



FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Markéta Zimová**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU AUTOPROTIILÁTEK  
U PACIENTŮ S POZITIVNÍM VYŠETŘENÍM  
KALPROTEKTINU**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2017

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

V Plzni dne

.....

Markéta Zimová

Chtěla bych velice poděkovat Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení mé bakalářské práce, průběžné opravy a poskytování cenných rad, podnětů a materiálních podkladů, jež mi pomohly při zpracování této bakalářské práce.

# OBSAH

ÚVOD .....	9
TEORETICKÁ ČÁST .....	10
1 AUTOPROTILÁTKY .....	10
1.1 Orgánově specifické protilátky .....	10
1.2 Orgánově nespecifické protilátky .....	10
1.3 ANCA.....	11
1.3.1 Cytoplazmatická imunofluorescence - cANCA .....	11
1.3.2 Perinukleární imunofluorescence – pANCA.....	11
1.4 ASCA.....	12
1.5 Srovnání ANCA a ASCA.....	12
2 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ .....	13
2.1 Idiopatické střevní záněty .....	13
2.1.1 Crohnova choroba .....	14
2.1.2 Ulcerózní kolitida .....	15
2.1.3 Léčba Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy .....	16
2.1.3.1 Farmakoterapie .....	16
2.2 Diagnostika autoimunitních onemocnění GIT .....	18
2.2.1 Laboratorní vyšetření.....	18
2.2.2 Endoskopické vyšetření.....	18
2.2.2.1 Gastroskopie .....	19
2.2.2.2 Kolonoskopie .....	19
2.2.3 Vyšetření protilátek.....	20
2.2.4 Radiologické metody .....	20
2.2.4.1 Skiografie.....	20
2.2.4.2 Irigografie.....	20
2.2.4.3 Enteroklýza.....	21
3 KALPROTEKTIN .....	22
3.1 Co je kalprotektin.....	22
3.2 Hodnoty kalprotektinu ve stolici .....	22
3.3 Zvýšená hladina kalprotektinu .....	22
PRAKTICKÁ ČÁST .....	24
4 CÍL PRÁCE.....	24

4.1 Výzkumné otázky .....	24
5 STANOVENÍ KALPROTEKTINU METODOU ELISA .....	25
5.1 Využívaný set .....	25
5.2 Reagencie .....	25
5.3 Princip vyšetření .....	26
5.4 Postup metody .....	27
6 IMUNOFLUORESCENCE .....	29
6.1 Využívaný set .....	29
6.2 Reagencie .....	29
6.3 Princip vyšetření .....	29
6.4 Postup metody .....	30
6.5 Vyhodnocení .....	31
7 VÝSLEDKY A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ .....	34
7.1 Základní statistické údaje .....	34
7.2 Senzitivita .....	34
7.3 Specifická .....	35
7.4 Porovnání výsledků senzitivity a specifity .....	36
8 TEST DOBRÉ SHODY .....	37
9 DISKUZE .....	38
ZÁVĚR .....	40
ZDROJE .....	41
ZDROJE OBRÁZKY .....	44
SEZNAM ZKRATEK .....	45

## **Anotace**

Příjmení a jméno:	Markéta Zimová
Katedra:	Katedra teoretických oborů
Název práce:	Sledování výskytu autoprotilátek u pacientů s pozitivním vyšetřením kalprotektinu
Vedoucí práce:	Ing. Tomáš Vlas
Počet stran:	číslované - 32 nečíslované - 13
Počet příloh:	1
Počet titulů použité literatury:	36
Klíčová slova:	kalprotektin – Crohnova choroba – ulcerózní kolitida – zánět – autoimunita

### **Souhrn:**

Práce se zabývá zjišťováním senzitivit, specificit a korelací u laboratorních vyšetřovacích metod využívaných k diagnostice autoimunitních onemocnění gastrointestinálního traktu. V práci se zaměřujeme na orgánově specifické autoprotilátky anti pankreas a anti tlusté střevo. Ty jsou porovnávány s markerem nespecifického střevního zánětu – kalprotektin.

## **Annotation**

Surname and name: Markéta Zimová

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Monitoring the occurrence of autoantibodies in patients with a positive test of calprotectin

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages: 45

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 36

Key words: Calprotectin – Crohn's disease – Ulcerative colitis – inflammation – autoimmune

### **Summary:**

The aim of the thesis is to introduce determination of sensitivity, specificity and correlation by laboratory examination methods used to diagnostics of autoimmune disorder of gastrointestinal tract. The consideration is taken to the organ specific auto-antidotes anti pancreas and anti-colon. Those are being compared with markers of nonspecific intestinal inflammation – Calprotectin.



## ÚVOD

Čím dál častějším problémem dnešní populace bývají trávicí potíže. Ty mohou být pouze drobné, například v důsledku sněženého špatného jídla, ale zároveň může jít o závažnější onemocnění. Problémy mohou být i na základě autoimunitních onemocnění. Důležité je správné určení diagnózy a sledování stavu nemocného, aby bylo možné zmírnit komplikace spojené s daným onemocněním a umožnit pacientovi co nejnornálnější fungování v běžném životě.

První část práce, tedy teoretická, je zaměřena na autoprotilátky, jejich výskyt a možnost stanovení. Teoreticky rozebereme autoimunitní onemocnění se zaměřením na Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu, jakožto nejčastějšími zástupci autoimunitních onemocnění gastrointestinálního traktu. Jejich rysy, hlavní projevy, lokalizaci onemocnění a vzájemnou podobnost, i čím jsou rozdílné. Závěr teoretické části je zaměřen na kalprotektin. Malý protein, vylučovaný stolicí, jež je markerem zánětlivých onemocnění.

Druhá část práce, část praktická, je zaměřena na stanovení kalprotektinu ve stolici nemocných pacientů, porovnání výsledků se zjištěním, která metoda je nejvhodnější pro diagnostiku autoimunitního střevního onemocnění.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 AUTOPROTILÁTKY

Autoprotilátky jsou takové protilátky, jež jsou namířené proti antigenům vlastního těla. Antigenem mohou být proteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy, glykoproteiny a flikofosfolipidy. Tvoří se fyziologicky a mají význam pro označení a destrukci nepatřičných autoantigenů. K jejich zvýšené tvorbě dochází v důsledku patologických mechanismů a vede k poškození orgánů či tkání. Autoprotilátky IgG a IgA podléhají somatické mutaci a mohou být vysoce specifické proti jednotlivým autoantigenům. Tyto autoprotilátky slouží jako marker autoimunitních onemocnění. K detekci autoprotilátek je možné využít několika metod, mezi které patří nepřímá imunofluorescence, radioimunoanalýza, imunoblot a enzymová imunoanalýza.

Autoprotilátky lze dělit na orgánově specifické a orgánově nespecifické. (1)

### 1.1 Orgánově specifické protilátky

Orgánově specifické protilátky jsou typické pro daný orgán nebo skupinu orgánů. Vyskytují se u celé řady autoimunitních onemocnění a jejich vyšetření má značný význam v diagnostice chorob. Příkladem jsou ASCA protilátky, neboli protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*, které se až v 80% vyskytují u pacientů s Crohnovou chorobou. (1)

### 1.2 Orgánově nespecifické protilátky

Orgánově nespecifické protilátky nejsou konkretizované pro daný orgán, ale zaměřují se na určité buňky či jejich součásti. Typickým příkladem jsou protilátky proti mitochondriím, antinukleární protilátky či protilátky proti cytoplazmě neutrofilů. (1, 2)

## 1.3 ANCA

ANCA (Anti-neutrophilcytoplasmic antibody) je skupina autoprotilátek, hlavně IgG, zaměřeným proti antigenům vyskytujícím se v cytoplazmě neutrofilních granulocytů a monocytů. Pozitivita těchto protilátek je typická pro vaskulitické syndromy typu Wegenerovy granulomatózy a nodózní polyarteriitidy. Často jsou pozitivní u chronických střevních zánětů, cystické fibrózy i jiných imunopatologických stavů.

Metodou nepřímé imunofluorescence na ethanolem fixovaných lidských neutrofilech lze stanovit odchylky v této skupině autoprotilátek, které se častěji vyskytují u ulcerózní kolitidy (60 – 70% vyšetřovaných) než u Crohnovi choroby (pouze 20 – 30% vyšetřovaných).

