

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Ivana Pluhaříková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**STANOVENÍ KALPROTEKTINU U AUTOIMUNITNÍCH
CHOROB GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Jitka Gorčíková

PLZEŇ 2016

Prohlášení:

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

V Plzni dne 27. 3. 2016

.....

vlastnoruční podpis

Děkuji paní Ing. Jitce Gorčíkové za odborné vedení mé práce, rovněž tak panu Ing. Tomáši Vlasovi za pravidelné konzultace a poskytování materiálních podkladů. Oběma jim vděčím za cenné rady a připomínky.

Anotace

Příjmení a jméno: Pluhaříková Ivana

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Stanovení kalprotektinu u autoimunitních chorob gastrointestinálního traktu

Vedoucí práce: Ing. Jitka Gorčíková

Počet stran – číslované: 42

Počet stran – nečíslované: 9

Počet příloh: 6

Počet titulů použité literatury: 25

Klíčová slova: autoimunita – zánět – trávicí trakt – ulcerózní kolitida – Crohnova choroba – celiakie - ELISA – Quantum Blue – extrakce – kalprotektin - stolice

Souhrn:

Tato práce se zabývá stanovením kalprotektinu jakožto markeru autoimunitních onemocnění gastrointestinálního traktu. V teoretické části je přiblížena problematika autoimunitních onemocnění, jejich dělení a patogeneze. Dále jsou rozebrána jednotlivá onemocnění trávicího traktu. Na závěr se věnujeme popisu kalprotektinu.

V praktické části jsou porovnávány odlišné metody extrakce vzorků a odlišné metody stanovení koncentrace kalprotektinu ve stolici. Jednotlivé kombinace metod jsou hodnoceny z hlediska vhodnosti pro rutinní zavedení v laboratoři.

Annotation

Surname and name: Pluhaříková Ivana

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: The determination of calprotectin in autoimmune diseases of the gastrointestinal tract

Consultant: Ing. Jitka Gorčíková

Number of pages – numbered: 42

Number of pages – unnumbered: 9

Number of appendices: 6

Number of literature items used: 25

Key words: autoimmune – inflammation – gastrointestinal tract – ulcerative colitis – Crohn's disease – celiac disease – ELISA – Quantum Blue – extraction – calprotectin – stool

Summary:

This work discusses about the determination of calprotectin as a marker of autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. The theoretical part focuses on the proposed autoimmune diseases, their separation and pathogenesis. There are also analyzed the various diseases of the digestive tract. In conclusion, we describe calprotectin.

In the practical part are compared different extraction methods and different sampling methods to determine the concentration of calprotectin in the stool. Individual combination of methods are evaluated in terms of suitability for routine implementation in the laboratory.

OBSAH

ÚVOD.....	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 AUTOIMUNITA.....	12
1.1 Patogeneze onemocnění	12
1.2 Dělení autoimunitních onemocnění.....	12
1.2.1 Systémová autoimunitní onemocnění.....	13
1.2.2 Autoimunitní choroby orgánově lokalizované	13
1.2.3 Orgánově specifické autoimunitní choroby.....	13
2 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ GIT	14
2.1 Vznik onemocnění a jeho příčina a projevy	14
2.2 Nejčastější autoimunitní onemocnění GIT	14
2.2.1 Celiakie.....	14
2.2.2 Crohnova choroba	15
2.2.3 Ulcerózní kolitida	15
2.2.4 Nespecifický střevní zánět.....	16
2.3 Diagnostika autoimunitních onemocnění GIT	16
2.3.1 Vyšetření protilátek	16
2.3.2 Bioptické metody.....	17
2.3.3 Klinické zobrazovací metody	18
2.3.3.1 Endoskopické vyšetření.....	18
2.3.3.2 Radiologické metody.....	19
2.4 Současná léčba autoimunitních onemocnění GIT	20
2.4.1 Léčba ulcerózní kolitidy a Crohnovy choroby	20
2.4.1.1 Farmakoterapie	20
2.4.1.2 Chirurgická léčba.....	21
2.4.1.3 Psychoterapie.....	22
2.4.2 Léčba celiakie	22
3 KALPROTEKTIN.....	23
3.1 Co je kalprotektin	23
3.2 Využitelnost při stanovení autoimunitního onemocnění GIT	23
3.3 Výhody a úskalí metody	24
3.3.1 Výhody	24
PRAKTICKÁ ČÁST	26
4 CÍL PRÁCE.....	26
4.1 Metodika.....	26
4.2 Výzkumné otázky	26
5 EXTRAKCE POMOCÍ FAECAL SAMPLE PREPARATION KIT	27

5.1 Postup	27
6 STANDARDNÍ EXTRAKCE	28
6.1 Postup	28
7 STANOVENÍ KALPROTEKTINU METODOU QUANTUM BLUE	29
7.1 Princip stanovení	29
7.2 Reagencie a vybavení	29
7.3 Uchovávání vzorků	30
7.4 Postup analýzy	30
8 STANOVENÍ KALPROTEKTINU METODOU ELISA	31
8.1 Princip testu	31
8.2 Reagencie a vybavení	31
8.3 Postup analýzy v pracovním rozmezí 10 – 600 µg/g	32
8.4 Tvorba kalibrační křivky	33
9 VÝSLEDKY A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ	34
9.1 Základní statistické údaje	34
9.2 Porovnání extrakcí v kombinaci s metodou Quantum Blue	34
9.2.1 Korelace	35
9.3 Porovnání extrakcí v kombinaci s metodou ELISA	35
9.3.1 Korelace	36
9.4 Porovnání nově zavedeného stanovení s dříve používaným	36
9.4.1 Korelace	37
10 FINANČNÍ ROZVAHA	38
10.1 Náklady na stanovení	38
10.2 Bodové ohodnocení	38
11 DISKUZE	40
ZÁVĚR	42
POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE	43
SEZNAM TABULEK	45
SEZNAM GRAFŮ	46
SEZNAM PŘÍLOH	47
PŘÍLOHY	48

ÚVOD

Autoimunitní onemocnění trávicího traktu se stávají čím dál častějším problémem současné populace. Pacienti trpící ulcerózní kolitidou, Crohnovou chorobou nebo celiakií trpí četnými symptomy, které lze snadno zaměnit za drobné trávicí obtíže, nebo naopak za jiná vážná onemocnění. Určení diagnózy a sledování stavu pacienta je důležité pro včasné zachycení a započetí léčby, které může výrazně zmírnit následky a komplikace plynoucí z onemocnění. To se však neobejde bez invazivních a pro pacienta nepříjemných vyšetření. Zavedení nových, neinvazivních a snadno dostupných metod je proto přínosné pro pacienty i lékaře. Stanovení kalprotektinu, proteinu vylučovaném ve stolici, je jedním z nich. Pro laboratoře je nutné zvolit si dostatečně citlivou metodu stanovení, která bude zároveň finančně únosná a časově efektivní. Stanovení tohoto proteinu a zvolení vhodné metody je hlavním tématem této bakalářské práce.

V první části této práce teoreticky rozebereme autoimunitu, vznik autoimunitních onemocnění a jejich rozdělení. Poté se blíže seznámíme s nejčastějšími autoimunitními onemocněními gastrointestinálního traktu: ulcerózní kolitidou, Crohnovou chorobou a celiakií. V popisu se zaměříme na hlavní rysy, projevy a lokalizaci těchto onemocnění, na jejich odlišnosti a na to, čím jsou si podobné. Dále popíšeme jednotlivé diagnostické metody těchto onemocnění a jejich léčbu. Závěr teoretické části se již týká popisu hlavního tématu této práce – kalprotektinu. Uvedeme charakteristiku, systém vylučování tohoto proteinu, vysvětlíme význam a využitelnost jeho stanovení a samozřejmě i výhody a nevýhody z toho plynoucí.

Druhá polovina této práce, tedy praktická část, se týká laboratorních metod stanovení tohoto proteinu. V tomto úseku budeme porovnávat mezi sebou dva odlišné druhy extrakcí vzorku a následně dvě odlišné metody stanovení hladin koncentrace kalprotektinu. Zázemím našeho výzkumu se stal Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň. První typ extrakce a stanovení se v naší laboratoři používal rutinně dříve, druhý typ extrakce a stanovení byl zde nově zaveden. Cílem naší práce je zhodnotit, jak se změní stanovené hladiny kalprotektinu při použití odlišných typů extrakcí a to v rámci obou metod stanovení. Dále budeme porovnávat výsledky u dříve zavedené metody s nově zavedenou. Naším posledním výzkumným tématem je finanční a časová náročnost obou typů stanovení.

TEORETICKÁ ČÁST

1 AUTOIMUNITA

1.1 Patogeneze onemocnění

Autoimunita označuje imunitní odpověď organismu na své vlastní složky – autoantigeny. Potenciálním autoantigenem je kterýkoli protein, řada sacharidů a lipidů. Imunitní reakce na takový antigen může být humorální i buněčně zprostředkovaná. V případě poruchy buněčné imunity lymfocyty T napadají vlastní buňky, jako by byly infikovány virem a ničí je, jako je tomu například u juvenilního diabetu. Langerhansovy buňky slinivky břišní jsou napadány T lymfocyty. V důsledku poškození Langerhansových buněk lymfocyty nemůže slinivka produkovat inzulín a propuká onemocnění. Diabetes mellitus I. typu je typickým příkladem orgánově specifické autoimunitní choroby. Dalším příkladem je revmatoidní artritida, při které je cílem útoku kloubní chrupavka. Druhý typ autoimunitních onemocnění je způsoben poruchou protilátkové imunity. Lymfocyty B produkují tzv. autoprotilátky, tedy látky, zaměřené proti vlastním tkáním.

