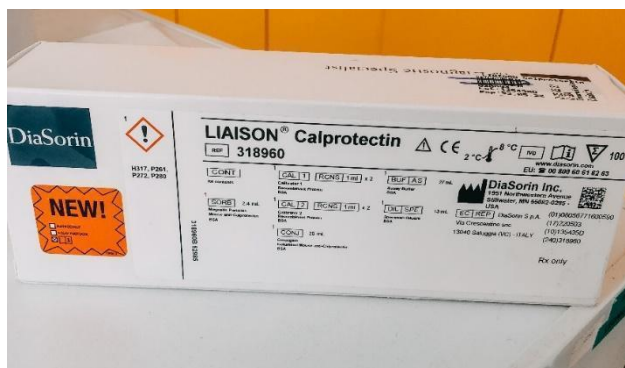
Obr. 5 Analyzátor LIAISON® XL. (zdroj vlastní)

4.2. Reagencie

Pro stanovení kalprotektinu jsme využívali test LIAISON® Calprotectin Assey od firmy DiaSorin.

Set obsahuje činidlo s magnetickými částicemi potažené myší monoklonální protilátkou proti kalprotektinu, konjugát, reakční pufr a činidlo pro ředění vzorků. V balení dále nalezneme reagencie potřebné pro samotnou analýzu, jež zahrnuje lyofilizované kalibrátory, LIAISON® Q.S.E.T. Buffer a LIAISON® Calprotectin Control Set.

Reagencie (integrály) opatrně zbavíme víčka. Reakční kazeta již obsahuje septa, proto dbáme na to, aby se nikde nevyskytovaly kapky ani pěna. Aby bylo možné do analyzátoru vložit nové integrály, musí být v režimu „PŘIPRAVEN“. Integrály před vložením ještě rozmícháme ručně kolečkem a vložíme do analyzátoru přes „LOADING“ → „REAGENTS“, kde se dalších 15 minut rozmíchávají.



Obr. 6 Souprava LIAISON® Calprotectin Assey (zdroj vlastní)



Obr. 7 Integrál (zdroj vlastní)

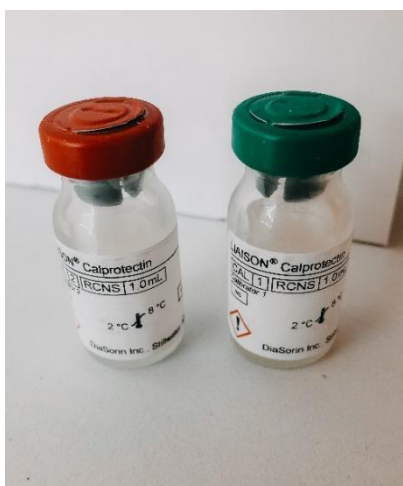
4.3. Kalibrace

Po vložení nových šarží reagentie (integrálů) je nutné provést kalibraci, po které dojde k vygenerování aktivní kalibrační křivky. Kalibraci je také nutné provést při:

- pokud opakovaně kontrolní hodnota metody není ve specifikovaném rozmezí;
- pokud některé součásti vyžadující kalibraci byly vyměněny;
- po kalibraci je vždy nutné změřit hladiny příslušných kontrol.

U kalibrace kalprotektinu musíme lyofilizované kalibrátory rozpustit v 1 ml destilované vody – promícháváme 15 min. Zkumavky polepíme přiloženými štítky s barkódem a vytvoříme tři alikvoty po 330 ul. První se použije pro kalibraci a nechá se v lednici, další dva se zmrazí. Kalibrace se provádí vložením kalibrátoru do vzorkového stojánku, zasunutím do Liaisonu a spuštěním kalibrace na integrálu. Na obrazovce „LOADING“ → označíme integrál → „CALIBRATE“ → „YES“

Stabilita kalibrátorů je 28 dnů.



Obr. 8 Lyofilizované kalibrátory (zdroj vlastní)

4.4. Interní kontroly

Interní kontroly měříme každý den ráno po provedení iniciace a před zpracováním rutinních vzorků od pacientů.

Pro stanovení kalprotektinu máme k dispozici lyofilizovanou kontrolu 1 a 2, která se rozpustí v 1 ml destilované vody – promícháváme 15 min. Zkumavky se polepí štítky s barkódem a vytvoří se tři alikvoty po 330 ul. První použijeme a dvě necháme zamrazit. Zkumavky pro kontrolu se vkládají ve vzorkových stojácích.

Stabilita kontrol je 28 dnů v lednici.

Vložíme je do speciálního racku → „LOADING“ → vložit rack na blikající pozici → „SCHEDULE“ → označit 1. kontrolu – zadat test (zmodrá), 2. kontrola atd. → STORE → START → YES

4.5. Měření vzorků

Zkumavky se naplní 6 ml 5× ředěného pufru, tyčinkou na víčku se nabere stolice tak, aby se drážky plně zaplnily (nebo můžeme napipetovat 120 μ l), zkumavka se otočí dnem vzhůru a cca 60 minut se třepé na třepačce.