Vzhledem k rozdílné distribuci vyskytujících se antigenů (proteinkináza-3, myeloperoxidáza, elastáza, kathepsin G, azurozidin, laktoferin, lysozym a BPI) se uvádějí tři typy positivity ANCA screeningu:

- 1) cANCA: cytoplazmatická imunofluorescence, typická pro Wegerovy granulomatózy
- 2) pANCA: perinukleární imunofluorescence, typická pro polyarteritidy
- 3) xANCA resp. aANCA: atypická imunofluorescence (3)

### 1.3.1 Cytoplazmatická imunofluorescence - cANCA

Běžný obraz cANCA se primárně vyskytuje u pacientů s Wegenerovou granulomatózou a odpovídá výskytu protilátek proti proteinkináze-3. Vzácně lze prokázat také u cystické fibrózy či bakteriální endokarditidy. (3)

### 1.3.2 Perinukleární imunofluorescence – pANCA

Obraz pANCA fluorescence naznačuje výskyt protilátek proti myeloperoxidáze, jež jsou spojené s idiopatickými střevními záněty. Jejich pozitivita v séru poukazuje na jejich tvorbu ve střevě vlivem slizničních genů. Výskyt protilátek pANCA je v 50–80% u pacientů s ulcerózní kolitidou. Přítomnost protilátek lze brát i jako ukazatel závažnosti průběhu onemocnění.

Častěji se vyskytuje agresivnější levostranná forma, jež příliš nereaguje na léčbu a vyžaduje chirurgický zákrok brzy po zjištění rozvoje onemocnění.

Pozitivita u Crohnovi choroby je u 10 – 30% pacientů a je spojena s podobnými klinickými příznaky jako u ulcerózní kolitidy. (1, 4, 5)

#### **1.4 ASCA**

ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) jsou protilátky proti fosfopeptidomanu kvasinek Sacchomyces cerevisiae vyskytující se u Crohnovy choroby. Jejich pozitivita se vyskytuje u sporadické formy zánětů u 35-63% pacientů s Crohnovou chorobou a 8-12% pacientů s ulcerózní kolitidou. U formy familiární je pozitivita protilátek u 55-62% pacientů s Crohnovou chorobou a 7-25% s ulcerózní kolitidou. (6)

#### **1.5 Srovnání ANCA a ASCA**

Nižší výskyt ANCA protilátek a vyšší ASCA protilátek u Crohnovi choroby, na rozdíl od ulcerózní kolitidy, má dle literatury prediktivní hodnotu okolo 90-96%. Některé práce však tuto specifitu uvádějí pouze u dětí. Senzitivita protilátek vykazuje odlišnost ras ve prospěch bělošské populace v porovnání s rasou mongoloidní. (7)

## 2 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ

Autoimunita je označení pro imunitní odpověď na vlastní složky těla – autoantigeny. Reakce na takovýto antigen je vytváření autoprotilátek. Jejich přítomnost a přítomnost autoreaktivních T-lymfocytů lze prokázat. Poškozují tkáň organismu a vytvářejí tak autoimunitní onemocnění.

Autoimunitní reakce může být humorálně i buněčně zprostředkovaná. V případě humorálních reakcí dochází k tvorbě autoprotilátek, většinou IgG, jež poškozují tkáň aktivací komplementu v místě navázání autoprotilátky. Další poškození tkáň může způsobit tvorba a ukládáním imunokomplexů. Některé autoprotilátky mohou způsobit funkční změny buňky nebo proteinu, na které je autoprotilátka navázaná. Reakce buněčného typu jsou charakteristické poškozujícím zánětem způsobeným Tc a Th1 lymfocyty, jejich cytokinovými produkty a aktivací makrofágů.

Autoimunitní onemocnění vznikají prolomením mechanismů udržujících imunitní reakci vůči vlastnímu tělu. Jedním z hlavních rysů je zánět. Rozdělení a možnosti autoimunitních onemocnění je celá řada. Jednou z možností je například rozdělení dle lokalizace zánětu. Mohou být orgánově specifická, což znamená, že reakce imunitního systému je namířena proti konkrétnímu orgánu či tkáni, nebo orgánově nespecifická. V tomto případě je imunitní reakce namířena na více orgánů či celý organismus.

Pro potřeby této bakalářské práce se zaměřím pouze na úzkou část autoimunitních onemocnění a to idiopatické střevní záněty a nemoci s nimi spojenými. (8)

### 2.1 Idiopatické střevní záněty

Pojmem idiopatické střevní záněty jsou rozuměna postižení střeva vyvolaná zánětem. Příčiny těchto zánětů nejsou známy (z tohoto důvodu idiopatické – neznámého původu), tím se liší od střevních zánětů specifických, jež mají známou příčinu, jako např. průjmovitá onemocnění způsobená bakterií (Salmonella, Shigella, Escherichia coli a další). Jisté ovšem je, že předpoklady pro tyto onemocnění jsou vrozené. Uvádí se působení genetických vlivů

a rodinná zátěž. Asi u 5% pacientů se v příbuzenstvu vyskytují další onemocnění. K projevení poté vedou faktory zevního prostředí, mezi které patří nejen strava, infekční faktory, UV záření a jiné chemikálie, ale i psychické faktory, mezi které řadíme stres. Do této kategorie je možné zařadit i jiné onemocnění, jež může osobu oslabit.

I přes to, že neznáme přesnou příčinu vzniku daného onemocnění, to neznamená, že neznáme ani lék, jež by tyto choroby léčil. Idiopatické střevní záněty se nedají zcela vyléčit, avšak lze dosáhnout dlouhodobé remise. Samotná léčba je symptomatická – léčí se příznaky onemocnění, případně jeho následky a komplikace.

Idiopatické střevní záněty nemusejí postihovat pouze trávicí trakt. Při těžkých průbězích dochází k zasažení i jiných orgánů jako jsou játra, klouby ale i kůže a oči. Ve vážných případech může dojít až k sepsi („otravě krve“) s možností vzniku šokového stavu a smrti pacienta.

Mezi idiopatické střevní záněty řadíme Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. Obě tyto choroby se mohou projevit v jakémkoliv věku. Výjimkou nejsou ani dětští pacienti. Avšak nejčastější věk pro projevení Crohnovy choroby je mezi 18 a 35 lety a ulcerózní kolitidy mezi 30 a 40 lety věku. Samotné onemocnění jako přímá příčina smrti není časté. Důvodem úmrtí bývají obvykle komplikace nemoci či chirurgického výkonu. Mortalita na idiopatické střevní záněty je v Evropě, Velké Británii a USA 0,2 – 0,4/100 000 za rok (údaje z roku 1998). (9, 10)

### **2.1.1 Crohnova choroba**

Zánětlivé onemocnění se může projevit v jakékoliv části trávicího ústrojí, avšak nejčastěji postihuje oblast spojení tenkého střeva s tlustým. Zánět proniká celou stěnou, nezděná je granulomatózní povahy. Běžným projevem je zvýšená teplota, průjemovitá stolice, obvykle bez příměsí krve a křečovitá bolest v oblasti břišní dutiny v důsledku zúžení průsvitu střeva, jež může vést k ztluštění střevní stěny. U těžkých případů dochází k vyprazdňování až dvacetkrát denně. 10 – 20% nemocných má úbytek na váze až o 20% tělesné hmotnosti. Jeho příčinou je většinou porušený příjem potravy.

Pacienti potravu odmítají, protože způsobuje bolest, průjem a může být důvodem k anorexii. Postižení tlustého střeva je spojeno s nízkým výskytem píštělí a obstrukcí ale vysokým výskytem perianálního postižení a enteroragie. Naopak pokud je postiženou částí tenké střevo, dochází k vysokému výskytu obstrukcí, ale s nízkým krvácením a perianálním poškozením. Úvodní projevy nemusí být nijak závažné, pouze neurčité bolesti břicha až po dobu několika let. Lokalizace bolesti obvykle ukazuje na lokalizaci postiženého místa. Mimo příznaky v oblasti dutiny břišní se Crohnova choroba může projevovat i tvorbou aftů v dutině ústní, zánětlivým onemocněním očí či postižením pohybového aparátu. (9, 10, 11, 12)

### **2.1.2 Ulcerózní kolitida**

Ulcerózní kolitida je zánětlivé onemocnění postihující konečník a tlusté střevo. Typické je kontinuální postižení bez přeskočených úseků, vždy začínající od konečníku. Zdravá sliznice je od zánětlivé ostře oddělena.