Autoimunita je způsobena selháním mechanismu tolerance a neschopností organismu rozpoznat neškodné antigeny vlastního těla od škodlivých, tedy autotolerance. Poté dochází k autoagresivnímu poškození vlastních buněk a tkání. Faktory podílející se na prolomení autotolerance, mohou být vnitřní (HLA asociace například HLA B 27 Bechtěrevova choroba, polymorfizmy genů pro cytokiny, mutace v genech regulujících apoptosu, asociace s imunodefekty, faktory hormonální atd.) a vnější (infekce, stres aktivací neuroendokrinní osy a hormonální dysbalancí, léky a UV záření modifikací autoantigenů atd.). (Hořejší, 2013)

1.2 Dělení autoimunitních onemocnění

Autoimunitní onemocnění dělíme zejména dle lokalizace poruchy v organismu. Základní dělení je na autoimunitní onemocnění systémová, orgánově lokalizovaná a orgánově specifická. Někdy je těžké z důvodu kombinace různých projevů onemocnění zařadit. Lokalizace a manifestace onemocnění se může u pacienta během vývoje nemoci měnit. (Hořejší, 2013) (Ferencík, 2005)

1.2.1 Systémová autoimunitní onemocnění

U tohoto typu autoimunitního onemocnění jsou napadány jaderné a další orgánově nespecifické antigeny. Pro tento typ onemocnění je typický imunokomplexový typ poškození tkání. Do této skupiny onemocnění patří systémový lupus erythematosus, který se projevuje postižením kloubů, kůže, ledvin a CNS, případně revmatoidní artritida, což je zánětlivé onemocnění kloubů. Dalšími typy onemocnění této kategorie jsou dermatopolymyositida, Sjörgenův syndrom, systémová sklerodermie, smíšená choroba pojiva apod. (Hořejší, 2013) (Ferenčík, 2005)

1.2.2 Autoimunitní choroby orgánově lokalizované

V této kategorii autoimunitních onemocnění se uplatňují imunopatologické mechanismy, které postihují především jeden orgán, ale jsou doprovázeny mnoha systémovými příznaky a výskytem autoprotilátek pro daný orgán nespecifických. Typickými příklady jsou nespecifické střevní záněty ulcerózní kolitida a Crohnova choroba, při kterých je primárně zasažen trávicí trakt. Do kategorie dále řadíme celiakii, autoimunitní hepatitidy, plicní fibrózy a další. (Hořejší, 2013) (Ferenčík, 2005)

1.2.3 Orgánově specifické autoimunitní choroby

V případě těchto onemocnění dochází k poškození konkrétní orgánové struktury. Účastní se zde autoreaktivní T lymfocyty nebo autoprotilátky. Ty mohou mít jednak cytotoxický účinek, případně ovlivňovat funkci daného orgánu nežádoucím způsobem. Většinou se zde uplatňují buněčné i humorální autoimunitní reakce. Do této kategorie řadíme autoimunitní endokrinopatie, neurologická onemocnění, cytopenie, kožní onemocnění a oční onemocnění. Známým příkladem je juvenilní diabetes mellitus. (Hořejší, 2013)

2 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ GIT

2.1 Vznik onemocnění a jeho příčina a projevy

Stejně jako u ostatních autoimunitních onemocnění, etiologie zatím není zcela jasná a u jednotlivých onemocnění se liší. Po prolomení autotolerance (popsáno v kapitole 1.1) dochází ke vzniku zánětlivých projevů různého rozsahu a lokalizace, nejběžněji však v tenkém nebo tlustém střevě. Vlivem autoimunitních procesů dochází k patologickým změnám trávicí trubice, které mohou být slizniční (ulcerózní kolitida, celiakie), nebo transmurální (Crohnova choroba) a vedou ke vzniku píštělí, abscesů nebo vředů. Kromě střeva mohou být zasaženy i jiné části gastrointestinálního traktu, od úst až po anus. Některá onemocnění mohou být doprovázena i extraintestinálními manifestacemi, k nejčastějším patří bolesti a otoky kloubů, kožní nálezy, zánětlivé projevy očního okolí, anémie, porucha kostního metabolismu. (Keil, 2012) (Lata, 2010)

Nástup onemocnění je obvykle plíživý, s postupně se zhoršujícími klinickými projevy, které mohou být velmi variabilní a závisí zejména na lokalizaci probíhajícího zánětu. „*Postižení rekta či levého tračníku se bude manifestovat spíše průjmem s možnou krvavou příměsí, u postižení pravého tračníku bude dominovat spíše bolest, váhový úbytek, zvýšená teplota a celkové neprospívání*“ (Keil a kol., 2012, s. 22). Projevy postižení tenkého střeva mohou zahrnovat anémii, hubnutí, průjmy a celkovou slabost. Zánět může probíhat i v několika úsecích GIT současně. (Keil, 2012) (Lata, 2010) (Di Sabatino, 2015)

2.2 Nejčastější autoimunitní onemocnění GIT

2.2.1 Celiakie

Jedná se o zánětlivé autoimunitní onemocnění tenkého střeva, vyvolané nesnášenlivostí glutenu, což je bílkovina obsažena v obilných zrnech. Podstatou vzniku poškození střevní sliznice je proces přeměny gliadinu, který je součástí glutenu. Gliadin je trávicími šťávami přeměněn na peptid, který je po průniku do střevních klků deaminován tkáňovou transglutaminázou a poté pohlcen antigen-prezentující buňkou. Má-li tato buňka na sobě HLA haplotypu DQ2, DQ3 nebo DQ8, dojde k prezentaci tohoto peptidu CD4+ T lymfocytům, čímž dojde k diferenciaci dalších helper lymfocytů produkujících prozánětlivé cytokiny a také Th2 buněk stimulujících B lymfocyty k produkci autoprotilátek. Tento proces vede k rozvoji chronického zánětu sliznice tenkého střeva a to zejména v oblasti duodena a jejunu. Vlivem zánětu dochází ke zmenšení střevních klků a celkovému

poškození sliznice. Následkem je snížená funkce vstřebávání živin, vitaminů a stopových prvků.

Klinické projevy vznikají v důsledku střevní malabsorpce. Typicky jsou to průjmy, anémie, hubnutí, únava. Vznikne-li choroba v dospělosti, její projevy mohou být zpočátku mírné a špatně rozpoznatelné. Jedná se o velmi časté onemocnění, ve většině zemí Evropy se udává výskyt v rozmezí 0,2-0,5 %. (Shoenfeld, a další, 2007) (Lata, 2010) (Keil, 2012) (Withoff, a další, 2016)

2.2.2 Crohnova choroba

Crohnova choroba (Crohn's Disease – CD) je chronické zánětlivé onemocnění kterékoli části gastrointestinálního traktu. Onemocnění má segmentální charakter a postihuje transmuraně trávicí trakt ve všech vrstvách, což může vést až k tvorbě píštělí a abscesů.

Největší část nemocných trpí ileokolickým projevem, druhým nejčastějším úsekem je zasažení terminálního ilea, dále pak postižení tlustého střeva. Postižení jícnu, žaludku a proximální části tenkého střeva bývá vzácné. U pacientů se mohou střídát bezpříznaková stádia (remise) se stádiem vzplanutí nemoci (relaps). Z rozdílné lokalizace onemocnění plyne i variabilita klinických příznaků onemocnění. Mezi hlavní symptomy patří průjem, bolest a horečka. Dlouhodobé postižení tenkého střeva je doprovázeno hubnutím a malasorbci, směrem k rektu mohou být četnější průjmy s možnou krvavou příměsí. Při postižení jícnu a žaludku může být složité odlišit chorobu od jiných vředových onemocnění. Vzhledem k tomu, že CD transmuraně zasahuje trávicí trubici, může u některých pacientů dojít až k intraabdominálním abscesům se septickými příznaky. Stejně jako u ulcerózní kolitidy, pacienti mají vyšší riziko vzniku malignit.

Extraintestinální projevy CD jsou převážně kloubní postižení, kožní nálezy, zánětlivá oční postižení a symptomy tromboembolické nemoci. (Lata, 2010) (Keil, 2012) (Kohout, a další, 2006)

2.2.3 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida (Ulcerative colitis – UC) je chronické zánětlivé střevní onemocnění, ohraničené na slizniční vrstvu tlustého střeva. Je charakterizované kontinuálním šířením zánětu začínajícím v konečníku a šířícím se orálním směrem dále do

tračnicku. Pro ulcerózní kolitidu je typické střídání stádií remise a relapsu. Délka zasaženého úseku střeva je různá a může se v průběhu života měnit. Při relapsu začíná zánět v konečnicku a při nezačínání včasné léčby se rozrůstá dále do tlustého střeva, až do celého tračnicku. Mezi typické příznaky patří průjem s příměsí krve a hlenu, bolesti břicha a tenesmy (nepříjemné až bolestivé nucení ke stolici), při vysoce aktivní chorobě dále i anémie, váhový úbytek a teploty. Horečky, bolest a tachykardie jsou spojené s fulminantním průběhem onemocnění, který může přejít až v toxický megakolon nebo karcinom tlustého střeva. Po letech trvání onemocnění se u pacientů zvyšuje riziko vzniku karcinomu.

I pro ulcerózní kolitidu jsou časté extraintestinální projevy onemocnění, jako jsou kloubní onemocnění, kožní nálezy, méně častěji zánětlivá oční postižení a symptomy tromboembolické nemoci. Tyto projevy jsou však méně časté, než u Crohnovy choroby. (Feuerstein, a další, 2014) (Keil, 2012) (Peyrin-Biroulet, a další, 2016) (Kohoutová, 2013)

2.2.4 Nespecifický střevní zánět

Nespecifický střevní zánět, neboli IBDU (= inflammatory bowel disease unclassified) je termín označující tu menšinu případů, kdy nejsme schopni rozlišit mezi ulcerózní kolitidou, Crohnovou chorobou a dalšími typy zánětlivých onemocnění. Termín je obvykle užíván v případech, kdy po provedení všech standardních diagnostických testů a vyšetření nenalzáme jednoznačné stanovisko. (Dignass, 2012)

2.3 Diagnostika autoimunitních onemocnění GIT

2.3.1 Vyšetření protilátek

V případě podezření na celiakii stanovujeme v rámci screeningu u pacienta pozitivitu specifických autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze a proti endomysiu ve třídě IgA v krvi. Zatímco hladina IgA stoupá, hladina IgM klesá. Zjistíme-li pozitivitu, je nutno diagnózu podpořit provedením gastrokopie s odběrem biopsie tenkého střeva. Vyšetření protilátek nelze použít, pokud pacient dodržuje bezlepkovou dietu.

Pro onemocnění Crohnovou chorobou jsou typické protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA = anti-*Saccharomyces cerevisiae*) v kombinaci s negativitou protilátek proti cytoplasmatickým antigenům neutrofilů (ANCA = anti-neutrophil-cytoplasmatic-

antibody). Ačkoliv ASCA nejsou autoprotilátky, společně s ANCA jsou faktorem podporujícím diagnózu Crohnovy choroby. V praxi však nemají dostatečnou senzitivitu.

U ulcerózní kolitidy nalézáme opačnou kombinaci, než je tomu u CD: pozitivní autoprotilátky ANCA, které jsou u CD negativní a naopak negativní protilátky ASCA – toho lze využít při diferenciální diagnostice CD a UC. (Hořejší, 2013) (Keil, 2012) (Lata, 2010) (Bartůňková, 2011)

2.3.2 Bioptické metody

Prokází-li se u pacienta s podezřením na celiakii zmiňované protilátky, je nutné potvrdit diagnózu gastroscopickým vyšetřením a následným vyšetřením biopsie tenkého střeva. Pro přesnější stanovení je biopsie odebrána z několika částí tenkého střeva. Sledován je samotný endoskopický obraz i následně zhotovené histologické preparáty z biopsií. Sliznice tenkého střeva má při celiakii typicky oploštělé, nebo zcela chybějící Kerkringovy duodenální řasy, na kterých jsou patrné zářezy a vroubkování. Střevo tedy působí hladce a leskle se. Na histologických preparátech stanovujeme počet lymfocytů na 100 enterocytů a sledujeme další typické nálezy, podobně jako u endoskopického vyšetření. Míra poškození sliznice tenkého střeva je hodnocena na základě stupnice dle Marshe (viz tab. 1).

