

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Kalprotektin a jeho význam v diagnostice a léčbě střevních zánětů
Bakalářská práce

2024

Kateřina Ryšlavá

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Ryšlavá**
Osobní číslo: **C21216**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Kalprotektin a jeho význam v diagnostice a léčbě střevních zánětů**
Téma práce anglicky: **The Role of Calprotectin in Diagnosis and Therapy of Inflammatory Bowel Disease**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literaturou týkající se střevních zánětů, jejich diagnostiky a terapie, zaměřte se na současný stav řešení v dané problematice (state-of-the-art).
2. Popište funkci, význam a strukturu proteinu kalprotektin, diagnostického markeru střevních zánětů.
3. Zhodnoťte význam tohoto biomarkeru v klinickém kontextu – diagnostika, průběh a prognóza onemocnění, monitorování účinku léčiv.
4. Seznamte se databázemi shromažďující a poskytující aktuální informace o proteinu kalprotektinu.
5. Uveďte přehled metod, jakými se tento protein stanovuje v klinické praxi i v rámci výzkumných aktivit.
6. Jako zdroje informací používejte odborné články z hodnotných odborných časopisů českých i zahraničních (anglický jazyk). K vyhledávání literatury využijte osvědčené databáze typu *PubMed*, *Scopus*, *Web of Science*.
7. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry, jak budou tyto informace o novém způsobu terapie využitelné do budoucna ve prospěch pacientů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Kalprotektin a jeho význam v diagnostice a léčbě střevních zánětů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 01.7.2024

Kateřina Ryšlavá v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Především bych ráda poděkovala své vedoucí prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat svým nejbližším za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato práce se zabývá kalprotektinem, a jeho rolí ve střevních zánětech. V práci jsou popsány nejčastěji se vyskytující střevní záněty, jejich patogeneze, diagnostika a možnosti léčby. Dále je v práci popsán kalprotektin. Uvedeny jsou základní informace o kalprotektinu, jeho historie a biologická funkce v těle. Dále jsou v práci uvedeny metody jeho stanovení, a jeho role jako biomarkeru ve střevních zánětech.

KLÍČOVÁ SLOVA

střevní záněty, kalprotektin, diagnostika, biomarker

TITLE

The Role of Calprotectin in Diagnosis and Therapy of Inflammatory Bowel Disease

ANNOTATION

This thesis focuses on calprotectin, and its role in intestinal inflammation. The most common intestinal inflammations, their pathogenesis, diagnosis and treatment options are described. Calprotectin is also described. Basic information about calprotectin, its history and biological function in the body are presented. Methods of its determination and its role as a biomarker in intestinal inflammation are also presented.

KEYWORDS

intestinal inflammation, calprotectin, diagnostics, biomarker

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	9
ÚVOD.....	11
1 Střevní záněty	12
1.1 Crohnova choroba	12
1.2 Ulcerózní kolitida	17
1.3 Jiná střevní onemocnění	22
2 Kalprotektin	25
2.1 Základní charakteristika	25
2.2 Biologická funkce.....	27
2.2.1 Intracelulární funkce kalprotektinu	28
2.2.2 Extracelulární funkce kalprotektinu.....	29
3 Metody stanovení kalprotektinu	31
3.1 Odběr a příprava vzorků.....	31
3.2 Imunoanalytické metody s indikátory	32
3.2.1 ELISA	32
<i>PhiCal test</i>	33
3.2.2 CLIA	36
3.2.2.1 DiaSorin LIASON Calprotectin test	37
3.2.2.2 ALPCO Calprotectin Chemiluminescence ELISA test	40
3.2.3 Metoda nepřímé imunofluorescence.....	42
3.2.3.1. Thermo Fisher – EliA Calprotectin 2	43
3.2.3.2 Proglead test.....	44
3.3 Turbidimetrické metody	45
<i>BÜHLMANN fCal turbo test</i>	46
3.4 Imunochromatografické testy	49
3.4.1. BÜHLMANN Quantum Blue fCAL test	50
3.4. „Point of care“ testy	53
4 Kalprotektin jako biomarker v diagnostice a monitorování střevních zánětů	55
ZÁVĚR	59
POUŽITÁ LITERATURA.....	60

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Schéma anatomie střevní sliznice	14
Obrázek 2 Typický nález při endoskopii u pacienta s CD.....	16
Obrázek 3 Nákresy demonstrující základní makroskopické rozdíly mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou	19
Obrázek 4 Sliznice tlustého střeva u ulcerózní kolitidy s narušenou architekturou krypt, zvýšeným počtem zánětlivých buněk a metaplazií Panethových buněk (šipky)	21
Obrázek 5 Struktura kalprotektinu.....	26
Obrázek 6 Kalprotektin v kontrole střevního zánětu	27
Obrázek 7 Princip nekompetitivní metody ELISA	33
Obrázek 8 Komerční sada PhiCal a její všechny komponenty	34
Obrázek 9 Počet kvalitativních výsledků pro 5 testů pro kalprotektin na základě referenčních mezích výrobců.....	36
Obrázek 10 Princip provedení metody CLIA	37
Obrázek 11 Přístroj LIAISON XL.....	38
Obrázek 12 ROC křivka pro rozlišení IBD od IBS a jiných gastrointestinálních poruch pomocí testu LIAISON Calprotectin	39
Obrázek 13 Komerční sada ALPCO a její komponenty	41
Obrázek 14 Rozdíl provedení přímé a nepřímé imunofluorescence.....	43
Obrázek 15 Regresní analýza koncentrací fekálního kalprotektinu (FC) mezi metodami FC Proglead a FC BÜHLMANN	45
Obrázek 16 Schéma provedení turbidimetrického stanovení	46
Obrázek 17 Reagencie pro provedení testu BÜHLMANN fCAL turbo.....	47
Obrázek 18 Zařízení CALEX pro odběr stolice	48
Obrázek 19 Schéma imunochromatografického testu	50
Obrázek 20 Zařízení Quantum Blue reader 3rd gen	51
Obrázek 21 Testovací kazetka testu Quantum Blue	52
Obrázek 22 Komponenty POCT sady od značky QuantOn	53
Obrázek 23 Vztah mezi klinickou aktivitou a koncentrací FC pomocí metody ELISA u A-ulcerózní kolitidy, B-Crohnovy choroby	56
Obrázek 24 ROC křivka hladin fekálního kalprotektinu v 8. týdnu pro predikci slizničního hojení v 54. týdnu	58
Tabulka 1 Montrealská a Vídeňská klasifikace Crohnovy choroby	13
Tabulka 2 Montrealská klasifikace rozsahu UC	17
Tabulka 3 Montrealská klasifikace závažnosti UC.....	18

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AIEC	Adherentně invazivní <i>Escherichia coli</i>
ADCY 7	Adenylátcykláza typu 7
anti-IgG	Protilátka proti imunoglobulinu třídy IgG
anti-TNF	Protilátka proti tumor nekrotizujícímu faktoru
ASCA	Protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (z angl. "Anti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Antibody")
CFA	Antigen cystické fibrózy
CLIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza
CT	Výpočetní tomografie (z angl. "Computed Tomography")
CD	Crohnova choroba (z angl. "Crohn's Disease")
CRP	C-reaktivní protein
EIA	Enzymová imunoanalýza
ESR	Sedimentace erytrocytů (z angl. "Erythrocyte Sedimentation Rate")
FC	Fekální kalprotektin (z angl. "Fecal Calprotectin")
FUT 2	Fukosyltransferáza 2
GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (z angl. "Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor")
HLA	Hlavní histokompatibilní systém (z angl. "Human Leukocyte Antigens")
HRP	Křenuvová peroxidáza (z angl. "Horseradish Peroxidase")
IBD	Idiopatické střevní záněty (z angl. "Inflammatory Bowel Disease")
IBS	Syndrom dráždivého tračníku (z angl. "Irritable Bowel Syndrome")
IL	Interleukin
IgE	Imunoglobulin třídy E
IgG	Imunoglobulin třídy G
IRAK	z angl. "Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1"
Mac-1	Antigen makrofágu 1 (z angl. "Macrophage 1 Antigen")
MIF	Migrací inhibující faktor
Muc 2	Mucin 2
MyD88	z angl. "Myeloid Differentiation Primary Response 88"
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NK	Přirození zabijáci (z angl. "Natural Killer")

NK	Přirození zabíječi (z angl. "Natural Killer")
NOD2	z angl. "Nucleotide-Binding Oligomerization Domain - Containing Protein 2"
NSAID	Nesteroidní protizánětlivé léky (z angl. "Non-Steroidal Anti Inflammantory Drugs")
pANCA	Perinukleární protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (z angl. "Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody")
PRR	Receptory rozpoznávající vzory (z angl. "Pattern Recognition Receptors")
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. "Reactive Oxygen Species")
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α
UC	Ulcerózní kolitida (z angl. "Ulcerative Colitis")

ÚVOD

Mezi idiopatické střevní záněty (IBD) se řadí Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. V České republice těmito onemocněními trpí dohromady okolo 50 tisíc pacientů. Nemoci se objevují jak u žen, tak i u mužů, většinou starších jak 20 let. Tato onemocnění jsou již delší dobu problémem, postihují okolo 5 milionů lidí na celé planetě a počet nemocných stále narůstá. Tato onemocnění vznikají na základě vícero faktorů jako je genetická predispozice, porucha imunitního systému, porušení střevní mikroflóry nebo životní styl.

I když je léčba IBD velmi rozmanitá, většinou nedojde k úplnému vyléčení onemocnění. Nemoc pouze přechází do stavu remise, při které je potřeba neustále v léčbě a monitorování stavu onemocnění pokračovat, aby se včas předcházelo novému vzplanutí onemocnění. V rámci zahajovací léčby se volí tato skupina léčiv: imunosupresiva, glukokortikoidy, aminosalicyláty a biologická léčba. V některých případech je možné nasadit i antibiotika. Léčba je zvolena dle stádia, v které se onemocnění nachází. Některé z nich se užívají v období remise onemocnění a některé z nich, jako je např. biologická léčba se nasazují, pokud pacient na žádnou z předchozích léčeb nereagoval. I přesto, že léčba nabízí škálu možností, část pacientů nakonec musí podstoupit chirurgický zákrok.

Zlatým standardem diagnostiky IBD je endoskopické vyšetření. I přesto, že nám tato technika umožňuje sledovat stav střevní sliznice, disponuje tato metoda několika nevýhodami. Jednou z nich je vyšší cena vyšetření, její invazivnost a jistý diskomfort pro pacienta. Proto v současné době probíhá výzkum klinické studie zaměřené na vyhledávání a validaci biospecifických markerů, které by nám poskytovaly dostatečné informace o konkrétním střevním zánětu. Při laboratorní diagnostice je důležité celkový krevní obraz a biochemické vyšetření, s důrazem na počet bílých krvinek, sedimentaci erytrocytů a CRP. CRP je významným ukazatel zánětu v těle. Jedná se však o biomarker nespecifický, informující pouze o zánětu systémovém. Velkou roli v diagnostice a léčbě střevních zánětů má fekální kalprotektin. Jedná o molekulu, která je v přímém kontaktu se sliznicí střeva a jeho množství ve stolici koreluje se závažností poškození střevní sliznice a zánětem. Běžně se kalprotektin vyšetřuje i ze séra, je však otázkou, jaký význam má sérový kalprotektin v diagnostice IBD. Vyšetření fekálního kalprotektinu je neinvazivní a existuje spousta metod, jak ho stanovit. Vztah kalprotektinu k IBD je v mnoha ohledech předmětem vědeckých výzkumů a studií, které by mohly v budoucnu vést ke zlepšení diagnostiky IBD.

1 Střevní záněty

1.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD) je chronické zánětlivé onemocnění, které se může vyskytovat po celé délce trávicího traktu. Ve většině případů je nemoc v době diagnózy lokalizovaná ve 35 % případů v oblasti tenkého střeva a tlustého střeva, ve 32 % pouze oblast tlustého střeva. Ve 28 % je postiženo pouze tenké střevo a v posledních 5 % je postižena oblast žaludku a dvanáctníku [1]. Dle “Crohn’s and colitis foundation“ je nejvíce diagnostikovaných ve věku od 20 do 30 let [2]. Pro účel výzkumu a léčby se CD rozdělila do fenotypových subtypů, kterými je: zánětlivý, stenozující a penetrující fenotyp. Zánětlivá CD je charakteristická zánětem gastrointestinálního traktu bez známky stenozního ani penetrujícího onemocnění. Zánět může vést k fibróze a zúžení lumen. Díky těmto změnám klasifikujeme nemoc jako stenozující. Jakmile dojde ke fibrostenitickým změnám, není jiná možnost léčby než chirurgický zákrok, jelikož jsou změny nevratné. Pokračující zánět může vést ke vzniku píštěle, charakteristický pro penetrující onemocnění. Penetrující onemocnění je spíše považováno jako komplikace, která se rozvíjí bez ohledu na základní fenotyp. Každý z těchto podtypů má jinou etiologii a vyžaduje různé přístupy ke sledování průběhu onemocnění a jeho léčby [3]. Nejrozšířenější klasifikací CD je klasifikace Montrealská [4], která bere v úvahu faktory jako je věk, ve kterém byla nemoc diagnostikována, lokace CD a fenotyp [5]. Tyto faktory jsou společně se starší Vídeňskou klasifikací shrnuty v Tabulce 1. Ta vznikla v roce 1998 z Římské klasifikace [6]. Montrealská klasifikace se oproti ní nemění v základních kategoriích, pouze v rozdělení uvnitř nich. Pokrok v genetických studiích podpořil koncept, že lokalizace CD je biologický znak, který se v průběhu onemocnění nemění. V důsledku toho lze předpokládat, že pacienti, kteří mají onemocnění lokalizované v konkrétní části trávicí trubice, mohou mít různou míru odpovědi a remise na konkrétní terapii a rozdílné mechanismy účinku [5].

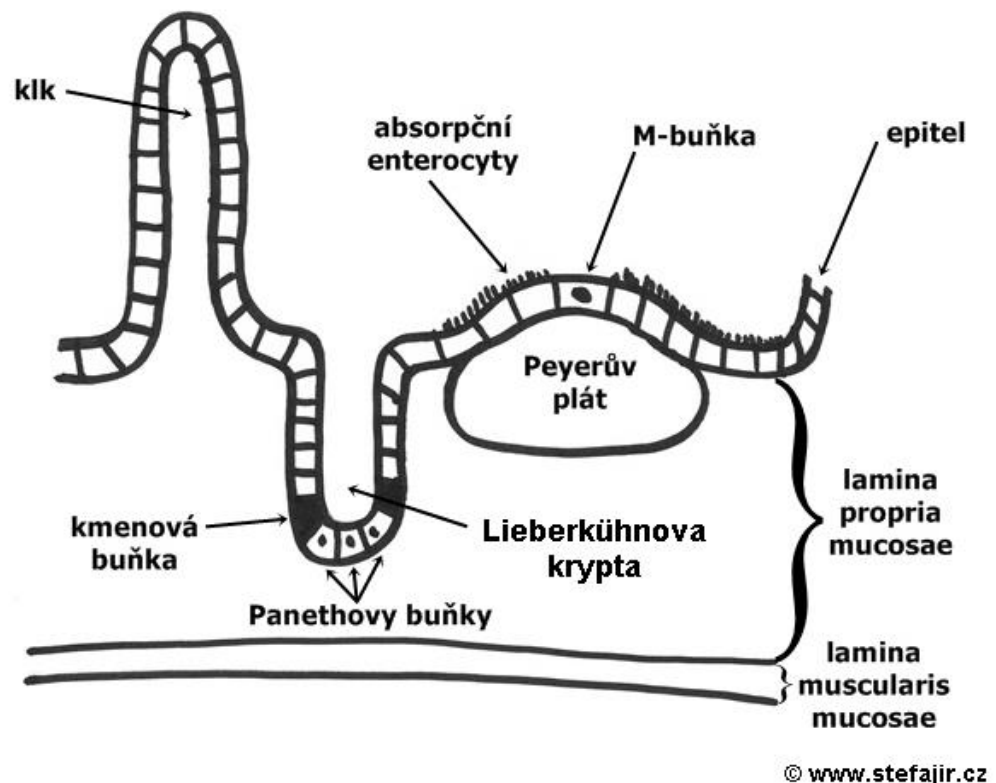
Tabulka 1 Montrealská a Vídeňská klasifikace Crohnovy choroby (převzato z [4])

	Montrealská klasifikace	Vídeňská klasifikace
Věk v době diagnózy	A1: <16 A2: 17-40 A3: >40	A1: <40 A2: >40
Lokace	L1: Terminální ileum L2: Tlusté střevo L3: Ileum a tlusté střevo L4: Izolované postižení horní části GIT	L1: Terminální ileum L2: Tlusté střevo L3: Ileum a tlusté střevo
Fenotyp	B1: Nestenozující B2: Stenozující B3: Perforující	B1: Zánětlivé B2: Stenozující B3: Perforující

Patogeneze CD zahrnuje několik faktorů jako jsou genetické predispozice, složení mikrobiomu a enviromentální faktory. Do dnešní doby bylo objeveno přes 200 genetických markerů, které byly spojeny s CD [7]. Zapojené geny naznačují, že imunoreaktivita vůči střevním bakteriím je rozhodující složkou rizika vzniku nemoci [8]. Důležitým genem, který byl objeven, je NOD2, také znám jako CARD15, na chromozomu 16. NOD2 je cytosolový receptor rozpoznávající vzory (PRR), má za úkol regulovat imunitní systém při přítomnosti intracelulárních bakterií. Je totiž schopný rozpoznávat muramyl dipeptid, který je obsažen v buněčné stěně bakterií. Přesné mechanismy, jak NOD2 ovlivňuje CD nejsou do hloubky prozkoumané, ale můžeme říct, že reguluje vrozenou imunitní odpověď, poskytuje tělu antibakteriální ochranu a prozánětlivou odpověď, která se spouští při rozpoznání patogenů a dojde k produkci prozánětlivých cytokinů [9]. Pokud se tento gen objeví v homozygotní formě, je pravděpodobnost, že pacient bude trpět CD, 20krát až 40krát vyšší než u genu s formou heterozygotní [4]. Důležitost střevního mikrobiomu je demonstrován na případě, kdy fekální transplantace přispívá k léčbě a prevenci recidivy onemocnění [9]. Bylo zjištěno, že adherentně invazivní *Escherichia Coli* (AIEC) se vyskytuje více u jedinců s CD než u jedinců zdravých. AIEC má schopnost napadat střevní epitel a množit se v makrofázích [4].

Mezi enviromentální faktory ovlivňující nemoc lze zařadit kouření, léky nebo dietu. Kouření zvyšuje riziko onemocnění 2krát. Riziko je zvýšené jak u lidí, kteří kouří v době diagnostiky, tak i u lidí, kteří už s kouřením v minulosti přestali [3]. Role diety ve vzniku nemoci je nejasný, ale některé studie tvrdí, že vysoký příjem cukrů, omega-6 mastných kyselin, polynenasycených mastných kyselin a masa zvyšuje pravděpodobnost výskytu CD. Naopak dieta bohatá na vlákninu a ovoce riziko snižuje [4].

Patogeneze je založena zejména na zánětu tkáně, který je způsobený nezvladatelnou imunitní odpovědí proti bakteriálním antigenům na povrchu lumen. Imunitní buňky, jako jsou T- lymfocyty, B-lymfocyty, monocyty a NK buňky jsou zúčastněné v tomto procesu tak, že se infiltrují do střeva pacientů postižených touto nemocí. Část imunitně podmíněné náchylnosti k CD spočívá v některých vlastních obranných mechanismech proti infekčním onemocněním, a střevní sekrece hlenu je jejich součástí. Bylo zjištěno, že s CD jsou spojené různé varianty genu Muc2, které snižují produkci hlenu. Je exprimován jednotlivými buňkami, které jsou prekurzory pohárkových buněk. Většina těchto buněk je lokalizována v oblasti krypt [11]. Kde se krypty ve střevech nachází, je vyznačeno na Obrázku 1, i s ostatními střevními strukturami.