Dle rozsahu rozdělujeme postižení na lehký, středně těžký a těžký tvar. Nejčastější formou je lehký tvar, jež se vyskytuje u 50% pacientů a postihuje konečník s esovitou kličkou. Projevuje se nucením na stolicí, která bývá s příměsí hlenu a krve. Průjem není podmínkou. U 20% pacientů nalézáme středně těžký tvar, kde se k postižení konečníku a esovité kličky přidává střevo, včetně sestupného tračníku. Průjem s krví a hlenem je již typický. U těžké formy dochází i k postižení příčného tračníku či tračníku vzestupného spolu s oblastí slepého střeva. Hlavními příznaky jsou vodnaté průjmy více než 6x za den s masivní příměsí krve a horečka. Může dojít i k septickému stavu s ohrožením pacienta s nutností intenzivního léčení.

Nejzávažnější komplikací u těžkého tvaru ulcerózní kolitidy je stav nazývaný toxický megakolon vznikající na základě septického stavu či po podání protiprůjmových léků. Dochází k ochrnutí hladké svaloviny střevní stěny, k rozšíření střevního průsvitu, kde se začne hromadit obsah. Nebezpečnost tohoto stavu je způsobena přemnožením bakterií, díky kterým je pak organismus zaplavován jedovatými toxiny střeva. Hrozí až jeho proděravění s následným zánětem pobříšnice. Tento stav vyžaduje intenzivní lékařskou

péči s chirurgickým zákrokem, během kterého dojde k odstranění tlustého střeva.

U typických případů nemá ulcerózní kolitida tendenci ke vzniku píštělí či abscesů. Nebývá totiž poškozena hlubší část stěny, nýbrž pouze sliznice střevní. V těžkých případech bývá časté zjizvení střeva, jeho zkrácení a ztráta funkce. (10)

### **2.1.3 Léčba Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy**

V současné době je léčba Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy velmi obdobná a proto budou popsány společně. Může být buď chirurgická nebo medikamentózní, ale nejčastěji bývá obojí. Druh léčby závisí na projevech choroby. Jiná bude při prvních projevech onemocnění, relapsu či léčby v klidovém období, kdy dochází ke snaze remisi udržet a zajistit co nejvyšší kvalitu života pacienta.

Během medikamentózní léčby jsou využívány hlavně léky, jež mají minimální vedlejší účinky. Je dán důraz na snahu co nejjednodušeji a nejefektivněji pomoci pacientovi. Avšak může dojít k situaci, kdy nedojde k úlevě nebo zhojení střevního zánětu a je zapotřebí nasadit silnější léčbu. Vše záleží na obtížích konkrétního pacienta a závažnosti situace. Samotná léčba se upravuje i v závislosti k předchozí léčbě a přítomnosti mimostřevních projevů onemocnění. Nedílnou součástí jsou dietní opatření a klidový režim. Mělo by dojít k vynechání cigaret, které zhoršují odpověď na léčbu a průběh celého onemocnění.

Aktivní onemocnění může být zjevné na základě klinických příznaků, jež jsou popsány u Crohnovy choroby i ulcerózní kolitidy, na základě laboratorních vyšetření, jež budou signalizovat zvýšené hodnoty zánětlivých parametrů či jen endoskopické. (35)

#### **2.1.3.1 Farmakoterapie**

Mezi hlavní skupinu léčiv využívaných při idiopatických střevních zánětech, zejména ulcerózní kolitidy, jsou aminosalicyláty – deriváty kyseliny



5-aminosalicylové. Kyselina je vázána na nosič nebo samostatně ve formě tablet a podávána pacientovi. Tablety mají na sobě speciální povrch, jež účinnou látku uvolňuje v závislosti na pH trávicí trubice. Nevýznamnějšími zástupci této skupiny jsou sulfasalazin s mesalazinem. I přes skutečnosti, že se mesalazin stále využívá při léčbě Crohnovy choroby, nemá takovou schopnost remisi udržet a tak má využití hlavně během léčby ulcerózní kolitidy.

Další využívanou skupinou jsou probiotika. Jsou to malé nepatogenní organismy, jež příznivě ovlivňují stav střevní mikroflóry. Jedním z možných důvodů vzniku idiopatických střevních zánětů může být porušení rovnováhy střevní mikroflóry, při které dochází k přemnožení škodlivých bakterií.

Nejčastějšími antibiotiky, jež se využívají pro léčbu osob se střevním zánětem jsou metrodiazol, rifaximin a ciprofloxacin. Antibiotika jsou indikována u pacientů s Ulcerózní kolitidou při infekci a před očekávaným operačním výkonem. U pacientů s Crohnovou chorobou jsou důvody různé, avšak mezi nejčastější patří postižení v oblasti řitního otvoru, ložisko v dutině břišní či výskyt vnitřních píštělí. Během antibiotik může u pacientů nastat nechutenství a nutkavý pocit na zvracení.

Při akutním vzplanutí choroby dochází k podávání kortikoidů, jež mají rychlé protizánětlivé účinky. Pro své vedlejší účinky však nemohou být využívány pro udržení remise. Jedním z problémů může být kordikodependence, při které by se aktivoval střevní zánět již při prvním vynechání dávky.

Kordikodependence a další problémy spojenými s kortikoidy jsou důvodem k zahájení imunosupresivní léčby. Ta má za úkol potlačit obranyschopnost a potlačit nežádoucí imunitní reakce.

Zatím nejnovější možností léčby je léčba biologická, která je indikována při rezistenci na běžnou farmakologickou léčbu. Jde o aplikaci látek, jež tlumí specifická místa se zánětlivou reakcí. U idiopatických zánětů je to především tumor necrosis factor, jež potlačuje funkci protizánětlivých bílkovin. Jejich účinek je i během dlouhodobého využívání. Mezi nejvyužívanější preparáty patří Infliximab a Adalimumab. (35)

## **2.2 Diagnostika autoimunitních onemocnění GIT**

### **2.2.1 Laboratorní vyšetření**

Při vyšetření krve se u pacientů s Crohnovou chorobou setkáváme s chudokrevností, snížením hladiny železa, zvýšením hladiny bílých krvinek a krevních destiček, což jsou hlavní příznaky aktivního zánětu. U rozsáhlejšího postižení střeva dochází k poruchám vstřebávání živin potřebných pro tělo pacienta. To se projevuje podvýživou s otoky a nízkou hladinou krevní bílkoviny.

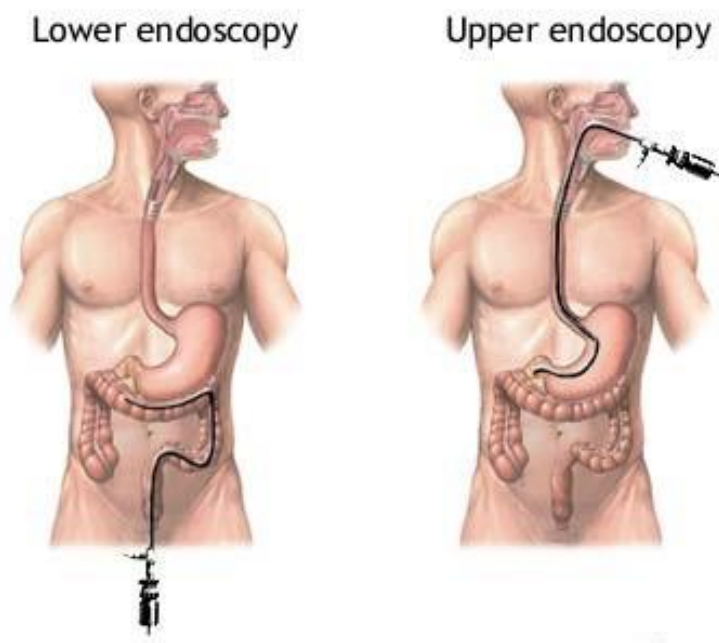
U pacientů s ulcerózní kolitidou také nalzáme chudokrevnost se zvýšenou hladinou bílých krvinek a krevních destiček. V případě těžších forem s rozsáhlými průjmy dochází k poruchám vodního a minerálového hospodaření těla.