Obr. 9 Polypropylenové zkumavky s inokulační kličkou (zdroj vlastní)

Následně se rukou promíchá tak, aby v zářezech na tyčince nezůstaly zbytky. Pozor musíme dávat na pěnu, která se z důvodů pufru může po promíchání vytvořit – v tom případě ji odstraníme. Otevřeme víčko a přesuneme do stojánku pro kalprotektin. Vložíme do analyzátoru a měříme cca 45 minut.

Stabilita primární stolice je 48 hodin při 4–8 °C – týden při teplotě pod -20 °C (zamrazení). Po odebrání do média je nutné změřit vzorek v ten samý den.

4.6. Výsledky

Informace o rozpracovanosti vzorku pacienta nalezneme v „LOADING“ → „SAMPLES“

Konečné výsledky kalprotektinu nalezneme v záložce „RESULTS“ → „ARCHIVED“ → kde je můžeme označit, vytisknout, popřípadě pomocí „UPLOAD“ odeslat do LISu, odkud je „uvolňujeme“ k hodnocení pro VŠS.

Vzorky s hodnotou <50 jsou hodnoceny jako negativní.

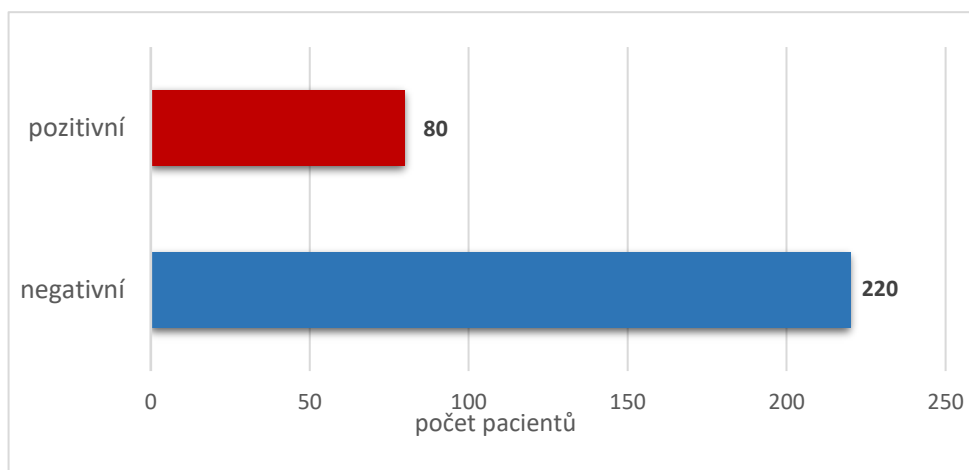
Vzorky s hodnotou >50 jsou hodnoceny jako pozitivní.

5. VÝSLEDKY A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ

5.1. Základní statistické údaje

Pro statistické zhodnocení bylo použito celkem 300 patientských vzorků bez rozdílu pohlaví či věku, ve kterých byla stanovena hladina kalprotektinu.

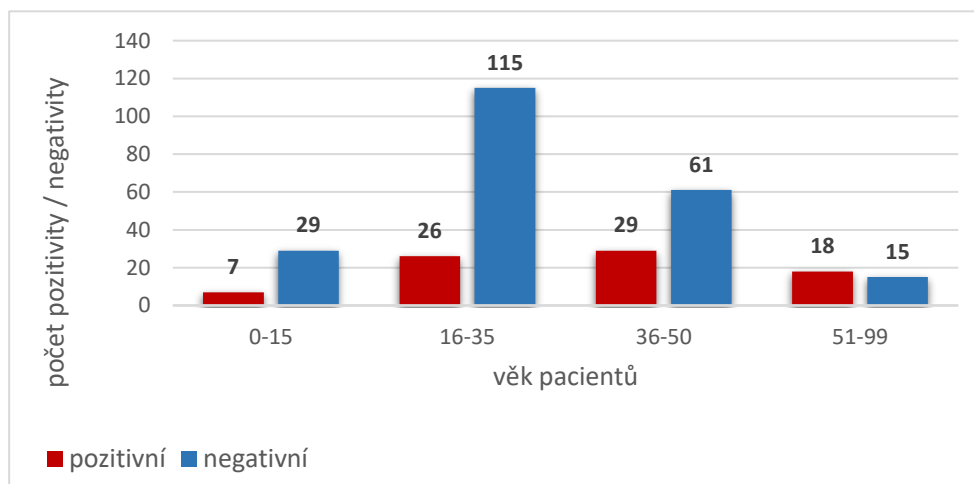
Graf 1: Počet pozitivních a negativních nálezů ze souboru vzorků