Tabulka 1: Klasifikace dle Marshe

Stádium	Počet intraepiteliálních lymfocytů	Histologické změny
0	Normální	Normální sliznice
1	Zvýšený	Normální sliznice
2	Zvýšený	Prohloubení krypt, normální střevní klky
3a	Zvýšený	+ mírná atrofie klků
3b	Zvýšený	+ subtotální atrofie klků
3c	Zvýšený	+ úplná atrofie klků

Zdroj: (Keil, 2012)

V diagnostice Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy má histologické vyšetření spíše diferenciální a potvrzující charakter. Typické nálezy u Crohnovy choroby jsou fokální

ulcerace a nález granulomů, což může pomoci při odlišení od ulcerózní kolitidy, která se vyznačuje nálezem kryptových abscesů, dále atrofí žláz a ztráty hlenu v pohárkových buňkách. Histomorfologické vyšetření nás však (vzhledem k riziku vývoje kolorektálního karcinomu u pacientů trpících CD a UC) může informovat o dysplastických změnách. (Keil, 2012) (Lata, 2010)

2.3.3 Klinické zobrazovací metody

Zobrazovací metody jsou jedny z hlavních pilířů diagnostiky autoimunitních onemocnění GIT. S jejich pomocí je gastroenterolog schopen téměř s jistotou říci, probíhá-li zánět, nebo zda je v útlumu, lokalizovat jej, zhodnotit míru poškození trávicí trubice, změnu průsvitu orgánu a v případě endoskopického vyšetření i odebrat vzorky (biopsie).

2.3.3.1 Endoskopické vyšetření

Je-li u pacienta na základě symptomů či laboratorních testů podezření na autoimunitní zánět GIT, diagnózu je nutno ověřit endoskopickým vyšetřením. To umožní reálné zobrazení stavu trávicí trubice a odebrání vzorku pro histologické či laboratorní vyšetření. Tato metoda je tedy vůbec nejpodstatnější ze zobrazovacích metod pro přesné určení diagnózy. Hlavní nevýhodou klasické endoskopie je její invazivita, dále pak příprava pacienta (lačnění a případný výplach střev) a jeho zotavení se po sedativech (užívaná zejména u dětských pacientů, na vyžádání i u dospělých). Podle vyšetřovaného úseku GIT se endoskopie dělí na gastrokopii (vyšetření jícnu, žaludku, příp. horní části dvanáctníku), enteroskopii (tenké střevo) a koloskopii (tlusté střevo). V případě ulcerózní kolitidy se někdy využívá pouze rektoskopie (konečník).

Principem klasického endoskopického vyšetření je zavedení endoskopu do jícnu či rekta a jeho zavedení hlouběji do vyšetřované oblasti. Tenká a ohebná hadice endoskopu je zakončena malou kamerou. Obraz je elektronicky přenášen na obrazovku, ze které nález vyhodnocuje lékař. Mimo kamerového zařízení konec endoskopu dále obsahuje odsávací zařízení na přebytečnou tekutinu či vzduch, případně kleštičky pro odebrání slizniční biopsie. Vyšetření je z mnoha hledisek přínosné, bezpečné a časté, nicméně ne příliš oblíbené mezi pacienty.

Kompletní vyšetření tenkého střeva bývalo díky jeho špatné dostupnosti komplikované. Výjimku tvoří gastroduodenální oblast dostupná gastrokopií a terminální

ileum dostupné koloskopii. Existují další typy endoskopie, které vyšetření tenkého střeva umožňují: kapslová enteroskopie, push enteroskopie a double balloon enteroskopie.

Při kapslové enteroskopii pacient spolkně tabletu obsahující malou kameru, která snímá obraz trávicího traktu. Výhodou této metody je větší komfort pro pacienta, nevýhodou její finanční nákladnost (tableta má pouze jednorázové použití) a jisté riziko spojené s uvíznutím kapsle v zúženém úseku střeva.

Double balloon enteroskopie (DBE) využívá tenký a velmi ohebný endoskop s balónky na začátku i konci, které se v průběhu vyšetření střídavě nafukují a vyfukují a zpřístupňují tak i ostré záhyby střeva. Oproti kapslové enteroskopii vyšetření umožňuje odebrat slizniční biopsie. Vyšetření se provádí za celkové anestezie. DBE je spojeno s rizikem perforace střev u pacientů s oslabenou střevní stěnou. (Keil, 2012) (Lata, 2010)

2.3.3.2 Radiologické metody

Radiologické metody jsou používány zejména za účelem určení lokalizace námi hledané patologie před provedením endoskopického (příp. chirurgického) vyšetření, dále při diagnostice endoskopicky špatně dostupných míst (tenké střevo, některá zúžení) a při diagnostice píštělí, abscesů a jiných komplikací. Typ vyšetření vybíráme podle lokalizace a typu nálezu, který chceme diagnostikovat. Vždy platí, že pacienta vystavujeme radiační zátěži jen je-li to nutné a převažuje-li přínos vyšetření nad riziky.

Irigografie (rentgenové vyšetření tlustého střeva s použitím bariové kontrastní látky) je metoda vhodná pro zobrazení hlubokých ulcerací, píštělí a stenóz. Využití má u CD a UC, pro svou radiační zátěž se od ní však u diagnostiky slizničních lézí upouští a je nahrazována šetrnějšími metodami.

CT-enteroklýza a MR-enteroklýza jsou zobrazovací metody vhodné pro diagnostiku Crohnovy choroby tenkého střeva. CT enteroklýza je kombinací počítačové tomografie (snímkování řezů těla rentgenovým zářením) se zavedením kontrastní látky. MR-enteroklýza využívá sílu magnetického pole též v kombinaci s podáním kontrastní látky. Obecně platí, že CT je rychlejší a dostupnější než MR, avšak na rozdíl od MR využívá škodlivého rentgenového záření. Obě vyšetření umožňují i diagnostiku píštělí a abscesů.

Dalším vyšetřením využívaným pro diagnostiku je ultrazvuk, který spočívá v nárazu a zpětném odrazu vysokofrekvenčních vln. Jedná se tedy o šetrné vyšetření bez

radiologické zátěže, které je navíc pro pacienta velmi komfortní. Je vhodné pro průkaz zánětlivého zesílení střevní stěny. V případě UC v rektální části je obtížné vyšetřením ultrazvukem provést, je ale možné hodnotit hlouběji umístěné léze a struktury. Vhodné je také jako kontrolní vyšetření během léčby. (Keil, 2012) (Lata, 2010)

2.4 Současná léčba autoimunitních onemocnění GIT

2.4.1 Léčba ulcerózní kolitidy a Crohnovy choroby

Léčba UC a CD je v mnoha ohledech totožná, proto bude nyní popsána dohromady. Bohužel se ještě stále nepodařilo léčbou dosáhnout úplného vymizení onemocnění. Jde tedy spíše o dlouhodobou snahu udržet fázi remise a zajistit pacientům co nejvyšší kvalitu života. Obecně dělíme terapii dle fází nemoci na útočnou a udržovací. V útočné fázi onemocnění volíme prostředky tak, abychom co nejdříve stabilizovali stav pacienta a to i za cenu využití prostředků s větší škálou nežádoucích účinků; poté se snažíme překlenout do fáze udržovací, kdy volíme léky pro dlouhodobé užívání. V pořadí od největšího zastoupení volíme léčbu farmakologickou, chirurgickou a dietní opatření. Další velmi významnou, ač mnohdy opomíjenou částí léčby je psychoterapie. (Keil, 2012) (Lata, 2010)

2.4.1.1 Farmakoterapie

Aminosalicyláty jsou hlavní skupina léčiv užívaných při léčbě IBD. Hlavní představitelé této skupiny léků jsou sulfasalazopyridin (sulfasalazin) a kyselina 5-aminosalicylová (mesalazin). Dříve hojně užívaný sulfasalazin byl z důvodu nežádoucích účinků téměř plně nahrazen bezpečnějším mesalazinem, který jich má minimum. Dnes nacházíme využití sulfasalazinu u pacientů s kloubními projevy onemocnění, při kterých je účinný.

Mesalazin je látka s protizánětlivým účinkem. V závislosti na léčeném úseku volíme formu podání léku. Pro uvolnění v tenkém střevě či první polovině tračníku volíme orálně podávanou formu mesalazinu (mikrogranule či enterosolventní tablety). Chceme-li léčit koncovou část tračníku či konečník, je vhodné rektální podání (čípky, klysmata). Běžně užívané léky jsou Salofalk, Asacol a Pentasa. Firmy obvykle nabízejí orálně i rektálně podávané formy léků. Obsah účinné látky se pohybuje okolo 0,5g v jedné tabletě, 1g obsaženo v čípku, nejvíce pak obsahuje rektální klysmata se 4 g mesalazinu.

Ačkoliv se mesalazin stále užívá při léčbě CD i UC, jeho schopnost udržení remise při CD se neprokázala, a proto má využití zejména při léčbě UC. Vzhledem ke kontinuálnímu postupu zánětu od rekta dál je při UC účinnější podání per rektum. Podání per os má hlavně preventivní charakter.

Kortikosteroidy jsou další skupinou léčiv užívaných při léčbě IBD. S jejich extrémně silným protizánětlivým účinkem jsou užívány při relapsu a vysoké aktivitě choroby. Hlavním důvodem pro jejich krátkodobé užívání jsou nežádoucí účinky, které se po delší době užívání projeví s téměř stoprocentní jistotou. Obvyklý postup je nasazení vysokého dávkování s postupným snižováním a vysazením do cca 6ti týdnů. V tomto období je potřeba monitorovat nežádoucí účinky a případně začít léčit (osteoporóza).

Třetí, standardně používanou skupinou léčiv jsou imunosupresiva. Mírným potlačením imunitního systému snižují aktivitu autoimunitního zánětu. Obvykle mají dlouhý nástup účinku (v řádu měsíců) a dlouhodobým užíváním pomáhají udržovat remisi u chronického průběhu nemoci. Existuje řada druhů, nejobvyklejší jsou léky skupiny thiopurinů (Imuran).

Biologická terapie je ze všech dosud zmíněných nejnovější metodou léčby. Anti-TNF alfa protilátky jsou indikovány v případech rezistence na klasickou farmakologickou léčbu. Přinášejí terapeutický účinek u všech forem zánětu i při dlouhodobém používání. Používané preparáty jsou Infliximab podávaný ve formě infuze a Adalimumab v injekční formě. (Keil, 2012) (Lata, 2010)

2.4.1.2 Chirurgická léčba

Indikací k chirurgické léčbě je dlouhodobě aktivní onemocnění nereagující na farmakologickou a jinou konzervativní léčbu, vedoucí k závažným komplikacím (dysplázie nebo již vzniklý karcinom, toxický megakolon, intraabdominální komplikace, příp. významné nežádoucí účinky klasické léčby apod.).