Pro vyloučení infekčního původu zánětu je vhodné provést mikrobiologické a parazitologické vyšetření stolice. U pacientů s idiopatickými záněty je nutné využití některých zobrazovacích vyšetření. (10)

### **2.2.2 Endoskopické vyšetření**

Endoskopické vyšetření je obrazovací metoda tělních dutin a dutin orgánů umožňující kromě pohledu i odběr vzorků pro další vyšetření a odstranění polyců či cizích těles. Patří mezi hlavní pilíře diagnostiky autoimunitních onemocnění gastrointestinálního traktu. Principem vyšetření je zavedení endoskopu do vyšetřovaných dutin přirozenými otvory, jako jsou například ústa a řitní otvor, či otvory uměle vytvořenými. Ohebná hadička endoskopu má na konci malou kameru, jež ukazuje reálný stav vyšetřované oblasti. Obraz je přenášen na obrazovku odkud lékař hodnotí nález.

Endoskopické vyšetření se rozdělují v závislosti na vyšetřovaném místě. Pro účely této bakalářské práce se zaměřím na vybraná vyšetření monitorující gastrointestinální trakt. (13, 14, 15)



Obrázek č.1 Možnosti zavedení endoskopu při vyšetření (Zdroj: <https://infograph.venngage.com/p/66047/endoscopy>)

#### 2.2.2.1 Gastroskopie

Vyšetření trávicí trubice, během kterého lze zjistit stav stěny žaludku s jícnem. Celý proces je šetrný a nese jen malá rizika. Spolu s možností odběru vzorku má význam v diagnostice rakoviny jícnu, žaludku, žaludečních vředů a dalších onemocnění těchto orgánů. (16)

#### 2.2.2.2 Kolonoskopie

Vyšetření tlustého střeva v celé délce a terminální části ilea. Prohlédnutí stěn střeva má mimo jiné význam i pro diagnostiku rakoviny tlustého střeva, ulcerózní kolididy či crohnovi choroby. Vyšetření umožňuje sledovat rozsah poškození, přítomnost komplikací či úspěšnost léčby, proto je dobré ho u nemocných pacientů provádět periodicky. Nejčastějším důvodem ke kolonoskopickému vyšetření je výskyt krve ve stolici. (17, 18, 19)

### 2.2.2.3 Enteroskopie

Vyšetření tenkého střeva, které se na rozdíl od kolonoskopie či gastrokopie neprovádí tak často. Důvodem je značná délka a nepřístupnost tenkého střeva spolu s menší frekvencí výskytu závažných onemocnění postihujících tuto oblast. Přednost před enteroskopickým vyšetřením má jednodušší rentgenové vyšetření, magnetická rezonance či počítačová tomografie. (20)

### 2.2.3 Vyšetření protilátek

Další z možností je vyšetření protilátek, jež je popsáno výše v kapitole AUTOPROTILÁTKY.

### 2.2.4 Radiologické metody

Pro radiologické metody je typické využití rentgenového či ionizujícího záření k diagnostice onemocnění. Rozdělení metod je na základě používané metody či oblasti, jež je zobrazována. (21)

#### 2.2.4.1 Skiografie

Radiologická metoda využívající se k zobrazení stavu kostí a jemných tkání. Používá elektromagnetické záření, jež zaměří na konkrétní část těla. (21)

#### 2.2.4.2 Irigografie

Irigografie je jedno z alternativních vyšetření ke kolonoskopii. Přednost tohoto vyšetření před kolonoskopií může být způsobeno nepříznivými anatomickými změnami či při nesouhlasu pacienta ke kolonoskopii. Jedná se o vyšetření tlustého střeva za využití kontrastní látky. Ta se přidává pro lepší vykreslení snímku. Irigografie je vhodná k zobrazení polypů, píštělí, steatóz, pozánětlivých a tumorosních změn. (21, 22)

#### 2.2.4.3 Enteroklýza

Enteroklýza umožňuje zobrazení tenkého střeva, které je běžně dostupnými metodami špatně přístupné. Endoskopické vyšetření tenkého střeva je poměrně náročné a provádí se pouze ve specializovaných pracovištích, proto je enteroklýza vhodnější metodou.

Skrz ústa či nos je do pacienta zavedena hadička, která vede až do dvanáctníku. Poté se přidá kontrastní látka, spolu s roztokem metylcelulózy. Ten slouží jako negativní kontrast. V průběhu vyšetření dochází k vytvoření rentgenových snímků břicha, jež monitorují průchod kontrastního zbarvení střevem. Tím se získá přehled o stavu sliznice pacienta, polypech, nádorech a velká výtěžnost je i u podezření na Crochnovu chorobu. (22, 23)

## **3 KALPROTEKTIN**

### **3.1 Co je kalprotektin**

Kalprotektin je malý protein, vázající vápník a zinek vazebný. Nachází se zejména v neutrofilních granulocytech (až 60% všech bílkovin v cytosolu), méně pak v makrofázích a monocytech. Je uvolňován po jejich aktivaci nebo lýze. Koncentrace je i za normálních okolností mnohonásobně vyšší ve stolici, ale můžeme ho detekovat i v tělních tekutinách, včetně plazmy. Zastupuje 5% všech bílkovin buňky a jeho obsah v neutrofilu je srovnatelný s obsahem hemoglobinu v erythrocytech.

### **3.2 Hodnoty kalprotektinu ve stolici**

Při naměřené koncentraci kalprotektinu pod 50 µg/g hodnotíme výsledek jako negativní. Tato hodnota neukazuje na zánět zažívacího traktu.

U hodnot nad 50 µg/g je již výsledek pozitivní a může znamenat onemocnění způsobené zánětem. Mezi takové patří i idiopatické střevní záněty. Vysoké hodnoty poukazují na aktivní zánětlivé onemocnění zažívacího traktu.

### **3.3 Zvýšená hladina kalprotektinu**

K výraznému zvýšení kalprotektinu dochází během zánětů. Při nich dochází ke zvýšení permeability sliznice a v důsledku toho i vyšší přítomnosti granulocytů s monocyty. Aktivace a následná smrt těchto buněk způsobí větší uvolňování kalprotektinu a jeho zvýšenou koncentraci ve stolici. Je tedy velmi dobrým markerem v diagnostice a při monitorování terapie chronických i akutních střevních zánětů a do určité míry i prediktorem relapsu onemocnění, mezi které patří Crohnova choroba, ulcerózní kolitida nebo nekrotizující enterokolitidy u dětí.

Důvodem zvýšené koncentrace kalprotektinu ve stolici i zdravého střeva souvisí pravděpodobně s tím, že většina neutrofilních granulocytů, jež nejsou zapojeny do obranných pochodů, přechází do gastrointestinálního traktu,

kde končí svůj život. Během zániku se opět uvolňují biologicky aktivní substance, mezi které patří i kalprotektin.

Fekální kalprotektin dokáže odolávat metabolické degradaci bakteriálními enzymy a střevními proteázami, proto je do stolice vylučován neporušený. Z tohoto důvodu je ideálním markerem pro screening střevních zánětů. Vhodným testem je ELISA. (24, 25, 26)

# **PRAKTICKÁ ČÁST**

## **4 CÍL PRÁCE**

### **4.1 Výzkumné otázky**

- 1) Stanovte specificity a senzitivity pro stanovení autoprotilátek zaměřených proti pankreatu a tlustému střevu.
- 2) Stanovte specificity a senzitivity pro stanovení kalprotektinu.
- 3) Stanovte specificity a senzitivity pro jednotlivé kombinace stanovení a porovnejte s dostupnými doporučeními.
- 4) Zjistěte zda stanovení nepřímou imunofluorescencí poskytují shodné výsledky s nespecifickým znakem střevního zánětu – kalprotektinem.



## 5 STANOVENÍ KALPROTEKTINU METODOU ELISA

ELISA (z angličtiny *enzyme-linked immuno sorbent assay*) je jedna z nepoužívanějších metod v imunologii založená na vysoce specifické interakci mezi antigenem a protilátkou. Na jedné z těchto složek je navázán enzym, jež katalyzuje chemickou přeměnu do směsi dodaného substrátu, na barevný produkt. Zabarvený produkt reakce je vhodný ke spektrofotometrickému stanovení či stanovení na základě fluorescence.