$$\frac{80,0}{300,0} = 0,267 \Rightarrow$$

$$0,267 \cdot 100 \Rightarrow 26,7 \%$$

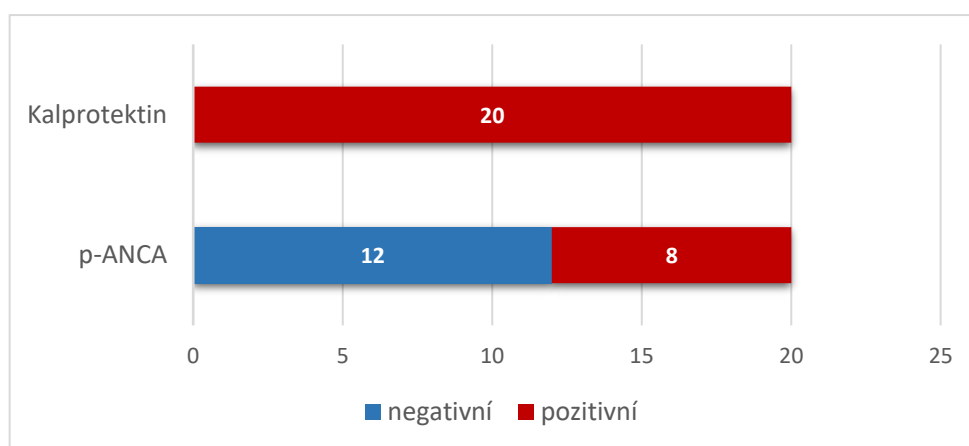
Graf 2: Počet pozitivních a negativních nálezů podle věkových skupin



5.2. Výzkumné otázky a hypotézy

1. Jak velká je korelace u výsledků kalprotektinu vůči výsledkům stanovení ANCA a ASCA protilátek?

Graf 3: Korelace výsledků kalprotektinu s metodou p-ANCA.



Postup výpočtu procentuálního zastoupení p-ANCA pozitivity vůči pozitivním vzorkům kalprotektinu:

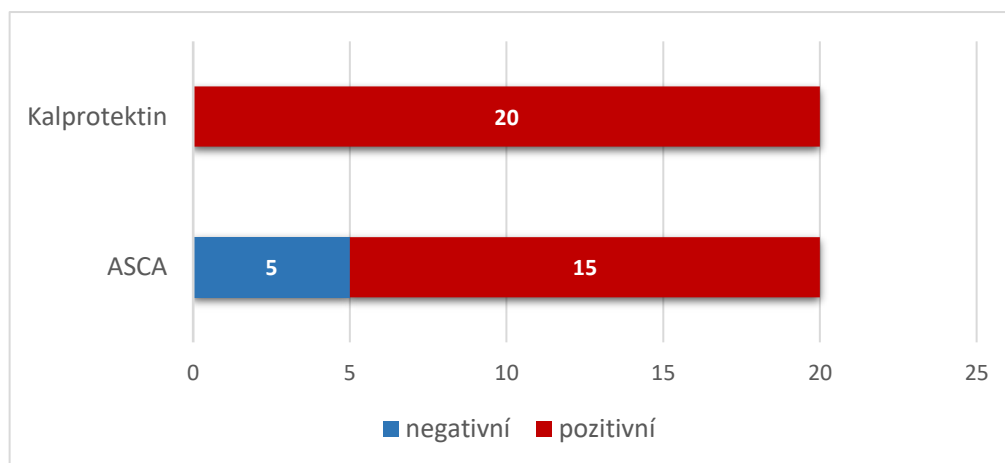
$$\frac{8,0}{20,0} = 0,400$$

$$0,400 \cdot 100 \Rightarrow 40,0 \%$$

Tabulka 3: Zastoupení pozitivity p-ANCA protilátek podle potvrzené diagnózy.

Diagnóza	Počet pozitivních vzorků
Crohnova choroba	3
Ulcerózní kolitida	5

Graf 4: Korelace výsledků kalprotektinu s metodou ASCA.



Postup výpočtu procentuálního zastoupení ASCA pozitivity vůči pozitivním vzorkům kalprotektinu:

$$\frac{15,0}{20,0} = 0,750$$

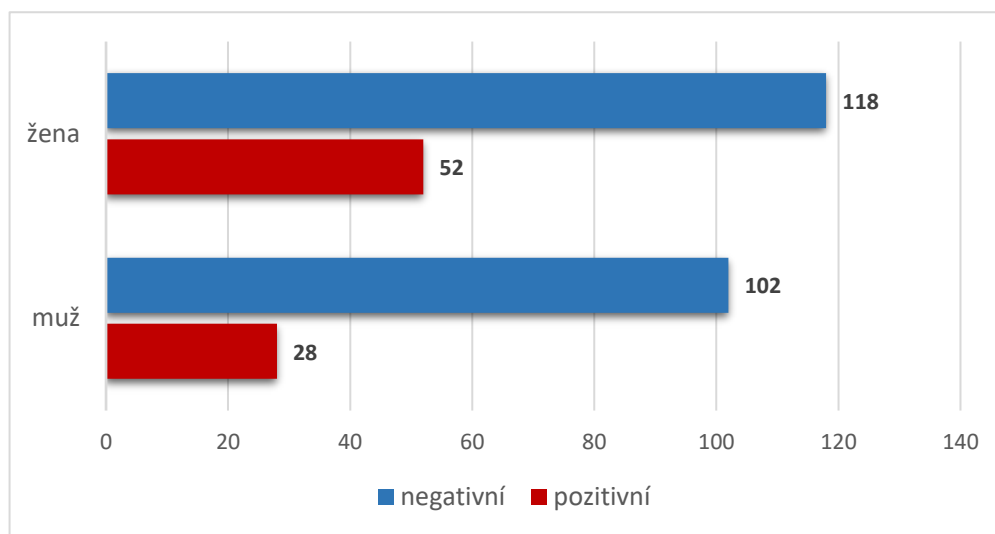
$$0,750 \cdot 100 \Rightarrow 75,0 \%$$

Tabulka 4: Zastoupení pozitivity ASCA protilátek podle potvrzené diagnózy.