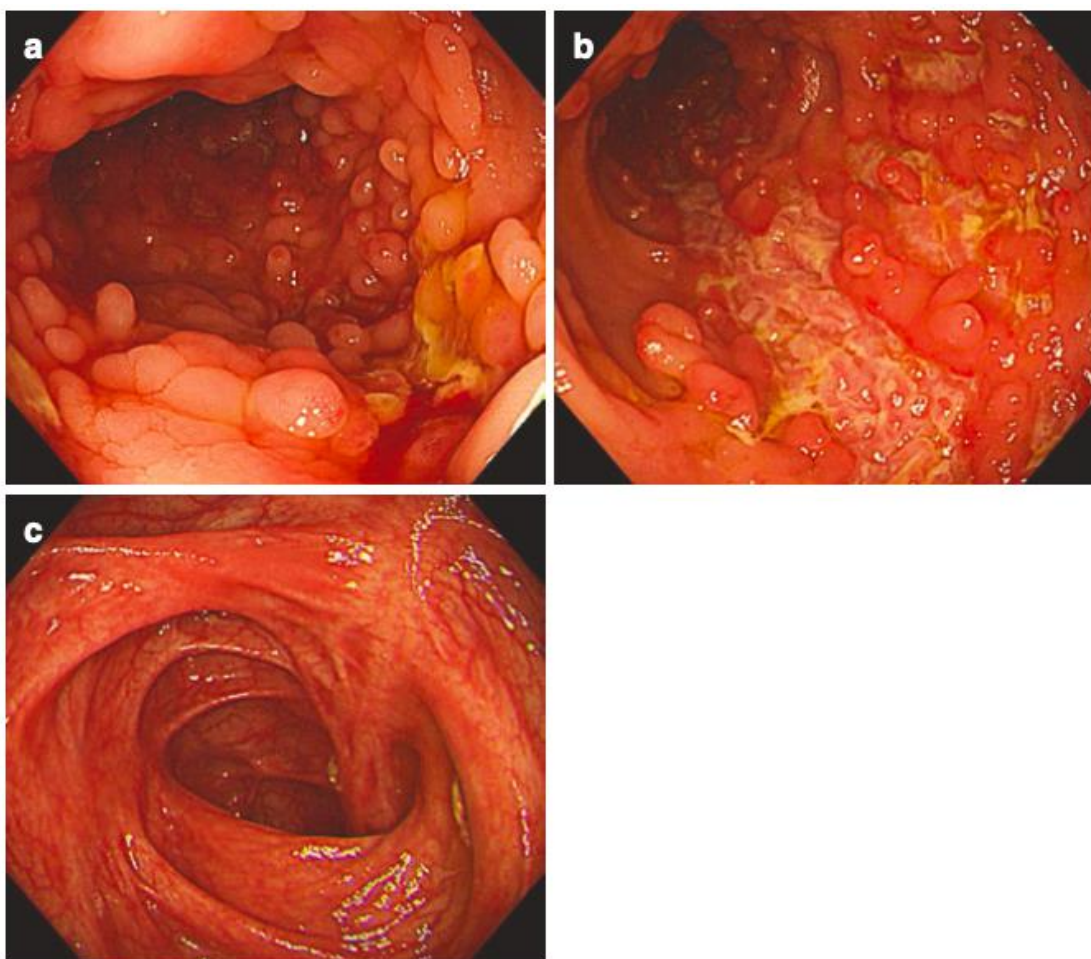
Obrázek 1 Schéma anatomie střevní sliznice (převzato z [12])

Včetně toho, byly s onemocněním spojeny molekuly, které zprostředkovávají bakteriální adhezi. Jednou z nich je gen FUT 2, který kóduje enzym fukosyltransferázu. Lidé, kteří jsou nositeli varianty tohoto genu, mají změněnou interakci s bakteriemi a jsou náchylnější ke vzniku CD. Patogeneze je také podpořena vzájemným působením buněk s integriny, adhezivními molekulami a chemokiny. Ty jsou zodpovědné za zvýšenou produkci zánětlivých cytokinů, které představují cíl imunitních i neimunitních buněk a podporují slizniční zánět [10].

Příznaky CD mohou být nespecifické a mohou záležet na lokalizaci a závažnosti onemocnění. Někteří pacienti mohou mít příznaky onemocnění i několik let před stanovením

diagnózy. Hlavními příznaky je průjem a bolest břicha, kdy průjem může být i s příměsí krve nebo hlenu [13]. Krvácení z konečníku sice není tak časté, ale může se vyskytnout při poškození distálního tračníku [8]. Mezi další příznaky patří únava, úbytek hmotnosti, horečka, anémie a opakované píštěle nebo jiné perianální vředy, mezi které se řadí např. fisury. U pacientů se striktně probíhajícím onemocněním se mohou objevovat střevní obstrukce, které mají za následek nedostatečné vyprazdňování. To může vést k hyperaktivním střevním zvukům, nevolnosti a zvracení [14]. CD se projevuje i mimo střeva, a to například artropatií, dermatologickým a hepatobiliárním onemocněním. Jako další se mohou objevit tromboembolické a metabolické kostní onemocnění. S CD je spojena i řada dalších imunitně zprostředkovaných onemocnění jako je astma, celiakie, revmatoidní artritida a roztroušená skleróza [15].

Vyšetření CD probíhá v několika fázích, kdy jejich součástí jsou zobrazovací metody, laboratorní vyšetření krve, stolice nebo samotné tkáně. Zlatým standardem mezi vyšetřeními je endoskopie. Typickým nálezem při endoskopii je nerovnoměrně rozložený zánět s lézemi. Postižená tkáň má vzhled podobný dlažebním kostkám, jak je vidět na Obrázku 2. U CD je také často pozorována aftózní eroze, která může být známkou časně fáze onemocnění [16].



Obrázek 2 Typický nález při endoskopii u pacienta s CD. a) Tkáň připomínající dlažební kostky. b) Podélný vřed v tlustém střevě. c) Tvorba jizev (slizniční hojení). (převzato z [16])

Klíčovou roli stále v první linii zobrazovacích metod hraje rentgenografie. Slouží k detekci obstrukce střev a rozšíření stěny střeva. K zobrazení tenkého střeva se často využívá ultrazvuk, kdy se nejvíce zkoumá změna tloušťky stěny, která by neměla být tlustší jak 3 mm [4]. Při provedení magnetické rezonance je možné pomocí kontrastní látky posoudit ztlustění střevní stěny a mezenterických cév. Mezi magnetickou rezonancí a endoskopickým vyšetřením, které je považováno za zlatý standard, byly zaznamenány podobné hodnoty senzitivity, specifity a přesnosti vyšetření [17].

Nejdůležitějšími parametry, které se v laboratoři vyšetřují je fekální kalprotektin, kompletní vyšetření krevního obrazu, kompletní biochemické vyšetření, C-reaktivní protein, sedimentace erytrocytů a laktoferin [4,18]. Tyto hodnoty nám podávají informace jak o průběhu nemoci, tak i o účinnosti léčby. Pro nás bude nejdůležitější vyšetření fekálního kalprotektinu. Hodnoty kalprotektinu by se u zdravého člověka měly pohybovat do 50 $\mu\text{g}/\text{g}$. Hodnoty vyšší jak 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ jsou spojeny s výskytem lézí, a hodnoty vyšší jak 250 $\mu\text{g}/\text{g}$ jsou považovány za

patologické. Pokud je u pacienta přítomen průjem, je potřeba vzorek stolice vyšetřit na přítomnost střevních patogenů a toxin produkovaný *Clostridium difficile* [4,19].

Léčba CD závisí na závažnosti, lokaci a fenotypu onemocnění. Pro léčbu hnisavých nebo perianálních komplikací se používají antibiotika, jejichž role v léčbě není klíčová. Již mnoho let se nasazuje léčba imunosupresivy, které ale mají pomalý nástup, a tak se více používají v období remise. Častěji se používají léčiva v kombinaci s protilátkami anti-TNF, které snižují imunogenicitu. V dnešní době se čím dál více používají také monoklonální protilátky proti integrinům nebo interleukinům. Prvním schváleným antiintegrinem pro léčbu CD byl natalizumab, který je ale spojen se zvýšeným rizikem rozvoje multifokální leukoencefalopatie nebo smrtelnou infekcí mozku. Na druhé straně používaný ustekinumab, který je inhibítorem IL-12 a IL-23, je stejně účinný jako anti-TNF terapie. I když je léčba velmi rozmanitá, 80 % pacientů po 20 letech od diagnózy vyžaduje chirurgický zákrok [3].

1.2 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida (UC) je chronické idiopatické zánětlivé onemocnění, které postihuje tlusté střevo. Poprvé bylo popsáno v roce 1859 Samuelem Wilksem, a v současné době je rozšířenější než Crohnova choroba [20]. Typickým znakem je recidivující a remitující zánět sliznice, který může mít počátek u konečníku a může postupovat až do segmentů tlustého střeva. Nemoc můžeme rozdělit na základě rozsahu a závažnosti onemocnění podle Montrealské klasifikace. Ta vymezuje tři podskupiny UC na základě rozsahu onemocnění a čtyři na základě závažnosti. Tyto skupiny jsou popsány v Tabulce 2 a 3 [20,21].

Tabulka 2 Montrealská klasifikace rozsahu UC (převzato a upraveno z [21])

Rozsah	Anatomická lokalizace
E1 – proktitida	postižení rekta (proximální postižení maximálně k rektosigmoideálnímu spojení)
E2 – levostranný typ	postižení rekta a tračníku maximálně k lineální flexuře
E3 – extenzivní postižení	postižení tračníku pokračuje orálně nad lineální flexuru

Tabulka 3 Montrealská klasifikace závažnosti UC (převzato a upraveno z [20])

Závažnost	Definice
S0 – klinická remise	bez příznaků
S1 – lehká ulcerózní kolitida	4 a méně stolic/den (s anebo bez krve), nepřítomnost celkových příznaků, normální zánětlivé markery (FW)
S2 – středně těžká ulcerózní kolitida	více jak 4 stolice s přítomnou krví denně, s minimálními známkami celkové toxicity
S3 – těžká ulcerózní kolitida	nejméně 6 stolic denně s krví, pulz > 90 nebo teplota > 37,5 °C nebo hemoglobin < 105/g/l nebo FW > 30 mm/h

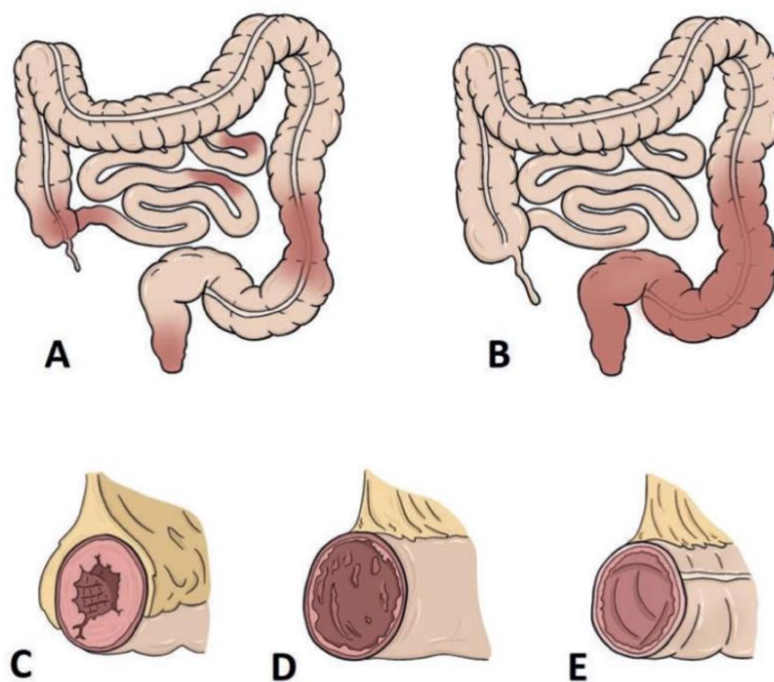
Dále se také ke klasifikaci onemocnění využívá Mayo skóre. To bylo vyvinuto jako složený index aktivity onemocnění, pro použití v klinických studiích. Původní Mayo skóre zohledňovalo dva parametry hlášené pacientem – frekvence stolice a krvácení z konečníku, k tomu endoskopický vzhled sliznice a celkové hodnocení lékaře. Každý z těchto parametrů byl hodnocen na škále od 1 do 3. Celkově je tedy možné dosáhnout až skóre 12 bodů. V současné době je akceptováno modifikované Mayo skóre (mMayo). Oproti původní popisu skóre Mayo se liší ve dvou parametrech. Endoskopický vzhled sliznice již nezahrnuje slizniční drobnost, a celkové hodnocení lékaře již není zahrnuto do tohoto hodnocení. Jelikož se v klinické praxi endoskopie neprovádí při každé návštěvě lékaře, onemocnění se též hodnotí podle tzv. částečného Mayo skóre (pMayo). Na rozdíl od mMayo skóre, pMayo skóre dobře koreluje s původním Mayo skóre [22].

Stejně jako u patogeneze CD, tak i u UC závisí na více faktorech, díky kterým dojde ke vzniku onemocnění. Při genové studii bylo identifikováno téměř 260 lokusů, které mají souvislost s IBD, a většina z nich jsou pro UC a CD společné. Tyto společné geny kódují jak vrozené, tak i adaptivní imunitní dráhy, signalizace cytokinů a imunitní senzitivitu [23]. Nejsilnější genetické signály specifické pro UC jsou spojeny s hlavním histokompatibilním komplexem HLA na chromozomu 6, které jsou spojeny s poškozením tlustého střeva [24]. V nedávných studiích byla u pacientů s UC identifikována nová, ale vzácná forma ADCY7, která zvyšuje riziko onemocnění až dvakrát. Má tedy spolu s oblastí HLA největší genetickou souvislost s UC [23]. U 8-14 % pacientů, kteří trpí UC, se zánětlivé onemocnění střev vyskytuje i u předchozích generací [25]. Výskyt onemocnění nemá specifickou věkovou kategorii, ani není pravidlem, že by se více vyskytovalo u žen nebo u mužů [23].

V nedávné studii, která se přímo zaměřovala na zánět sliznice, bylo u nově diagnostikovaných dětských pacientů zjištěno, pomocí metody RNA sekvenování, snížení

exprese některých mitochondriálních a jaderných genů. Mitochondriální geny mají za úlohu kódovat řetězec oxidativní fosforylace, jaderné geny jsou zodpovědné za biogenezi mitochondrií. Těmito procesy zahrnujeme mitochondropatii jako patologický proces u UC [23].

UC je též závislá na enviromentálních faktorech jako je kouření a dieta. Ačkoliv se v současné době patogeneze ulcerózní kolitidy zmiňuje po boku Crohnovy choroby, jsou zde značné rozdíly. CD se může projevit v celé délce trávicí soustavy, zatímco UC se projevuje nejvíce v tlustém střevě. Pokud je u CD postiženo tlusté střevo, je nejvíce postižena jeho pravá část. U UC je postižena zejména levá část. Dalším rozdílem může být způsob, jakým je zánět v trávicí soustavě distribuován. Při CD je distribuce zánětu segmentální, na druhé straně při UC je distribuce kontinuální. U pacientů s CD prostupuje zánět celou stěnou trávicí trubice a dochází ke tvorbě jizevnatých struktur a hlubokých fisur. UC je většinou omezena pouze na sliznici tlustého střeva. Tyto odlišnosti jsou popsány na Obrázku 3. [26].

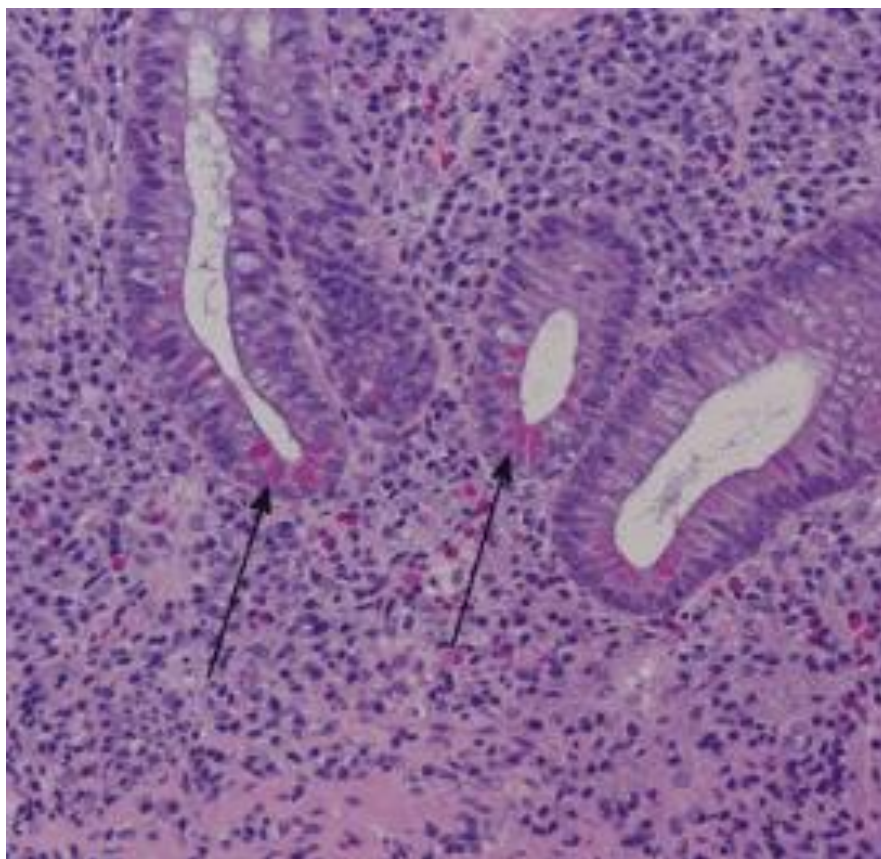


Obrázek 3 Nákresy demonstrující základní makroskopické rozdíly mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou(A: Segmentální charakter Crohnovy choroby; B: Kontinuální charakter ulcerózní kolitidy; C: Transmurální charakter Crohnovy choroby s tendencí ke tvorbě jizevnatých struktur a hlubokých fisur; D: Omezení ulcerózní kolitidy pouze na sliznici, tvorba plošných ulcerací, fibrotizace sliznice a vymizení haustrace; E: Normální tlusté střevo) (převzato a upraveno z [26])

Příznakem nemoci může být krvavý průjem s hlenem nebo bez, tenesmus a různé stupně bolesti břicha, nevolnost a ztráta hmotnosti [27]. Vyskytující se abnormality při laboratorním vyšetření jsou např. anemie způsobená nedostatkem železa, trombocytóza, výskyt autoprotilátek proti pohárkovým buňkám a proti cytoplazmě neutrofilů, a také hypoalbuminemie, která je markerem závažnosti onemocnění a odpovědi na biologickou léčbu.

Několik studií uvedlo spojení UC s výskytem *Helicobacter pylori* nebo s fokální gastritidou. Nejzávažnější komplikací onemocnění je vznik toxického megakolonu, kdy zánětlivý proces může být na tolik závažný, že naruší nervosvalovou funkci střeva, a vede k dilataci a následné perforaci střeva [20]. Ačkoli je UC omezena na tlusté střevo, až u třetiny pacientů se mohou vyskytnout extraintestinální projevy. Nejčastěji je postižena kůže, oči, klouby a játra. Nejvíce se u pacientů vyskytují artritidy [28]. Příznaky UC a CD se mohou lišit. Při CD se u pacientů vyskytuje bolest zejména v pravé spodní části břicha, u UC je bolest lokalizována spíše v dolní levé oblasti břicha. U CD se dále nevyskytuje krvácení z konečníku při pohybech střev, jako je to typické u UC.

UC je diagnostikována na základě kombinace vyšetření, která se skládá z endoskopie, zobrazovacích metod a laboratorního vyšetření, stejně jako je tomu u CD. Endoskopie je důležitý diagnostický nástroj, který slouží k odlišení UC od CD a jiných kolitid, nesouvisejících s UC. Endoskopie se provádí k posouzení rozsahu onemocnění a k získání vzorků tkáně pro biopsii. Charakteristický nález při endoskopii je kontinuální zánět sliznice, zánik normálního vaskulárního vzoru, granularita nebo krvácení. K diagnostice UC není potřeba rutinně provádět gastrokopii [29]. Pro spolehlivou diagnózu je potřeba odebrat alespoň dvě biopsie z minimálně šesti oblastí [20]. V histologickém preparátu je možné při diagnóze UC vidět narušení architektury krypt. Dále je také pozorovatelná bazální plazmocytoza, zvýšené množství lymfocytů v lamina propria, vyčerpání mucinu a metaplazie Panethových buněk [29]. Některé z těchto patologií je možno vidět na Obrázku 4 .



Obrázek 4 Sliznice tlustého střeva u ulcerózní kolitidy s narušenou architekturou krypt, zvýšeným počtem zánětlivých buněk a metaplazií Panethových buněk (šipky) (převzato z [30])

Ze zobrazovacích technik se nejvíce využívá výpočetní tomografie (CT), pomocí které se primárně vyšetřuje zesílení sliznice. Tloušťka stěny tlustého střeva je při onemocnění zvýšena v průměru na 8 mm, oproti normálním 3 mm [31].

Laboratorními parametry, které se měří v krvi a séru, je kompletní krevní obraz, sedimentace erytrocytů, C-reaktivní protein, sérový albumin ve spojení se studiem železa a vitamínu B12. Ve stolici se poté provádí vyšetření fekálního kalprotektinu a laktoferinu. Ty napomáhají určit stupeň onemocnění anebo odhalit klinický relaps. Hodnoty fekálního kalprotektinu, které onemocnění indikují jsou stejné jako u CD [32]. Nejdůležitější studovanými zánětlivými markery je CRP a fekální kalprotektin. Pro fekální kalprotektin existuje řada studií, které prokazují velmi dobrou korelaci s klinickou aktivitou, endoskopickými ukazateli, a dokonce i s hojením sliznice u UC [33]. K rozlišení UC a CD se využívá vyšetření dvou protilátek – perinukleární protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (pANCA) a protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Pokud pacient trpí UC bude jeho výsledek testování na pANCA negativní a na ASCA pozitivní. U pacienta s CD bude výsledek opačný [20].

Výběr léčby závisí, tak jako u CD, na charakteru postižení a stupni klinické aktivity onemocnění [19]. Hlavním pilířem léčby UC je mezalamin, který je známý jako kyselina 5 – aminosalicyllová. Může být podáván buď per os, nebo per rektum ve formě čípku nebo klyzmatu. Rektální podání léku poskytuje až stokrát vyšší koncentraci účinné látky v místě zánětu, a proto je pro navození remise preferováno před perorálním podáním [34]. U pacientů s akutní nebo těžkou formou onemocnění se k primární léčbě používají glukokortikoidy. Používající se také v situaci, pokud se remisi nepodaří navodit mezalaminem. Vzhledem k známým nežádoucím účinkům steroidů by se měly podávat pouze krátkodobě, nikoliv jako udržovací léčba. Komplikovaný průběh léčby je takový, kdy pacient nereaguje na běžnou léčbu. V tomto případě můžeme průběh rozlišit na steroid-dependentní a steroid-rezistentní. K léčbě steroid-dependentního onemocnění se používá azathioprin, což je imunosupresivum. Jejich efekt nepřichází dříve než za tři měsíce, proto je někdy nutné dočasně přejít na glukokortikoidy. Kromě imunosupresiv, je možné použít při léčbě závislé na steroidech anti-TNF protilátky, tzv. infliximab [34].

1.3 Jiná střevní onemocnění

Střevní onemocnění nemusí být jen výsledkem zánětlivého procesu, jako je tomu u Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy. Vznik kolitid může být výsledkem infekce, ischemie, užívání léků nebo radiace. Jako další mohou vznikat mikroskopické kolitidy, anebo jako sekundární onemocnění při imunodeficienci [35].