ELISA se využívá ke stanovení protilátek proti určitému patogenu. Dále je možné detekovat různé antigeny. Pro průkaz specifických protilátek či antigenů existuje rozmanité množství variací ELISA testu. Mezi ty patří přímá a nepřímá ELISA a přímá sendvičová a nepřímá sendvičová ELISA.

V komerčních testech je nejvíce využívána sendvičová metoda. Název sendvičová proto, že antigen je chycený mezi dvěma protilátkami. (27, 28)

### 5.1 Využívaný set

Pro stanovení kalprotektinu jsem využívala set fCAL™ ELISA Calprotectin od firmy Bühlmann, což je diagnostický test in vitro, sloužící ke kvantitativnímu stanovení kalprotektinu ve stolici a posouzení zánětu střevní sliznice sendvičovou metodou ELISA. Metoda může být využita pro rozlišení zánětlivého onemocnění gastrointestinálního traktu od funkčních nemocí, jako je dráždivý tračník, u pacientů s chronickými bolestmi v oblasti dutiny břišní. (29)

### 5.2 Reagencie

Součástí setu EK-CAL je mikrotitrační destička (B-CAL-MP) potažena monoklonální protilátkou mAB spolu s fólií na zalepení destičky. Dále v balení nalezneme reagencie potřebné pro analýzu, jež zahrnuje 3x 125 ml extrakčního pufru pro extrakci stolice, 100 ml lahvičku koncentrovaného promývacího roztoku, jež je potřeba zředit s 900 ml destilované vody, 2x 125 ml inkubačního pufru, 5 kalibrátorů s různou koncentrací kalprotektinu v pufru v lahvičkách

po 1 ml, 2 lahvičky kontrol po 1 ml s nízkou a vysokou koncentrací kalprotektinu, 12 ml enzymového pufru, 12 ml TMB substrátu a 12 ml stop činidla.

Pro provedení metody jsou dále za potřebí 10, 100 a 1000  $\mu$ l pipety, polystyrenové nebo polypropylenové zkumavky, odměrný válec potřebný pro ředění promývacího pufru, zařízení na promývání mikrotitračních destiček a jejich třepačku, savý papír a spektrofotometr na měření koncentrace kalprotektinu, jež nejsou součástí komerčního setu. (29)



Obrázek č.2: Mikrotitrační destička pro metodu ELISA (Zdroj: <http://www.bio-equip.cn/ensrc.asp?ID=2067>)

### 5.3 Princip vyšetření

Principem je navázání na mikrotitrační destičku, která je potažena monoklonální protilátkou mAb, specifickou právě pro různé epitopy lidského kalprotektinu. Do jamek v mikrotitrační destičce napipetujeme extrakty z pacientova vzorku stolice, kontroly a kalibrátory. Po 30 minutové inkubaci při pokojové teplotě a promytí přidáme detekční protilátku konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP), jež detekuje molekuly kalprotektinu navázané na monoklonálních protilátkách mikrotitrační destičky. Po další inkubaci s následným promytím, při kterém se odmyjí nenavázané protilátky, přidáme substrát následovaný stop-činidlem, při kterém se modré zbarvení vzorků změní na žluté. Zbarvení je vhodné k fotometrickému stanovení při 450 nm.

Koncentrace kalprotektinu ve vzorku je přímo úměrné enzymatické aktivitě navázaných komplexů. Finální koncentraci odečítáme z kalibrační křivky vytvořené z koncentrací kalibrátorů a absorbancí. (29)

## 5.4 Postup metody

Metoda může být provedena 2 postupy a to v nižším či rozšířeném rozsahu v závislosti na očekávané koncentraci vzorků. Pro hodnoty do 600 µg/g je vhodný nižší rozsah, pro vzorky nad 600 µg/g rozsah rozšířený.

Před začátkem analýzy je důležité nechat vytemperovat reagentie na 18 – 28 °C a naředit pouze extrakty stolice. Kontroly a standardy jsou již připravené od výrobce k použití.

Postup metody v pracovním rozmezí 10-600 µg/g využívané pro účely výzkumu této bakalářské práce byl následující:

1. V poměru 1:50 naředíme extrakty vyšetřované stolice s inkubačním pufrům a dobře promícháme. Použijeme tedy 20 µl extraktu a 980 µl pufru. Připravené vzorky necháme 5 minut inkubovat při pokojové teplotě.
2. Připravíme si mikrotitrační destičku s potřebným počtem jamek pro vzorky, kontroly a kalibrátory. Nevyužité stripy co nejdříve vrátíme do obalu s vysoušedlem.
3. 2x promyjeme jamky mikrotitrační destičky s 300 µl promývacího pufru. Při každém promytí musí zůstat pufr v jamkách alespoň po dobu 20 sekund. Po té ho dobře vyklepeme do savého papíru.
4. Do každé jamky napipetujeme po 100 µl vždy inkubační pufr, kalibrátory – každou koncentraci vždy po dvou jamkách, nízkou a vysokou kontrolu, také vždy po dvou jamkách a patientské vzorky do příslušných jamek.
5. Mikrotitrační destičku přikryjeme fólií ze setu a necháme inkubovat po dobu 30 minut + maximálně 5 minut na třepačce při 450 rpm za teploty 18 – 28 °C.
6. Odstraníme fólii destičky, vyprázdníme jamky a 3x propereme promývacím roztokem. Používáme 300 µl po dobu alespoň 20 sekund. Dobře vyklepeme do savého papíru.

7. Do každé z jamek napipetujeme 100  $\mu$ l enzymového pufru.
8. Destičku překryjeme fólií a inkubujeme 30 minut + maximálně 5 minut na třepačce při 450 rpm za teploty 18 – 28 °C.
9. Odstraníme folii destičky, vyprázdníme jamky a 5x propereme promývacím roztokem. Používáme 300  $\mu$ l po dobu alespoň 20 sekund. Dobře vyklepeme do savého papíru.
10. Do každé z jamek napipetujeme 100  $\mu$ l TMB substrátu.
11. Destičku překryjeme fólií a inkubujeme 15 minut + maximálně 2 minuty na třepačce při 450 rpm za teploty 18 – 28 °C.
12. Do každé z jamek napipetujeme 100  $\mu$ l stop činidla. Odstraníme bubliny.
13. Do 30 minut měříme absorbanci při 450 nm. (29)

## **6 IMUNOFLUORESCENCE**

Imunofluorescence je metoda využívaná v laboratořích zejména k detekci a lokalizaci antigenů. Po jejich reakci mezi fluorescenčně značenými protilátkami a antigenem je možné sledovat vytvořený imunokomplex ve fluorescenčním mikroskopu. K detekci antigenů přítomných ve tkáních a buňkách se využívá přímá fluorescence. K detekci autoprotilátek volně cirkulujících v patientském séru se využívá fluorescence nepřímá. Nejčastěji využívanou fluorescenční protilátkou je fluoresceinizothyokyanát (FITC). (30, 31)

### **6.1 Využívaný set**

Pro stanovení jsem využívala set pankreas, tlusté střevo IIFT (IgA - IgM) firmy EUROIMMUN. Testovací soupravu lze využít pro kvalitativní nebo kvantitativní in vitro stanovení lidských protilátek v plazmě či séru. (32)

### **6.2 Reagencie**

Součástí setu je 10 sklíček, každé obsahující biočip potažený řezy pankreatu a tlustého střeva, 1,5 ml fluoresceinem značené anti-lidské IgA (kozí), 0,1 ml pozitivního kontrolního séra a 0,1 ml negativního kontrolního séra, 2 balení soli pro PBS s pH 7,2, 2x 2,0 ml Tweenu 20, 3,0 ml montovacího média, 12 kusů krycích sklíček a návod k provedení testu. Obsah soupravy je pro 50 stanovení. (32)

### **6.3 Princip vyšetření**

Principem testu je inkubace nátěrů pankreatu a tlustého střeva s naředěným patientským vzorkem. Pokud je reakce pozitivní, antigeny se naváží na specifické IgA a IgM protilátky, jež se detekují pomocí fluoresceinem značených anti-lidských protilátek. Výsledky se poté odečítají fluorescenčním mikroskopem. Jako substráty jsou využity řezy opičího střeva a transferované Hep-2 buňky. Ty obsahují antigeny rPAg1/CUZD1 a Pag2. (32)

## 6.4 Postup metody

Pro standardizování imunologické analýzy vyvinula firma EUROIMMUN Techniku TITERPLANE, kde se značené protilátky či vzorky aplikují na reakční políčka reagenčních nosičů. Na nosiče se následně pokládají sklíčka s biočipy. Všechny biočipy přicházejí do kontaktu s tekutinami a jednotlivé reakce začínají v jeden okamžik. Kapalina je uzavřena v omezeném prostoru a proto není zapotřebí využití vlhké komůrky. Za těchto podmínek je možné inkubovat libovolný počet vzorků vedle sebe, a to za stejných podmínek.

