

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

IMUNOLOGICKÁ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA
NESPECIFICKÝCH STŘEVNÍCH ZÁNĚTŮ

Diplomová práce

Hradec Králové, 2008

Jana Vohralíková

Tato práce byla vypracována pod odborným vedením RNDr. Marcely Drahošové ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové na Oddělení klinické imunologie a alergologie, které si tímto dovoluji poděkovat za poskytnuté cenné rady a pomoc. Mé poděkování patří rovněž Interní klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové, s jejíž pomocí mohla tato práce vzniknout za podpory grantu MZO 00179906 MZ ČR.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

.....

Seznam použitých zkratk

ABBA	Protilátky proti kartáčovému lemu enterocytů
ACCA	Anti Chitobiosid Carbohydrate Antibodies Protilátky proti Chitobiosid Carbohydratu
ALCA	Anti Laminarobioside Carbohydrate Antibodies Protilátky proti antigenu Laminaribioside Carbohydratu
ANCA	Antibodies against Neutrophil Cytoplasmatic Antigens Protilátky proti cytoplasmě neutrofilů
AMCA	Anti Mannobioside Carbohydrate Antibodies Protilátky proti mannobiosid carbohydratu
ASCA	Anti Saccharomyces cerevisiae Antibodies Protilátky proti Saccharomyces cerevisiae
BPI	Bactericidal Permeability Increasing factor
cANCA	cytoplazmatická ANCA
pANCA	perinukleární ANCA
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CCA-IgG-Ab	Colon colitis associated IgG antibody
CN	Crohnova nemoc
CRP	C-reaktivní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GS-ANA	Protilátky proti jádru neutrofilů (granulocyt-specific ANA)
HLA	Human Leukocyt Antigens histokompatibilní antigeny, antigeny lidských leukocytů
HLA-DR2	histokompatibilní antigeny, řada DR
HLA-DR1/DQw5	histokompatibilní antigeny, řada Dr,DQ
IBD	nespecifické střevní záněty (Inflammatory Bowel Disease)
IL-2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6
MPO	enzym myeloperoxidáza
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PR-3	enzym proteináza 3

SD	směrodatná odchylka
TcR	receptor pro antigen T lymfocytů
TMB	tetrametylbenzidin
UC	ulcerózní kolitida

ABSTRAKT

ÚVOD: Nespecifické střevní záněty (IBD) tvoří heterogenní skupinu chorob nejasné etiologie. Patří sem především Crohnova nemoc (CN) a ulcerózní kolitida (UC). Serologické markery jsou důležité pro stanovení diagnózy IBD, především pro rozlišení mezi CN a UC. Mezi hlavní markery, nejčastěji používané, patří ASCA a ANCA. V nedávné době byly objeveny nové protilátky, a to ALCA a ACCA. Jsou spojovány převážně s dg.CN.

CÍL: Zhodnotit přínos nově objevených serologických markerů ALCA a ACCA

METODIKA: Stanovení ANCA protilátek bylo provedeno pomocí metody nepřímé imunofluorescence, stanovení ASCA, ALCA a ACCA pomocí ELISA testu. Vzorky sér byly získány od 89 pacientů s CN a 33 pacientů s UC. Výsledky byly shledány pozitivními pokud: ASCA > 15 U/ml, ALCA > 60 EU a ACCA > 90 EU.

VÝSLEDKY: ASCA byla pozitivní u 78.8% (70/89) pacientů s CN a u 12.1% (4/33) pacientů s UC. pANCA byla pozitivní u 42.4% (14/33) pacientů s dg. UC a 7.8% (7/89) pacientů s CN. ASCA IgA vykazovala 71.3% sensitivitu a 93.9% specifitu pro CN. ASCA IgG vykazovala 57.3% sensitivitu a 93.9% specifitu pro CN. ANCA vykazovala sensitivitu 41.9% a specifitu 92.1% pro UC. ANCA protilátky jsou výrazně zvýšené u žen. ALCA byla pozitivní u 24.7% pacientů s dg. CN a 6.0% pacientů s dg. UC. ACCA byla pozitivní u 8.9% pacientů s CN a 6.0% pacientů s UC. ACCA vykazovala sensitivitu 64.0% a specifitu 69,7% pro CN. ALCA vykazovala sensitivitu 39.0% a specifitu 90.9% pro CN. Sensitivita a specifita byly určeny na základě hodnoty cut-off získané z ROC analýzy pro každé stanovení. 10.1% pacientů s dg. CN bylo negativní na všechny sledované markery. 3.4% (3/89) pacientů s CN bylo pozitivních pouze na jeden sledovaný marker a to ALCA. 1.1% pacientů s dg. CN bylo pozitivní pouze na ACCA.