Mikroskopická kolitida je zánětlivé onemocnění tlustého střeva. Dělí se na dvě skupiny: lymfocytární a kolagenní kolitidu. Tyto dvě skupiny se dělí pouze na základě histologického obrazu, jelikož klinický průběh i léčba jsou totožné. Ke stanovení definitivní diagnózy nelze použít zobrazovací metody ani endoskopii, ale je potřeba udělat histologické vyšetření [36]. Typickým projevem tohoto onemocnění je vodnatý průjem bez příměsi krve, často se projevující v noci. Objevují se i bolesti břicha, bolesti kloubů a úbytek váhy. Obecně jde ale říct, že jsou příznaky této nemoci nespecifické [37]. Studie z roku 2023 se věnovala roli fekálního kalprotektinu v diagnostice mikroskopické kolitidy. Bylo zjištěno, že u pacientů s tímto onemocněním byly hodnoty fekálního kalprotektinu zvýšeny. Ale i přesto je fekální kalprotektin nespecifický marker pro toto onemocnění a nejde se při diagnostice spoléhat pouze na něj [38].

Infekční kolitida vzniká působením bakterií, virů a parazitů a vede k zánětlivému typu průjmu. U pacientů se objevuje hnisavá, krvavá, hlenovitá řídká stolice, horečka, tenesmy a

bolesti břicha. Bakterie, které běžně způsobují infekční kolitidy, jsou např. *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Yersenia enterocolitica*, *Clostridium difficile* a *Mycobacterium tuberculosis*. Mezi běžné příčiny virové kolitidy patří: norovirus, rotavirus, adenovirus a cytomegalovirus. Parazitární nákaza může vzniknout např. působením *Entamoeba histolytica*. Tento prvek je schopen napadnout sliznici tlustého střeva a způsobit kolitidu [39].

U těchto infekčních průjmů je zlatým standardem pro diagnostiku kultivace stolice. Ovšem tato metoda je relativně zdlouhavá a finančně náročná. Proto bylo testováno několik biomarkerů, kdy nejlepší výsledky vykazoval fekální kalprotektin. Rozsáhlá studie 2382 pacientů s akutním průjmem ukázala, že senzitivita a specificita fekálního kalprotektinu v diagnostice akutního bakteriálního průjmu je 83 % a 87 %. V pediatrické studii, která hodnotila zvýšení fekálního kalprotektinu u pacientů s bakteriálním a virovým průjmem, bylo zjištěno, že při virové infekci byla průměrná hodnota fekálního kalprotektinu menší jak průměrné hodnoty u bakteriálního průjmu. Tyto informace svědčí o jasném oddělení virového a bakteriálního průjmu [40].

Jak už bylo zmíněno další příčinou kolitidy může být ischemie. Tato forma onemocnění vzniká v důsledku sníženého průtoku krve. Může se jednat o povrchové poranění až po úplnou nekrózu tlustého střeva [41]. K nedostatečnému dokrvení stěny tlustého střeva dochází v důsledku celkového snížení krevního tlaku v těle, těžké dehydratace nebo při ucpávání krevních cév, které by měly tlusté střevo vyživovat. Roli ve vzniku onemocnění hraje i vysoký věk a celková zchátralost organismu. U pacientů se onemocnění projevuje náhlými bolestmi břicha, stolící s příměsí krve anebo jen vylučováním krve bez stolice, průjmem a nevolností [42]. Diagnostika ischemické kolitidy je obtížná, protože se projevuje nespecifickými příznaky a může se zaměňovat s jinými kolitidami. Diagnostika se opírá o kombinaci klinické anamnézy, radiografických nálezů, endoskopie, biopsie a vyloučení jiných příčin kolitid, jako je infekční onemocnění [43].

Často se IBD spojuje se syndromem dráždivého tračníku, hlavně v kontextu vyšetření fekálního kalprotektinu. Syndrom dráždivého tračníku (IBS) je funkční střevní porucha, charakterizována bolestmi břicha nebo nepříjemnými pocity, nepravidelností stolice a nadýmáním. Tím, že je IBS funkční onemocnění, tak není spojená se strukturálními nebo biochemickými abnormalitami, které jsou zjistitelné pomocí současných rutinních diagnostických nástrojů [44]. IBD od IBS lze od sebe především odlišit nálezy při endoskopickém vyšetření, kdy u pacientů s IBD se vyskytují abnormální výsledky kolonoskopie s výskytem střevních vředů, ale u pacientů s IBS nikoli. Značná prevalence IBS

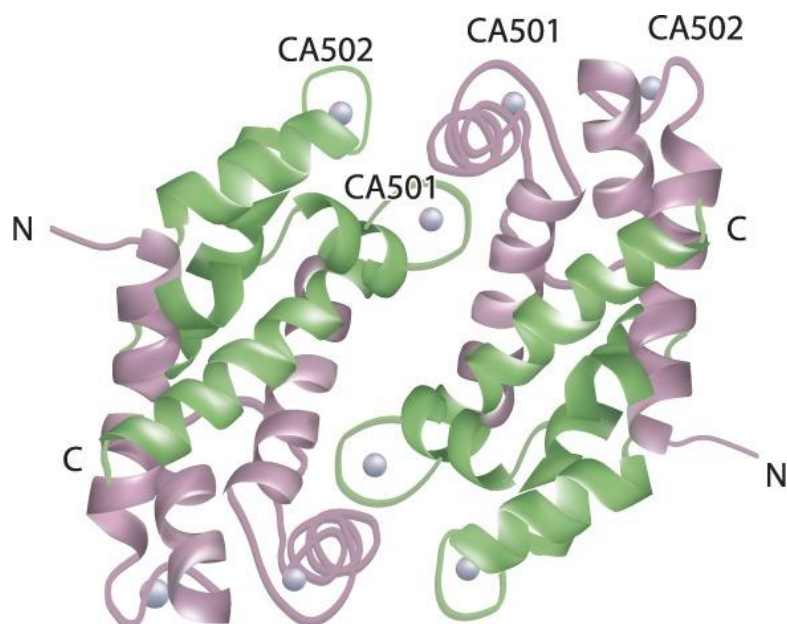
a překrývání klinických příznaků s IBD, může zvýšit počet provedených kolonoskopií. Neinvazivní diagnostický marker může být v tomto ohledu velmi užitečný. Proto je zkoumán vztah mezi hladinami fekálního kalprotektinu u obou těchto nemocí. V jedné studii byla uvedena senzitivita 87,5 % a specifická 90,5 % při hraniční hodnotě 150 µg/g pro fekální kalprotektin při rozlišení mezi IBS a IBD [45].

2 Kalprotektin

2.1 Základní charakteristika

Kalprotektin, také znám jako MRP8/14 a S100A8/S100A9, je protein o velikosti 36,5 kDa vázající vápník a zinek, který je složený z heteromerického komplexu dvou podjednotek S100A8 a S100A9. Konformace a oligomerizace S100A8/S100A9 je daná vlastnostmi vápníku a zinku, které vedou ke vzniku fyziologicky aktivního heterooligomeru [46]. Je pozorováno, že podjednotky S100A8 a S100A9 mohou v lidském těle cirkulovat jako samostatné molekuly, ale nejvíc stabilní jsou ve formě heterodimeru, který je zobrazen na Obrázku 5. Ten hraje klíčovou roli v biologické interakci proteinů [47]. Kalprotektin je v lidském těle uvolňován z neutrofilů a monocytů, a představuje okolo 60 % solubilních proteinů v lidských neutrofilních granulocytech [48]. Převážně je kalprotektin lokalizován v cytoplazmě. Po zvýšení intracelulární hladiny vápníku se přemísťuje z cytoplazmy do cytoskeletu a buněčné membrány. Při aktivaci neutrofilů nebo endoteliální adhezi monocytů se vylučuje alternativní cestou zprostředkovanou mikrotubuly [49].

V této době o kalprotektinu pojednává spousta studií, ale poprvé byl kalprotektin zmíněn již ve studii z roku 1980 M.K. Fagerhola a spol., která se věnovala izolaci proteinu L1 z lidských leukocytů [50]. L1 byl původní název pro kalprotektin. V budoucnu byl označován i jinými názvy, jako je například Migrací Inhibující Faktor (MIF) související s proteiny 8 a 14 (MRP- 8/14), a antigen cystické fibrózy (CFA). Mezi těmito třemi návrhy byla určena podobnost, díky které byl název určen na kalgranulin A a B, kvůli jeho schopnosti vázat vápník a jeho původu v granulocytech [51]. Struktura tohoto proteinu byla v roce 1989 zařazena do rodiny proteinů S100, specificky do S100A8/A9 [52]. Jeho současný název, kalprotektin, byl navržen o 10 let později od jeho objevení, díky jeho antimikrobiální aktivitě proti *Enterobacteriaceae* v krevní kultuře a *Cryptococcus spp.* v mozkomíšním izolátu [53].



Obrázek 5 Struktura kalprotektinu (N; C= konce bílkovin, CA501; CA502= vazebná místa pro Ca^{2+}) (převzato z [51])

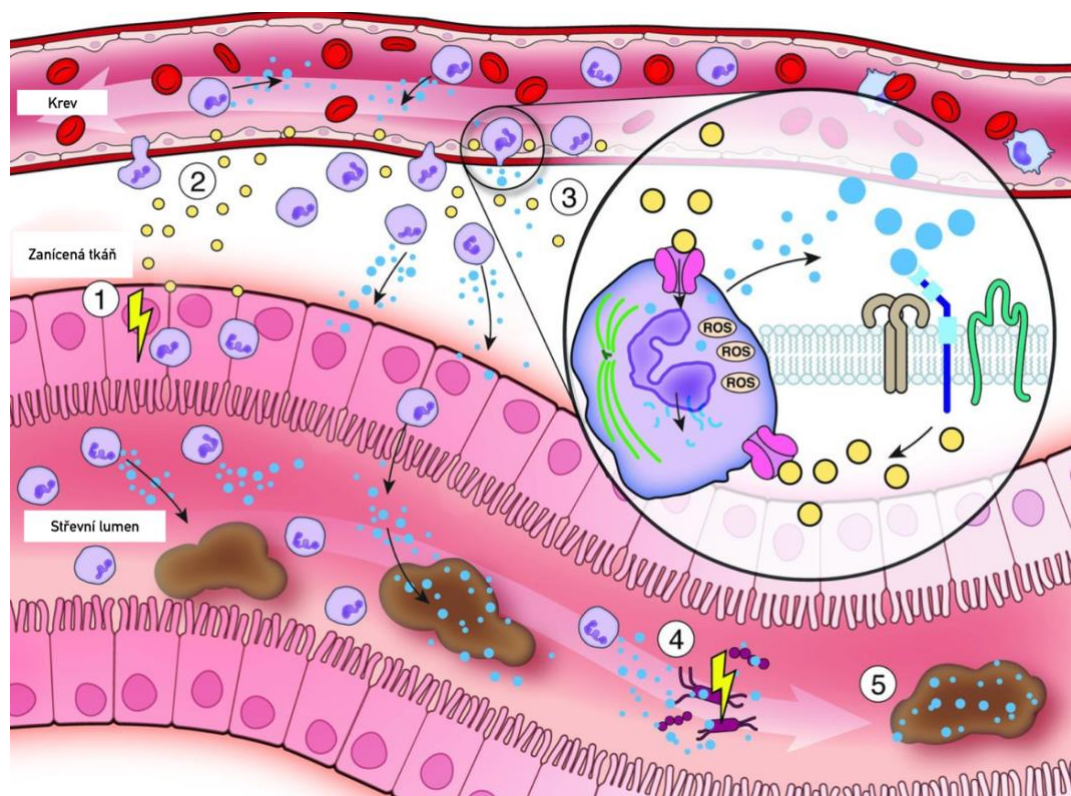
Tento protein může být v lidském těle nalezen a měřen v několika tělních tekutinách, jako např. v plazmě, moči, slinách, synoviální tekutině nebo ve fekáliích [48], které jsou pro nás, v kontextu střevních zánětů, nejdůležitější. Jelikož je aktivní střevní zánět spojen s migrací leukocytů do střeva, jsou v místě střevního zánětu přítomny neutrofily, a kalprotektin se uvolňuje díky rozpadu a apoptóze buněk v lumen střeva. Protein je poté součástí stolice a je možné ho měřit [54]. Samozřejmě i další formy kalprotektinu jsou důležité, jako je např. sérový kalprotektin, který je vyšetřován při autoimunitních onemocnění jako je např. revmatoidní artritida [55]. V poslední době získal sérový kalprotektin větší pozornost jako biomarker IBD, protože biomarker vyšetřovaný z plné krve může být v rutinní praxi vhodnější, a pro pacienty přijatelnější. Ačkoli byl sérový kalprotektin předmětem mnoha studií, jejich výsledky však nebyly jednotné. Většina dřívějších šetření zjistila významnou souvislost mezi sérovým kalprotektinem a CRP, nikoli však kalprotektinem fekálním. Předpokládá se, že sérový kalprotektin může více reprezentovat systémový zánět než zánět střevní [56]. Fekální kalprotektin je extrémně odolný k degradaci pankreatickými šťávami a intestinálními proteázami, stejně tak jako k bakteriální degradaci *in vitro*, tak i *in vivo*. Jeho jednotná distribuce a stabilita ve stolici až po dobu jednoho týdne přispívá k jeho významu jako diagnostického biomarkeru. Jelikož jsou fekálie v přímém kontaktu se zánětem a postiženou střevní sliznicí, napomáhá nám měření biomarkerů, se v nich nacházejících, lepší odhalení střevních zánětů nežli při měření sérového biomarkeru [48].

Při prvních analýzách byly výsledky udávány v $\mu\text{g}/\text{ml}$. S optimalizací analytických sad na testování fekálního kalprotektinu se nyní uvádí hodnoty v $\mu\text{g}/\text{g}$ stolice. Tato změna byla pravděpodobně provedena kvůli vyrovnaní účinku ředění, který by mohl mít průjem na vzorek, který by se kvantifikoval na základě objemu [51].

Molekuly, které jsou kalprotektinu podobné jsou např. laktoferin nebo fekální hemoglobin. Laktoferin je železo vázající protein, obsažen v sekundárních granulách slizničních neutrofilů. Ve srovnání s kalprotektinem je méně stabilní, ale pořád dobře stanovitelný [57].

2.2 Biologická funkce

Jedinečná struktura kalprotektinu mu dává schopnost několika rolí v organismu, závisící na koncentraci, posttranslační modifikaci nebo na jeho oligomerických formách. Kalprotektin má funkci jak intracelulární, tak extracelulární. Přehled funkcí, které kalprotektin zastává je uveden na Obrázku 6.



Obrázek 6 Kalprotektin v kontrole střevního zánětu. 1- Vznik zánětu, 2- Působení cytokinů na poškozenou tkáň, 3- Akutní zánět vede ke slizničnímu náboru neutrofilních granulocytů (fialová), které částečně migrují do lumen střeva. Neutrofilové konstitutivně exprimují a uvolňují kalprotektin (modrá), který může podněcovat slizniční zánět, protože kalprotektin pohání chemotaxi neutrofilů, indukuje expresi endoteliálních adhezních molekul a aktivuje receptory rozpoznávání vzorů na buňkách vrozené a adaptivní imunity. Kalprotektin u neutrofilů moduluje adhezenci tkáni přestavbou mikrotubulů (zeleně) a cytotoxicitu tvorbou reaktivních forem kyslíku prostřednictvím NADPH oxidázy, 4- Antimikrobiální funkce kalprotektinu, 5- Funkce kalprotektinu jako neinvazivního biomarkeru onemocnění (převzato a upraveno podle [58])

2.2.1 Intracelulární funkce kalprotektinu

Je známo, že komplex S100A8/S100A9 je senzor pro Ca^{2+} kationty, v cytosolu má regulační a ochranné funkce, řídí intracelulární dráhy buněk vrozené imunity a umožňuje regulovat imunitní odpověď [57]. Tento komplex může mít vliv i na rezistenci vůči patogenním bakteriím. Jednou z hlavních intracelulárních funkcí je rychlé zprostředkování cytoskeletu, které je předpokladem pro rychlou přestavbu, fagocytózu a exocytózu. Přestavba je závislá na vápenatém kationtu, stejně tak jako interakce komplexu S100A8/A9 s cytoskeletálními proteiny, zahrnující tubuliny, mikrofilamenta a kreatinová intermediální filameny v aktivovaných fagocytech epiteliálních buněk [58].

Komplex se podílí na polymerizaci a reorganizaci mikrotubulů. Tvorba komplexu je regulována fosforylací S1009, zprostředkovanou mitogenem aktivovanou proteinkinázou, a závisí na koncentraci Ca^{2+} . Rychlé přijímání leukocytů z krve do zánětlivých míst závisí na kaskádě adhezních dějů, které jsou spouštěny selektiny a $\beta 2$ integriny. S100A8 a S100A9 řídí adhezi neutrofilů k fibrinogenu prostřednictvím aktivace $\beta 2$ integrinu Mac-1 [59].

Další funkcí je transport polynenasycených mastných kyselin a aktivace NADPH oxidázy. Komplex se podílí na respiračním vzplanutí, při níž se zvyšuje spotřeba kyslíku jednotlivých buněk, a leukocyty začínají na obranu produkovat toxiny [58]. Kalprotektin je hlavním proteinem, který v lidských neutrofilech váže kyselinu arachidonovou. Tento proces je závislý na Ca^{2+} , a zdá se, že je jedinečný pro tento specifický protein [59]. Transport této kyseliny na membránu aktivuje NADPH oxidázu a tvorbu ROS fagocytů. Tato aktivace může být dále podpořena komplexem, který se vmezeří mezi kyselinu a NADPH oxidázu, pro upevnění jejich vzájemné interakce [58]. Kyselina arachidonová je silným zánětlivým lipidovým mediátorem, protože je nezbytná pro syntézu leukotrienu B4, který podporuje zánět a poškození tkání během IBD [58].

2.2.2 Extracelulární funkce kalprotektinu

Jednou z extracelulární funkcí je podpora sekrece mnoha cytokinů v zánětlivých buňkách, které mohou udržovat nebo zhoršovat průběh zánětu. Během septického šoku S100A8 indukuje translokaci MyD88, hyperfosforylaci IRAK-1 a aktivaci NF- κ B, což vede k zvýšení exprese TNF- α ve fagocytech [59].

Jednou z dalších funkcí je funkce antimikrobiální. Pokud je komplex po infiltraci fagocytů nebo po buněčné nekróze uvolněn do extracelulárního prostoru, vykazuje komplex řadu antimikrobiálních aktivit. Tato aktivita je zprostředkována schopností vázat a kontrolovat hladiny esenciálních kovů jako Zn^{2+} a Mn^{2+} , které jsou potřebné k růstu bakterií. Inhibice růstu byla popsána *in vitro* u druhů jako *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* a další. Ve slizničních tekutinách, dýchacích cestách a tkáňových abscesech přispívá k omezení růstu komenzálních mikroorganismů a prevenci proti průniku patogenů. Úbytek komplexu u myši, vede ke značnému zvýšení bakteriální zátěže v krvi, játrech a slezině. S100A8/A9 tedy inhibuje růst patogenů v infekčních místech při počáteční fázi infekce, čímž poskytuje čas pro přestavbu fagocytů. S100A9 následně zvyšuje fagocytární aktivitu infiltrujících leukocytů, čímž se urychluje proces odstranění patogenů [58].

Ve studii z roku 2022 byla zkoumána interakce kalprotektinu s biofilmem *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. S mikrobiálními filmy *in vivo* je spojena spousta nemocí, jako je cystická fibróza, chronická infekce ran nebo záněty středního ucha. Kalprotektin má schopnost ovlivňovat bakteriální buňky, způsobem závislém na kovu, i na přímém kontaktu. Předpokládá se, že povrchové interakce kalprotektinu asociované s mikrobiálními filmy by mohly přímo ovlivnit extracelulární polymerní látku, způsobem nezávislým na nedostatku zinku. Pro ověření hypotézy byla struktura biofilmu zkoumaných mikroorganismů studována pomocí rastrovací elektronové a konfokální laserové skenovací mikroskopie. Pomocí těchto metod byly skutečně pozorovány přímé interakce kalprotektinu s buněčným povrchem mikroorganismů. Data z této studie by v budoucnu mohly vést k vývoji efektivnější léčby mikrobiálních infekcí [60].

Za určitých podmínek, ale funguje kalprotektin protizánětlivě, aby zabránil poškození tkáně při nadměrném zánětu. S100A8, S100A9 a S100A8/A9 ovlivňují produkci prozánětlivých mediátorů, včetně cytokinů, chemokinů, ROS a NO. S100A8 *in vitro* redukuje degranulaci žírných buněk a sekreci IL-4, IL-6 a GM-CSF, při odpovědi na IgE křížovou vazbu, inhibovanou intracelulární produkcí ROS. V plicích myši s astmatem, S100A8 potlačuje degranulaci žírných buněk, infiltraci eozinofilů a produkci eosinofilních chemotraktantů. Předstimulace jak lidských, tak myších monocytů pomocí S100A8, tlumí produkci IL-6 a

TNF- α při odpovědi na lipopolysacharid a bakterie. Díky regulaci fosforylovaného p38, jenž chrání hostitele před smrtelnou sepsí. Kromě toho, nekovalentní a vysoce afinitní vazba S100A8/A9 s prozánětlivými IL-1 β , IL-6 a TNF- α , naznačuje schopnost komplexu vychytávat prozánětlivé cytokiny, a tím tlumit aktivitu imunitního systému. Také působí regulačně proti zánětu prostřednictvím svého potenciálu inhibovat růst a apoptózu neutrofilů. V poslední fázi zánětu jsou neutrofily odstraněny fagocytózou, která posléze aktivuje inhibiční signály prozánětlivé aktivity makrofágů. Lze tedy říct, že S100A8, S100A9 a S100A8/A9 se podílejí na modulaci a obnově homeostázy při zánětlivé reakci, ale jejich přílišná exprese a sekrece může vést k nerovnováze zánětlivých procesů [58].