Před vlastní analýzou si musíme připravit potřebné reagensie.

- Sklíčka: po dosažení pokojové teploty sklíček odstraníme ochranný obal a sklíčko následně do 15 minut inkubujeme. Je-li ochranný obal poškozen, sklíčko se již nesmí pro diagnostiku využít. Pro značení využíváme fixu s plstěným hrotem.
- Fluoresceinem značená sekundární protilátka (FITC): před prvním použitím je nutné pořádně promíchat a nevystavovat slunečnímu světlu. Konjugát je citlivý na světlo.
- Pozitivní a negativní kontrolní séra: před prvním použitím je potřeba řádného promíchání.
- PBS-Tween: v 1 litru destilované vody rozpustíme 1 balení „PBS“ a smícháme s 2 ml Tween 20. Mícháme alespoň 20 minut, dokud není homogenní.
- Reagenční nosiče: Políčka reagenčního nosiče musí být hydrofilní a povrch okolo hydrofobní. V případě potřeby je potřeme pomocí Extran MA 01 (Merck) a pořádně propláchneme vodou.
- Protilátky třídy IgM: před stanovením specifických protilátek třídy IgM je nutné odstranit z patientských vzorků protilátky třídy IgG a tím zabránit nechtěné reakci a následnému vzniku falešně pozitivních výsledků na IgM. Zároveň se vyvarujeme možnosti, kdy IgG vytlačí IgM z antigenu a tím vzniku falešně IgM negativních výsledků.

Vlastní postup metody:

1. Do všech políček reagenčního nosiče napipetujeme 30  $\mu$ l naředěného vzorku, bez vzduchových bublin.
2. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě. Reakce se spustí vložením sklíček v biočipy do odpovídajících drážek nosiče. Musíme zajistit, aby došlo ke spojení vzorku se svým biočipem, avšak aby se vzorky navzájem nedotýkaly.
3. V kádince za pomoci PBS-Tween pufru promyjeme biočipy a ihned ponoříme alespoň na 5 minut do kyvety s PBS-Tween. Využijeme třepačku k protřepání.
4. Za pomoci dávkovací pipety do všech políček reagenčního nosiče napipetujeme 25  $\mu$ l fluoresceinem značeného anti-lidského globulinu.
5. Z kyvety vyjmeme sklíčko s biočipy. V následujících 5 vteřinách je nutné papírovým ručníkem osušit zadní stranu sklíčka a neprodleně vložit do drážek reagenčního nosiče. Toto provedeme se všemi sklíčky a následně inkubujeme 30 minut. Sklíčka je nutné chránit před přímým slunečním světlem. Pro ušetření času můžeme během inkubace s naředěným vzorkem pipetovat konjugát na separátní reagenční nosiče.
6. Biočipová sklíčka opláchneme v kádince proudem PBS-Tween pufru a vložíme alespoň na 5 minut do kyvety naplněné PBS-Tween puftrem. Využijeme třepačku k protřepání. Pro kontrastní barvení můžeme využít 10 kapek Evans Blue na každých 150 ml forfátového pufru.
7. Vložíme ustalovací medium na krycí sklíčko. Přidáme maximálně 10  $\mu$ l na reagenční políčko. Z PBS-tween pufru vyjmeme jedno sklíčko, osušíme zadní stěnu papírovým ručníkem a stranu s biočipy přiložíme na připravené krycí sklíčko. Zkontrolujeme, je-li sklíčko správně upevněno v drážkách podložního sklíčka. (32)

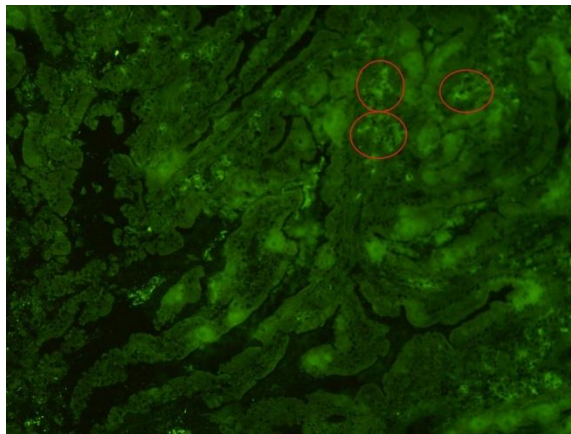
## 6.5 Vyhodnocení

Při pozitivní reakci, jsou-li tedy přítomny protilátky proti tlustému střevu a pankreatu, bude obraz v celém svém rozsahu jasně fluoreskovat. Obraz bude

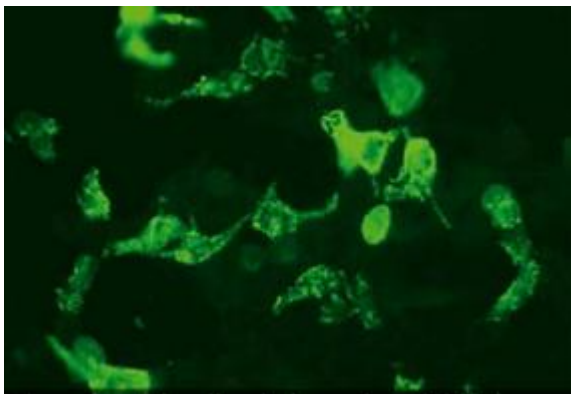
stejný, jako při pohledu na pozitivní kontrolu. Nevykazuje-li pozitivní kontrola specifickou fluorescenci či naopak negativní kontrola fluorescenci vykazuje, nesmí se výsledek vydat a je nutné test opakovat.



Obrázek č.2 (Zdroj: Vlastní sbírky ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň)



Obrázek č. 3 (Zdroj: Vlastní sbírky ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň)



Obrázek č. 4 (Zdroj: Vlastní sbírky ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň)



Na obrázkách č. 2 a 3. můžeme vidět pozitivní reakci na protilátky proti tlustému střevu. Fluorescence vykazující přítomnost protilátek je vyznačena červeným kolečkem. Na obrázku č. 4 vidíme pozitivitu transferovaných buněk s antigenem rPAg1/CUZD1 a Pag2. Využití těchto antigenů zvyšuje senzitivitu a specifitu stanovení.

U kvalitativního vyhodnocení pozorujeme reakce při ředění. Pokud se vyskytne pozitivní reakce IgA při ředění 1:100, ukazuje to na indikaci Crohnovy choroby. Stejně tak tomu je u třídy IgG, avšak zde ředíme v poměru 1:1000. Pozitivní výsledek u třídy IgM je tehdy, jsou-li ve vzorku detekovány i protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* třídy IgG nebo IgA. Pokud nedojde po ředění k žádné reakci, je výsledek negativní.

U kvantitativního vyšetření sledujeme titr vzorku, při kterém je ještě možné detekovat specifickou fluorescenci. Tento výsledek je nutný hodnotit ve srovnání s reakcí vznikající při použití ekvivalentně naředěného negativního séra. (32)

## 7 VÝSLEDKY A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ

### 7.1 Základní statistické údaje

Pro zhodnocení bylo celkem využito 100 patientských vzorků bez rozdílu věku či pohlaví, ve kterých byla stanovena koncentrace kalprotektinu. Na základě výsledků nepřímé imunofluorescence bylo možné zhodnotit pozitivitu na jednotlivých řezech pankreatu a tlustého střeva. Po srovnání s výsledky bylo možné určit správně pozitivní a negativní a falešně pozitivní a negativní výsledky.