Diagnóza	Počet pozitivních vzorků
Crohnova choroba	11
Ulcerózní kolitida	4

2. Předpokládáme že, výskyt pozitivního nálezu je vyšší u žen než u mužů.

Graf 5: Počet pozitivních a negativních nálezů podle pohlaví.



Postup výpočtu procentuálního zastoupení pozitivních výsledků u mužů:

$$\frac{28,0}{130,0} = 0,215 \Rightarrow$$

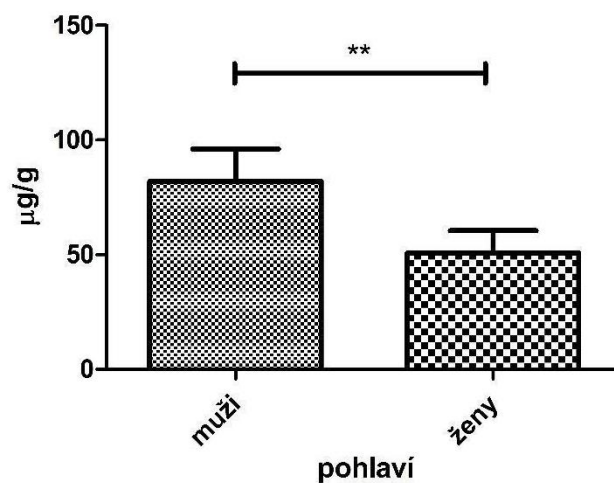
$$0,215 \cdot 100 \Rightarrow 21,5 \%$$

Postup výpočtu procentuálního zastoupení pozitivních výsledků u žen:

$$\frac{52,0}{170,0} = 0,306 \Rightarrow$$

$$0,306 \cdot 100 \Rightarrow 30,6 \%$$

Graf 6: Statistické zhodnocení naměřených dat mezi pohlavími



Mann Whitney statický test na hladině významnosti 5 % se dvěma nezávislými výběry.

6. DISKUZE

Cílem výzkumu bylo osvojení si základní identifikační metody kalprotektinu v rámci laboratorní praxe. Dalším cílem bylo osvojení si základní interpretace výsledků použité metody. Díky výsledkům kalprotektinu jsem s nimi mohla dále pracovat a statisticky prověřit, zda korelují s dalšími metodami pro zjištění idiopatických střevních chorob.

Ke stanovení hodnot kalprotektinu jsem používala metodu LIAISON® Calprotectin Assey od firmy DiaSorin. ANCA protilátky byly stanoveny imunofluorescenčně. Protilátky ASCA byly stanoveny metodou ELISA.

Na začátku zpracování jsem si stanovila výzkumnou otázku, jak velká je korelace u výsledků kalprotektinu vůči výsledkům stanovení p-ANCA a ASCA protilátek. Z celkového počtu 300 vzorků bylo vybráno 20 pozitivních na kalprotektin s potvrzenou diagnózou, z toho 11 pacientů bylo diagnostikováno s Crohnovou chorobou a 9 pacientů bylo diagnostikováno s ulcerózní kolitidou (graf 3 a 4).

U pacientů s Crohnovou chorobou jsme pozorovali výskyt p-ANCA protilátek ve třech případech (27,3 %) a výskyt protilátek anti-ASCA jsme potvrdili u všech 11 (100 %). Vyskytl se i případ dvou pacientů (18,2 %) s pozitivními oběma sledovanými protilátkami.

U pacientů s ulcerózní kolitidou jsme pozorovali výskyt p-ANCA protilátek v pěti případech (55,6 %), a výskyt protilátek anti-ASCA ve čtyřech případech (44,4 %). Vyskytl se i jeden případ (9,1 %) s pozitivitou obou sledovaných parametrů.

Výsledky jsme porovnali s prací Said H. (2011), kde výsledky korelace p-ANCA u ulcerózní kolitidy vyšly v intervalu 40–80 %, které souhlasí s našimi zjištěnými výsledky (55,6 %) a výsledky u pacientů s Crohnovou chorobou, kdy korelace mezi protilátkami vyšla u autorů Said H. (2011) (50–80 %), jsme pozorovali shodu až ve 100 %.

Autorovi Said H. (2011) a naše výsledky mohou být ovlivněny nízkým počtem sledovaných pacientů (UC 15, CD 5 (Said H. 2011) a UC 9, CD 11 naše výsledky). Dostupnost vzorků od pacientů s jasnou diagnózou je velmi omezená, většinou je zapotřebí spolupráce s gastroenterology a souhlas pacientů. I přesto je patrné, že naše výsledky se téměř přesně shodují s publikovaným materiálem.

Můžeme tedy konstatovat, že ASCA a ANCA protilátky zvyšují přesnost sérologické diagnostiky idiopatických střevních zánětů. U ASCA protilátek můžeme pozorovat větší korelaci s diagnózou Crohnovy choroby, než u vyšetření p-ANCA s diagnózou ulcerózní kolitidy.