3 Metody stanovení kalprotektinu

3.1 Odběr a příprava vzorků

Před odběrem vzorků stolice je vhodné informovat pacienta o doporučených opatřeních. Před odběrem není třeba dodržovat speciální dietu. Na rozdíl od diety, hladiny kalprotektinu ovlivňují některé léky, a je třeba je před odběrem vynechat. Jde zejména o léky tlumící bolest, jako např. Ibuprofen, Naproxen anebo další non-steroidní protizánětlivé medikamenty. Tyto léky by se měly vysadit na 4 týdny před vyšetřením. Dále by se mělo omezit kouření a konzumace alkoholu minimálně 24 hodin před odběrem [61].

Vhodná doba pro odběr vzorku je diskutabilní. Většinou se doporučuje odebírat první ranní stolicí, ale při výzkumu bylo dokázáno, že jen u třetiny vzorků byly hodnoty kalprotektinu zvýšené. Nejvyšší hodnoty byly naměřené v druhém vzorku dne. V jiné studii při vyšetření vzorků stolice, ze dvou po sobě jdoucích dnů u pacientů s CD, byl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnotách kalprotektinu. Naopak studie zabývající se denní variabilitou hladin FC u pacientů s CD a UC, zjistila vysokou variabilitu během odběrů během dne, proto se doporučuje ranní odběr pro odstranění možných rozdílů v hodnotách [62].

Vzorek se odebírá do speciálních plastových kontejnerů, které se liší podle prováděné metody stanovení [62]. Při odběru je nutné, aby stolice nebyla v kontaktu jak s vodou, záchodovými přípravky, tak ani s močí [61]. Všechny tyto věci by mohli ovlivnit výsledky měření. Proto je potřeba do toalety umístit např. plastový kontejner, noviny nebo obalit toaletu do strečové folie. Postup samotného odběru se také liší podle použité metody, každá metoda vyžaduje jiné množství vzorku. Ke kvalitnímu provedení vyšetření je třeba odebrat alespoň 100 mg stolice normální konzistence.

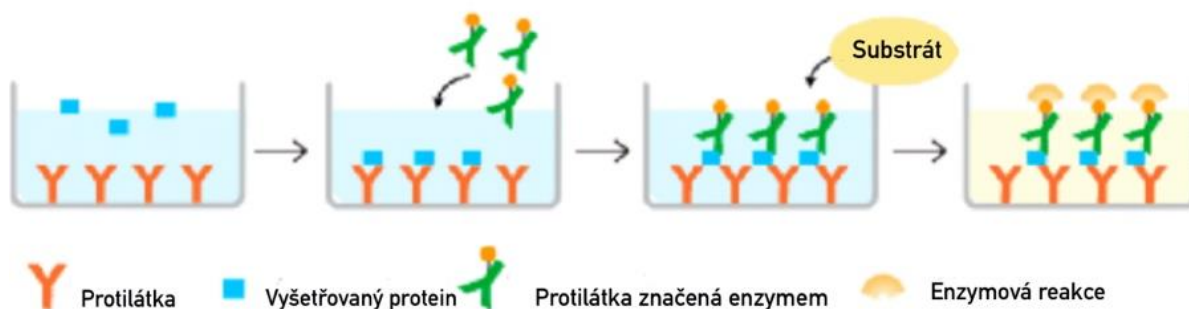
Po odběru je nutné vzorek dopravit do laboratoře do 4 dní od samotného odběru. Do té doby se vzorek skladuje v lednici, bez přítomnosti přímého světla. Vzorek se poté může skladovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až 3 měsíce, při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i déle. Pro následnou analýzu je potřeba provést extrakci kalprotektinu ze stolice. Nejčastěji se provádí pomocí pufu. Konkrétně je možné proteiny extrahovat např. Tris HCl pufrem, ke kterému je přidáno NaCl a povrchově aktivní látka, kterou může být např. Triton X. Bílkoviny je možné extrahovat i jinými metodami, jako je např. precipitace, filtrace s následnou centrifugací nebo pomocí afinitní chromatografie. Při extrakci bílkovin je potřeba zvážit její použité množství. Stolicí je možné zvážit manuálně, ale spíše se upřednostňuje použití speciálních přístrojů, specifických pro každou měřicí sadu. Použitím těchto přístrojů se minimalizuje manipulace se vzorkem. Poté už nastává samotná analytická fáze, kdy můžeme kalprotektin měřit jak kvantitativně, tak kvalitativně, kdy ale

kvalitativní měření má malou klinickou váhu, a proto je většina sad kvantitativního charakteru [61] . Kalprotektin se dá stanovovat i v jiných tělních tekutinách, jak už bylo zmíněno, ale oproti fekálnímu kalprotektinu nemají takovou specifitu vůči střevním onemocněním [48].

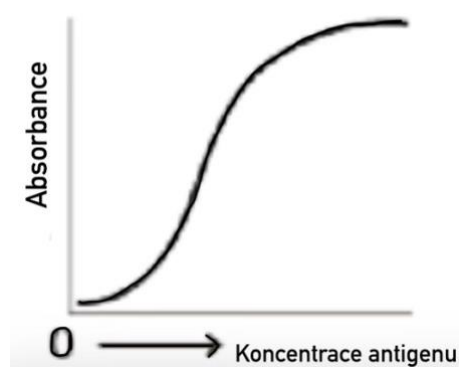
3.2 Imunoanalytické metody s indikátory

3.2.1 ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) je technika používaná v klinických analýzách pro průkaz specifických proteinů v biologickém materiálu. V této metodě se využívá toho, že jedna z komponent je nespecificky sorbovaná nebo kovalentně vázáná na povrch pevné fáze, kterou může být např. mikrotitrační jamka, magnetická částice nebo plastová kulička. Tato vazba nám usnadňuje oddělení navázaných a volně značených reaktantů. Metoda je založena na reakci protilátky s antigenem. Při vyšetření se kalprotektin naváže na protilátku proti kalprotektinu, která je navázaná na mikrotitrační destičku. Poté je do reakce přidán konjugát (protilátka značená enzymem), který následně štěpí přidaný substrát a podle koncentrace kalprotektinu, ve vzorku vzniká zbarvení o dané intenzitě. Konečné množství produktu je přímo úměrné množství antigenu ve vzorku. Pro vysokomolekulární antigeny, kterým kalprotektin je, je vhodné nekompetitivní uspořádání. Tato tzv. sendvičová metoda, kdy jsou jednotlivé fáze vrstveny na sebe, poskytuje i informaci o kvantitě analytu. Postup této metody je znázorněn na Obrázku 7. Na principu metody ELISA funguje test PhiCal (odkaz na testovací sadu: <https://www.svarlifescience.com/products/cpt400>)



Nekompetitivní ELISA



Obrázek 7 Princip nekompetitivní metody ELISA (převzato a upraveno z [63])

PhiCal test

PhiCal test, na vyšetření fekálního kalprotektinu, má povahu kvantitativní metody ELISA. Pro provedení testu se využívají polyklonální protilátky proti kalprotektinu. Kalprotektin obsažený v roztoku vzorku, je navázán na protilátku vázanou na povrch plastické jamky. Protilátka s navázaným enzymem se váže na antigen a následně enzym katalyzuje přeměnu substrátu na barevný produkt. Intenzita zbarvení je přímo úměrná obsaženému antigenu. Koncentrace kalprotektinu je vypočtena díky zprostředkovaným standardům, které mají koncentraci od 6,25 do 100 ng/ml [64].

V soupravě tohoto testu nalezneme již potaženou destičku protilátkou proti kalprotektinu, konjugát, kterým je alkalická fosfatáza značená imunoafinitně očištěnými králičími IgG protilátkami. Součástí je také substrát, promývací, ředící a extrakční roztok. Dále jsou to již zmíněné kalibrační roztoky o daných koncentracích. Nakonec obsahuje pozitivní a negativní kontrolu [64]. Veškeré komponenty této sady jsou vidět na Obrázku 8.



Obrázek 8 Komerční sada PhiCal a její všechny komponenty (převzato z [65])

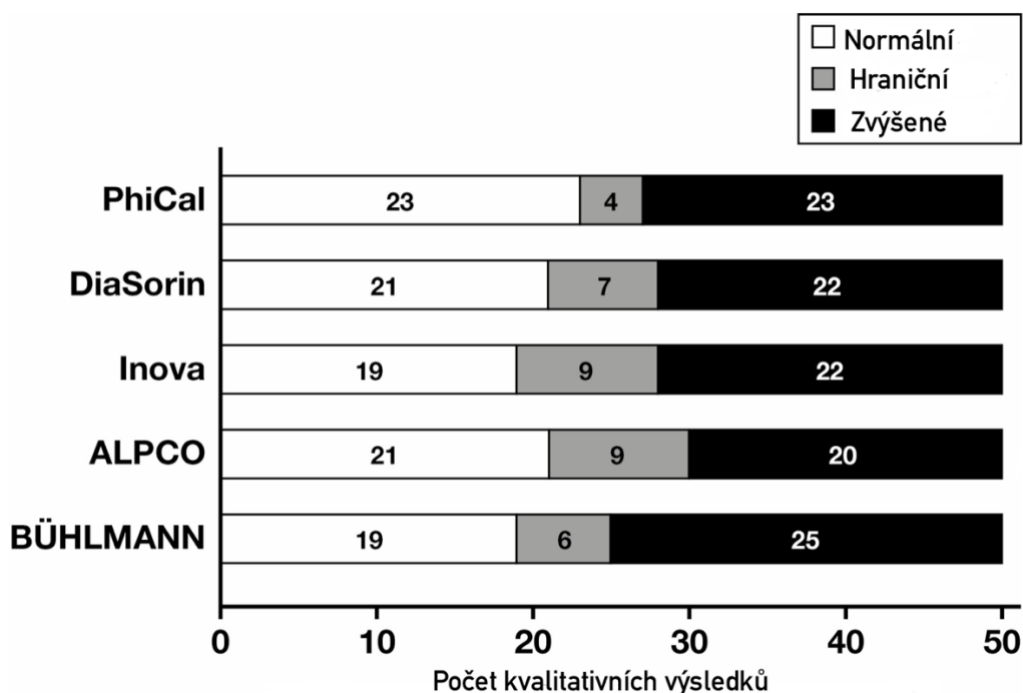
Zmražený vzorek je potřeba rozmrazit při pokojové teplotě. Stejně tak je nutné vytemperovat na pokojovou teplotu všechny reagenty. Po zvážení prázdné zkumavky se šroubovacím uzávěrem, je do ní pomocí dřevěné aplikační tyčinky přeneseno přibližně 100 mg stolice. K danému množství vzorku stolice je přidán extrakční roztok v poměru 1:50. Například tedy ke 100 mg stolice je přidáno 4,9 ml extrakčního činidla. Zkumavka je následně uzavřena, a po dobu 30 sekund intenzivně protřepána, nebo umístěna na míchačku. Dále následuje promíchání na třepače. Ta by měla být prováděna po dobu cca. 25 minut. Vzorek by neměl být míchán méně jak 20 minut. 1 ml vzorku je centrifugován 20 minut při 10000 x g a pokojové teplotě. Doba a síla g centrifugace musí být dodržena. Po centrifugaci, je třeba se ujistit, že je peleta na dně zkumavky celistvá. Pokud ano, je odebráno 0,5 ml z horní poloviny supernatantu do nové zkumavky. Takto připravený extrakt je možný okamžitě testovat. [64].

Vzorek extraktu je naředěn 1:50 (příp. 1:250) . Podle rozvržení mikrotitrační destičky v návodu je provedeno napipetování vyšetřovaných roztoků. Všechny vyšetřované roztoky se dávají po 100 μ l po dvou. Poté se destička přikryje krytem a inkubuje se při pokojové teplotě po dobu 45 minut. Na konci inkubace je každá jamka promyta 0,4 ml zředěného promývacího roztoku. Tento krok je zopakován ještě dvakrát. Po posledním promytí je destička otočena, a

jemně vyklepána na absorpční tkaninu. Dále je do každé jamky přidáno 100 μ l promíchaného konjugátu. Je opakována inkubace a promytí z předchozího postupu. Poté je přidáno do každé jamky 100 μ l substrátu. Následuje inkubace při pokojové teplotě, po dobu 30 minut. Inkubace musí probíhat na tmavém místě, nebo zabalená v hliníkové folii. Poté se již odečte hodnota absorbance pomocí EIA čtečky při 405 nm. [64].

Rozmezí hodnot, pro které je vhodné pracovat s tímto testem, je 15,625 až 250 μ g/ g. Analytická senzitivita tohoto testu je 6,25 ng/ ml, což odpovídá 15,6 μ g kalprotektinu na gram stolice při ředění vzorku 1:2500. Pro přesné vyhodnocení je potřeba vypočítat průměrnou hodnotu absorbancí dvojic pro každý vzorek. Od těchto průměru je potřeba odečíst hodnoty absorbancí slepého vzorku. Pokud byl vzorek ředěn, je třeba toto ředění při výpočtech zohlednit. Výpočty zahrnují korekci ředění a normalizaci hmotnosti stolice. V klinickém významu jsou hodnoty od 15,625 do 50 μ g/ g považovány za normální. Hodnoty v rozmezí 5 až 120 μ g/g jsou hraniční hodnoty, a vzorky musí být po 4 až 6 týdnech znovu vyšetřeny. Hodnoty vyšší jak 120 μ g/ g jsou hodnoty abnormální. Tyto vzorky je potřeba opakovat podle klinické indikace [64].

PhiCal test byl prvním testem pro měření kalprotektinu v USA, který Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (“US Food and Drug Administration“) povolila k používání, na základě literatury popisující nápady pro měření fekálního kalprotektinu z roku 1999. Ve studii z roku 2021 byl tento starší test porovnán s dalšími čtyřmi testy nové generace. Testy nové generace by s sebou měli přinést automatizaci a zrychlení metod oproti klasické ELISA metodě, a také rozšíření rozmezí hodnot, pro které je vhodné test provádět. Testy, s kterými byl PhiCal test porovnáván jsou: LIASON Calprotectin (Diasorin), QUANTA Lite Calprotectin ELISA (Inova Diagnostics), Chemiluminiscence ELISA (ALPCO) a fCAL turbo (BÜHLMANN). Pro studii bylo od pacientů vybráno 50 vzorků stolice. Po vyšetření vzorků všemi metodami byly výsledky rozděleny do tří kategorií: normální, hraniční a zvýšené, dle referenčních rozmezí daných výrobci. Jak je vidět na Obrázku 9, celkově byla mezi 5 testy dobrá kvalitativní shoda, ale u novějších testů bylo o něco méně normálních výsledků, dle referenčních rozmezí jednotlivých testů jsou normální hodnoty ty, které neukazují na přítomnost onemocnění. Odpovídajícím způsobem se zvýšil počet hraničních výsledků [66].



Obrázek 9 Počet kvalitativních výsledků pro 5 testů pro kalprotektin na základě referenčních mezí výrobců (převzato a upraveno z [66])

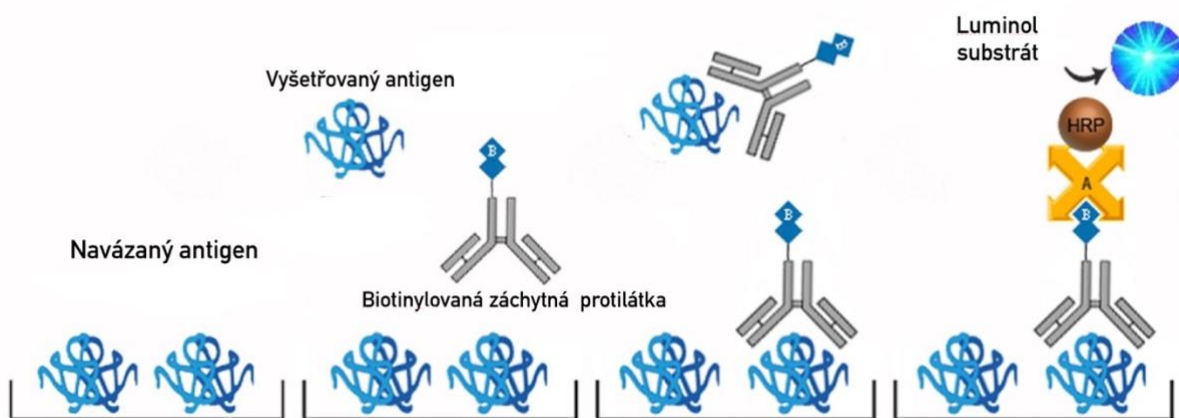
Obecně lze říct, že nová generace testů k vyšetření kalprotektinu má podobné vlastnosti jako PhiCal test. Je zde ale několik důvodů, proč by laboratoře mohly od používání testu PhiCal opustit. Může to být např. vyšší automatizace, snížení počtu replikátů potřebných na jeden vzorek (např. duplicitní testování u ELISA) a možnost používání zařízení pro extrakci stolice, které urychlí pracovní postup laboratoře. Tyto výhody by mohly vést ke zkrácení doby zpracování a snížení nákladů při zachování kvality výsledků [66].

3.2.2 CLIA

Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA) je imunoanalytická technika, při níž je antigen nebo protilátka značena luminiscenční molekulou. Luminiscence je definována jako emise viditelného, nebo téměř viditelného záření, které vzniká při přechodu elektronu z excitovaného stavu do stavu základního. Při měření luminiscence je měřena světelná jednotka. V naší souvislosti mluvíme o chemiluminiscenci, jelikož jako zdroj energie, potřebné k vzniku elektronového excitovaného stavu, se využívá exergonické chemické reakce.

Nejvíce používaným typem této metody je heterogenní způsob provedení. Chemiluminiscenční metody mohou být buď přímé, za využití chemiluminiscenční značky, anebo nepřímé, za využití značení enzymem. Testy, které jsou v této práci popsány, fungují na principu nepřímém. V metodě nepřímé se jako enzymatické značení protilátky používají

alkalická fosfatáza se substrátem adamantyl-1,2- dioxetan aryl fosfát nebo křenová peroxidáza, a jako substrát se využívá luminol nebo jeho deriváty, jak je znázorněno na Obrázku 10. Výhoda této metody je její široké dynamické rozmezí (až ng/ml), vysoká intenzita signálu, absence interferenčních emisí, rychlé získání analytického signálu, vysoká stabilita reagensů a jejich konjugátů, nízká spotřeba reagensů, snížené inkubační časy a kompletní kompatibilita s imunoanalytickými protokoly. V porovnání s metodou ELISA je metoda CLIA více citlivá, rychlejší a méně pracná, jelikož je spojená s větší automatizací postupů. Při porovnání cenové náročnosti je CLIA dražší než metoda ELISA. [67]. Testy, které fungují na principu chemiluminiscenční imunoanalýzy, je test od firmy Diasorin (odkaz na webové stránky: <https://int.diasorin.com/en>) nebo test od firmy ALPCO (odkaz na webové stránky: <https://www.alpco.com>).



Obrázek 10 Princip provedení metody CLIA (převzato a upraveno z [68])

3.2.2.1 DiaSorin LIAISON Calprotectin test

Test DiaSorin LIAISON Calprotectin je *in vitro* diagnostický chemiluminiscenční imunoanalytický test. Je určený ke kvantitativnímu měření fekálního kalprotektinu. Tento test lze použít jako pomůcka při diagnostice IBD. Slouží také k rozlišení IBD od syndromu dráždivého tračníku [69]. Výsledky z tohoto testu jsou použity ve spojení s informacemi získanými z klinického hodnocení pacientů a dalších diagnostických postupů. Test musí být proveden na analyzátoru LIAISON XL (Obrázek 11), nebo LIAISON XS [69,74].



Obrázek 11 Příklad přístroje LIAISON XL (převzato z [70])

Pro přípravu vzorku stolice je určeno zařízení DiaSorin LIAISON Q.S.E.T. - “Quantitative Stool Extraction and Test“. Pokud není extrakce provedena pomocí tohoto zařízení, je vzorek stolice extrahován manuálně pomocí pufru od výrobce. Pro manuální extrakci je potřeba od 50 do 100 mg stolice. Oproti tomu, pro extrakci pomocí extrakčního zařízení je potřeba pouze 10,5 mg stolice [69]. Při porovnání s ostatními extrakčními metodami ostatních značek, patří samotná extrakce mezi ty rychlejší. Kdy samotná extrakce trvá 30 minut. Např. u EliA testu firmy Thermo Fisher trvá extrakce až 2,5 hodiny. I přesto, že je DiaSorin extrakce rychlejší než testu EliA, nevyrovná se, co se týče rychlosti, extrakci testu fCAL turbo. Rychlost extrakce tohoto testu, je pouze 10 minut [71].