V případě UC je obvyklou metodou kompletní odstranění tlustého střeva a konečníku s následným napojením tenkého střeva k řitnímu kanálu. Tato metoda je pro onemocnění léčebná. U CD spočívá chirurgická léčba především v resekcích zasažených částí střeva, v některých případech dochází až k totální kolektomii. Úseky tenkého střeva jsou řešeny strikturoplastikou, případně drenážními operacemi. Výkon nemá léčebný

účinek jako v případě UC, u většiny nemocných dochází v průběhu onemocnění k opětovnému výskytu potíží. (Lata, 2010) (Keil, 2012)

2.4.1.3 Psychoterapie

U idiopatických střevních zánětů nacházíme psychosomatickou složku onemocnění, která má (i vzhledem ke stále nejasné příčině vzniku onemocnění) mnohdy nedoceněný význam. Někteří lékaři sledují u svých pacientů souvislost vzniku a relapsu onemocnění s jejich momentálním psychickým rozpoložením, který se mnohdy cyklicky opakuje v návaznosti na pravidelné události v jejich životě, vedoucí ke stresovým až úzkostným stavům. Ačkoliv se jedná o stále neprobádanou problematiku, je pravděpodobné, že postupné sbírání zkušeností a sledování těchto souvislostí může pacientovi pomoci eliminovat riziko relapsu a zlepšit tak kvalitu života. (Porcelli, a další, 2016)

2.4.2 Léčba celiakie

Léčba celiakie spočívá v celoživotní bezlepkové dietě, tedy vyloučení potravin s obsahem pšenice, žita a ječmene. Při správném dodržování diety můžeme sledovat pokles autoantilátek a normalizaci histologického nálezu. Vzhledem k vysokému výskytu onemocnění se v současné době rozrůstá nabídka potravin bez obsahu lepku a objevují se noví dodavatelé těchto produktů. (Keil, 2012)

3 KALPROTEKTIN

3.1 Co je kalprotektin

Během posledních let byly objeveny nové biomarkery střevních zánětů - neutrofilům příbuzné proteiny vylučované stolicí, jako například laktoferin, neutrofilní elastasa a esterázy leukocytů. Mezi ně patří i fekální kalprotektin, který se zdá být nejslibnější parametr. Kalprotektin je 36,5 kDa velký protein vázající vápník a zinek, který představuje 60% proteinů v cytosolu frakce neutrofilních granulocytů. Jedná se o heterotrimer skládající se ze dvou těžkých řetězců a jednoho neglykosylovaného lehkého řetězce.

S antimikrobiální a antiproliferativní aktivitou hraje kalprotektin regulační úlohu v zánětlivém procesu. Díky zánětu v prostředí trávicího traktu dochází ke zvýšení permeability sliznice, kdy granulocyty a monocyty prostupují do střevní sliznice. Následná aktivace a potom smrt těchto buněk vede k uvolňování velkého množství kalprotektinu, které se vyloučí stolicí. Mnoho studií prokázalo, že existuje souvislost mezi hladinou kalprotektinu a mírou zánětu, což může být využito jako prostředek k monitorování odpovědi na léčbu a případného včasného odhalení rizika relapsu.

Fekální kalprotektin je do stolice vylučován neporušený, neboť dovede odolávat metabolické degradaci bakteriálními enzymy a střevními proteázami. To z něj dělá vhodnější marker pro screening střevních zánětů oproti ostatním, jako jsou například laktoferin, neutrofilní elastázy, nebo esterázu leukocytů. Vhodným testem je ELISA. (El-Badry, 2010) (Okuyama, a další, 2016) (Gisbert, a další, 2009)

3.2 Využitelnost při stanovení autoimunitního onemocnění GIT

Opakující se bolesti břicha a střevní změny jsou časté potíže většiny populace. Funkční střevní poruchy - a zejména syndrom dráždivého tračníku - se projevuje u 5-20% z celkové populace v průmyslových zemích a zároveň jsou nejčastějším důvodem k návštěvě praktického lékaře nebo konzultace v gastroenterologických poradnách.

V rutinní klinické praxi gastroenterologové často narazí na diagnostickou výzvu rozlišovat mezi pacienty se syndromem dráždivého tračníku a ty s organickou patologií, zejména, zánětlivého onemocnění střev. U pacientů s projevy nevysvětlitelného nadýmání, bolestí břicha nebo chronickým průjmem s nebo bez malabsorpce by měli pacienti podstoupit sérologické vyšetření (např. na přítomnost protilátek proti tkáňové transglutamináze a gliadinu) a tím vyloučit přítomnost celiakie.

Protože toto rozlišení je nadále problematické, mnoho pacientů s dráždivým syndromem tračníku je vyšetřováno na více diagnostických testů, včetně invazivních endoskopických nebo radiologických procedur, aby byla určena přesná diagnóza. Výběr pacientů, u kterých by měla být provedena daná vyšetření je jedním z klíčových bodů v diagnostice a měl by zabránit zneužívání invazivních a nákladných vyšetření, jakož i podcenění potenciálně nebezpečných onemocnění.

Pokud je u pacienta podezření na funkční střevní poruchu, klinická kritéria mohou být kombinovaná s mnoha neinvazivními testy pro určení správné diagnózy. Sérologické markery zánětu, jako jsou CRP, leukocyty a krevní destičky, mají nedostatečnou diagnostickou senzitivitu a specifitu, neboť neodráží přímý rozsah lokálního zánětu. Dalším v pořadí je test na okultní krvácení, který má však malou hodnotu v detekci zánětlivého onemocnění střev a má nízkou citlivost pro diagnostiku rakoviny tlustého střeva, a to zejména v počáteční fázi. (El-Badry, 2010)

3.3 Výhody a úskalí metody

3.3.1 Výhody

Vysoká citlivost v diagnostice střevních změn (jakožto nestravitelné odrážejí fekální markery dynamiku zánětlivého procesu). Další velkou výhodou je snadné získávání biologického materiálu (stolice), s čímž souvisí i neinvazivita testu, kterou oceňují zejména pacienti s IBD, u kterých jsou invazivní testy součástí diagnózy (důležité zejména u dětí). Metoda je dále schopna snížit frekvenci invazivního testování, v důsledku provádění běžného vyšetřování koncentrace fekálního kalprotektinu jako součást pravidelných kontrol pacientů s IBD. Podstatná je také vysoká korelace s aktivitou onemocnění. Diagnostický postup lze také snadno implementovat v běžné klinické praxi a je použitelný při diferenciaci funkčních stavů organických změn. Metoda také přináší možnost včasného vyhodnocení výsledků léčby a případné recidivy onemocnění. (Roszak, a další, 2015) (Gisbert, a další, 2009) (Kittanakom, a další, 2014)

3.3.2 Nevýhody

Relativně nízká specifita - koncentrace stanovované látky se zvyšuje nejen při zhoršení průběhu IBD, ale i u jiných typů onemocnění, jako je například bakteriální průjem, atd. (vzhledem k tomu, že bílkoviny a enzymy, které jsou markery zánětu, jsou uvolňovány do stolice během jakéhokoli zánětlivého procesu, vyskytujícího se ve střevní sliznici, potravinové alergie,..). Další nevýhodou je relativně vysoká cena - u některých

pacientů získání přesné hodnoty koncentrace vyžaduje několik ředění vzorků stolice (dodatečné náklady). Dalším faktorem je i časová náročnost stanovení - doba čekání na výsledek je prodloužená díky potřebě provádět a analyzovat určitý počet vzorků v důsledku diagnostického postupu, který je založen na enzymatické imunoanalýze (doba odběru, vzorky od potřebného množství pacientů). Dále hraje roli velký rozptyl výsledků způsobený různým obsahem vody ve stolici a také neschopnost hodnotit průjmové stolice - často přítomné u pacientů s IBD - v důsledku ředění a potenciálního vlivu na výsledek. (Roszak, a další, 2015) (Gisbert, a další, 2009)

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

4.1 Metodika

Cílem této práce je porovnat odlišné metody stanovení kalprotektinu ze vzorků stolice - dříve užívanou metodu s nově zavedenou - a vyhodnotit, která z metod je celkově efektivnější a finančně výhodnější. Naší snahou je určit, která z metod je vhodnější pro zavedení v laboratoři při zachování senzitivity a specifity a obhájit konečnou volbu. Konkrétním místem výzkumu se po nás stala laboratoř Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Plzni.

V praktické části budou nejprve podrobně popsány dva odlišné druhy extrakčních metod, které se užívají k přípravě stolice pro následné stanovení kalprotektinu. Následně rozebereme použití dvou odlišných setů určených pro stanovení kalprotektinu - nejprve stanovení na principu kvantitativní laterální průtokové analýzy, poté stanovení metodou ELISA. Popis obsahuje rozebrané principy metod včetně samotného postupu. Následuje samotné statistické vyhodnocení výsledků a vzájemné porovnání metod včetně korelací. Na závěr této práce se věnujeme finanční rozvaze. Souhrnu všech výsledků se podrobně věnujeme v kapitole Diskuze, kde se snažíme dojít ke konkrétnímu závěru vyplývajícího ze získaných dat a tím i zodpovědět zadané výzkumné otázky.

4.2 Výzkumné otázky

1. Jak velkou shodu výsledků nalézáme při porovnání výsledků metod Quantum Blue a ELISA, pokud v obou případech použijeme extrakční sadu Faecal Sample Preparation Kit ?
2. Jak velkou shodu výsledků nalézáme při porovnání výsledků metod Quantum Blue a ELISA, pokud v obou případech použijeme standardní metodu extrakce s očkovací kličkou?
3. Jak velkou shodu výsledků nalézáme při porovnání dříve zavedené metody stanovení kalprotektinu (extrakční sada Faecal Sample Preparation Kit + Quantum Blue) s nově zavedenou metodou stanovení (standardní extrakce s očkovací kličkou + ELISA)?
4. Která ze dvou porovnávaných metod je finančně a časově výhodnější?

5 EXTRAKCE POMOCÍ FAECAL SAMPLE PREPARATION KIT

Prvním ze dvou typů porovnávaných extrakcí je Faecal Sample Preparation Kit (Smart-Prep), který je navržen pro rychlou a reprodukovatelnou přípravu vzorků stolice pro stanovení kalprotektinu. Set je určený pro použití společně s diagnostickým setem Calprotectin ELISA (EK-CAL) a Quantum Blue Calprotectin od Bühlmann Laboratories AG.