ZÁVĚR: V této studii jsme se snažili na souboru pacientů s dg. CN a UC ověřit diagnostický přínos nově objevených serologických markerů ALCA a ACCA, sloužících k rozlišení pacientů s CN od UC, ASCA negativních. Námi zjištěné výsledky přesvědčivě nepodpořily teorii o významu stanovení nových markerů ALCA a ACCA v diagnostice IBD.

U ASCA negativních pacientů s dg. CN, jsme prokázali výskyt markeru ALCA pouze v 3.4% případů a přítomnost markeru ACCA u 1.1% případů s dg. CN. Parametry ALCA a ACCA mají u těchto pacientů vysokou specificitu, ale vykazují velmi nízkou sensitivitu. Bohužel se nehodí k vyhledávání pacientů s CN a k odlišení pacientů s dg. CN od pacientů s dg.UC, ASCA negativních. K rozlišení pacientů s IBD by se i nadále v blízké budoucnosti měly používat doposud stanovované serologické markery ASCA a ANCA. Hodnota těchto serologických testů je sice částečně omezena, jsou-li užívány samostatně, ale při jejich kombinaci je jejich specificita velmi vysoká.

Význam stanovení ALCA a ACCA, jako doplňujícího vyšetření ke stávajícímu rutinně užívanému protilátkovému profilu, bude muset být podroben dalšímu zkoumání.

ABSTRACT

BACKGROUND: Inflammatory bowel disease (IBD), with Crohn Disease (CD) and ulcerative colitis (UC) as the two main disorders, is a heterogeneous group of disease of unknown etiology. IBD serological markers may be important in the diagnosis of IBD, for differentiating CD from UC. The major serological marker in common use are ASCA and ANCA. Recently new antiglycan antibodies have been identified: anti laminaribioside carbohydrate antibodies - ALCA and anti chitobioside carbohydrate antibodies ACCA. The antibodies are significantly associated with CD.

AIMS: To evaluate the significance of the recently discovered novel antibodies: ALCA and ACCA

METHODS: Assessment of pANCA, ASCA, ALCA and ACCA was performed using the standardized indirect immunofluorescence technique and ELISA. Serum samples were obtained from 89 patients with CN and from 33 patients with UC. Results were considered positive if: ASCA > 15 U/ml, ALCA > 60 EU and ACCA > 90 EU.

RESULTS: ASCA was positive for 78.8% (70/89) of patients with CD and 12.1% (4/33) of patients with UC. pANCA was positive for 42.4% (14/33) of patients with UC and 7.8% (7/89) of patients with CN. The ASCA IgA test yielded 71.3% sensitivity and 93.9% specificity for CN. The ASCA IgG test yielded 57.3% sensitivity and 93.9% specificity for CN. The ANCA test yielded 41.9% sensitivity and 92.1% specificity for UC. ANCA antibodies are expressively higher by women. ALCA was positive for 24.7% of patients with CN and 6.0% of patients with UC. ACCA was positive for 8.9% of patients with CN and 6.0% of patients with UC. The ACCA test yielded 64.0% sensitivity and 69.7% specificity for CN. The ALCA test yielded 39% sensitivity and 90.9% specificity for CN. Sensitivity and specificity were determined based on optimal cut-off value obtained from ROC curve analysis for each assay. 10.1% of all patients with CN was serologically completely negative. 3.4% (3/89) of patients with CN were positive for ALCA IgG, only. 1.1% of patients with CN were positive for ACCA, only.