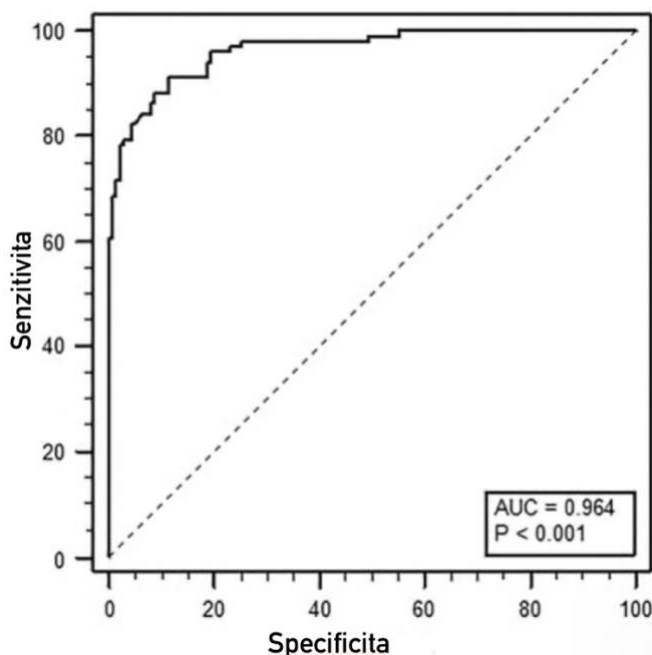
Test inkubuje extrahovaný vzorek, kalibrátor, kontrolu nebo ověřovací kalibrační látku s testovacím pufrem a paramagnetickými částicemi potaženými monoklonální protilátkou, která specificky rozpoznává heterokomplex kalprotektinu. Po inkubaci se provede promývací cyklus, aby se odstranil veškerý nenasazený materiál. Poté se do reakce přidá monoklonální protilátka konjugovaná s izoluminolem, která rozpoznává kalprotektin, a inkubuje se. Nenasazený konjugát se odstraní druhým promývacím krokem. Poté se přidají startovací činidla a spustí se chemiluminiscenční reakce. Světelný signál se měří fotonásobičem, a je přímo úměrný koncentraci kalprotektinu přítomného v kalibrátorech, kontrolách nebo vzorcích. Všechny kroky testu a inkubace se provádějí pomocí analyzátoru LIAISON® XL. Software

analyzátoru automaticky vypočítá koncentraci kalprotektinu ve vzorku. Tato koncentrace je vyjádřena v $\mu\text{g/g}$ [69].

Rozmezí, pro které je možné tuto metodu použít, je 5-800 $\mu\text{g/g}$. Koncentrace kalprotektinu, které jsou menší jak 50 $\mu\text{g/g}$, jsou považovány za normální. Ty, které spadají do rozmezí 50-120 $\mu\text{g/g}$ jsou hodnoty hraniční. Hodnoty větší jak 120 $\mu\text{g/g}$ jsou hodnoceny jako abnormální [69].

Tento test je velmi variabilní, a je možné na něm měřit kalprotektin i v jiných tělních tekutinách jako je např. sérum nebo pleurální výpotek [72,73].

Ve studii z roku 2021 byl tento test použit k odlišení IBD od IBS. Do studie bylo zahrnuto celkem 240 pacientů, kdy 102 z nich bylo diagnostikováno IBD, 67 z nich IBS a zbylých 71 mělo jiné střevní onemocnění než IBD nebo IBS. U pacientů s IBD byly hodnoty fekálního kalprotektinu znatelně vyšší než u pacientů s IBS, nebo s ostatními střevními onemocněními. V průměru byly hodnoty fekálního kalprotektinu u pacientů s IBD 522 $\mu\text{g/g}$, s IBS 34,5 $\mu\text{g/g}$ a s ostatními střevními onemocněními 28,6 $\mu\text{g/g}$. Senzitivita a specificita tohoto testu ve vztahu k IBD je 92,2 % a 88,4 %. Na Obrázku 12 je ROC křivka pro rozlišení IBD od IBS od pomocí testu LIAISON. LIAISON Calprotectin přichází s efektivním testováním kalprotektinu, kdy prvním výsledkům se dostává do 35 minut, a nabízí rozšířený rozsah testu až na 8000 $\mu\text{g/g}$. Pomáhá nám rozlišit IBD od IBS s použitím "cut-off" hodnoty $\sim 100 \mu\text{g/g}$ [74].



Obrázek 12 ROC křivka pro rozlišení IBD od IBS a jiných gastrointestinálních poruch pomocí testu LIAISON Calprotectin (převzato a upraveno z [74])

Test byl použit i ve studii, která zkoumala, zda je možné pomocí hodnot FC, změřených tímto testem, predikovat relaps u pacientů s UC. Test vykazoval senzitivitu a specificitu 63 %. To naznačuje, že FC nemusí být specifický pro pacienty s UC, a hodnoty FC mezi 50 a 250 $\mu\text{g/g}$ mohou obvykle předpovídat relaps přibližně u 50 % pacientů [75].

3.2.2.2 ALPCO Calprotectin Chemiluminiscence ELISA test

ALPCO test je *in vitro* diagnostický chemiluminiscenční test určený ke kvantitativnímu měření kalprotektinu. Tento test funguje na principu sendvičového imunoabsorbčního systému s chemiluminiscenční detekcí [76].

Součástí soupravy je mikrotitrační destička, potažená protilátkou proti kalprotektinu. Dále to jsou standardy pro proměření kalibrační křivky. Ty jsou dodávány v koncentracích od 0 do 10000 $\mu\text{g/g}$. V balení, které je na Obrázku 13, jsou i 3 kontroly, jejichž koncentrace najdeme specificky v každé sadě, pufr, detekční protilátky, pufr pro detekční protilátky, promývací pufr, streptavidin a pufr pro něj. Jako poslední je součástí chemiluminiscenční substrát. Pro analýzu jsou potřeba ještě tyto pomůcky a reagentie, které ale nejsou součástí balení. Pro přípravu vzorků stolice jsou potřeba jednorázové sterilní očkovací smyčky nebo dřevěné tyčinky, jednorázové zkumavky se šroubovacím uzávěrem a zkumavky značky Eppendorf. Jako další to je citlivá digitální váha, extrakční pufr, míchačka třepačka, centrifuga, mraznička a jako poslední zařízení ALPCO, pro snadnou extrakci stolice [76].

Pro samotné měření jsou nutné následující potřeby – automatické pipety s objemem 100 μl a jednorázovými špičkami, odměrné nádoby, destilovaná voda, promývací zařízení na mikrotitrační destičky, třepačka destiček a čtečka mikrodestiček, schopná snímat luminiscenci [76].



Obrázek 13 Komerční sada ALPCO a její komponenty (převzato z [77])

Pro analýzu je možné použít vzorek i řídké nebo tekuté stolice, jelikož součástí výpočtu výsledné koncentrace, je normalizace na hmotnost stolice. Mělo by být odebráno přibližně 1-5 g stolice. Vzorek by měl být do laboratoře doručen do 4 dnů od odběru. Teplota při přepravě by neměla přesáhnout 28 °C. Vzorek by měl být do 14 dnů od odběru stolice buď extrahován nebo zmražen. Po extrakci mohou být vzorky uskladněny při 2–8 °C až po dobu 14 dní. Pokud nebude analýza vzorku provedena do 14 dní, musí být vzorky zamrazeny při -20 °C nebo -80 °C. Extrakci lze provést na zařízení “ALPCO Easy Stool Extraction“, anebo podle následujícího postupu manuálním vážením. Při standardní extrakci je potřeba jako první odebrat 50 až 100 mg vzorku stolice a přenést je do předem zvážené zkumavky. Do zkumavky je přidán extrakční pufr s použitím 99násobku objemu navážky. Vzorek je promíchán na míchačce po dobu 30 minut. Poté je vzorek centrifugován po dobu 5 minut při 3000 x g. Poté je potřeba supernatant dekantovat do čisté označené zkumavky. Po tomto kroku je již možné vzorek analyzovat, nebo ho uchovat pro další analýzu [76].

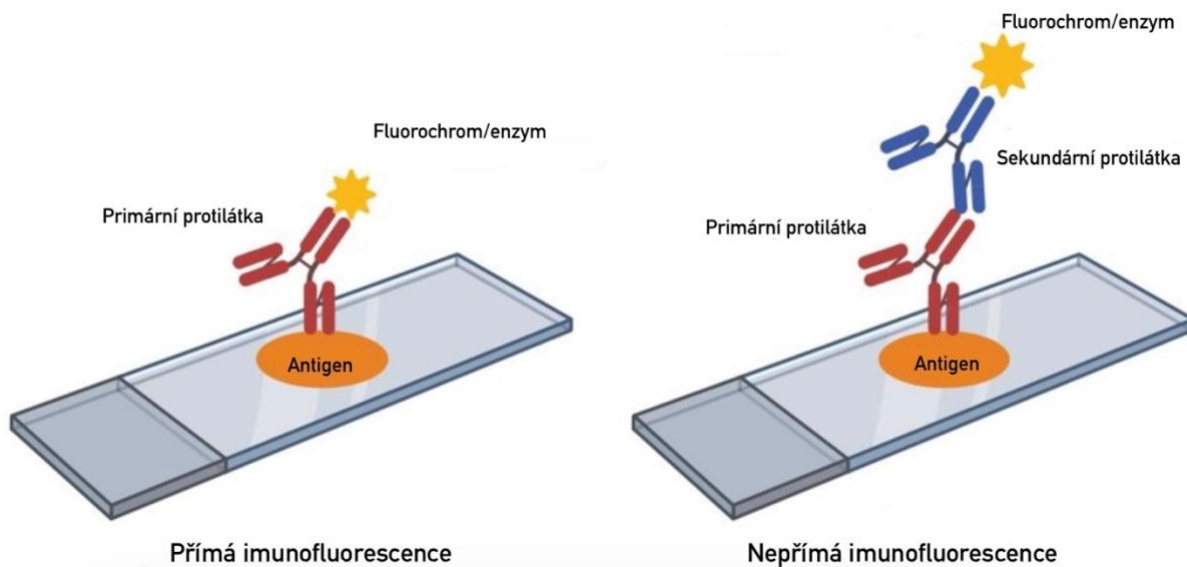
Před samotnou analýzou je potřeba si připravit všechna činidla. Činidla a vzorky musí být vytemperovány na pokojovou teplotu a dobře promíchány. Reagencie, které jsou potřebné naředit, jsou naředěny dle návodu výrobce. Kalibrační křivka musí být sestavena s každou zkouškou a s každou mikrotitrační destičkou. Pro analýzu musí mít vzorek konečné ředění 1:25 000. Standardy a kontroly jsou pipetovány po dvou objemu 100 µl. Objem naředěných

vzorků je také 100 μ l. Vzorky nejsou pipetovány po dvou, ale pouze po jednom. Po napipetování standardů, kontrol a vzorků se destička zavře a inkubuje se po dobu 30 ± 5 minut na třepačce pro mikrotitrační destičky, při 700–900 rpm a 18–28 °C. Po inkubaci jsou jamky vyklepnuty a 6krát promyty použitím minimálně 300 μ l promývacího pufru. Do každé jamky je napipetováno 100 μ l naředěných detektorových protilátek. Mikrotitrační destička je uzavřena a inkubována za stejných podmínek jako při předchozí inkubaci. Po inkubaci je destička vyprázdněna a promyta podle postupu prvního promývání. Do všech jamek je napipetováno 100 μ l naředěného streptavidin-HRP, destička se inkubuje a po inkubaci je promyta za stejných podmínek. Jako poslední je do všech jamek napipetováno 100 μ l chemiluminiscenčního substrátu. Destička se nechá inkubovat 2–5 minut. Bezprostředně po inkubaci je destička umístěna na chemiluminiscenční čtečku. Doba, po kterou se chemiluminiscence měří je 1 sekunda [76].

Koncentrace vzorku stolice je vypočítána z kalibrační křivky, která je sestavena z hodnot standardů. Rozmezí koncentrací, pro které se dá tento test použít je 7,9 - 6000 μ g/g. Koncentrace kalprotektinu, menší jak 50 μ g/g, je považována za normální a analýza nemusí být opakována. Hodnoty 50–100 μ g/g jsou označovány jako nejednoznačné a analýza by měla být zopakována za dalších 4–6 týdnů. Pokud jsou hodnoty kalprotektinu větší jak 100 μ g/g, jsou hodnoty zvýšené, a analýzu je nutno opakovat dle klinické indikace [76].

3.2.3 Metoda nepřímé imunofluorescence

Imunofluorescence je založena na detekci antigenu nebo protilátky pomocí značení látek fluorochromy. Fluorochromy jsou barviva, která absorbují záření, jsou jím excitována a vyzařují viditelné světlo. Jedním z nejpoužívanějších fluorochromů je fluorescein isothiokyanát, zelené barvy. Jako další se používá rhodamin červené barvy [78]. My se budeme zabývat imunofluorescencí nepřímou. Jaký je rozdíl mezi přímou a nepřímou imunofluorescencí je na Obrázku 14. Při nepřímé imunofluorescenci dochází k navázání primární protilátky na kalprotektin. Na tento komplex je poté navázána sekundární protilátka značená fluorescenčním barvivem. Při vystavení světlu je fluorescenční barvivo excitováno, a vyzařuje vlnovou délku, kterou lze pozorovat. Na principu nepřímé fluorescence je založen test od firmy ThermoFisher (odkaz na webovou stránku: <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/our-solutions.html>)



Obrázek 14 Rozdíl provedení přímé a nepřímé imunofluorescence (převzato a upraveno z [79])

3.2.3.1. Thermo Fisher – EliA Calprotectin 2

EliA test je fluorescenční enzymoimunoanalýza založená na nepřímém stanovení ELISA. Test je určen ke kvantitativnímu měření kalprotektinu v lidské stolici *in vitro* jako pomůcka při klinické diagnostice IBD. Metoda je prováděna na přístroji Phadia 250 [80].

Jamka EliA je potažena jedním nebo několika cílovými antigeny, které jsou rozpoznávány a vázány specifickými protilátkami. Při stanovení kalprotektinu ze stolice pacienta jsou jamky dodávané výrobcem potaženy monoklonálními protilátkami proti kalprotektinu [81]. Pokud je kalprotektin ve vzorku pacienta přítomen, naváže se na potažené protilátky. Po promytí nenavázaných složek se přidávají enzymem značené protilátky proti lidskému kalprotektinu, které vytvoří komplex kalprotektinu a konjugátu. Po inkubaci se nenavázaný konjugát promyje a navázaný komplex se inkubuje s vývojovým roztokem. Po zastavení reakce se měří fluorescence v reakční směsi. Čím větší je hodnota reakce, tím více kalprotektinu je ve vzorku pacienta přítomno [80].

K provedení testu je potřeba si od výrobce zakoupit tzv. modulární balíčky. K provedení EliA Calprotectin 2 testu jsou potřeba tyto balíčky: EliA Calprotectin pozitivní kontrola, negativní kontrola, sada pro extrakci stolice a jamky potažené monoklonální protilátkou [80].

Na extrakci stolice lze použít sadu pro extrakci stolice EliA anebo ji lze provést manuálně. Extrakční sada obsahuje zkumavky s 750 µl extrakčního pufru. Po odebrání vzorku se vzorek rozmíchá na míchačce a je inkubován 10 minut. Promíchaný vzorek je poté přenesen do zkumavky Eppendorf, a je centrifugován 5 minut při 3000 x g. Po tomto kroku je odebraný supernatant připravený k analýze [80].

Celá analýza probíhá na analyzátoru Phadia 250, který všechny kroky analýzy dělá automaticky. První výsledky jsou dostupné po cca. 2 hodinách [80]. Analyzátor měří koncentraci kalprotektinu v jednotkách ng/ml, ale pomocí přepočítacímu faktoru specifického kódu destičky, jsou koncentrace automaticky přepočítávány na mg/kg [81].

Rozmezí, pro které je tento test použitelný je 15–3000 mg/kg [81]. Pokud je koncentrace kalprotektinu menší nebo rovno 50 mg/kg, je výsledek považován ze negativní. Pokud je koncentrace větší jak 50 mg/kg je výsledek pozitivní [80].

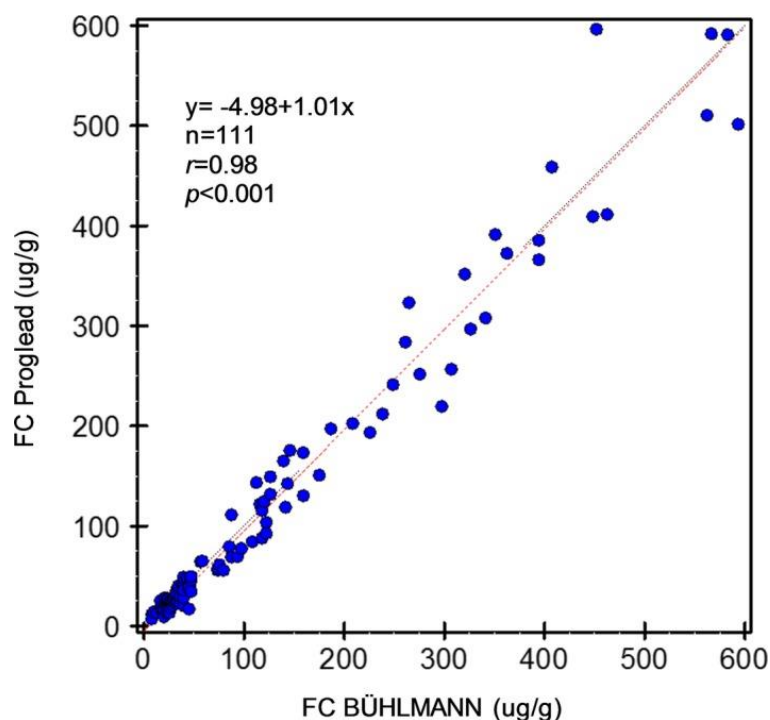
Ve studii, která porovnávala test od značky Thermo Fisher a značky Calpro AS, bylo zjištěno, že test značky Thermo Fisher je více citlivý, ale zároveň méně specifický v porovnání s druhým testem, při testování FC [82].

3.2.3.2 Proglead test

Tato souprava se používá pro *in vitro* kvantitativní detekci obsahu kalprotektinu v lidské stolici [83].

O tomto testu pojednávala studie z roku 2020, kdy ho porovnávala s ELISA testem od značky BÜHLMANN. V době, kdy tato studie vyšla Proglead test ještě nebyl dostupný pro komerční použití. Dle mé rešerše stále není pro český trh dostupný. Pro studii bylo použito 111 vzorků stolice, které byly extrahovány pomocí zařízení od značky BÜHLMANN. Proglead test pro stanovení fekálního kalprotektinu je používán ke kvantitativnímu stanovení kalprotektinu ve vzorcích stolice. Funguje na principu fluorescenčních imunochromatografických testů [84].

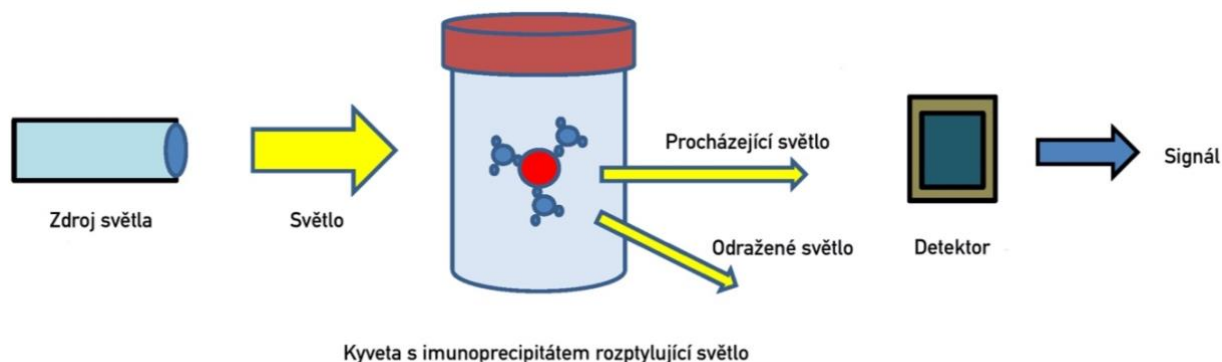
Analýza testu Proglead byla provedena tak, že 90 µl supernatantu bylo přidáno do nanášecího místa pro vzorek na testovací kazetě [84]. Pokud je testovací kazeta otevřena je potřeba test do 1 hodiny provést [83]. Následovala 10minutová inkubace. Detekční myší protilátka, konjugovaná s fluorescenční mikrosférou se váže na kalprotektin ve vzorcích, a komplexy antigen-protilátka proudí do detekční oblasti. Detekční oblast nitrocelulóзовé membrány v testovací kartě byla potažena myší záchytnou monoklonální protilátkou, vysoce specifickou pro kalprotektin. V detekční oblasti byl vytvořen sendvičový komplex dvojité protilátky proti kalprotektinu – kalprotektinu – značené protilátky. Poté byl signál generován fluorescenční mikrosférou pod excitačním světlem, a signál byl detekován pomocí odpovídajícího fluoroimunologického přístroje. Studie ukázala, že výsledky nového Proglead testu s ELISA metodou od firmy BÜHLMANN vykazují dobrou shodu (Obrázek 15). Tato metoda by mohla zefektivnit analýzu kalprotektinu a snížit čas analýzy pod 30 minut [84].



Obrázek 15 Regresní analýza koncentrací fekálního kalprotektinu (FC) mezi metodami FC Proglead a FC BÜHLMANN (převzato z [84])

3.3 Turbidimetrické metody

Turbidimetrie je metoda založená na měření stupně zákalu vzorku pro stanovení hladiny analytu. V kontextu naší práce se bavíme o imunoturbidimetrii, kdy kvantifikujeme komplex kalprotektin-protilátka. Tvorba tohoto komplexu zvyšuje zákal vzorku. Při průchodu světla reakčním analytem je část světla rozptýlena vzorkem, část světla je absorbována a zbytek světla vzorkem prochází. Koncentrace kalprotektinu ve vzorku se stanoví měřením absorbance světla. Prošlé záření má tedy vždy nižší intenzitu než záření dopadající. Tato metoda je hojně využívána v klinické diagnostice. Schéma provedení turbidimetrického stanovení je na Obrázku 16. Turbidimetrického stanovení využívá ve svých testech firma BÜHLMANN (odkaz na webové stránky: <https://www.buhlmannlabs.ch>).