Tabulka č. 1: Četnosti jednotlivých výsledků pro jednotlivé metody a jejich kombinace

	<b>Pankreas</b>	<b>Tlusté střevo</b>	<b>Kalpro- tektin</b>	<b>Pankreas + tlusté střevo + kalprotektin</b>	<b>Pankreas + kalpro- tektin</b>	<b>Tlusté střevo + kalpro- tektin</b>
<b>Správně negativní</b>	22	19	24	18	19	22
<b>Falešně pozitivní</b>	2	5	0	6	5	2
<b>Správně pozitivní</b>	29	35	66	67	67	66
<b>Falešně negativní</b>	47	41	10	9	9	10

Zdroj: Vlastní

### 7.2 Senzitivita

Senzitivita je ukazatelem spolehlivosti metody. Udává nám pravděpodobnost správně pozitivního výsledku, za předpokladu nemocného pacienta. Senzitivita nabývá hodnot od 0 do 1, případně 100%. Čím více se hodnoty blíží maxima, tedy 1 či 100%, tím je test spolehlivější a dokáže zachytit onemocnění. Nevýhoda příliš vysoké senzitivity může být ve vytváření falešně pozitivních výsledků. Test označí pacienta za pozitivního, i když u něj daná nemoc není přítomna.

Hodnotu senzitivity získáme z rovnice:

$$\text{Senzitivita} = \frac{\text{počet skutečně pozitivních}}{\text{počet skutečně pozitivních} + \text{počet falešně negativních}} \quad (33, 34)$$

Pro zjištění senzitivity metod, které byly využívány během hodnocení vzorků, jsem použila výsledky tabulky číslo 1 a vzorcem senzitivitu vypočítala.

Tabulka č. 2: Senzitivita jednotlivých metod a jejich kombinací

	<b>Senzitivita</b>
<b>Pankreas</b>	0,3816
<b>Tlusté střevo</b>	0,4605
<b>Kalprotektin</b>	0,8684
<b>Pankreas + tlusté střevo + kalprotektin</b>	0,8816
<b>Pankreas + kalprotektin</b>	0,8816
<b>Tlusté střevo + kalprotektin</b>	0,8684

Zdroj: Vlastní

### 7.3 Specificita

Specificita nám ukazuje správnou negativitu u pacientů bez onemocnění. Stejně jako senzitivita nabývá hodnot od 0 do 1, případně 100%. Čím vyšší hodnotu dostaneme, tím správnější test je a máme tím méně falešně pozitivních nálezů. Avšak u příliš vysoké specificity může nastat problém výskytu falešně negativních výsledků u pacientů, u kterých se nevyskytují všechny symptomy nemoci a tudíž je test označí jako zdravé pacienty, i když jsou nemocní. (35)

Hodnoty specifity získáme z rovnice:

$$\text{Specifita} = \frac{\text{počet skutečně negativních}}{\text{počet skutečně negativních} + \text{počet falešně pozitivních}} \quad (36)$$

Pro zjištění senzitivity metod, které byly využívány během hodnocení vzorků, jsem použila výsledky tabulky číslo 2 a vzorcem senzitivitu vypočítala.

Tabulka č. 3: Specifita jednotlivých metod a jejich kombinací

	<b>Specifita</b>
<b>Pankreas</b>	0,9167
<b>Tlusté střevo</b>	0,7917
<b>Kalprotektin</b>	1,0000
<b>Pankreas + tlusté střevo + kalprotektin</b>	0,7500
<b>Pankreas + kalprotektin</b>	0,7917
<b>Tlusté střevo + kalprotektin</b>	0,9167

Zdroj: Vlastní

## 7.4 Porovnání výsledků senzitivity a specifity

Na základě výsledků senzitivity a specifity bylo možné zhodnotit, která metoda či kombinace metod je nejvhodnější pro diagnostiku autoimunitních onemocnění. Pro vybrání nejlepší metody bylo zapotřebí vybrat nevyšší kombinaci výsledků specifity se senzitivitou. V případě, že by se vybíralo pouze na základě jednoho z těchto kritérií, výsledky by byly nepřesné a mohlo by dojít k výskytu falešně pozitivních či falešně negativních výsledků testu.

## 8 TEST DOBRÉ SHODY

Pro porovnání vzájemných vztahů výsledků, získaných nepřímou imunoflorescencí a metodou ELISA, jsme využili test dobré shody neboli chí kvadrát.

Test dobré shody je statistická metoda založena na zjištění rozdílu mezi pozorovanými hodnotami (zjištěnými) a hodnotami námi očekávanými (kalkulovanými). Test dobré shody nám umožňuje ověřit shodu teoretického modelu od skutečného.

Chí kvadrát jsme využívali na porovnání různých vztahů mezi kalprotektinem, tlustým střevem a pankreatem. Výsledky byly následující: při porovnání kalprotektinu s pankreatem nebyly výsledky statisticky významné. Vztah není na sobě závislý, výsledky nekorelují. Dalším porovnávaným byl kaprotektin s tlustým střevem, ale ani v tomto případě se nepodařilo zjistit závislost. Změna nastala u porovnání kalprotektinu vůči kombinaci tlusté střevo s pankreatem, u kterých bylo zjištěno, že určitá závislost mezi jednotlivými hodnotami existuje. Ke stejnému výsledku došlo poté i u tlustého střeva a pankreatu. I zde byly na sobě hodnoty závislé.

## 9 DISKUZE

Cílem výzkumu bylo stanovit specifitu a senzitivitu metod pro stanovení autoprotilátek zaměřených proti pankreatu a tlustému střevu a metody proti kalprotektinu, jakožto markeru zánětlivého střevního onemocnění. Dále pak zjistit, která metoda či kombinace metod jsou nejvhodnějším ukazatelem autoimunitního onemocnění gastrointestinálního traktu.

Pro výzkum bylo využito sto vzorků různých pacientů Fakultní nemocnice Plzeň, kteří byli vybráni bez ohledu na věk či pohlaví. Po zpracování vzorků metodou ELISA a nepřímou fluorescencí se hodnotila senzitivita a specifita jednotlivých autoprotilátek. Nejvyšší senzitivita se ukázala na metodách v kombinaci pankreas s kalprotektinem a pankreas s kalprotektinem a tlustým střevem, jež byla téměř 87%. Nejvyšší specifita pak nastala u citlivosti na kalprotektin a to rovných 100%. Další v pořadí, s téměř 92% bylo stanovení v kombinaci kalprotektin s tlustým střevem. Podobným výzkumem na citlivost metod kalprotektinu se zabýval i Puos-Serrano kol., u kterého se senzitivita se specifitou pohybovala v rozmezí 80 – 85%. Rozdílné hodnoty mezi jednotlivými výzkumy může být způsobena cut-off hladinou V případě našeho výzkumu byla hladina 50 µg/g, kdežto Puos-Serrano (36) využíval cut-off = 170 µg/g.

V další části se zjišťovalo, zdali se při využití nepřímé fluorometrie výsledky shodují s nespecifickým znakem středního zánětu kalprotektinem. U porovnání závislosti kalprotektinu s pankreatem a závislosti kalprotektinu s tlustým střevem se nepodařilo najít shodu. Metody jsou na sobě nezávislé. Tato skutečnost může být způsobena nízkou specifitou pankreasu s tlustým střevem ale vysokou u kalprotektinu. Další ze zkoumaných byl kalprotektin vůči kombinaci tlusté střevo a pankreas. V tomto případě se již podařilo nalézt shodu a výsledky jsou na sobě závislé. To může být využitím nepřímé fluorescence, která zvyšuje specifitu a senzitivitu u tlustého střeva s pankreatem a díky tomu se hodnoty blíží hodnotám kalprotektinu. Posledním hodnoceným parametrem byla závislost tlustého střeva a pankreatu, u kterého se podařila naleznout shoda. Jedná se o metody na detekci zánětu a proto v tomto případě dostáváme podobné výsledky.

Na základě zjištěných senzitivit a specifit u jednotlivých metod a vzájemných závislostí, navrhujeme pro laboratorní diagnostiku střevních zánětů využívání metody v kombinaci kalprotektin, tlusté střevo a pankreas.

## ZÁVĚR

Hlavním tématem této práce bylo zjištění senzitivit, specifit a korelací u laboratorních vyšetřovacích metod využívaných k diagnostice autoimunitních onemocnění gastrointestinálního traktu. Začátek teoretické části práce byl zaměřený na jednotlivá onemocnění s možnostmi vyšetření a léčbou. V praktické části došlo k vytyčení cílů práce, kterými bylo zjištění specifity a senzitivity pro stanovení autoprotilátek zaměřených proti pankreatu a tlustému střevu, pro stanovení kalprotektinu a následně jednotlivé kombinace těchto metod. Z výsledků vyplývá, že nejcitlivější metodou je kombinace kaprotektin, tlusté střevo a pankreas.