ASCA a ANCA protilátky jsou tedy velmi dobře hodnocené markery u Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy a jsou dobrou volbou pro neinvazivní screening zánětlivých střevních onemocnění (IBD) společně s kalprotektinem (Gabalec L. 2009), i když jejich specifita nedosahuje až tak vysokých hodnot.

Dále můžeme potvrdit trend, že pacienti s potvrzeným pozitivním výsledkem na kalprotektin se dále dovyšetřují například na výskyt protilátek ANCA nebo ASCA u nás v laboratoři Aeskulab. Toto zjištění bylo prověřeno díky možnosti nahlédnout do kartotéky u každého pacienta.

Hypotézu, že výskyt pozitivního nálezu je vyšší u žen než u mužů, jsme **potvrdili**. Rozdíl však není markantní, u žen je celkový pozitivní nález 30,6 % a u mužů 21,5 % (graf 5). Dle našeho zjištění je patrné, že pohlaví na výskyt tohoto onemocnění má vliv, ale v tomto konkrétním případě ne tak vysoký, jak některé zdroje uvádí „*Ženy trpí autoimunitními chorobami více než muži, někdy je riziko vzniku i několikanásobně vyšší.*“ (Kostelík A. 2018)

Jedním z hlavních ukazatelů statistických dat, které jsme shromáždili, bylo celkové množství pozitivních vzorků kalprotektinu. U všech vyšetřovaných pacientů, kteří měli podezření na IBD, se tento výsledek potvrdil u necelých 27 %.

Dále jsem se zaměřila na věkové skupiny a jejich pozitivitu (graf 2).

V první věkové skupině 0–15 let jsme vyšetřili celkem 36 vzorků. Pozitivita se projevila u 7 vzorků. Vzhledem k tomu, že to je nejnížší věková kategorie, kde se výskyt IBD v zásadě nepředpokládá, je výskyt pozitivních pacientů nezanedbatelný.

Do druhé věkové kategorií 15–35 let spadalo 141 vzorků. V této věkové kategorii se podezření na IBD potvrdilo u 26 případů.

Třetí věková skupina 36–50 let měla celkem 90 vzorků, kdy v této věkové kategorii máme největší zastoupení pozitivních výsledků (29) v rámci celkového zhodnocení i s ohledem

na celkový počet pacientů v této kategorii. Podle získaných dat můžeme usoudit, že incidence tohoto onemocnění stoupá.

U poslední čtvrté věkové skupiny 51–99 let máme 33 vzorků, kdy v této věkové kategorii byly pozitivní výsledky v 18 případech. Lze soudit, že screening IBD v této věkové kategorii je lépe cílený, a proto dosahuje tak vysokého poměru pozitivních výsledků než u předešlých věkových kategorií. Samozřejmě nelze vyloučit, že pacient již léčený je, a nejedná se o prvozáchyt.

Podařilo se zjistit statistickou významnost mezi pohlavími v závislosti na koncentraci kalprotektinu ve stolici. Muži mají statisticky vyšší hladinu než ženy, dle Mann Whitney statistického testu na 5 % hladině pravděpodobnosti se dvěma nezávislými výběry (graf 6).

Získané statistické výsledky nedokáží rozdělit všechny pacienty podle typu onemocnění, a to z důvodu chybějících informací od lékařů doporučujících tyto pacienty na vyšetření. Pokud by tyto informace byly dostupné, mohly by data odrážet skutečnosti o jednotlivých onemocněních.

Během zpracování vzorků na stanovení koncentrace kalprotektinu ve stolici jsme narazili na některá úskalí. Prvním úskalím může být zápach z vyšetřované stolice. Na našem oddělení jsme tento problém vyřešili tím, že příprava vzorků probíhá v laminárním boxu, který má odsávání vzduchu přes HEPA filtry a tím eliminuje zápach. Dalším úskalím je konzistence odebraných vzorků, kdy některé vzorky lze velmi těžce odebrat z důvodu vysoké pevnosti, a záleží pouze na zkušenostech laboranta, jak se s problémem vypořádá a dokáže tento ne zcela vhodný materiál na analýzu zpracovat. V některých případech je problém i množství stolice, někdy jsou pacienti poučeni, že velikost odebraného vzorku má být velikosti lískového ořechu a zasílají množství tak malé, že je nelze použít pro analýzu. Tyto vzorky byly vyřazeny z analýzy a statistického hodnocení.

7. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce na téma „Stanovení kalprotektinu u pacientů s autoimunitní chorobou“ je zaměřena na nespecifické střevní záněty, jejich diagnostiku, léčbu a komplikace.

V teoretické části jsem se zabývala idiopatickými střevními záněty a jejich rozdělením na Crohnovu chorobu, ulcerózní kolitidu, celiakii a nespecifické střevní záněty. Dále jsem se zaměřila na kalprotektin, jeho úlohu v autoimunitních zánětech a možnosti jeho stanovení.

V praktické části jsem se zaměřila na stanovení kalprotektinu ve stolici pomocí metody chemiluminiscence, stanovení protilátek anti-ASCA pomocí metody ELISA a stanovení protilátek ANCA pomocí metod imunofluorescence.

Výsledky jsem statisticky zpracovala dle věkových skupin a pohlaví, dále jsem se zaměřila na srovnání p-ANCA a ASCA protilátek dle diagnózy u pacientů, díky nimž jsem dostala odpověď na stanovené otázky a hypotézy.