Obrázek 16 Schéma provedení turbidimetrického stanovení (převzato a upraveno z [85])

BÜHLMANN fCal turbo test

BÜHLMANN fCAL turbo test je turbidimetrická imunoanalýza se zvýšeným obsahem částic a umožňuje kvantifikaci kalprotektinu ve fekálních extraktech na analyzátorech klinické chemie. Tato metoda je založená na měření absorbance světla, které prošlo připraveným vzorkem. Tento vzorek je připraven tak, že je nejprve extrahován pufrům pomocí extrakčního zařízení BÜHLMANN CALEX, anebo pomocí manuální váhové metody s konečným ředěním 1:500. Extrakty vzorku stolice jsou inkubovány s reakčním pufrům a smíchány s polystyrenovými nanočásticemi. Kalprotektin přítomný ve vzorku zprostředkovává aglutinaci imunočástic. Imunočástice jsou nosiče pro protilátky proti lidskému kalprotektinu. V této sadě jsou to polystyrenové kuličky. Pokud je kalprotektin ve vzorku vyskytuje, naváže se na protilátku na kuličkách. Zákal vzorku je poté měřený pomocí světelné absorbance, která se zvyšuje s tvorbou komplexu kalprotektin-imunočástice. Ten je přímo úměrný koncentraci kalprotektinu [86]. Vlastnosti tohoto testu jsou shodné s klasickými ELISA testy. Hodnoty, změřené tímto testem, odrážely endoskopické skóre pacientů, kteří byli součástí této studie [87].

Součástí analytické soupravy jsou pouze 2 reagenty [87]: 35 ml reakčního pufru a imunočástice, kterých je 7 ml (Obrázek 17). Pufr je složením 3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina. Jako imunočástice jsou použity polystyrenové kuličky potaženy ptačími protilátkami proti lidskému kalprotektinu. Tyto reagenty se nesmí zamrazit. Musí být skladované neotevřené při 2–8 °C. Další reagenty, které jsou potřeba, ale nejsou součástí balení jsou: BÜHLMANN fCAL turbo kalibrační set, BÜHLMANN fCAL turbo kontrolní set, CALEX zařízení s uzávěrem a extrakční souprava. Kalibrační set obsahuje 1 až 6 kalibračních roztoků, kontrolní set obsahuje pozitivní a negativní kontrolu [86].



Obrázek 17 Reagencie pro provedení testu BÜHLMANN fCAL turbo (převzato z [88])

CALEX je speciální zkumavka pro odběr stolice (Obrázek 18). Tato zkumavka obsahuje 5 ml pufru a dávkovací kolík. Tento kolík má v sobě drážky, do kterých se zachytává vzorek stolice. Výhodou těchto zkumavek je jejich jednoduché použití. Postup použití se dá shrnout do tří kroků. První krok je samotný odběr stolice, kdy stačí ponořit kolík na několika místech stolice, tak aby drážky byly vyplněné. Dále se takto odebraný vzorek v kolíku zastrčí zpátky do zkumavky, zkumavka se pevně uzavře a dá se promíchat. Jako poslední je potřeba zkumavku pouze deset minut centrifugovat a vzorek je připravený k použití pro turbidimetrickou analýzu. Extrakční set obsahuje extrakční pufr k alternativní extrakci stolice, pokud by vzorek nebyl odebrán do CALEX zařízení [86]. Použití této zkumavky k extrakci vzorku, vykazuje podobnou přesnost, jako při provedení manuální extrakce. Navíc, použití CALEX zkumavky, je spojeno se snadným používáním, šetří čas personálu laboratoří a není potřeba použití více materiálu [89].



Obrázek 18 Zařízení CALEX pro odběr stolice (převzato z [90])

Odebraný vzorek stolice by měl být dopravený do laboratoře do 3 dní od odebrání vzorků. Měl by být transportován při pokojové teplotě 23 °C. Po převzetí vzorku laboratoří by měl být skladován při 2–8 °C maximálně 3 dny. Vzorky stolice jsou odebírány, extrahovány a zředěny na konečnou koncentraci 1:500, použitím již zmíněného CALEX zařízení. Po extrakci je vzorek centrifugován deset minut při 1000–3000 x g, a poté lze navázat již samotnou analýzou. Pokud není vzorek odebírán do CALEX zařízení je potřeba vzorek stolice manuálně zvážit. Hmotnost stolice se řídí poměrem 1:50 k extrakčnímu pufru. Po extrakci následuje centrifugace 5 minut při 3000 x g. Tento krok je následován ředěním 1:10 extrakčním pufrům. Pro takto vyextrahovaný kalprotektin platí stejné doby uchování při daných teplotách jako u kalprotektinu extrahovaného pomocí CALEX [86].

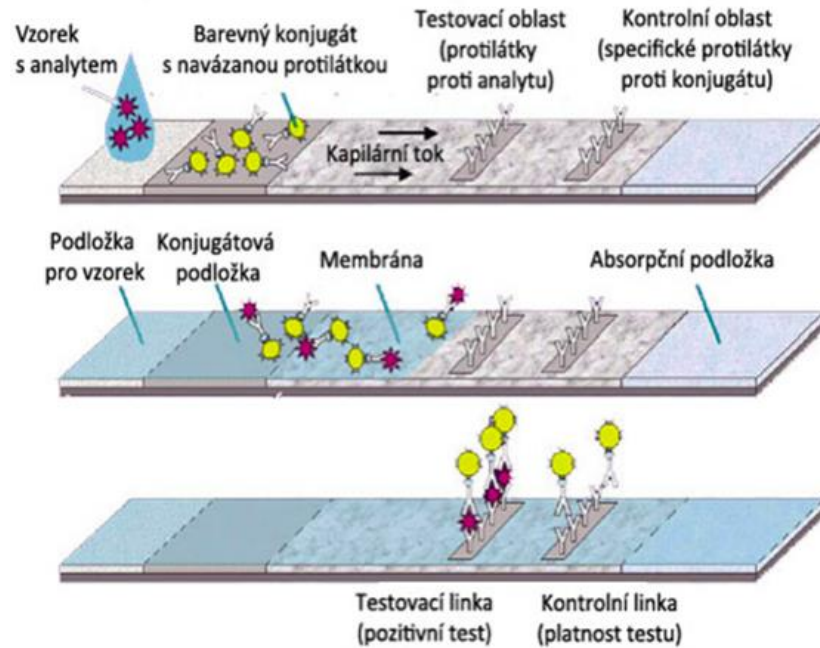
Samotné stanovení pro BÜHLMANN fCAL turbo se provádí na různých analyzátořech klinické biochemie [91].

Poznámky popisující instalaci a analýzu na konkrétních přístrojích jsou vydávány společností BÜHLMANN. Dodávaná činidla jsou již připravena k použití. Před vložením do přístroje je potřeba je jemně promíchat. Lahvičky s činidly lze umístit přímo do přístroje, pokud není v návodu uvedeno jinak. Kalibrační souprava se používá k sestavení šestibodové kalibrační křivky. Hodnoty kalibrátoru jsou specifické pro danou šarži, ale pohybují se v rozmezí 0–2000 µg/ g. Po stanovení kalibrační křivky a ověření její platnosti pomocí kontrol, je možné přejít na samotné měření vzorků stolice. Samotná analýza je velmi rychlá a je hotová do deseti minut. Výsledky jsou automaticky vypočteny na analyzátoru v jednotkách µg/ g. Rozmezí koncentrací, které se dají analyzovat, je 20–8000 µg/ g. Limit kvantifikace tohoto testu je 19 µg/ g [86].

Společnost BÜHLMANN doporučuje použít stejné mezní klinické hodnoty jako u testu BÜHLMANN fCAL ELISA. Hodnoty menší jak 50 $\mu\text{g}/\text{g}$ kalprotektinu nesvědčí o zánětu v gastrointestinálním traktu. U těchto pacientů s nízkými hodnotami není pravděpodobně potřeba provádět invazivní zákroky ke zjištění příčiny zánětu. Zvýšené hodnoty mezi 50 a 200 $\mu\text{g}/\text{g}$ mohou představovat mírné organické onemocnění. Tím může být zánět způsobený používáním NSAID, mírná divertikulitida anebo IBD ve fázi remise. Při těchto hodnotách je doporučeno opakované měření a provedení dalších vyšetření. Hodnoty kalprotektinu vyšší jak 200 $\mu\text{g}/\text{g}$ svědčí o aktivním organickém onemocnění se zánětem v gastrointestinálním traktu. V těchto případech se doporučují další vyšetření u specialistů [86].

3.4 Imunochromatografické testy

Použití imunochromatografických testů je rychlý způsob diagnostiky, který se využívá v prostředí bez dostatečného laboratorního vyšetření nebo přímo v domácnosti. Při vyšetření se používá destička nebo proužek, které je složeno ze zóny pro nanášení vzorku, konjugační zóny, membrány, která je nejčastěji nitrocelulósová, testovací a kontrolní linie, a absorpční linie. Jelikož je kalprotektin látka vysokomolekulární, uplatňují se testy v sendvičovém uspořádání (Obrázek 19). Při sendvičové metodě se používají značené polyklonální protilátky. Při nanášení vzorku, který obsahuje kalprotektin, se antigen v konjugační zóně naváže na značenou protilátku. Vytvořený komplex je unášen na testovací linii, která obsahuje fixované protilátky. Pokud vzorek obsahuje kalprotektin, vzniká barevný proužek (vazba imunokomplexu s fixovanou protilátkou), pokud ne proužek nevzniká. Zbytek imunokomplexu je unášen na kontrolní linii, který obsahuje anti-IgG protilátky zvířecího původu. Zde se proužek objeví jak při pozitivní, tak i při negativním výsledku, jelikož slouží jako kontrola správně provedeného testu. Imunochromatografické testy vyrábí např. již zmíněná firma BÜHLMANN.



Obrázek 19 Schéma imunochromatografického testu (převzato z [92])

3.4.1. BÜHLMANN Quantum Blue fCAL test

BÜHLMANN Quantum blue fCAL test je *in vitro* diagnostický test pro kvantitativní stanovení kalprotektinu ve vzorku lidské stolice. Test je určen k selektivnímu měření antigenu kalprotektinu pomocí sendvičové imunoanalýzy. Monoklonální záchytná protilátka, která je vysoce specifická proti kalprotektinu, je nanášena na testovací membránu. Druhá detekční monoklonální protilátka, která je konjugovaná s koloidním zlatem, je nanášena na podložku pro uvolnění konjugátu. Tato protilátka je poté uvolněna do reakčního systému po přidání extrahovaného a naředěného vzorku stolice. Konjugát kalprotektin/antikalprotektin se zlatem se váže na protilátku proti kalprotektinu nanášenou na testovací linii. Zbývající volný konjugát antikalprotektinu se zlatem se váže na kozí protilátku proti myši nanášenou na kontrolní linii. Intenzita signálu testovací a kontrolní linie se měří kvantitativně pomocí následujícího postupu BÜHLMANN Quantum Blue Reader (Obrázek 20) [93]. Tento test je možné využít i při oddělení IBD od IBS. Při “cut-off“ 50 µg/g, je senzitivita a specifická 94 % a 91 % [94].



Obrázek 20 Zařízení Quantum Blue reader 3rd gen (převzato z [95])

Tato sada obsahuje testovací kazetu (Obrázek 21), extrakční pufr, pozitivní a negativní kontroly. Koncentrace jednotlivých kontrol jsou specifické pro danou šarži a jsou uvedené v doplňkovém listu pro kontrolu kvality. Jako další, sada obsahuje dvě RFID čipové karty a kartu s čárovým kódem. Testovací kazeta, které již byla vyjmuta z foliového obalu, musí být použita do 4 hodin. K provedení je dále potřeba míchačka, automatické pipety s jednorázovými špičkami, centrifuga, savý papír a BÜHLMANN Quantum Blue Reader. K extrakci vzorku stolice je potřeba méně než 1 g nativního vzorku. Vzorek se odebírá do obyčejných zkumavek a měl by být dopraven do laboratoře do 3 dnů [93].

Po přípravě vzorku je možné přejít k samotné analýze. Z příslušné čipové karty jdou nahrát dvě alternativní metody: s interním časovačem a bez interního časovače. Veškeré uvedené postupy jsou aktuální pro analýzu prováděnou na přístroji “Quantum blue reader 3rd generation“. Před zahájením analýzy je potřeba vybrat jednu z čipových karet RFID. Dále společnost BÜHLMANN nabízí dva různé provozní režimy pro měření vzorků: režim “Fast track“ a “Fail safe“. Testovací metodu lze načíst pomocí karty s čárovým kódem. Dále se postupuje podle pokynů na přístroji. Pokud jsme si vybrali analýzu s interním časovačem, tak bude probíhat následovně: Vybalíme testovací kazetu a necháme ji alespoň 2 minuty stabilizovat v laboratorním prostředí. Přidáme 60 μ l extraktu stolice do vstupního otvoru testovací kazety. Kazetu vložíme do držáku přístroje, zavřeme držák a spustíme měření volbou

“Začátek měření“. Skenování se pusť automaticky po 12 minutách. Pokud jsme zvolily metodu bez interního časovače je začátek analýzy stejný, až po aplikaci extraktu stolice. Poté musíme ručně změřit inkubační dobu 12 minut, a až po uplynutí inkubace vložíme kazetu do přístroje, a spustíme analýzu jako v předchozím kroku [93].



Obrázek 21 Testovací kazeta testu Quantum Blue (převzato z [96])

Aby byl výsledek testu platný, musí být vždy viditelná kontrolní čára. Pokud není testovací linie detekovatelná po 12 minutách inkubace, je koncentrace kalprotektinu ve vzorku stolice pod detekčním limitem. Rozsah testu se pohybuje mezi 30 a 1000 $\mu\text{g/g}$.

Test by měl být rozdělen do dvou skupin: s nízkým a vysokým rozmezím. Kdy test s nízkým rozmezím je užitečnější pro určení rozdílu mezi funkčním a organickým onemocněním. Jeho rozmezí se pohybuje od 30 do 300 $\mu\text{g/g}$. Druhé provedení je spíše užitečné pro vyšetření pacientů s již diagnostikovaným IBD [97].

U pacientů, kteří mají hodnoty pod 80 $\mu\text{g/g}$, jsou výsledky interpretovány jako normální a není potřeba analýzu opakovat. Pokud se koncentrace pohybuje v rozmezí od 80 do 160 $\mu\text{g/g}$, výsledky se objevují v tzv. šedé zóně a jsou považovány za hraniční. Při takovýchto výsledcích by se měla analýza zopakovat během 4 až 6 týdnů. U koncentrací vyšších jak 160 $\mu\text{g/g}$ jsou hodnoty považovány za zvýšené a analýze je potřeba opakovat dle potřeby [93].

Studie z roku 2016 porovnávala metodu BÜHLMANN Quantum blue fCAI test s metodou LIAISON Calprotectin test. Byly porovnány jak metody extrakce, tak i funkčnost

užívaných přístrojů. Mezi extrakčními metodami daných testů nebyl zjištěn žádný rozdíl. Při samotném měření byly výsledky pro Quantum blue test vyšší ve srovnání s testem LIAISON. Tyto neshody byly připisovány samotným analyzátorům. Bylo zjištěno, že test Quantum blue má větší klinickou účinnost předpovědi relapsu, a byl schopný odhalit 100 % pacientů při relapsu. I když jsou vlastnosti testu Quantum blue a testu LIAISON velmi podobné, má test Quantum blue některé výhody jako je např. rychlá a snadná extrakce [54].

3.4. „Point of care“ testy

“Point of care“ testy (POCT) jsou určeny k analýze vzorků v místě péče o pacienta, tedy mimo laboratorní prostředí, kde se obvykle testy provádějí. Jedná se o jednoduché a rychlé testy, které může provádět i vyhodnotit poučený laik. Princip těchto testů je založený na imunochromatografických testech. Tyto testy zprostředkují pacientovi pohodlí při odběru a analýze, kdy celý postup analýzy je možný provést v pohodlí domova. Odběr vzorku se provádí jako při odběru k běžnému laboratornímu vyšetření. Při koupi těchto rapid testů v balení najdeme testovací kazetu, zkumavku pro odběr vzorku a návod pro použití (Obrázek 22). Podle toho, od které firmy test zakoupíme, dostaneme i návod na stáhnutí aplikace, která nám po vyfocení kazety test vyhodnotí. Výrobě POCT se věnuje nespočet značek. V práci budou zmíněny testy od firmy BÜHLMANN, Preventis (odkaz na webové stránky: <https://preventis.com/en>) a od značky Calpro (<https://www.svarlifescience.com/products/calprotectin-solutions>).



Obrázek 22 Komponenty POCT sady od značky QuantOn (převzato z [98])

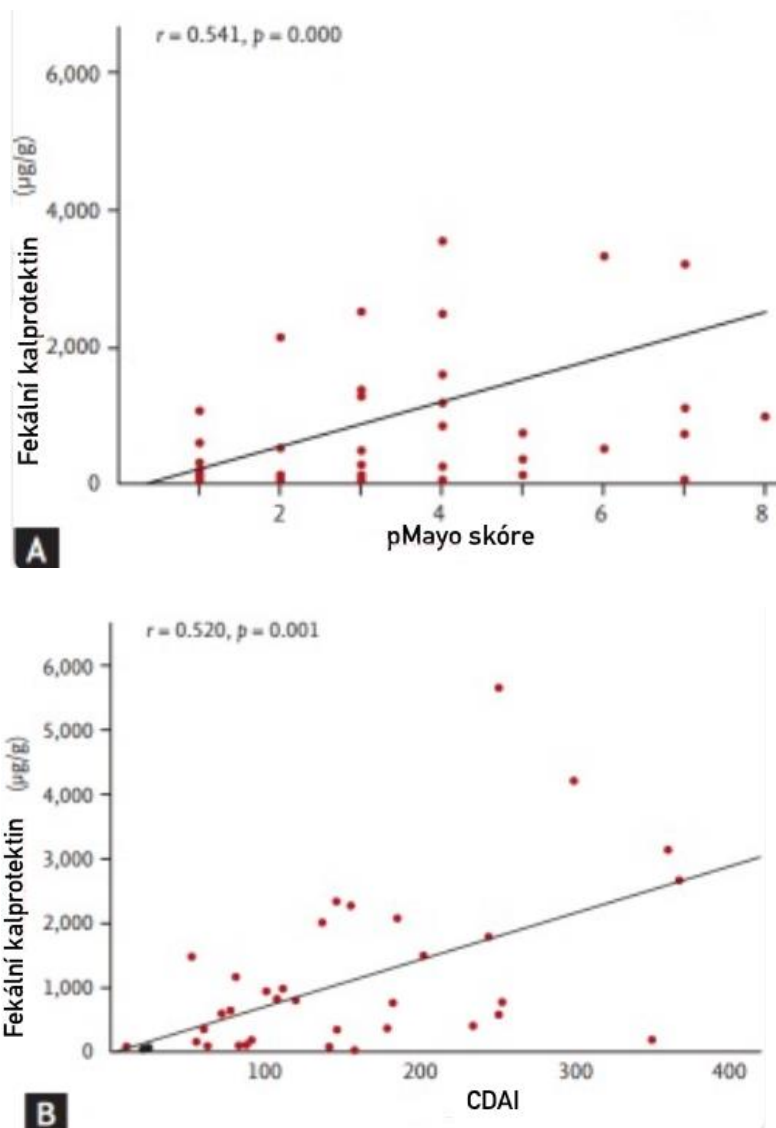
Ve studii z roku 2019 byly porovnávány tři druhy rapid testů (IBDoc, QuantOn Cal a CalproSmart) s ELISA metodami od stejných firem (fCAL, IDK-Calprotectin a

Calprotectin ALP). Oběma metodami bylo otestováno celkem 40 vzorků stolice, aby byla pokryta celá škála koncentrací kalprotektinu. Bylo provedeno celkem 1440 vyhodnocení analýz pomocí chytrého telefonu a 120 měření pomocí metody ELISA. K vyhodnocení rapid testů byly použity čtyři druhy telefonů, pro ověření vhodnosti zařízení pro přečtení kazety a jeho následného vyhodnocení. Po provedení všech analýz byly výsledky vyhodnoceny pomocí Bland-Altmanovo diagramu, kdy byly porovnány průměrné hodnoty testů od stejné firmy. *IBDoc* podhodnotil výsledky fCAL ELISA v celém rozsahu potenciálních hodnot kalprotektinu s průměrnou odchylkou 105 $\mu\text{g/g}$. *QuantOn Cal* nadhodnotil výsledky testu IDK-Calprotectin ELISA s průměrnou odchylkou 137 $\mu\text{g/g}$. *CalproSmart* nadhodnotil výsledky testu ELISA Calprotectin-ALP s průměrnou odchylkou 141 $\mu\text{g/g}$. Výsledky studií ukazují, že u všech porovnání párových měření byly výsledky nižších hodnot kalprotektinu blíže a více seskupeny u nulové linie, a výsledky vyšších hodnot kalprotektinu byly více rozptýleny. Nižší hodnoty kalprotektinu jsou menší nebo rovno 500 $\mu\text{g/g}$, vyšší hodnoty kalprotektinu jsou ty, které jsou větší jak 500 $\mu\text{g/g}$. Lze tedy tvrdit, že rapid testy jsou srovnatelné s klasickými ELISA metodami pouze v nižším rozmezí koncentrací [99].

4 Kalprotektin jako biomarker v diagnostice a monitorování střevních zánětů

Fekální kalprotektin je skvělý neinvazivní biomarker u zánětlivých střevních onemocnění. Jeho výhodou jsou snadné a levné metody detekce a také disponuje větší diagnostickou přesností než klasické sérové markery jako CRP, ESR, ANCA a ASCA. FC má dobrou diagnostickou přesnost pro oddělení organických a funkčních onemocnění. Je také schopný předpokládat relaps IBD. Předpokládá se, že u pacientů se zánětlivým střevním onemocněním, kteří se léčí, je pokles koncentrací nebo úplné srovnání fekálního kalprotektinu na fyziologickou hodnotu přesným ukazatelem endoskopického uzdravení. Díky tomu lze sledovat léčebný proces a podle koncentrací fekálního kalprotektinu je možné léčbu dle potřeb modifikovat [100].