K extrakci musí být použit extrakční pufr (B-CAL-EX) dodaný ve výše zmíněných soupravách. Pufr je přidán do zkumavky ve standardizovaném množství 4 ml. Pro zaručení úplné extrakce vzorků doporučuje výrobce vortexovat vzorky po dobu 1 minuty na vícezkušňkové třepačce. Po homogenizaci se 1-2 ml extraktu převede do prázdné, označené zkumavky (Eppendorf) a ta je centrifugována po dobu 5 minut při 3000 x g v mikrocentrifuze. Supernatant je odpipetován do čerstvé, označené zkumavky a může být ihned dále zpracováván či skladován 7 dní při teplotě 2-8°C nebo 4 měsíce v -20°C. (Bühlmann, 2014)

5.1 Postup

1. Opatrně vzorkem naplníme prázdnou dutinu spodního uzávěru extrakční zkumavky a povrch uhladíme.
2. Spodní uzávěr pevně nasadíme na extrakční zkumavku, odломíme držátko a přidáme 4 ml extrakčního pufru (B-CAL-EX).
3. Pečlivě uzavřeme zkumavku a vortexujeme vzorek po dobu 1 minuty.
4. Přeneseme homogenizát do čisté Eppendorf zkumavky a centrifugujeme 5 minut při 3'000 x g.
5. Odpipetujeme supernatant, který dále zpracujeme zvolenou metodou pro kvantifikaci kalprotektinu event. zamrazíme.

(Bühlmann, 2014)

6 STANDARDNÍ EXTRAKCE

Druhým typem vyluhování je extrakce vážením s použitím očkovací kličky. K extrakci potřebujeme extrakční pufr, který je obvykle dodáván v setu určenému ke stanovení kalprotektinu. Dále budeme potřebovat 10 µl jednorázové očkovací kličky, 15 ml popylpropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem, laminární box, vortexovací zařízení, přesnou váhu (10-150 mg), mikrocentrifugu a klasickou centrifugu. (Bühlmann, 2014)

6.1 Postup

1. Označíme a zvážíme (tare) prázdnou polypropylenovou zkumavku společně s očkovací kličkou.
2. Nabereme 50 až 100 mg vzorku stolice pomocí očkovací kličky a vložíme ji do předem zvážené zkumavky.
3. Odečteme přesné množství vzorku, ulomíme očkovací kličku a necháme dolní část kličky ve zkumavce.
4. Přidáme extrakční pufr podle vzorce:
 $x \text{ mg stolice} \times 49 = y \text{ µl extrakční pufr}$
(například 50 mg stolice + 2450 ul pufru) do zkumavky a zavíčujeme ji.
5. Homogenizujeme vzorek na vícezkumavkové míchačce s prudkým třepáním (na nejvyšší rychlost) po dobu 30 minut.
6. Přeneseme homogenát do 2 ml Eppendorf zkumavky a centrifugujeme v mikrocentrifuze po dobu 5 minut při 3'000 x g.
7. Odebereme supernatant do čisté, označené zkumavky a pokračujeme se stanovením.
(Bühlmann, 2014)

7 STANOVENÍ KALPROTEKTINU METODOU QUANTUM BLUE

Prvním typem námi použitého stanovení kalprotektinu je kvantitativní laterální průtoková analýza. BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range je immunoanalýza určená pro kvantitativní stanovení zvýšené koncentrace kalprotektinu ve vzorcích lidské stolice v kombinaci s Quantum Blue® Reader. (Bühlmann, 2013) (Biovendor, a další, 2011)

7.1 Princip stanovení

Test je vytvořen pro selektivní měření antigenu kalprotektinu pomocí sendvičové immunoanalýzy. Testovací membrána je potažena monoklonálními protilátkami vysoce specifickými pro kalprotektin. Sekundární monoklonální detekční protilátky konjugované na částice koloidního zlata jsou naneseny na podložku uvolňující konjugát a uvolní se do reakčního systému po přidání extrahovaného a naředěného vzorku stolice. Zlatý konjugát kalprotektin/anti-kalprotektin se naváže na anti-kalprotektinové protilátky navázané na testovacím proužku a zbývající volný anti-kalprotektinový zlatý konjugát se naváže na kozí antimyší protilátky navázané na kontrolním proužku. Intenzitu signálu testovací a kontrolní linie je dále měřena pomocí BÜHLMANN Quantum Blue® Readeru. (Bühlmann, 2013) (Biovendor, a další, 2011)

7.2 Reagencie a vybavení

Součástí balení je 25 testovacích kazet vakuově zabalených v hliníkové fólii (B-CAL-TC); lahev extrakčního pufru 125 ml (B-CAL-EX), který je připraven k použití; další součástí je lahev Chase ředícího pufru 100 ml (B-CHR-CB), taktéž připraven k použití; poslední součástí je RFID čipová karta 1ks.

Materiály a reagencie, které je nutno objednat zvlášť (nejsou součástí balení) jsou zařízení pro extrakci stolice (například Smart Prep, nebo Schebo® Quick-Prep™) nebo kontroly (Low/High). Další potřebná zařízení nedodávaná výrobcem jsou: vortexovací zařízení, laboratorní pipety s jednorázovými špičkami o objemech 10-100 µl a 3 ml, centrifuga, polypropylenové nebo polystyrenové zkumavky o objemech 5 ml pro ředění

extraktů, nastavitelné stopky, Quantum Blue® Reader, ochranné rukavice a laboratorní plášť, papírové utěrky. (Bühlmann, 2013) (Biovendor, a další, 2011)

7.3 Uchovávání vzorků

Vzorek stolice uchováváme v odběrových zkumavkách v lednici při 2-8°C maximálně po dobu 6 dnů. Zamrazení vzorku může mírně zvýšit hodnotu kalprotektinu díky vyloučeným neutrofilům, proto je pro delší skladování vhodné uchovávat extrakty při teplotě -20°C. Vzorek musí být nabrán do sběrného zařízení bez přídavku jakýchkoliv chemických nebo biologických látek. (Bühlmann, 2013) (Biovendor, a další, 2011)

7.4 Postup analýzy

Samotnou analýzu provádíme ve třech krocích. První částí analýzy je extrakce vzorků stolice. Postup je popsán v instrukcích pro konkrétní vybranou extrakční metodu. Druhou částí analýzy je zpracování vzorků. Extrakty vzorků naředíme v poměru 1:150 pomocí Chase pufru (ke 20 µl vzorku tedy přidáme 3000 µl pufru) a zvortexujeme. Naředěné extrakty centrifugujeme po dobu 5 min při 3'000 x g a dále pokračujeme laterální průtokovou analýzou. Namísto centrifugace lze extrakty stolice nechat odstát 10 minut. Pro analýzu použijeme supernatant.

Na zařízení Quantum Blue® Reader vyberte jednu z dostupných metod: <CH_900> nebo <CHR_0>. Metoda <CH_900> obsahuje interní časovač a inkubace probíhá uvnitř readeru, pro metodu <CHR_0> probíhá inkubace na stole v laboratoři a je potřeba použít stopky. Načteme RFID čipovou kartu na Tag pozici RFID readeru – tím se specifické parametry testu přenesou do readeru. Přidáme 80 µl naředěného extraktu stolice na port pro načtení vzorku testovací kazety. Zavřeme testovací kazetu a odstartujeme začátek měření zmáčknutím tlačítka START. Při metodě <CH_900> začne měření automaticky po 15 minutách inkubace. Do hlavního menu se vrátíme stiskem tlačítka ENTER. V případě metody <CHR_0> po aplikaci 80 µl naředěného extraktu stolice nastavíme manuálně stopky a necháme 15 minut inkubovat. Měření odstartujeme ručně po uplynutí doby inkubace stisknutím tlačítka ENTER. (Bühlmann, 2013) (Biovendor, a další, 2011)

8 STANOVENÍ KALPROTEKTINU METODOU ELISA

8.1 Princip testu

Souprava fCAL™ ELISA Calprotectin je navržena pro kvantitativní detekci lidského kalprotektinu ve vzorcích stolice metodou sendvičové ELISA. Principem testu je navázání kalprotektinu na pro něj specifické protilátky natažené na speciální mikrotitrační destičce. Jedná se o monoklonální protilátku (mAb) vysoce specifickou pro různé epitopy lidského kalprotektinu. Do jamek mikrotitrační destičky napipetujeme kalibrátory, kontroly a naředěné extrakty. Po krátké inkubaci a promytí přidáme konjugát monoklonální protilátky proti lidskému kalprotektinu s křenovou peroxidázou. Po další inkubaci vznikne komplex v pořadí: protilátka na mikrotitrační destičce – kalprotektin – konjugát. Díky tomuto uspořádání je komplex označován jako „sendvič“. Nenavázané protilátky jsou odstraněny promytím a po následné inkubaci se substrátem a přidáním stop-činidla měříme na spektrofotometru při 450 nm. Enzymatická aktivita navázaných komplexů je přímo úměrná koncentraci kalprotektinu. Koncentraci odečítáme z kalibrační křivky vytvořené z absorbancí a příslušných koncentrací kalibrátorů. (Bühlmann, 2014)

8.2 Reagencie a vybavení

Součástí balení setu EK-CAL jsou zejména reagenty potřebné pro provedení analýzy: extrakční pufr B-CAL-EX pro extrakci stolice (3x 125 ml), dále koncentrovaný promývací pufr (B-CAL-WB), který je třeba ředit s 900 ml destilované vody (10x lahev po 100 ml), dále inkubační pufr (B-CAL-IB) připravený k použití (2 lahve po 125 ml), kalibrátory A až E (B-CAL-CASET) s obsahem různých koncentrací kalprotektinu v pufru (5 lahviček po 1 ml), 2 lahvičky kontrol (B-CAL-CONSET) s nízkou a vysokou koncentrací kalprotektinu (1 ml), dále 12 ml enzymového markeru (B-CAL-EL), 12 ml TMB substrátu (B-TMB12) a 12 ml stop činidla (B-STS12). Mimo reagentů set obsahuje mikrotitrační destičku potaženou monoklonální protilátkou proti kalprotektinu 12x8 jamek (B-CAL-MP) s fólií pro zalepení destičky.