Zjistila jsem, že převaha pozitivních vzorků u žen nedosahuje tak vysokých statistických rozdílů (30,6 % vs. 21,5 %), jak uvádí některé literární zdroje, například Betteridge J.D. (2013) a Kostelík A. (2018).

Data ukázala statistickou významnost u množství kalprotektinu ve stolici u žen a mužů.

Problematika IBD, jež je celosvětově na vzestupu, si zaslouží pozornost, kdy pomocí správné a včasné diagnostiky můžeme výrazně zlepšit kvalitu života pacientů.

Sběrem dalších dat můžeme vypožorovat trendy, které by mohly být nápomocné při screeningu potenciálních pacientů s těmito chorobami. Lze doporučit větší spolupráci mezi laboratořemi a ošetřujícími lékaři, kteří by poskytli přesné diagnózy a výsledky léčby u vyšetřovaných pacientů, což by vedlo k ucelení informací v této oblasti a možnému nalezení trendu mezi hodnotami jednotlivých vyšetřovacích parametrů a typů IBD onemocnění.

Literatura

1. ACTIS G.C., et al., 2019, History of Inflammatory Bowel Diseases. J Clin Med, 4;8(11)
2. AL-Obaidy, T. M. M., Mutar, H. A., & Salih, T. A. (2021). Studying of Some Immunological Parameters in Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD) in Al-Anbar Province. Journal of university of Anbar for Pure science, 15(1)
3. BAUMGART D.C., et al, 2012, Crohn's disease, Lancet, 380(9853):1590-605
4. BETTERIDGE J.D. et al, 2013, Inflammatory bowel disease prevalence by age, gender, race, and geographic location in the U.S. military health care population. Inflamm Bowel Dis, Jun;19(7):1421-7
5. BORTÍK M., 2019, Všechno, co jste chtěli vědět o biologické léčbě u idiopatických střevních zánětů, ale báli jste se zeptat, Medica Healthworld, ISBN 978-80-905120-9-2
6. BRONSKÝ J., 2013, Nespecifická zánětlivá střevní onemocnění u dětí, 1 vydání, ISBN: 978-80-87023-16-7
7. BROWN D., 2014, Lewis's MedicalSurgical Nursing. 4. vydání. Austrálie: Elsevier Australia, ISBN: 9780729583930.
8. CAMPBELL J. P., et al., 2021, Clinical Performance of a Novel LIAISON Fecal Calprotectin Assay for Differentiation of Inflammatory Bowel Disease From Irritable Bowel Syndrome, J Clin Gastroenterol, 1;55(3):239-243
9. CAVIGLIA G.P., et al., 2018, Fecal calprotectin: beyond intestinal organic diseases, Panminerva Med, Mar;60(1):29-34
10. COHEN R.D., 2002, The quality of life in patients with Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther., Sep;16(9):1603-9
11. ČERVENKOVÁ, R. a LUKÁŠ K. Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-807-2626-007.
12. DE SLOOVERE M.M.W., et al., 2017, Analytical and diagnostic performance of two automated fecal calprotectin immunoassays for detection of inflammatory bowel disease, Clin Chem Lab Med., Aug 28;55(9):1435-1446

13. DI CARO S., et al., 2019, Enteral Nutrition in Adult Crohn's Disease: Toward a Paradigm Shift. *Nutrients*. 2019;11(9):2222
14. DIGNASS A., et al., 2012, Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis., *Journal of Crohn's and Colitis*, 965-990
15. DOUDA T., 2017, Pokroky v terapii idiopatických střevních zánětů, *Interní medicína pro praxi*, 19(3): 110–115
16. DOUGLAS N. et al., 2020, Imaging of bowel in patients requiring surgery for Crohn's disease, *Seminars in Colon and Rectal Surgery*, Volume 31, Issue 2
17. EHRMANN J. KONEČNÝ M., 2011, Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů, *Medicína pro praxi*, 8(10) "
18. EL-BADRY, Ahmed et al. Faecal calprotectin in differentiating between functional and organic bowel diseases. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2010, 11, 70-73. ISSN 1687–1979.
19. FERENČÍK M., 2005, Imunitní systém: informace pro každého. Vyd. 1. české. Praha: Grada, ISBN 80-247-1196-6
20. FRYČ P., MENGEROVÁ O., 2008, Celiakie, Bezlepková dieta a rady lékaře, *Medica Publishing*, ISBN 9788085936629
21. GABALEC L., 2009, *Interní medicína pro praxi*, 11(6): 276–281
22. GABALEC L., 2009, *Interní medicína pro praxi*, 11(1): 16-20
23. GANZETTI G., 2016, Biologic Therapy in Inflammatory and Immunomediated Skin Diseases: Safety Profile. *Curr Drug Saf.*, 11(1):12-21
24. GATTI S., et. al., 2017, Effects of the Exclusive Enteral Nutrition on the Microbiota Profile of Patients with Crohn's Disease: A Systematic Review, *Nutrients* 9, 832
25. GIACOMO CAIO., 2019, Celiac disease: a comprehensive current review, 17:142
26. GOULART R.A., et al., 2016, Facing Terminal Ileitis: Going Beyond Crohn's Disease., *Gastroenterology Res*, Feb;9(1):1-9