Je také známo, že FC dobře koreluje s aktivitou onemocnění. Tomuto parametru FC se věnovala studie z roku 2019. Ta se nejvíce zaměřila na posouzení užitečnosti FC jako markeru aktivity onemocnění a studovala vztah FC s laboratorními a endoskopickými parametry, včetně slizničního hojení u pacientů s IBD. Do studie bylo zařazeno 93 pacientů, z toho 55 s UC a 38 s CD. Vzorky stolice byly měřeny dvěma metodami: metodou ELISA a imunochromatografickým testem. Výsledkem této studie bylo zjištění, že FC má významnou souvislost s klinickou a endoskopickou aktivitou obou onemocnění. Poznatek o klinické aktivitě je shrnut v Obrázku 23. Pro představení klinické remise u UC měla hraniční hodnota 211,3 $\mu\text{g/g}$ senzitivitu a specificitu 77,4 % a 75 %. U CD při hraniční hodnotě 710 $\mu\text{g/g}$ měla senzitivitu a specificitu 62,5 % a 59,1 %. U zhodnocení vztahu FC a endoskopické aktivity, byla u pacientů s UC s mezní hodnotou 201 $\mu\text{g/g}$ senzitivita a specificita 81,8 % a 100 %. Studie ohodnotila užitečnost FC jako biomarkeru pro sledování aktivity onemocnění u pacientů s IBD pomocí ELISA i imunochromatografického testu. Bylo potvrzeno, že hladina FC byla u pacientů s IBD silně spojena s indexy aktivity onemocnění, sérologickými markery a endoskopickou aktivitou. Oba testy dokázaly u pacientů s UC předpovědět slizniční hojení s vysokou senzitivitou (> 81 %) a specificitou (100 %) [101].



Obrázek 23 Vztah mezi klinickou aktivitou a koncentrací FC pomocí metody ELISA u A-ulcerózní kolitidy, B-Crohnovy choroby (CDAI-Index aktivity Crohnovy choroby) (převzato a upraveno z [101])

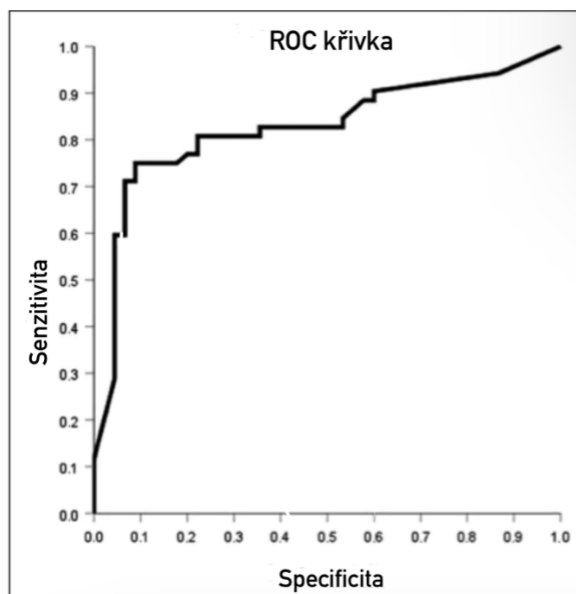
Další studie z roku 2018, vykazovala podobné výsledky vztahu FC a endoskopické aktivity jako předchozí novější studie. Tato studie také zjistila, že výsledky testování FC má lepší výsledky u pacientů s UC než s CD. A i když specifita testu u CD je 72,1 %; 27,9 % testů vykazovaly falešně pozitivní výsledky, což by mohlo vést k léčbě pacientů s neaktivním onemocněním [102].

K předpovědi léčebné odpovědi pomocí FC je nashromážděna spousta informací. Bylo zjištěno, že u pacientů s remisí UC, u kterých byla zjištěna vyšší hodnota FC, došlo při zvýšení dávky mezalaminu ke snížení FC na hodnoty spojené s nižší mírou relapsu [103]. U pacientů, kteří podstupovali léčbu pomocí infliximabu, se ukázalo, že u pacientů, u kterých došlo ke snížení FC po dvou týdnech léčby, mají vyšší pravděpodobnost

endoskopické remise už po 10 týdnech [104]. Studie od Narula a kol. zařadila celkem 677 pacientů s CD léčených ustekinumabem a prokázali, že FC po 6 týdnech může předpovídat endoskopické vyléčení po 52 týdnech, což může být přínosnější než zlepšení klinických příznaků [105]. FC však nemusí být užitečný pro rozhodování o terapeutické odpovědi v krátkém období po zahájení primární, indukční, léčby [106]. Studie z roku 2019 zkoumala vliv podávání vedolizumabu na koncentraci FC a to, zda by koncentrace FC mohla být spolehlivým ukazatelem stavu onemocnění. Koncentrace kalprotektinu byla více snížena při podání vedolizumabu než při podávání placebo. Koncentrace FC v 6. týdnu měly pouze průměrnou hodnotu biomarkeru pro endoskopický stav. Údaje naznačují, že ačkoli FC může zachycovat zánětlivou aktivitu onemocnění, koncentrace FC po podání vedolizumabem nemusí být spolehlivým biomarkerem slizničního zánětu [107].

U pacientů s IBD v klinické remisi bylo zjištěno, že pacienti s vysokým FC mají vyšší riziko časného relapsu než pacienti s nízkým FC. Bylo zjištěno, že u asymptomatických pacientů s IBD, kteří měli opakovaně koncentraci FC nad hraniční hodnotou, byla 53-83% pravděpodobnost relapsu během 2-3 měsíců. Pacienti, kteří měli opakovaně normální hodnoty FC, měli 67-94% pravděpodobnost udržení klinické remise v následujících 2-3 měsících [108]. Studie z roku 2013 se zabývala měřením FCP u pacientů s UC, kteří dostávali udržovací léčbu infliximabu, každé 4 týdny. Bylo zjištěno, že pacienti, u nichž došlo ke vzplanutí, měli již 3 měsíce před vzplanutím významně vyšší hladinu FC [104]. V novější studii bylo zjištěno, že ideální hranicí, která předpovídá relaps, je koncentrace FC 152 µg/g [109]. V jiné studii bylo zjištěna senzitivita a specificita FC předpovídající relaps je 78 % a 73 %. Ze všech zařazených pacientů s CD byla předvídatelnost FC lepší u CD postihující současně tlusté a tenké střevo nebo jen tlusté střevo, na rozdíl u pacientů s postižením pouze tenkého střeva [110].

Studie z roku 2017 zjistila, že hodnoty FC <250 µg/g u pacientů s UC, předpovídají slizniční hojení. Avšak této hodnoty musí být dosaženo ve dvou po sobě provedených hodnoceních. Tato předpověď má vysokou spolehlivou prediktivní hodnotu, a tak může být FC považován za spolehlivý marker [111]. Jiná studie zkoumala, zda FC dokáže předpovědět hojení sliznice u pacientů s UC, kteří mají nasazenou biologickou léčbu. Hodnoty FC, které byly změřeny po osmi týdnech léčby, předpověděly slizniční hojení při 54. týdnu léčby. Na základě "cut – off" hodnoty FC 157,5 mg/kg je senzitivita a specificita 75 % a 88,9 %. Tyto parametry jsou porovnány pomocí ROC křivky na Obrázku 24 [112].



Obrázek 24 ROC křivka hladin fekálního kalprotektinu v 8. týdnu pro predikci slizničního hojení v 54. týdnu (převzato a upraveno z [112])

ZÁVĚR

Fekální kalprotektin se ukazuje jako slibný marker IBD. Studie ukazují, že koncentrace kalprotektinu dobře koreluje jak s endoskopickou, tak i s klinickou aktivitou, a také i s jinými markery zánětu jako je např. CRP. Na rozdíl od jiných markerů, je fekální kalprotektin specifický přímo pro střevní záněty. Jeho vyšetření nám pomáhá sledovat úspěšnost léčby. Díky tomu můžeme léčbu změnit, v případě, že aktuální léčba nezabírá. Je také dobrým indikátorem relapsu.

I když FC je považován za specifický marker IBD, způsob vyšetření ze stolice není v nějakých ohledech ideální jak pro pacienty ani pro samotnou analýzu. Proto je otázkou výzkumu přijít na biomarker, který by byl možný vyšetřit ideálně ze séra pacienta. Takovými markery by mohl být např. onkostatín M nebo faktor aktivující B-buňky. Avšak to, jak velký vztah mají tyto markery k IBD je potřeba ještě studovat. Přesto, žádný z těchto markerů nekonkuruje endoskopickému vyšetření.

Metod pro vyšetření kalprotektinu je spousta a pořád dochází k vývoji nových, které by měli lepší vlastnosti jako je kratší čas analýzy, menší náklady a větší senzitivitu a specificitu k vyšetření FC. Nejvíce jsou prováděny metody ELISA, CLIA anebo turbidimetrické stanovení. Největší rozmach mají v poslední době rapid testy. Ty jsou přizpůsobeny použití v domácím prostředí nebo v podmínkách, kdy nemají lékaři přístup ke standardnímu laboratornímu příslušenství. Tyto testy nabízí pacientům jednoduché provedení analýzy, větší komfort v prostředí domova, rychlejší získání výsledků. Domácí testování bylo velmi přínosné hlavně v době pandemie COVID-19, kdy pacienti omezovali přímý kontakt s lékaři a rutinní vyšetření byla odklání. Díky rapid testům bylo možné pořád sledovat aktivitu onemocnění i bez návštěvy nemocnice, která byla pro pacienty s IBD v té době jistým rizikem.

I když domácí testování přináší určité výhody, nemůžeme stavět diagnostiku IBD pouze na rapid testech provedených přímo pacienty, a diagnostika musí být nadále řízena odborníky a rapid testy by měli zůstat jen jakýmsi doplňkem k hlavní diagnostice.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Veauthier B, Hornecker JR. Crohn's Disease: Diagnosis and Management. [online] *Am Fam Physician*. 2018 Dec 1;98(11):661-669. PMID: 30485038. [cit. 2024-03-10]. Dostupné z: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2018/1201/p661.html>
- [2] Who is affected?, Crohn's and colitis foundation. [online] [cit. 2024-03-10] Dostupné z: <https://www.crohnscolitisfoundation.org/patientsandcaregivers/what-is-crohns-disease/overview>
- [3] FEUERSTEIN, Joseph D. a CHEIFETZ, Adam S. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. [online]. *Mayo Clinic Proceedings*. 2017, roč. 92, č. 7, s. 1088-1103. [cit. 2024-02-20]. ISSN 00256196. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.010>.
- [4] GAJENDRAN, Mahesh; LOGANATHAN, Priyadarshini; CATINELLA, Anthony P. a HASHASH, Jana G. A comprehensive review and update on Crohn's disease. [online]. *Disease-a-Month*. 2018, roč. 64, č. 2, s. 20-57. ISSN 00115029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2017.07.001>. [cit. 2024-02-20]
- [5] SEHGAL, Rishabh a KOLTUN, Walter A. Scoring systems in inflammatory bowel disease. [online]. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2014, roč. 4, č. 4, s. 513-521. ISSN 1747-4124. Dostupné z: <https://doi.org/10.1586/egh.10.40>. [cit. 2024-02-21]
- [6] VERSTOCKT, Bram; BRESSLER, Brian; MARTINEZ-LOZANO, Helena; MCGOVERN, Dermot a SILVERBERG, Mark S. Time to Revisit Disease Classification in Inflammatory Bowel Disease: Is the Current Classification of Inflammatory Bowel Disease Good Enough for Optimal Clinical Management? [online]. *Gastroenterology*. 2022, roč. 162, č. 5, s. 1370-1382. ISSN 00165085. [cit. 2024-02-21] Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.12.246>.
- [7] RODA, Giulia; CHIEN NG, Siew; KOTZE, Paulo Gustavo; ARGOLLO, Marjorie; PANACCIONE, Remo et al. Crohn's disease. [online]. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020, roč. 6, č. 1. ISSN 2056-676X. [cit. 2024-03-10] Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>.
- [8] CUSHING, Kelly a HIGGINS, Peter D. R. Management of Crohn Disease. [online] *JAMA*. 2021, roč. 325, č. 1. [cit. 2024-02-20]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.18936>.
- [9] BOYAPATI, Ray; SATSANGI, Jack a HO, Gwo-Tzer. Pathogenesis of Crohn's disease. [online]. *F1000Prime Reports*. 2015, roč. 7. [cit. 2024-02-20]. ISSN 20517599. Dostupné z: <https://doi.org/10.12703/P7-44>.
- [10] PETAGNA, L.; ANTONELLI, A.; GANINI, C.; BELLATO, V.; CAMPANELLI, M. et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. [online]. *Biology Direct*. 2020, roč. 15, č. 1. [cit. 2024-02-21]. ISSN 1745-6150. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13062-020-00280-5>.

- [11] KANG, Youra; PARK, Hyeonjeong; CHOE, Byung-Ho a KANG, Ben. The Role and Function of Mucins and Its Relationship to Inflammatory Bowel Disease. [online]. *Frontiers in Medicine*. 2022, roč. 9. [cit. 2024-02-15]. ISSN ISSN 2296-858X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.848344>
- [12] Schéma – sliznice tenkého střeva. [online]. [cit. 2024-05-07]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/tenke-strevo-obecne-informace>
- [13] RANASINGHE, Indika R.; HSU Ronald. Crohn Disease. [Updated 2023 Feb 20]. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cit. 2024-02-19]. ISSN Jan-. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436021/>
- [14] RODA, Giulia; CHIEN NG, Siew; KOTZE, Paulo Gustavo; ARGOLLO, Marjorie; PANACCIONE, Remo et al. Crohn's disease. [online]. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020, roč. 6, č. 1. [cit. 2024-02-19]. ISSN ISSN 2056-676X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>
- [15] LICHTENSTEIN, Gary R; LOFTUS, Edward V; ISAACS, Kim L; REGUEIRO, Miguel D; GERSON, Lauren B et al. ACG Clinical Guideline: Management of Crohn's Disease in Adults. [online]. *American Journal of Gastroenterology*. 2018, roč. 113, č. 4, s. 481-517. [cit. 2024-02-19]. ISSN 0002-9270. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ajg.2018.27>
- [16] HISAMATSU, Tadakazu. Typical Endoscopic Findings and Diagnostic Criteria for Crohn's Disease. [online]. In: HIBI, Toshifumi; HISAMATSU, Tadakazu a KOBAYASHI, Taku (ed.). *Advances in Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease*. Tokyo: Springer Japan, 2018, s. 77-83. [cit. 2024-03-15]. ISBN 978-4-431-56016-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-4-431-56018-0_8
- [17] CICERO, Giuseppe a MAZZIOTTI, Silvio. Crohn's disease at radiological imaging: focus on techniques and intestinal tract. [online]. *Intestinal Research*. 2021, roč. 19, č. 4, s. 365-378. [cit. 2024-03-15] ISSN 1598-9100. Dostupné z: <https://doi.org/10.5217/ir.2020.00097>
- [18] GABALEC, Libor. Crohnova nemoc – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. [online]. *Interní Med*. 2009; 11(1): 16–20. [cit. 2024-05-27], Dostupné z: <https://www.internimedcina.cz/pdfs/int/2009/01/03.pdf>
- [19] ROMERO-MASCARELL, Cristina; FERNÁNDEZ-ESPARRACH, Gloria; RODRÍGUEZ-DE MIGUEL, Cristina; MASAMUNT, Maria Carme; RODRÍGUEZ, Sonia et al. Fecal Calprotectin for Small Bowel Crohn's Disease: Is It a Cutoff Issue? [online]. *Diagnostics*. 2022, roč. 12, č. 9. [cit. 2024-02-05]. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092226>.
- [20] GAJENDRAN, Mahesh; LOGANATHAN, Priyadarshini; JIMENEZ, Guillermo; CATINELLA, Anthony P.; NG, Nathaniel et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. [online]. *Disease-a-Month*. 2019, roč. 65, č. 12. [cit. 2024-02-20]. ISSN 00115029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.02.004>.
- [21] PABLA, Baldeep Singh a SCHWARTZ, David Allen. Assessing Severity of Disease in Patients with Ulcerative Colitis. [online]. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2020, roč. 49, č. 4, s. 671-688. [cit. 2024-03-01] ISSN 08898553. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.08.003>.

- [22] NAEGELI, April N; HUNTER, Theresa; DONG, Yan; HOSKIN, Ben; MIDDLETON-DALBY, Chloe et al. Full, Partial, and Modified Permutations of the Mayo Score: Characterizing Clinical and Patient-Reported Outcomes in Ulcerative Colitis Patients. [online]. *Crohn's & Colitis* 360. 2021, roč. 3, č. 1. [cit. 2024-03-01]. ISSN 2631-827X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/crocol/otab007>.
- [23] PORTER, Ross J; KALLA, Rahul a HO, Gwo-Tzer. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. [online]. *F1000Research*. 2020, roč. 9. [cit. 2024-02-20]. ISSN 2046-1402. Dostupné z: <https://doi.org/10.12688/f1000research.20805.1>.
- [24] GOYETTE, Philippe; BOUCHER, Gabrielle; MALLON, Dermot; ELLINGHAUS, Eva; JOSTINS, Luke et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. [online]. *Nature Genetics*. 2015, roč. 47, č. 2, s. 172-179. [cit. 2024-03-10] ISSN 1061-4036. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ng.3176>
- [25] DU, Lillian a HA, Christina. Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. [online]. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2020, roč. 49, č. 4, s. 643-654 [cit. 2024-02-20]. ISSN 08898553. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.07.005>.
- [26] FABIÁN, Ondřej a KAMARADOVÁ, Kateřina. Morfologie zánětlivých střevních onemocnění (IBD). [online]. [obrázek]. *Česko-slovenská patologie*. 2022, roč. 2022, č. 1, s. 37. [cit.] Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/en/journals/czecho-slovak-pathology/2022-1-18/morfologie-zanetlivych-strevnich-onemocneni-ibd-130417>
- [27] Lynch WD, Hsu R. Ulcerative Colitis. [Updated 2023 Jun 5]. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. [cit. 2024-03-01]. Dostupné z : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459282/>
- [28] FEUERSTEIN, Joseph D.; MOSS, Alan C. a FARRAYE, Francis A. Ulcerative Colitis. [online]. *Mayo Clinic Proceedings*. 2019, roč. 94, č. 7, s. 1357-1373. [cit. 2024-03-01]. ISSN 00256196. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.018>.
- [29] MURPHY, Megan E.; BHATTACHARYA, Sumona a AXELRAD, Jordan E. Diagnosis and Monitoring of Ulcerative Colitis. [online]. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2022, roč. 35, č. 06, s. 421-427. [cit. 2024-02-24]. ISSN 1531-0043. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0042-1758047>
- [30] GASSLER, Nikolaus. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. Online. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2017, roč. 8, č. 4, s. 150-160. [cit. 2024-05-27]ISSN 2150-5330. Dostupné z: <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i4.150>.
- [31] KAENKUMCHORN, Tanyaporn a WAHBEH, Ghassan. Ulcerative Colitis. [online]. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2020, roč. 49, č. 4, s. 655-669. [cit. 2024-02-28]ISSN 08898553. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.07.001>
- [32] NAKOV, Radislav. New markers in ulcerative colitis. [online]. *Clinica Chimica Acta*. 2019, roč. 497, s. 141-146. [cit. 2024-02-28] ISSN 00098981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.033>

- [33] Zamani H, Barzin G, Yousefinia M, Mohammadkhani A, Ostovaneh MR, Sharifi AH, Tayebi S, Malekzadeh R, Ansari R. Diagnostic value of fecal calprotectin in patient with ulcerative colitis. [online]. Middle East J Dig Dis. 2013 Apr;5(2):76-80. [2024-03-01]PMID: 24829673; PMID: 24829673; PMCID: PMC3990145. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/24829673/>
- [34] KUCHARZIK, Torsten; KOLETZKO, Sibylle; KANNENGIESSER, Klaus a DIGNASS, Axel. Ulcerative Colitis—Diagnostic and Therapeutic Algorithms. [[online]]. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2020. [cit. 2024-03-01]. ISSN 1866-0452. Dostupné z: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0564>.
- [35] Azer SA, Sun Y. Colitis. [Updated 2023 Aug 7]. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. [cit. 2024-03-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541037/?report=classic>
- [36] DÍTĚ, Petr. Nejčastější zánětlivá střevní onemocnění. [online]. Interní Med. 2001; 3(10): 451-454. [cit. 2024-03-22]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2001/10/04.pdf>
- [37] TOME, June; KAMBOJ, Amrit K. a PARDI, Darrell S. Microscopic Colitis: A Concise Review for Clinicians. [online]. *Mayo Clinic Proceedings*. 2021, roč. 96, č. 5, s. 1302-1308. [cit. 2024-03-22]. ISSN 00256196. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.03.022>
- [38]SONGTANIN, Busara; KAHATHUDUWA, Chanaka a NUGENT, Kenneth. Fecal calprotectin level in microscopic colitis: a systematic review and meta-analysis. [online]. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 2023, roč. 36, č. 5, s. 641-646.[cit. 2024-03-22] ISSN 0899-8280. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/08998280.2023.2223950>
- [39] Azer SA, Tuma F. Infectious Colitis. 2022 Sep 26. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. [cit. 2024-03-22]. PMID: 31335045. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544325/>
- [40] ALIBRAHIM, Bashaar; ALJASSER, Mohammed I a SALH, Baljinder. Fecal Calprotectin Use in Inflammatory Bowel Disease and Beyond: A Mini-Review. [online]. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2015, roč. 29, č. 3, s. 157-163. [cit. 2024-03-22]. ISSN 2291-2789. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2015/950286>.
- [41] FITZGERALD, James a HERNANDEZ III, Luis. Ischemic Colitis. [online]. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2015, roč. 28, č. 02, s. 093-098. [cit. 2024-03-22]. ISSN 1531-0043. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1549099>.
- [42] Ischemic colitis, *Mayo Clinic*. 2022.[online]. [cit. 2024-03-30]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/ischemic-colitis/symptoms-causes/syc-20374001>
- [43] HUNG, Alex; CALDERBANK, Tom; SAMAAAN, Mark A; PLUMB, Andrew A a WEBSTER, George. Ischaemic colitis: practical challenges and evidence-based recommendations for management. [online]. *Frontline Gastroenterology*. 2020, roč. 12, č. 1, s. 44-52. [cit. 2024-03-30] . ISSN 2041-4137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/flgastro-2019-101204>. [cit. 2024-03-22]

- [44] ENCK, Paul; AZIZ, Qasim; BARBARA, Giovanni; FARMER, Adam D.; FUKUDO, Shin et al. Irritable bowel syndrome. [online]. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016, roč. 2, č. 1. [cit. 2024-03-30]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.14>
- [45] KHAKI-KHATIBI, Fatemeh; QUJEQ, Durdi; KASHIFARD, Mehrdad; MOEIN, Soheila; MANIATI, Mahmood et al. Calprotectin in inflammatory bowel disease. [online]. *Clinica Chimica Acta*. 2020, roč. 510, s. 556-565. [cit. 2024-03-30]. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431395/>
- [46] LASERNA-MENDIETA, Emilio J. a LUCENDO, Alfredo J. Faecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: a review focused on meta-analyses and routine usage limitations. [online]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2019, roč. 57, č. 9, s. 1295-1307. [cit. 2024-03-01]. ISSN 1437-4331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1063>.
- [47] CARNAZZO, Valeria; REDI, Serena; BASILE, Valerio; NATALI, Patrizia; GULLI, Francesca et al. Calprotectin: two sides of the same coin. [online]. *Rheumatology*. 2024, roč. 63, č. 1, s. 26-33. [cit. 2024-03-27]. ISSN 1462-0324. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kead405>.
- [48] AYLING, Ruth M. a KOK, Klaartje. Fecal Calprotectin. [online]. In: . *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, 2018, s. 161-190. [cit. 2023-9-19]. ISBN 9780128152034. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.005>.
- [49] Protein S100-A9, *Uniprot*. [online]. [cit. 2024-02-20]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06702/entry>
- [50] FAGERHOL, M.K.; DALE, I. a ANDERSSON, T. A RADIOIMMUNOASSAY FOR A GRANULOCYTE PROTEIN AS A MARKER IN STUDIES ON THE TURNOVER OF SUCH CELLS. [online]. In: *Biochemistry, Pathology and Genetics of Pulmonary Emphysema*. Elsevier, 1981, s. 273-282. [cit. 2024-03-01]. ISBN 9780080273792. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-027379-2.50028-4>.
- [51] HERRERA, Oscar R.; CHRISTENSEN, Michael L. a HELMS, Richard A. Calprotectin: Clinical Applications in Pediatrics. [online]. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 2016, roč. 21, č. 4, s. 308-321. [cit. 2023-9-19]. ISSN 1551-6776. Dostupné z: <https://doi.org/10.5863/1551-6776-21.4.308>.
- [52] FREEMONT, PAUL; HOGG, NANCY a EDGEWORTH, JONATHAN. Sequence identity. [online]. *Nature*. 1989, roč. 339, č. 6225, s. 516-516. [cit. 2024-03-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/339516b0>.
- [53] STEINBAKK, M.; NAESS-ANDRESEN, C-F.; FAGERHOL, M.K.; LINGAAS, E.; DALE, I. et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. [online]. *The Lancet*. 1990, roč. 336, č. 8718, s. 763-765. [cit. 2024-03-27]. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)93237-J](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)93237-J).