Pro provedení analýzy dále potřebujeme vybavení, které není součástí setu. Jsou to laboratorní pipety o objemech 10, 100 a 1000 µl, polystyrenové nebo polypropylenové zkumavky, savý papír, odměrný válec pro ředění promývacího pufru, zařízení pro promývání mikrotitračních destiček, rotátor mikrotitračních destiček, reader mikrotitračních destiček pro měření absorbance při 450 nm. (Bühlmann, 2014)

8.3 Postup analýzy v pracovním rozmezí 10 – 600 µg/g

1. Extrakty stolice naředíme v poměru 1:50 s inkubačním pufrem a dobře promícháme. Takto naředěné extrakty vzorků nechejte inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
2. Připravíme si mikrotitrační destičku – vybereme stripy s odpovídajícím počtem jamek pro vzorky, kontroly i kalibrátory. Nepoužité stripy ihned vrátíme zpět do obalu s vysoušedlem.
3. 2 x promyjeme prázdné jamky 300 µl promývacího pufru. Dobře vyklepeme do savého papíru. Pufir musí při každém promytí zůstat v jamkách alespoň 20 sekund.
4. Napipetujeme do jamek vždy po 100 µl do každé jamky:
 - Blank (inkubační pufir)
 - Kalibrátory A – E vždy po dvou jamkách
 - Nízkou a vysokou kontrolu, obě po dvou jamkách
 - Pacientské vzorky do příslušných jamek
5. Destičku přikryjeme fólií a inkubujeme po dobu 30 min + max 5 min na třepačce mikrotitračních destiček při 450 rpm za teploty 18-28°C.
6. Odstraníme fólii, vyprázdníme destičku a 3x promyjeme promývacím pufrem – 300 µl do každé jamky. Vyklepeme na savý papír.
7. Napipetujeme 100 µl konjugátu do všech jamek.
8. Zalepíme fólií a inkubujeme 30 min na třepačce při 450 rpm za teploty 18 – 28°C.
9. Odstraníme fólii, vyprázdníme destičku a 5x promýváme 300 µl promývacího pufru. Dobře vyklepeme.
10. Do každé jamky napipetujeme 100 µl TMB substrátu, předem vytemperovaného na 18-28°C.
11. Zalepíme fólií, ochráníme destičku od přímého světla a necháme inkubovat 15 min na třepačce při 450 rpm za teploty 18-28°C.
12. Přidáme 100 µl stop-činidla do všech jamek. Odstraňte vzduchové bubliny.
13. Do 30ti minut změřte absorbanci při 450 nm.

(Bühlmann, 2014)

8.4 Tvorba kalibrační křivky

Z naměřených výsledků vytvoříme standardní křivku. Nejprve vypočteme průměrnou absorbanci každého dubletu a odečteme absorbanci blanku od průměrné absorbance ostatních kalibrátorů. Tyto korigované absorbance spolu se standardními koncentracemi použijeme pro vytvoření kalibrační křivky. Z této kalibrační křivky odečítáme koncentrace patientských vzorků. (Bühlmann, 2014)

9 VÝSLEDKY A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ

9.1 Základní statistické údaje

Pro statistické zhodnocení bylo celkem použito 39 patientských vzorků, ve kterých byla v průběhu několika týdnů stanovena koncentrace kalprotektinu nejprve původně používanou metodou stanovení a poté nově zavedenou metodou. Vzorky byly vyšetřeny nejprve metodou Quantum Blue a poté metodou ELISA a to vždy dvakrát, nejprve s použitím extrakčního kitu Faecal Sample Preparation Kit (dále jen FSPK) a poté se standardní extrakcí s použitím očkovací kličky.

Tabulka 2: Základní statistické údaje

[$\mu\text{g/g}$]	Ex. FSPK + Quantum Blue	Ex. vážením+ Quantum Blue	Ex. FSPK + ELISA	Ex. vážením + ELISA
Počet st.	39	12	13	39
Průměr	316,6	420,6	522,9	175,1
Medián	100,0	109,0	49,8	54,5
Max	1800,0	1800,0	2580,0	600,0
Min	100,0	100,0	30,0	2,4

Zdroj: Vlastní

Rozdíl mediánů námi porovnávaných stanovení je v rámci vyšetření metodou Quantum Blue různými extrakčními sadami poměrně nízký (9 $\mu\text{g/g}$), podobný rozdíl nacházíme i v rámci metody ELISA (4,7 $\mu\text{g/g}$). Podstatně vyšší rozdíl mediánů vychází v případě porovnání metody Quantum Blue + extrakce FSPK (dříve používaná kombinace) s metodou ELISA + standardní extrakce (nově zavedená metoda) a to celých 45,5 $\mu\text{g/g}$.

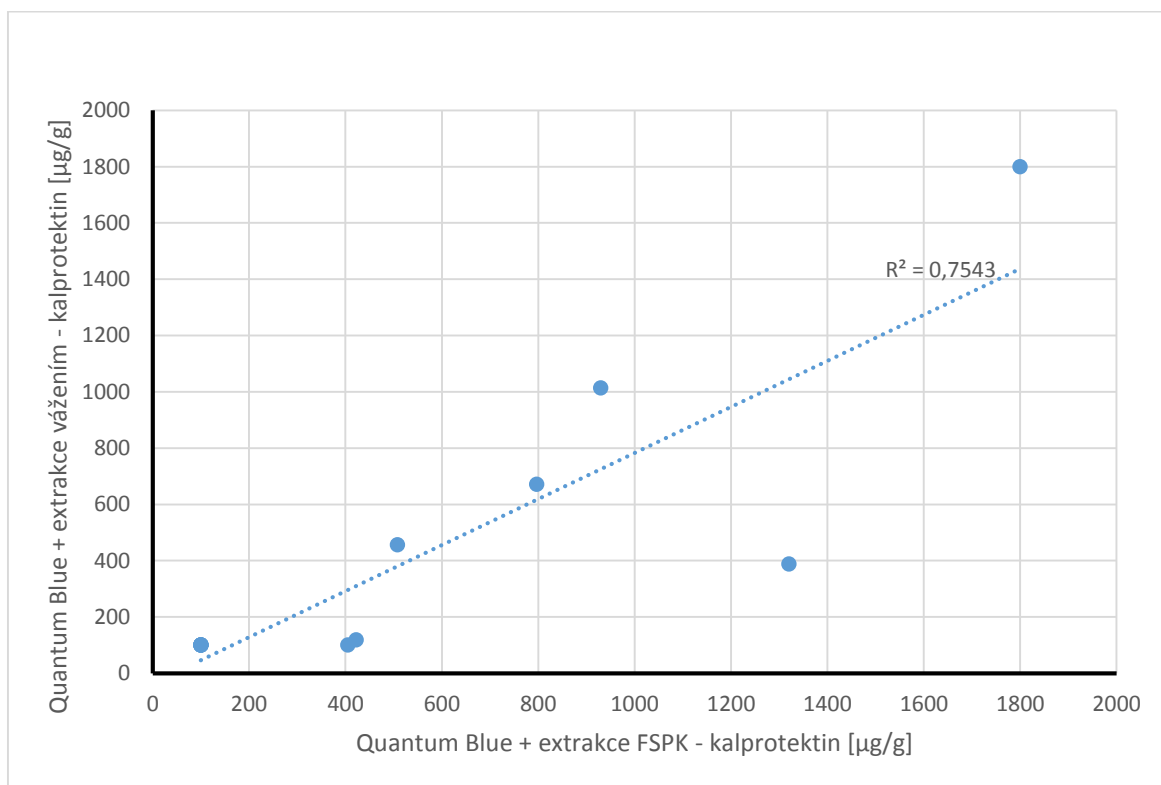
9.2 Porovnání extrakcí v kombinaci s metodou Quantum Blue

V následujícím srovnání jsme extrahovali 12 vzorků stolice za použití dvou druhů metod: extrakce s Faecal Sample Preparation Kit a extrakce vážením s očkovací kličkou. Extrakty byly následně stanoveny metodou BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range (LF-CHR25). Faecal Sample Preparation Kit (Smart-Prep) je typem extrakce, který naše laboratoř používala dříve. Podruhé jsme vyšetření opakovali s použitím nově zavedeného typu extrakce – extrakce vážením s použitím očkovací kličky. Obě skupiny výsledků (stanovených koncentrací kalprotektinu) jsme vzájemně porovnali.

9.2.1 Korelace

Korelační koeficient $R^2 = 0,7543$ po převedení na procentuální hodnotu vychází jako 87% shoda výsledků, kterou považujeme za velmi dobrou.

Graf 1: Korelace mezi extrakcemi v rámci metody Quantum Blue



Zdroj: Vlastní

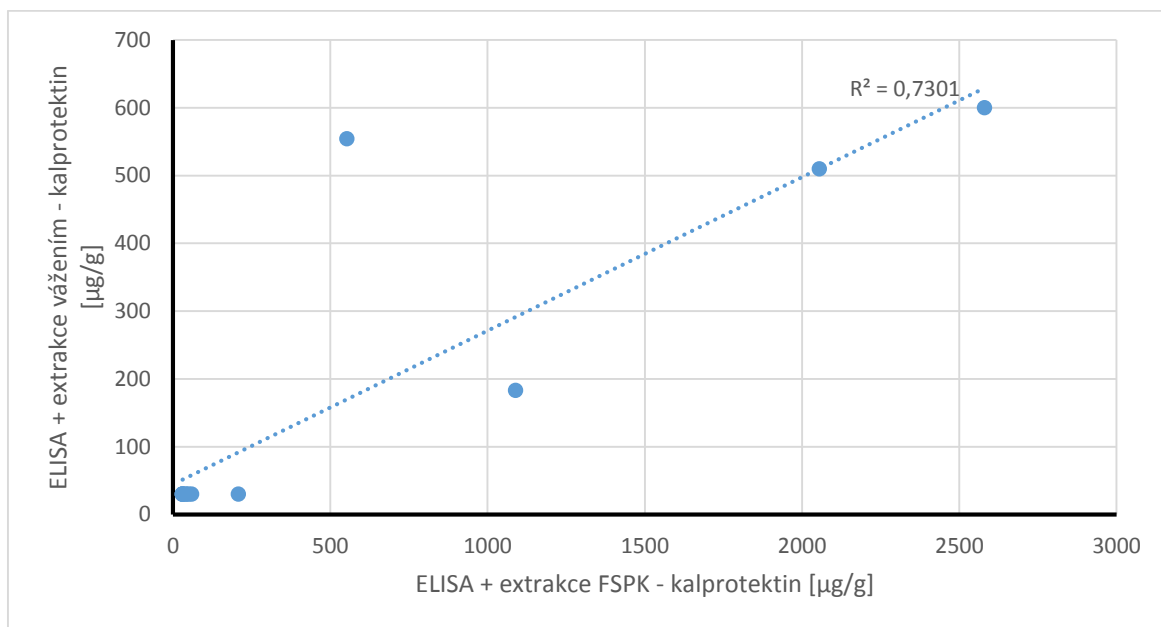
9.3 Porovnání extrakcí v kombinaci s metodou ELISA

Dalším krokem našeho průzkumného šetření bylo porovnání obou typů extrakcí s následným stanovením extraktů metodou BÜHLMANN fCAL™ ELISA Calprotectin (EK-CAL). Provedli jsme extrakci u 13 vzorků stolice nejprve s použitím dříve užívané extrakční sady Faecal Sample Preparation Kit, poté jsme extrakci opakovali s použitím extrakce vážením s očkovací kličkou. Obě skupiny výsledků (stanovených koncentrací kalprotektinu) jsme vzájemně porovnali.

9.3.1 Korelace

Korelační koeficient $R^2 = 0,7301$ po převedení na procentuální hodnotu vychází jako 85% shoda, kterou považujeme stejně jako v předchozím případě za dobrý výsledek.