27. GREUTER T. et al., 2020, Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease, Digestion, 101 Suppl 1:98-104
28. HALLING M. L., et al., 2017, Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases.” World journal of gastroenterology vol. 23,33, 6137-6146
29. HARRIS, J, 2016, Cellular stress and innate inflammation in organ-specific autoimmunity: lessons learned from vitiligo. Immunological Reviews [online], 269(1), 11-25 [cit. 2021-5-19]. ISSN 01052896. doi:10.1111/imr.12369
30. HOLUBOVÁ, A. NOVOTNÁ, H. a MAREČKOVÁ, J., 2013, Ošetrovatelská péče v gastroenterologii a hepatologii. Praha: Mladá fronta, ISBN 978-80-204-2806-6.
31. HOPKINSMEDICINE, (2013), Crohn's Disease [online]. Dostupné: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/crohns-disease>
32. HOŘEJŠÍ V., et al., 2013, Základy imunologie. 5 vyd. Praha: Triton, ISBN 978-80-7387-713-2.
33. KAGUEYAMA F.M., et al., 2014, Importance of biopsies and histological evaluation in patients with chronic diarrhea and normal colonoscopies. Arq Bras Cir Dig., 27(3):184-187
34. KEIL, Radan a kol. Vybrané kapitoly z gastroenterologie. 1.vyd. Praha Karolinum, 2012. 86 s. ISBN 978-80-246-1970-5.
35. KHAKI-KHATIBI F., et al., 2020, Calprotectin in inflammatory bowel disease, Clin Chim Acta., Nov;510:556-565
36. KOHOUT, P., PAVLÍČKOVÁ, J. Crohnova choroba, ulcerózní kolitida. 1. vyd. Praha: Forsapi, 2006. ISBN 9788090382008.
37. KOSTELÍK A., POHANKA M., Diagnostika autoimunitních chorob, Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy) 2018, 87(2), 74-81
38. KREJSEK J., ANDRÝS C., KRČMOVÁ I., Imunologie člověka, Garamon: Hradec Králové, 2016. ISBN: 978-80-86472-74-4
39. LATA, Jan et al. 2010. Gastroenterologie. 1.vyd. Praha: Galén, 2010. 256 s. ISBN 978-80-7262-692-2.

40. LOFTUS E. V. JR., 2004, Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences, *Gastroenterology*, May;126(6):1504-17
41. LUKÁŠ, K. a HOCH J., ed. *Nemoci střev*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0353-9
42. LUKÁŠ M., 2010, Postavení koloskopie u idiopatických střevních zánětů, *Endoskopie*, 19(3-4): 105-112
43. LUKÁŠ, K., 2007. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry*. Grada Publishing. 380. s. ISBN 80-247-1283-0
44. LUKÁŠ M., ČERVENKOVÁ R., 2009, Crohnova nemoc a Ulcerózní kolitida, *Gastroent Hepatol*
45. LUKÁŠ M., 2013, *Biologická terapie idiopatických střevních zánětů*, 1 vyd. Galén, ISBN 978-80-7262-600-7
46. LUKÁŠ, M. 2019, *Pokroky v diagnostice a léčbě idiopatických střevních zánětů*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-453-8
47. LUKÁŠ M., 2020, Idiopatické střevní záněty – nové trendy a mezioborové souvislosti, Grada, ISBN: 978-80-271-1208-1
48. MALÍČKOVÁ K. a kol., 2019, POCT systém detekce hladin fekálního kalprotektinu při telemonitoringu pacientů s idiopatickými střevními záněty, *Klin. Biochem. Metab.*, 27 (48), No. 2, p. 72–77
49. *Medicína pro praxi: Celiakie pro praxi* [online]. ©2011, 8(9) [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/med/2011/09/03.pdf>
50. MITROVÁ, K. Novinky v léčbě zánětlivých střevních onemocnění u dětí. *Pediatric pro praxi*. SOLEN, 2016, 17(6), 344-347. ISSN 12130494. Dostupné z: doi:10.36290
51. MCDOWELL C., et al., 2020, Inflammatory Bowel Disease, *StatPearls*, Jun 28
52. MUMOLO M.G., et al., 2018, Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases clinical setting. *World J Gastroenterol*, Sep 7;24(33):3681-3694