- [54] DELEFORTRIE, Quentin; SCHATT, Patricia; GRIMMELPREZ, Alexandre; GOHY, Patrick; DELTOUR, Didier et al. 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. [online]. *Clinical Biochemistry*. 2016, roč. 49, č. 3, s. 268-273. [cit. 2024-04-11]. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.10.010>.
- [55] WANG, Qin; CHEN, Weiqian a LIN, Jin. The role of calprotectin in rheumatoid arthritis. [online]. *Journal of Translational Internal Medicine*. 2019, roč. 7, č. 4, s. 126-131. [cit. 2024-04-09] ISSN 2224-4018. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/jtim-2019-0026>.
- [56] Azramezani Kopi T, Shahrokh S, Mirzaei S, Asadzadeh Aghdaei H, Amini Kadijani A. The role of serum calprotectin as a novel biomarker in inflammatory bowel diseases: a review study.[online] *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2019 Summer;12(3):183-189. [cit. 2024-03-21] PMID: 31528300; PMCID: PMC: 6668766. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/31528300/>
- [57] MINISTRO, Paula a MARTINS, Diana. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: how, when and why? [online]. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2017, roč. 11, č. 4, s. 317-328. [cit. 2023-11-1]. ISSN 1747-4124. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1292128>.
- [58] WANG, Siwen; SONG, Rui; WANG, Ziyi; JING, Zhaocheng; WANG, Shaoxiong et al. S100A8/A9 in Inflammation. [online]. *Frontiers in Immunology*. 2018, roč. 9. [cit. 2023-10-26]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01298>.
- [59] JUKIC, Almina; BAKIRI, Latifa; WAGNER, Erwin F.; TILG, Herbert a ADOLPH, Timon E. Calprotectin: from biomarker to biological function. [online]. *Gut*. 2021, roč. 70, č. 10, s. 1978-1988. [cit. 2023-10-26]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324855>.
- [60] BAISHYA, Jiwasika; EVERETT, Jake A.; CHAZIN, Walter J.; RUMBAUGH, Kendra P. a WAKEMAN, Catherine A. The Innate Immune Protein Calprotectin Interacts With and Encases Biofilm Communities of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. [online]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022, roč. 12. [cit. 2024-04-08]ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.898796>.
- [61] Faecal Calprotectin Sample Collection, Peterborough and Stamford Hospitals, NHS Foundation Trust, [online], [cit. 2024-02-13] Dostupné z: <http://pch-pathlab.com/cms/sites/default/files/documents/Faecal%20Calprotectin%20Patient%20Information%20Sheet.pdf>
- [62] D'AMICO, Ferdinando; NANCEY, Stéphane; DANESE, Silvio a PEYRIN-BIROULET, Laurent. A Practical Guide for Faecal Calprotectin Measurement: Myths and Realities. [online]. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2021, roč. 15, č. 1, s. 152-161. [cit. 2024-02-13]ISSN 1873-9946. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa093>.

- [63] LINDAHL, Gabriel. *The effects of flaxseed and tamoxifen on the inflammatory microenvironment in normal breast tissue and in breast cancer*. [obrázek] Linköping University Medical Dissertations. Linköping: Linköping University Electronic Press, 2019. [cit. 2024-04-08]. ISBN 9789179299637. Dostupné z: <https://doi.org/10.3384/diss.diva-161062>.
- [64] PhiCal Test, Calpro AS, 03/2020. [online]. [cit. 2024-02-27]. Dostupné z: [https://cdn2.hubspot.net/hubfs/2441243/Calpro/IFUs/PhiCal/9053%20PhiCal%20Test%20\(32123\)%20Rev2.pdf](https://cdn2.hubspot.net/hubfs/2441243/Calpro/IFUs/PhiCal/9053%20PhiCal%20Test%20(32123)%20Rev2.pdf)
- [65] Komerční sada PhiCal a její komponenty, [obrázek]. Dostupné z: <https://www.svarlifescience.com/products/cpt400>
- [66] LIN, Leo; WYNESS, Sara P; JENSEN, Ryan; BIRD, Joseph; NORGYAL, Tenzin et al. Comparison of Next-Generation Assays for Fecal Calprotectin vs the PhiCal Assay. [online]. *American Journal of Clinical Pathology*. 2022, roč. 157, č. 2, s. 252-256. cit. 2024-04-08]. ISSN 0002-9173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab114>. [
- [67] CINQUANTA, Luigi; FONTANA, Desré Ethel a BIZZARO, Nicola. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? [online]. *Autoimmunity Highlights*. 2017, roč. 8, č. 1. [cit. 2024-04-08]. ISSN 2038-0305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2>.
- [68] Chemiluminiscent Immunoassay (CLIA) Kit, LSBio, Dostupné z: <https://www.lsbio.com/products/elisakits/clia>
- [69] LIAISON Calprotectin DIASORIN, US Food and Drug administration, 2018. [online]. Dostupné z: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf18/K182698.pdf
- [70] LIAISON XL DIASORIN. [obrázek]. Dostupné z: <https://int.diasorin.com/en/immunodiagnostics/gastrointestinal-diseases/liaisonr-calprotectin>
- [71] PELKMANS, Leonie P J; DE GROOT, Monique J M a CURVERS, Joyce. Analytical Performance and Clinicopathologic Correlation of Four Fecal Calprotectin Methods. Online. *American Journal of Clinical Pathology*. 2019, roč. 152, č. 3, s. 392-398. [cit. 2024-05-27]ISSN 0002-9173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz051>.
- [72] MACIAS-MUÑOZ, Laura; FRADE-SOSA, Beatriz; INICIARTE-MUNDO, Jose; HIDALGO, Susana; MORLA, Rosa Maria et al. Analytical and clinical evaluation of DiaSorin Liaison® Calprotectin fecal assay adapted for serum samples. [online]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022, roč. 36, č. 3. [cit. 2024-04-11]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.24258>.
- [73] DE PAZ POVES, Cristina; BARNEO-CARAGOL, Clara; CILLERO SÁNCHEZ, Ana Isabel; JIMENEZ MENDIGUCHIA, Lucía; QUIRÓS CASO, Covadonga et al. Evaluation of DiaSorin Liaison® calprotectin fecal assay adapted for pleural effusion. [online]. *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio*. 2023, roč. 4, č. 4, s. 419-424. [cit. 2024-04-2].ISSN 2628-491X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/almed-2023-0106>.

- [74] CAMPBELL, James P.; ZIEROLD, Claudia; RODE, Ashli M.; BLOCKI, Frank A. a VAUGHN, Byron P. Clinical Performance of a Novel LIAISON Fecal Calprotectin Assay for Differentiation of Inflammatory Bowel Disease From Irritable Bowel Syndrome. [online]. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2021, roč. 55, č. 3, s. 239-243. [cit. 2024-04-08]. ISSN 0192-0790. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001359>.
- [75] FIORINO, Gionata; DANESE, Silvio; PEYRIN-BIROULET, Laurent; SANS, Miquel; BONELLI, Fabrizio et al. LIAISON ® Calprotectin for the prediction of relapse in quiescent ulcerative colitis: The EuReCa study. Online. *United European Gastroenterology Journal*. 2022, roč. 10, č. 8, s. 836-843. [cit. 2024-05-27] ISSN 2050-6406. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ueg2.12268>.
- [76] ALPCO Calprotectin Chemiluminiscence ELISA. [online]. [cit. 2024-03-02]. Dostupné z: <https://s3.amazonaws.com/alpco-docs/80/80-CALPHU-CH01,CH50%20IFU.pdf>
- [77] Komerční sada ALPCO a její komponenty. [obrázek]. Dostupné z: <https://www.alpco.com/resources/a-guide-to-stellux-chemiluminiscence-elisas-an-infographic>
- [78] Aoki V, Sousa JX Jr, Fukumori LM, Perigo AM, Freitas EL, Oliveira ZNP. Direct and indirect immunofluorescence. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):490-9 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z:
- [79] LAGER, Malin. *Molecular and serological tools for clinical diagnostics of Lyme borreliosis - can the laboratory analysis be improved?* [obrázek]. Linköping University Medical Dissertations. Linköping: Linköping University Electronic Press, 2020. [cit. 2024-04-08] ISBN 9789179298333. Dostupné z: <https://doi.org/10.3384/diss.diva-170740>.
- [80] Thermo Fisher EliA Calprotectin 2. [online]. [cit. 2024-04-08]. Dostupné z: https://www.abacusdx.com/media/EliA_Calprotectin_2_DFU_V23_2020.pdf
- [81] HAN, Sung-Hee; YI, Joowon; KIM, Ji-Hoon a MOON, Hee-Won. Investigation of Intestinal Microbiota and Fecal Calprotectin in Non-Toxigenic and Toxigenic *Clostridioides difficile* Colonization and Infection. [online]. *Microorganisms*. 2020, roč. 8, č. 6. [cit. 2024-05-27]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060882>.
- [82] ACEVEDO, Delia; SALVADOR, Maria Pilar; GIRBES, Javier a ESTAN, Nuria. Fecal Calprotectin: A Comparison of Two Commercial Enzymoimmunoassays and Study of Fecal Extract Stability at Room Temperature. [online]. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2018, roč. 10, č. 5, s. 396-404. ISSN 1918-3003. Dostupné z: <https://doi.org/10.14740/jocmr3275e>. [cit. 2024-05-27]
- [83] Proglead test. [online]. [cit. 2024-05-27]. Dostupné z: http://www.proglead.com/Product/Details_18874.html
- [84] LI, Runqing; ZHAO, Xiuying; DONG, Jingxiao; ZHU, Dong; WANG, Tengjiao et al. Evaluation of a fluorescent immunochromatography test for fecal calprotectin. [online]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2020, roč. 34, č. 2. [cit. 2024-04-08] ISSN 0887-8013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.23059>.

- [85] POHANKA, Miroslav. Diagnoses Based on C-Reactive Protein Point-of-Care Tests. [obrázek]. *Biosensors*. 2022, roč. 12, č. 5. [cit. 2024-04-08]ISSN 2079-6374. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios12050344>.
- [86] BÜHLMANN fCAL turb, BÜHLMANN LABORATORIES AG, [online]. [cit. 2024-03-05]. Dostupné z: https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/06/20170224-KK-CAL_IFU-CE-Reagent.pdf
- [87] OKA, Akihiko; KAWASHIMA, Kousaku; KISHIMOTO, Kenichi; KOTANI, Satoshi; FUKUNAGA, Mai et al. Validation of rapid fecal calprotectin assay using particle enhanced turbidimetric immunoassay for inflammatory bowel disease. [online]. *Scientific Reports*. 2024, roč. 14, č. 1. [cit. 2024-05-27] ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51580-z>.
- [88] Reagencie pro provedení testu BÜHLMANN fCAL turbo. [obrázek]. Dostupné z: <https://www.calprotectin.co.uk/calprotectin-products/calprotectin-for-laboratories/fcal-turbo/>
- [89] KAUR, Sukhbir; FORD, Clare a GAMA, Rousseau. BÜHLMANN Calex® Cap for the faecal extraction of calprotectin – Fit for purpose? [online]. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. 2020, roč. 57, č. 4, s. 332-333. [cit. 2024-05-27].ISSN 0004-5632. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0004563220927056>.
- [90] Zařízení Calex pro odběr stolice, [obrázek]. Dostupné z: <https://www.buhlmannlabs.ch/products-solutions/gastroenterology/extraction-calex/>
- [91] NILSEN, Tom; SUNDE, Kathrin; HANSSON, Lars-Olof; HAVELKA, Aleksandra Mandic a LARSSON, Anders. A novel turbidimetric immunoassay for fecal calprotectin optimized for routine chemistry analyzers. Online. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2017, roč. 31, č. 4. [cit. 2024-05-27]. ISSN 08878013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.22061>.
- [92] Schéma imunochromatografického testu.[obrázek]. BICANOVÁ, Šárka. ŠULÁKOVÁ, Anna. KUCHAR, Martin: Komponenty imunochromatografických testů por detekci syntetických kanabinoidů Dostupné z: https://uchpl.vscht.cz/files/uzel/0010733/Bicanova_SVK2014.pdf?redirected
- [93] Quantum blue fCAL extended, BÜHLMANN laboratories AG. [online]. [cit. 2024-03-6]. Dostupné z: https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/01/LF-CALE25_IFU-CE0123_VA4_2022-07-13_IVDR_CS.pdf
- [94] JANG, Hui Won; KIM, Hyun Sook; PARK, Soo Jung; HONG, Sung Pil; KIM, Tae Il et al. Accuracy of three different fecal calprotectin tests in the diagnosis of inflammatory bowel disease. Online. *Intestinal Research*. 2016, roč. 14, č. 4. [cit. 2024-05-27]. ISSN 1598-9100. Dostupné z: <https://doi.org/10.5217/ir.2016.14.4.305>.
- [95] Quantum blue Reader gen. 3. [obrázek]. Dostupné z: <https://www.buhlmannlabs.ch/products-solutions-quantum-blue-quantum-blue-reader>

- [96] Testovací kazeta testu Quantum blue. [obrázek]. Dostupné z: <https://www.buhlmannlabs.ch/products-solutions-quantum-blue-quantum-blue-reader>
- [97] JUSUÉ, Vanesa; CHAPARRO, María a GISBERT, Javier P. Accuracy of fecal calprotectin for the prediction of endoscopic activity in patients with inflammatory bowel disease. Online. *Digestive and Liver Disease*. 2018, roč. 50, č. 4, s. 353-359. [cit. 2024-05-27]. ISSN 15908658. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.12.022>.
- [98] Komponenty testovací sada POCT od značky QuantOn. [obrázek]. Dostupné z: <https://preventis.com/en/products/quanton-cal>
- [99] HAISMA, Sjoukje-Marije; GALAURCHI, Anne; ALMAHWZI, Shatha; ADEKANMI BALOGUN, Joy A.; MULLER KOBOLD, Anneke C. et al. Head-to-head comparison of three stool calprotectin tests for home use. [online]. *PLOS ONE*. 2019, roč. 14, č. 4. [cit. 2024-04-02] ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214751>.
- [100] GISBERT, J.P. a MCNICHOLL, A.G. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. [online]. *Digestive and Liver Disease*. 2009, roč. 41, č. 1, s. 56-66. [cit. 2024-04-05] ISSN 15908658. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.05.008>.
- [101] LEE, Yang Woon; LEE, Kang-Moon; LEE, Ji Min; CHUNG, Yoon Yung; KIM, Dae Bum et al. The usefulness of fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease activity. [online]. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2019, roč. 34, č. 1, s. 72-80. [cit. 2024-04-05] ISSN 1226-3303. Dostupné z: <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.324>.
- [102] ROKKAS, Theodore; PORTINCASA, Piero a KOUTROUBAKIS, Ioannis E. Fecal Calprotectin in Assessing Inflammatory Bowel Disease Endoscopic Activity: a Diagnostic Accuracy Meta-analysis. [online]. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2019, roč. 27, č. 3, s. 299-306. [cit. 2024-04-09] ISSN 1842-1121. Dostupné z: <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.273.pti>.
- [103] OSTERMAN, Mark T.; ABERRA, Faten N.; CROSS, Raymond; LIAKOS, Steven; MCCABE, Robert et al. Mesalamine Dose Escalation Reduces Fecal Calprotectin in Patients With Quiescent Ulcerative Colitis. [online]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014, roč. 12, č. 11, s. 1887-1893.e3. [cit. 2024-04-09] ISSN 15423565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.03.035>.
- [104] WAGATSUMA, Kohei; YOKOYAMA, Yoshihiro a NAKASE, Hiroshi. Role of Biomarkers in the Diagnosis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. [online]. *Life*. 2021, roč. 11, č. 12 [cit. 2024-04-09]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life11121375>.
- [105] NARULA, Neeraj; WONG, Emily C L; DULAI, Parambir S; MARSHALL, John K; COLOMBEL, Jean-Frederic et al. Week 6 Calprotectin Best Predicts Likelihood of Long-term Endoscopic Healing in Crohn's Disease: A Post-hoc Analysis of the UNITI/IM-UNITI Trials. [online]. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2021, roč. 15, č. 3, s. 462-470. [cit. 2024-04-09]. ISSN 1873-9946. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa189>.

- [106] TOYONAGA, Takahiko; KOBAYASHI, Taku; NAKANO, Masaru; SAITO, Eiko; UMEDA, Satoko et al. Usefulness of fecal calprotectin for the early prediction of short-term outcomes of remission-induction treatments in ulcerative colitis in comparison with two-item patient-reported outcome. [online]. *PLOS ONE*. 2017, roč. 12, č. 9. [cit. 2024-04-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185131>.
- [107] REINISCH, Walter; BRESSLER, Brian; CURTIS, Rebecca; PARIKH, Asit; YANG, Huyuan et al. Fecal Calprotectin Responses Following Induction Therapy With Vedolizumab in Moderate to Severe Ulcerative Colitis: A Post Hoc Analysis of GEMINI 1. Online. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2019, roč. 25, č. 4, s. 803-810. [cit. 2024-05-06] ISSN 1078-0998. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ibd/izy304>.
- [108] HEIDA, Anke; PARK, K. T. a VAN RHEENEN, Patrick F. Clinical Utility of Fecal Calprotectin Monitoring in Asymptomatic Patients with Inflammatory Bowel Disease. [online]. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2017, roč. 23, č. 6, s. 894-902. [cit. 2024-04-09]. ISSN 1078-0998. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001082>.
- [109] SHI, Jin-Tong; CHEN, Nuo; XU, Jia; GOYAL, Hemant; WU, Zhi-Qi et al. Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin for Predicting Relapse in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. [online]. *Journal of Clinical Medicine*. 2023, roč. 12, č. 3. [cit. 2024-04-09]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm12031206>
- [110] GALGUT, Bianca J.; LEMBERG, Daniel A.; DAY, Andrew S. a LEACH, Steven T. The Value of Fecal Markers in Predicting Relapse in Inflammatory Bowel Diseases. Online. *Frontiers in Pediatrics*. 2018, roč. 5. [cit. 2024-05-06] ISSN 2296-2360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00292>.
- [111] KRISTENSEN, Vendel; RØSETH, Arne; AHMAD, Tahir; SKAR, Viggo a MOUM, Bjørn. Fecal Calprotectin: A Reliable Predictor of Mucosal Healing after Treatment for Active Ulcerative Colitis. Online. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017, roč. 2017, s. 1-5. [cit. 2024-05-06] ISSN 1687-6121. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/2098293>.
- [112] BERTANI, Lorenzo; BLANDIZZI, Corrado; MUMOLO, Maria Gloria; CECCARELLI, Linda; ALBANO, Eleonora et al. Fecal Calprotectin Predicts Mucosal Healing in Patients With Ulcerative Colitis Treated With Biological Therapies: A Prospective Study. Online. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2020, roč. 11, č. 5. [cit. 2024-05-06].ISSN 2155-384X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000174>.