Graf 2: Korelace mezi extrakcemi v rámci metody ELISA



Zdroj: Vlastní

9.4 Porovnání nově zavedeného stanovení s dříve používaným

Poslední částí našeho výzkumu je porovnání dříve používané kombinace metody + extrakce s nově zavedenou kombinací. Dříve používanou extrakční sadou byl Faecal Sample Preparation Kit (Smart-Prep). Pomocí této sady se připravily extrakty, které se následně vyšetřily metodou BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range (LF-CHR25). Nově zavedenou kombinací je extrakce vážením pomocí očkovací kličky a nádoby s následným stanovením metodou BÜHLMANN fCAL™ ELISA Calprotectin (EK-CAL). Stanovili jsme 39 vzorků stolice první a poté druhou metodou a následně výsledky zhodnotili.

10 FINANČNÍ ROZVAHA

10.1 Náklady na stanovení

Při zavádění nové metody v laboratoři musí odpovědný pracovník hodnotit nejen její přesnost a efektivitu, ale i finanční náklady, které je nutno za dané stanovení vynaložit. Z následující rozvahy vyplývá, že náklady na jedno stanovení metodou kvantitativní laterální průtokové analýzy Quantum Blue jsou poměrně vysoké. Metoda ELISA vychází v porovnání s Quantum Blue o 210 Kč za jedno stanovení levněji. Ceny obou typů námi zkoumaných extrakcí jsou také velmi rozdílné. Zatímco u extrakce s použitím očkovací kličky jsou náklady pouhých 7 Kč na jednu extrakci, extrakce s použitím zkumavky se spirálou (FSPK) stojí 121 Kč za extrakci (viz tab. 3).

Tabulka 3: Náklady na jednotlivá stanovení

	Cena setu	Náklady na jedno stanovení
Quantum Blue	11 360 Kč /25 stanovení	454,4 Kč
ELISA	20 570 Kč / 84* stanovení	244,88 Kč
Extrakce FSPK	3 015 Kč / 25 stanovení	120,6 Kč
Extrakce klička	1,25 Kč /klička; 5,69 Kč/ nádobka	6,94 Kč

*k dispozici je 96 jamek, 12 je však potřeba pro kalibrátory a kontroly

Tučně zvýrazněny porovnávané hodnoty.

Zdroj: Vlastní

Cena za celkové stanovení (extrakce + stanovení, viz tab.4) u dříve používané kombinace Quantum Blue s extrakcí FSPK je 575 Kč, což je o 323 Kč více, než u nově zavedené kombinace ELISA s extrakcí pomocí očkovací kličky, která vyjde na 252 Kč.

Tabulka 4: Náklady na jednotlivé kombinace stanovení

	Extrakce FSPK	Extrakce s oč.klič.
Quantum Blue	575 Kč	461,34 Kč
ELISA	365,48 Kč	251,82 Kč

Tučně zvýrazněny porovnávané hodnoty.

Zdroj: Vlastní

10.2 Bodové ohodnocení

Vzhledem k bodovému systému zavedenému v laboratoři je nutno náklady přepočítat na body, které poté proplácí pojišťovna. Bodové ohodnocení jednoho vyšetření

kalprotektinu ze stolice (včetně extrakce) činí 1037 bodů. Nákladová hodnota bodu, kterou proplatí pojišťovna, činí 0,32 Kč. Vydělíme-li náklady na jedno vyšetření bodovým ohodnocením výkonu, získáme náklady stanovení na 1 bod (viz tab. 5).

Tabulka 5: Náklady na jeden bod u jednotlivých kombinací metod

Metoda	Náklady na 1 bod
Quantum Blue + Extrakce FSPK	0,55 Kč
ELISA + extrakce s oč.klič.	0,24 Kč
Quantum Blue + extrakce s oč.klič.	0,45 Kč
ELISA + extrakce FSPK	0,35 Kč

Tučně zvýrazněny porovnávané hodnoty.

Zdroj: Vlastní

Jsou-li náklady na jeden bod vyšší, než 0,32 Kč, laboratoř o daný rozdíl prodělává. Z rozvahy tedy vyplývá, že finančně výhodněji vychází metoda ELISA se standardní extrakcí vážením.

10.3 Časová náročnost stanovení

V následující tabulce jsou uvedeny časy potřebné k provedení jednotlivých metod. Dříve používané metody extrakce a stanovení jsou o několik desítek minut rychlejší (viz tab. 6).

Tabulka 6: Časová náročnost jednotlivých metod

Metoda	Doba provedení
Extrakce FSPK	7 min
Extrakce s oč.kličkou	35 min
Quantum Blue	15 min
ELISA	75 minut

Zdroj: Vlastní

11 DISKUZE

Cílem našeho výzkumu bylo zjistit, je-li rozdíl mezi dříve používanou a nově zavedenou metodou stanovení statisticky a klinicky významný a je-li metoda ELISA vhodná pro zavedení. Dále jsme hodnotili dva odlišné typy extrakcí vzorků stolice a zjišťovali, neovlivní-li odlišná příprava vzorku výslednou koncentraci kalprotektinu. Z rozdílu mediánů u jednotlivých stanovení vyplývá, že v rámci jedné metody stanovení kalprotektinu (Quantum Blue nebo ELISA) s použitím různých extrakcí se výsledné koncentrace kalprotektinu lišily jen mírně. V rámci metody Quantum Blue byl rozdíl hodnot 9 $\mu\text{g/g}$ a v případě metody ELISA byl 4,7 $\mu\text{g/g}$. Obě stanovení spolu také dobře korelují ($R^2 = 0,7301$ v případě porovnání extrakcí v rámci metody ELISA; $R^2 = 0,7543$ v rámci metody Quantum Blue). Podobným výzkumem se zabývali i Delefortrie a spol. z Clinique Notre Dame de Grâce, Belgie (Delefortrie, a další, 2016), kde v rámci jedné metody porovnávali rozdílné extrakční procedury s dobrou výslednou korelací, rozdíl koncentrací kalprotektinu byl však v jejich případě o poznání vyšší.

Dále jsme porovnávali dříve používanou metodu stanovení v naší laboratoři, při které se používalo kombinace extrakce FSPK spolu se setem BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin High Range a metodu BÜHLMANN fCAL™ ELISA Calprotectin v kombinaci se standardní extrakcí vážením, která byla zavedena nově. Navzdory poměrně velkému rozdílu mediánů koncentrací kalprotektinu (45,5 $\mu\text{g/g}$) nám vyšla ucházející korelační shoda 72% ($R^2 = 0,518$). Tento rozdíl si vysvětlujeme rozdílnou citlivostí obou stanovení. Ta je u ELISA metody vyšší než u metody Quantum Blue. Zatímco u metody Quantum Blue bereme koncentraci pod 100 $\mu\text{g/g}$ jako negativní, u ELISA metody považujeme za negativitu hladinu pod 50 $\mu\text{g/g}$. K podobným výsledkům dospěli i A. Dolci a M. Panteghini z laboratoře klinické biochemie University of Milan Medical School, Itálie (Dolci, a další, 2012), kde porovnávali dvě rozdílné metody stanovení kalprotektinu.

Jako další výzkumnou otázku jsme si stanovili, která z metod stanovení kalprotektinu je pro laboratoř finančně výhodnější. Při rozpočtení nákladů na jedno stanovení se ukázala být standardní extrakce o poznání úspornější (6,94 Kč). V porovnání s extrakcí FSPK vychází o 114 Kč levněji na jedno stanovení. V případě setů určených k samotnému stanovení kalprotektinu je výrazně finančně výhodnější metoda ELISA (244,88 Kč / stanovení). Za jedno stanovení metodou Quantum Blue zaplatíme o 209 Kč víc. Při přepočtení celkových nákladů stanovení (extrakce + metoda) na bodový systém se kombinace standardní extrakce s očkovací kličkou v kombinaci s ELISA metodou ukázala

být jako jediná, kterou laboratoři plně uhradí pojišťovna. U ostatních kombinací laboratoř prodělává. V rámci finanční rozvahy jsme hodnotili i časovou náročnost jednotlivých stanovení. Z extrakcí se ukázala být nejrychlejší Faecal Sample Preparation Kit, ze samotných stanovení pak metoda Quantum Blue.

Vzhledem k minimálním rozdílům naměřených hodnot u srovnání extrakčních metod se ukazuje standardní extrakce vážením jako výhodnější pro zavedení v laboratoři. Metodu ELISA považujeme za vhodnou k zavedení laboratoři pro rutinní stanovení. Dříve užívanou metodu Quantum Blue doporučujeme používat jako doplňkovou metodu pro statimové případy, zejména z důvodu rychlejšího provedení. Přestože rozdílnost výsledků u staré a nové metody stanovení není zanedbatelná, jejich vzájemná korelace je dobrá. Domníváme se, že přesnějších výsledků by bylo dosaženo vyšetřením většího vzorku pacientů, za úvahu také stojí možná laboratorní chyba při jednotlivých postupech. Doporučujeme v rámci dlouhodobého sledování jednotlivých pacientů stanovovat kalprotektin stejnou metodou, aby nedošlo ke zkreslení výsledků, případně informovat ošetřujícího lékaře.

ZÁVĚR

Hlavním tématem této práce bylo porovnání jednotlivých metod stanovení kalprotektinu. V úvodu práce jsme teoreticky přiblížili danou problematiku. V praktické části jsme si určili cíl práce, kterým bylo určit změnu výsledných koncentrací u vzorku pacientů, změníme-li metodu extrakce, metodu stanovení, či obojí. Námi porovnávanými extrakčními metodami byla extrakce se sadou Faecal Sample Preparation Kit, naší laboratoří používanou dříve, a standardní extrakce s očkovací kličkou, která je nově zavedena. Z našich výsledků vyplývá, že změna extrakce při zachování dané metody stanovení výrazně neovlivní výslednou koncentraci kalprotektinu.

Dále jsme se zaměřili na srovnání dříve používané metody stanovení Quantum Blue® Calprotectin High Range (v kombinaci se starou metodou extrakce) s nově používanou metodou fCAL™ ELISA Calprotectin (v kombinaci s novou metodou extrakce). Ačkoliv výsledky jednotlivých stanovení nebyly shodné, obě metody spolu dostatečně korelují. Rozdíl si také vysvětlujeme vyšší citlivostí ELISA metody a poměrně malý vzorek hodnocených pacientů. Závěr práce se týkal finanční rozvahy a časové náročnosti vybraných stanovení. Jako finančně nejvýhodnější se ukázala nově zavedená metoda stanovení (ELISA v kombinaci se standardní extrakcí), metoda Quantum Blue je však o poznání rychlejší.

Vzhledem k našemu výzkumu se domníváme, že metoda ELISA je vhodnou metodou pro rutinní stanovení v laboratoři. Metodu Quantum Blue doporučujeme zavést jako doplňkovou metodu vhodnou pro statimová vyšetření.

POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. 164s. ISBN 978-80-247-3533-7.
- BIOVENDOR, Laboratorní medicína a.s. a AG, BÜHLMANN LABORATORIES. Quantum Blue® Calprotectin High Range: Kvantitativní laterální průtoková analýza. Schönenbuch : BÜHLMANN LABORATORIES AG, 2011.
- BÜHLMANN. *Bühlmann fCAL ELISA Calprotektin*. Schönenbuch: Bühlmann Laboratories AG, 2014.
- BÜHLMANN. *Quantum Blue® Calprotectin High Range: Quantitative Lateral Flow Assay*. Schönenbuch, Switzerland : BÜHLMANN Laboratories AG, 2013.
- BÜHLMANN. *Bühlmann Calprotectin ELISA: Simplified and Efficient Stool Extraction using a Faecal Sample Preparation Kit*. Schönenbuch: Bühlmann Laboratories AG, 2014.
- DELEFORTRIE, Quentin, a další. Comparison of the Liaison® Calprotectin kit with a well established point of care test (Quantum Blue — Bühlmann-Alere®) in terms of analytical performances and ability to detect relapses amongst a Crohn population in follow-up. *Clinical Biochemistry*. 2016, 49, 268-273. ISSN 0009-9120.
- DI SABATINO, Antonio et al. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimmunity Reviews*. 2015, 14, 1161–1169. ISSN 1568-9972.
- DIGNASS, Axel et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*. 6.10, 2012, 965-990. ISSN 1873-9946.
- DOLCI, Alberto a PANTEGHINI, Mauro. Comparative study of a new quantitative rapid test with an established ELISA method for faecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta*. 2012, 413, 350-351.
- 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.
- FERENČÍK, Miroslav et al. *Imunitní systém: informace pro každého*. 1.vyd. Praha : Grada, 2005. 236s. ISBN 80-247-1196-6.
- FEUERSTEIN, Joseph D. a CHEIFFETZ, Adam S. Ulcerative Colitis: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings*. 2014, 1553–1563. ISSN 0025-6196.
- GISBERT, J.P. a MCNICHOLL, A.G. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*. 2009, 41, 56-66. ISSN 1590-8658.

- HOŘEJŠÍ, Václav et al. *Základy imunologie*. 5 vyd. Praha : Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
- KEIL, Radan a kol. *Vybrané kapitoly z gastroenterologie*. 1.vyd. Praha : Karolinum, 2012. 86s. ISBN 978-80-246-1970-5.
- KITTANAKOM, Saranya, a další. Validation and evaluation of fecal calprotectin assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Clinical Biochemistry*. 2014, 47, 1141–1158. ISSN 0009-9120.
- KOHOUT, Pavel a PAVLÍČKOVÁ, Jaroslava. *Crohnova choroba, ulcerózní kolitida*. Praha : Forsapi, 2006. ISBN 80-903820-0-2.
- KOHOUTOVÁ, Darina a kol. *Střevní mikrobiota u idiopatických střevních zánětů a kolorektálních neoplázií*. 1.vyd. Praha : Nucleus HK, 2013. 126s. ISBN 978-80-87009-97-0.
- LATA, Jan et al. 2010. *Gastroenterologie*. 1.vyd. Praha : Galén, 2010. 256s. ISBN 978-80-7262-692-2.
- 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.
- PEYRIN-BIROULET, Laurent , a další. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2016, 14, 348-354. ISSN 1542-3565.
- PORCELLI, Brunetta, a další. Association between stressful life events and autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis of retrospective case–control studies. *Autoimmunity Reviews*. 2016, 15, 325-334. ISSN 1568-9972.
- ROSZAK, Dorota, a další. Determination of faecal inflammatory marker concentration as noninvasive method of evaluation of pathological activity in children with inflammatory bowel diseases. *Advances in Medical Sciences*. 2015, 60, 246-252. ISSN 1896-1126.
- SHOENFELD, Yehuda, FUČÍKOVÁ, Terezie a BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. 1.vyd. Praha : Grada, 2007. 88 s. ISBN 978-80-247-2044-9.
- WITHOFF, Sebo, a další. Understanding Celiac Disease by Genomics. *Trends in Genetics*. 2016, 1262, 1-14. ISSN 0168-9525.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikace dle Marshe

Tabulka 2: Základní statistické údaje

Tabulka 3: Náklady na jednotlivá stanovení

Tabulka 4: Náklady na jednotlivé kombinace stanovení

Tabulka 5: Náklady na jeden bod u jednotlivých kombinací metod

Tabulka 6: Časová náročnost jednotlivých metod

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Korelace mezi extrakcemi v rámci metody Quantum Blue

Graf 2: Korelace mezi extrakcemi v rámci metody ELISA

Graf 3: Korelace mezi dříve a nově používanou metodou

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Příloha 2: Extrakce vážením s očkovací klíčkou

Příloha 3: Mikrotitrační destička

Příloha 4: Souprava fCAL™ ELISA Calprotectin

Příloha 5: Automat pro stanovení metodou ELISA

Příloha 6: Pozitivní stanovení metodou Quantum Blue Calprotectin High Range

PŘÍLOHY

Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

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

Vážená paní
Ivana Pluhaříková
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o laboratorních metodách, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván v souvislosti s vypracování Vaší bakalářské práce s názvem „*Stanovení kalprotektinu u autoimunitních chorob gastrointestinálního traktu*“, při splnění níže uvedených podmínek.

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

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

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

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

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

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

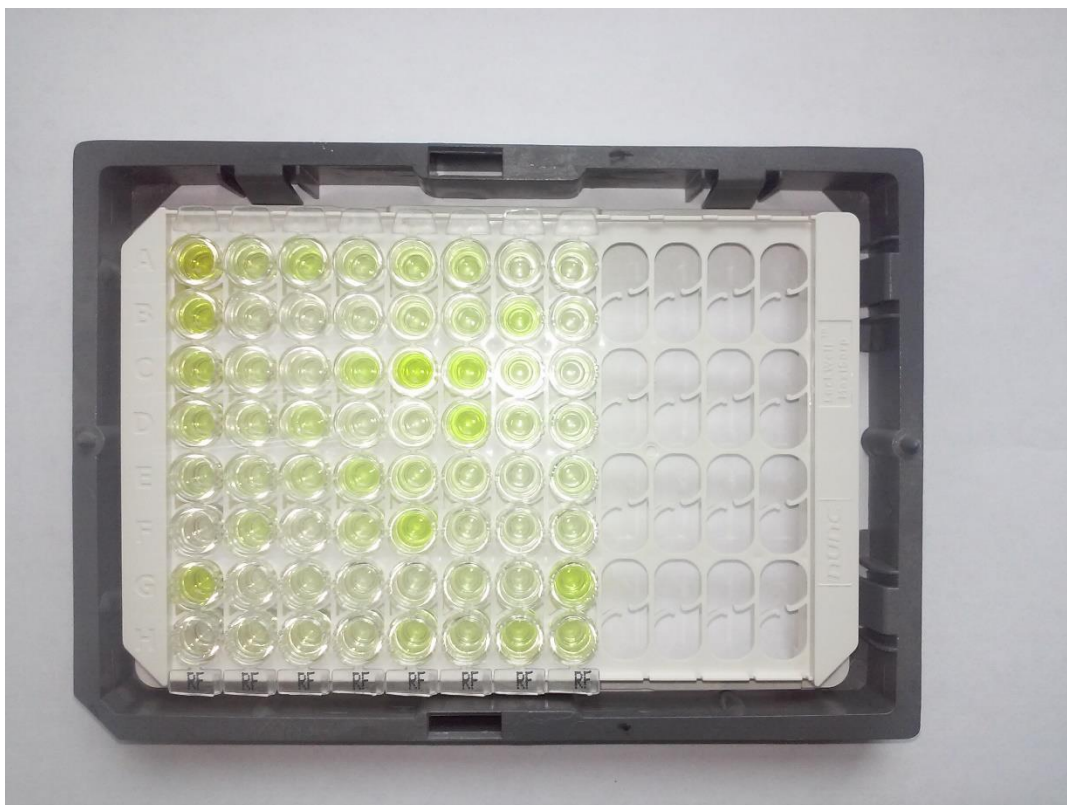
Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

22. 3. 2016

Příloha 2: Extrakce vážením s očkovací klíčkou



Příloha 3: Mikrotitrační destička



Příloha 4: Souprava fCAL™ ELISA Calprotectin



BÜHLMANN Laboratories AG
 Bismarckstr. 35
 CH-4154 Schönenbuch/Schönen-
 Buchenried
 Phone +41 (0) 827 12 13
 Fax +41 (0) 827 12 14
 Postfach
 BÜHLMANN Laboratories AG
 CH-4153 Reinthal 1
 www.buehlmann.ch
 info@buehlmann.ch

BÜHLMANN

QC-DATASHEET

BÜHLMANN fCAL™ ELISA Calprotectin **CODE: EK-CAL** **LOT: 4290**
EXP: 2017-01-31

Quality Control: Signature: *[Signature]* Date: *2015-10-26*

Approval for Release: Signature: *[Signature]* Date: *2015-10-26*

PROCEDURE
 Test performed according to the current instruction for use (IFU).

REAGENTS	LOT	EXP	REAGENTS	LOT	EXP
B-CAL-MP:	4290	2017-09-30	B-CAL-EL:	4068	2017-08-31
B-CAL-IB:	4077	2017-08-31	B-CAL-MB:	4050	2017-08-31
B-CAL-CASSET:	0759	2017-01-31	B-TMB12:	4045	2017-08-31
B-CAL-COINSET:	0759	2017-01-31	B-ST512:	4046	2017-08-31
B-CAL-EX:	4053	2017-08-31			

working range	10 - 600 µg/g		30 - 1800 µg/g	
	Target	Range (3 SD)	Target	Range (3 SD)
CONTROLS	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
Low	36	20 - 52	108	89 - 166
High	137	96 - 178	411	288 - 534

Standards (µg/g)						
1:50	Mean OD	%CV	Calc.	1:100	Mean OD	%CV
10	0.039	12.5	8	90	0.029	12.3
30	0.199	15.4	33	90	0.199	12.4
100	0.575	2.2	98	300	0.575	2.2
300	1.296	0.2	302	900	1.296	0.2
600	2.068	0.3	599	1800	2.068	0.3

Blank used for reduction = 0.083
 Curve1 50 = PmtDx 3.86334
 Curve1 30 = PmtDx 0.1731151
 Curve1 20 = PmtDx 1.02829
 Curve1 50 = PmtAx -0.01685
 Curve1 100 = PmtDx 3.86334
 Curve1 150 = PmtDx 1.02829
 Curve1 150 = PmtDx 1.02829
 Curve1 150 = PmtAx -0.01685

BÜHLMANN

Příloha 5: Automat pro stanovení metodou ELISA



Příloha 6: Pozitivní stanovení metodou Quantum Blue Calprotectin High Range