Dále jsme se zaměřili na vzájemné závislosti výsledků metod, které jsme zjišťovali za využití testu dobré shody. Zde nám vyšla závislost kombinací metod tlusté střevo a pankreat. Dále jsme zjistili závislost mezi metodou kalprotektin a kombinací metod nepřímá fluorescence tlusté střevo a nepřímá fluorescence pankreat.

Vzhledem k výsledkům se domníváme, že nejlepší postup z laboratorního pohledu ke správné diagnostice autoimunitních onemocnění astrointestinálního traktu je kombinace metod kalprotektin, tlusté střevo a pankreas.



## ZDROJE

1. BARTUŇKOVÁ, Jiřina, Terezie FUČÍKOVÁ a Zuzana HUMLOVÁ. *Laboratorní diagnostika v imunologii*. In ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3. vydání. Praha : Galén, 2013. 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2
2. Autoprotilátka. Velký lékařský slovník [online]. Maxdorf, 2017 [cit. 2016-11-06]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/autoprotilatka-6>
3. TEPLAN, Vladimír. *Praktická nefrologie*. 2., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1122-2.
4. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. NCBI [online]. Rockville Pike, USA: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2019365>
5. *Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods*. [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 2002 [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2019365>
6. *Anti-saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: a study in IBD families*. [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 2002 [cit. 2017-12-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2019365>
7. *A prospective comparative study of ASCA and pANCA in chinese and caucasian IBD patients*. [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 2001 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11233666>
8. HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
9. LUKÁŠ, K. et al.: *Idiopatické střevní záněty*. Praha: Triton, 1997, ISBN 80-85875-31-4.

10. KOHOUT, Pavel a Jaroslava PAVLÍČKOVÁ. *Crohnova choroba, ulcerózní kolitida*. Praha: Forsapi, c2006. Rady lékaře, průvodce dietou. ISBN 80-903820-0-2.
11. SUMMERS, R. W.; ELLIOTT, D. E.; URBAN, J. F., et al. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*. 2005, roč. 54, čís. 1, s. 87–90. PMID 15591509
12. KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství*. Praha : Galén ; Karolinum, 2006. ISBN 80-7262-430-X. S. 601.
13. *Endoskopie* [online]. 2001 [cit. 2017-02-10]. Dostupné z: <http://cust.sweb.cz/fmm/endoskop.htm>. Semestrální práce z předmětu Fyzikální metody v medicíně.
14. KEIL, Radan a kol. *Vybrané kapitoly z gastroenterologie*. 1.vyd. Praha : Karolinum, 2012. 86s. ISBN 978-80-246-1970-5
15. LATA, Jan et al. 2010. *Gastroenterologie*. 1.vyd. Praha : Galén, 2010. 256s. ISBN 978-80- 7262-692-2.
16. ŠTEFÁNEK, Jiří. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz>.
17. *Střevní-záněty.cz. Kolonoskopie* [online]. [cit. 2017-03-1]. Dostupné z: <http://www.strevni-zanety.cz/virtualni-kolonoskopie>
18. Koloskopické vyšetření. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Koloskopické\\_vyšetření&oldid=359461](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Koloskopické_vyšetření&oldid=359461)
19. Enteroskopie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2014 [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Enteroskopie&oldid=11198529>
20. Radiologie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Radiologie&oldid=14418627>
21. Diagnostické zobrazovací metody při vyšetření zažívacího traktu. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2017-01-02]. Dostupné z:

[http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Diagnostick%C3%A9\\_zobrazovac%C3%AD\\_metody\\_p%C5%99i\\_vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD\\_z\\_a%C5%BE%C3%ADvac%C3%ADho\\_traktu&oldid=342025](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Diagnostick%C3%A9_zobrazovac%C3%AD_metody_p%C5%99i_vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD_z_a%C5%BE%C3%ADvac%C3%ADho_traktu&oldid=342025)

Enteroklýza. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2011

Copyright © 2011 MUDr. Jiří Štěfánek [cit. 2017-02-25]. Dostupné z:

<http://www.stefajir.cz/?q=enteroklyza>

22. Kalprotektin [online]. Karlovy Vary, 2013, 2013(30), 2 [cit. 2017-03-30].

DOI: Kalprotektin. Dostupné z: [http://www.sanglab.cz/media/laboratorni-listy/laboratorni\\_listy\\_2013/lab.%20listy\\_1330\\_Kalprotektin.pdf](http://www.sanglab.cz/media/laboratorni-listy/laboratorni_listy_2013/lab.%20listy_1330_Kalprotektin.pdf)

23. Kalprotektin ve stolici: Kalprotektin. Institut Klinické a Experimentální

Medicíny [online]. © Institut klinické a experimentální medicíny 2015 -

2017, 2017 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z:

[https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_17246-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_17246-L0000006.htm)

24. A novel sol particle immunoassay for fecal calprotectin in inflammatory bowel disease patients. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online].

8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: National Center for

Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2016 [cit.

2017-03-14]. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26908083>

25. ELISA. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA):

Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z:

<https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=ELISA&oldid=14497365>

26. SCHNEIDERKA, Petr, et al. *Kapitoly z klinické biochemie* 2. vydání.

Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0678-X.

27. BÜHLMANN. Bühlmann fCAL ELISA Calprotektin. Schönenbuch:

Bühlmann Laboratories AG, 2014.

28. *Datový standard MZČR* [online]. Dostupné

z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/ILABS.htm>

29. *Fakultní nemocnice Hradec Králové: Fingerlandův ústav*

*patologie* [online]. Hradec Králové, 2011 [cit. 2017-03-14]. Dostupné z:

[https://www.fnhk.cz/fingerland/aktivita-](https://www.fnhk.cz/fingerland/aktivita-ustavu/diagnostika/imunofluorescence)

[ustavu/diagnostika/imunofluorescence](https://www.fnhk.cz/fingerland/aktivita-ustavu/diagnostika/imunofluorescence)

30. EUROIMMUN. CIBD Mosaic Instruction for the indirect immunofluorescence test. Lübeck: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, 2016
31. Senzitivita testu. *WikiSkripta* [online]. 2008- [cit. 2017-03-11]. ISSN 18046517. Dostupné z:  
[http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Senzitivita\\_testu&oldid=310995](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Senzitivita_testu&oldid=310995)
32. Senzitivita. Zdravotnictví: Vše, co student potřebuje vědět [online]. ČR: Zdravotnictví, 2017 [cit. 2016-12-30]. Dostupné z:  
<http://zdravotnictvi.studentske.cz/2008/08/senzitivita.html>
33. (ZAČÁTEČNÍCI) Co přesně znamená Senzitivita a Specificita? *KARDIOLOG* [online]. 2013 [cit. 2016-12-30]. Dostupné z:  
<http://kardiologie.blogspot.cz/2012/09/zacatecnici-co-presne-znamenam.html>
34. Specificita testu. *WikiSkripta* [online]. 2008- [cit. 2016-12-30]. ISSN 18046517. Dostupné z:  
[http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Specificita\\_testu&oldid=337869](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Specificita_testu&oldid=337869)
35. Crohnova choroba a ulcerózní kolitida [online]. Praha, 2010, [cit. 2017-01-30]. DOI: Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. Dostupné z:  
[http://www.crohn.cz/wp-content/uploads/2013/10/brozura\\_dospeli\\_2.pdf](http://www.crohn.cz/wp-content/uploads/2013/10/brozura_dospeli_2.pdf)
36. Correlation between fecal calprotectin and inflammation in the surgical specimen of Crohn's disease. *Journal of surgical research* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z:  
<http://www.journalofsurgicalresearch.com/>

## **SEZNAM ZKRATEK**

GIT - Gastrointestinální trakt

ASCA - Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody

ANCA - Anti-neutrophilcytoplasmic antibody

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

IgG – Imunoglobulin G

IgM - Imunoglobulin M

Tc – Cytotoxický T-lymfocit

Th1 – Pomocný T-lymfocit

mAb – monoklonální protilátka

FITC - fluoresceinizothyokyanát