53. NAIR, M. and PEATE, I. PATHOPHYSIOLOGY FOR NURSES AT A GLANCE. West Sussex: John Wiley And Sons, 2015. ISBN 978-11-187-4606-6
54. OKUYAMA, Yuko, a další. A novel sol particle immunoassay for fecal calprotectin in inflammatory bowel disease patients. Clinica Chimica Acta. 2016, 456, 1-6. ISSN 0009–8981.
55. OLIVEIRA S.B., et al., 2017, Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. BMJ., May 31;357: j2083
56. ORDÁS I., et al., 2012, Ulcerative colitis. Lancet, Nov 3;380(9853):1606-19
57. PARAMSOTHY S., et al., 2018, The current state of the art for biological therapies and new small molecules in inflammatory bowel disease. Mucosal immunology, 11(6), 1558–1570
58. PATHIRANA W.G.W., et al., 2018, Faecal Calprotectin. Clin Biochem Rev, Aug;39(3):77-90.
59. PAVELKA, K. a kol. Biologická léčba zánětlivých autoimunitních onemocnění. Praha: Grada, 2014. ISBN: 978-80-247-5048-4
60. PÉREZ DE ARCE E., et al., 2020, Biomarkers in inflammatory bowel disease, Rev Med Chil., Mar;148(3):362-370
61. PITHADIA A.B., et al., 2011, Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). Pharmacol Rep., 63(3):629-42
62. PRAVDA J., 2019, Can ulcerative colitis be cured? Discov Med, May;27(149):197-200
63. RANASINGHE I.R., et al., 2020, Crohn Disease, StatPearls, Jun 9
64. ROKKAS T., et al., 2018, Fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease endoscopic activity: a diagnostic accuracy meta-analysis. J Gastrointestin Liver Dis., Sep;27(3):299-306
65. SAID H. kol., 2011, The diagnostic value of faecal calprotectin in differentiating inflammatory bowel diseases (IBD) from irritable bowel syndrome (IBS), Report and Opinion, 2011;3(1)

66. SENDID B., et al., 1998, Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in familial Crohn's disease Am J Gastroenterol, 1306-10
67. SEYEDIAN S.S., et al., 2019, A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease, J Med Life, Apr-Jun;12(2):113-122
68. SRIDHAR M. et al., 2019, Fecal Calprotectin as a Screening Marker for Inflammatory Bowel Disease, Indian Pediatr, Mar 15;56(3):249-250
69. SUCHÁ V., JURGOŠ L., et al., 2015. Aktuálny pohľad na celiakiu: Current view of celiac disease. Via practica. Bratislava: SOLEN, 12(1), 22-26 a 28
70. TAN P., et al., 2020, Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: An Update. Front Pharmacol., Sep 18;11:574533
71. THERRIEN AMELIE, et al., 2020, Celiac Disease: Extraintestinal Manifestations and Associated Conditions; 54(1): 8–21
72. THURGATE L.E., et al., 2019, An Overview of Inflammatory Bowel Disease Unclassified in Children., Inflamm Intest Dis, Aug;4(3):97-103
73. VEAUTHIER B., et al., 2018, Crohn's Disease: Diagnosis and Management. Am Fam Physician, Dec 1;98(11):661-669
74. VICENTE-STEIJN R. et al., 2020, Analytical and clinical performance of the fully-automated LIAISONXL calprotectin immunoassay from DiaSorin in IBD patients, Laboratory Medicin, Volume 21
75. WEINGARDEN A.R., et al., 2017, Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease. Gut Microbes., May 4;8(3):238-252
76. WEINER M., et al., 2016, The clinical presentation and therapy of diseases related to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), Autoimmunity Reviews, Volume 15, Issue 10, 978-982
77. WOLF J.H. et al., 2021, Frailty is a stronger predictor than age for postoperative morbidity in Crohn's disease, Surgery
78. ZÁVADA, F. 2010, Gastrointestinální imunitní systém, Med. Pro Praxi; 7(6 a 7): 268–269

79. ZBOŘIL V., 2005, Infliximab v klinické léčebné praxi, Klin Farmakol Farm, 19, 67-71
80. ZBOŘIL, V. et al. 2018 Idiopatické střevní záněty. Praha: Mladá fronta, ISBN 978-80-204-4720-3.

Seznam obrázků, grafů, tabulek a zkratk

Seznam obrázků

Obr. 1 a) Crohnova choroba, b) Ulcerózní kolitida

Obr. 2 Celiakie

Obr. 3 Montrealská klasifikace

Obr. 4 Diagnostická sada pro domácí měření koncentrace fekálního kalprotektinu

Obr. 5 Analyzátor LIAISON[®] XL

Obr. 6 Souprava LIAISON[®] Calprotectin Assey

Obr. 7 Integrál

Obr. 8 Lyofilizované kalibrátory

Obr. 9 Polypropylenové zkumavky s inokulační kličkou

Seznam grafů

Graf 1: Počet pozitivních a negativních nálezů ze souboru vzorků

Graf 2: Počet pozitivních a negativních nálezů podle věkových skupin

Graf 3: Korelace výsledků kalprotektinu s metodou ANCA

Graf 4: Korelace výsledků kalprotektinu s metodou ASCA

Graf 5: Počet pozitivních a negativních nálezů podle pohlaví

Graf 6: Porovnání kalprotektinu mezi pohlavím

Seznam tabulek

Tabulka 1: Diferenciální diagnostika Crohnovy choroby

Tabulka 2: Diferenciální diagnostika ulcerózní kolitidy

Tabulka 3: Zastoupení positivity ANCA protilátek podle potvrzené diagnózy.

Tabulka 4: Zastoupení positivity ASCA protilátek podle potvrzené diagnózy

Tabulka 5: GraphPad Prism

Seznam zkratk

ANCA	anti-neutrofilní cytoplazmatické protilátky
ASCA	protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CD	Crohnova nemoc
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBDU	neklasifikované zánětlivé střevní onemocnění
FTM	Fekální mikrobiální transplantace
LIS	Laboratorní informační systém
POC	point-of-care
UC	ulcerózní kolitida