CONCLUSIONS: We have tried in this study, on a group of patients with CN and UC diagnosis, to verify the diagnostic contribution of newly

discovered serological markers ALCA and ACCA, used to sort out patients with CN from those with UC, ASCA negative. The results that we have come to do not compellingly support the theory of the importance of determination of new markers ALCA and ACCA in the diagnostics of IBD.

With ASCA negative patients with CN diagnosis we have proved the occurrence of ALCA marker only in 3.4 % of cases and the occurrence of ACCA marker only in 1.1% of cases with CN diagnosis. ALCA and ACCA parameters with these patients have high specificity, but they show very low sensitivity. Unfortunately they are not suitable for looking for CN patients and for sorting them out from UC, ASCA negative patients. In the near future, IBD patients should still be sorted out by means of the serological markers ASCA and ANCA. Although the value of these serological tests is partly limited if they are used individually. However, their specificity is very high if they are combined.

The importance of specification of ALCA and ACCA as supplementary test to currently used antisubstance profile, will have to be put through further research.

OBSAH

1 . ÚVOD.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	16
2.1. Etiologie a etiopatogeneze IBD	16
2.1.1 Faktory imunologické.....	16
2.1.1.1 Chronické střevní záněty jako autoimunitní choroby.....	16
2.1.1.2 Autoimunitní reaktivita navozená superantigeny.....	18
2.1.1.3 Dysregulace slizniční imunity v etiopatogenezi nespecifických střevních zánětů.....	19
2.1.2 Faktory genetické.....	21
2.1.3 Faktory infekční.....	22
2.1.4 Faktory zevního prostředí	23
2.2 Klinický obraz	24
2.2.1 Ulcerózní kolitida.....	24
2.2.1.1 Příznaky.....	24
2.2.1.2 Klasifikace UC dle anatomické lokalizace.....	25
2.2.2 Crohnova nemoc.....	26
2.2.2.1. Příznaky	26
2.2.2.2. Klasifikace CN dle anatomické lokalizace.....	27
2.2.2.3 Klasifikace CN dle komplikací perforujících a neperforujících.....	28
2.2.2.4 Stanovení aktivity Crohnovy nemoci.....	29
2.2.3 Mimostřevní příznaky IBD.....	29
2.2.4 Komplikace IBD.....	30
2.3 Průběh a vývoj	31
2.3.1 Ulcerózní kolitida.....	31
2.3.2 Crohnova nemoc.....	33
2.4 Diagnostika IBD	38
2.4.1. Laboratorní vyšetření	38
2.5 Serologické markery nespecifických střevních zánětů	40
2.5.1 Protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.5.2 Protilátky proti složkám cytoplazmatických granulí neutrofilních granulocytů	40
2.5.3. Nově objevené serologické markery.....	42

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
3.1 Charakteristika souboru.....	44
3.2 Použité metody.....	44
3.2.1 Stanovení protilátek proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA).....	44
3.2.2 Stanovení protilátek proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ASCA).....	48
3.2.3 Stanovení protilátek proti antigenu <i>Laminaribioside Carbohydrate</i> (ALCA).....	51
3.2.4. Stanovení protilátek proti antigenu <i>Chitobioside Carbohydrate</i> (ACCA).....	52
4. VÝSLEDKY	54
5. DISKUSE	75
6. ZÁVĚR	80
7. SEZNAM LITERATURY	81

1 . ÚVOD

Idiopatické střevní záněty (IBD) jsou chronická, často celoživotní onemocnění tenkého a tlustého střeva s neznámou etiologií a jen částečně objasněnou patogenezi (Lukáš M., 2003). Udává se, že jsou druhým nejčastějším chronickým zánětovým onemocněním člověka. Četností následují po revmatoidní artritidě.

IBD zahrnují nejméně dvě klinicko–patologické jednotky, a to Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu (Krejsek a kol., 2004).

Neurčitá kolitida je zánět tlustého střeva, u kterého jsou nacházeny překrývající se rysy ulcerózní kolitidy i Crohnovy choroby, nebo různé atypické známky, takže je nemožné stanovit jistou a důvěryhodnou diagnózu (Lukáš K., 1997).

Crohnova choroba a ulcerózní kolitida se od sebe odlišují klinickými projevy, průběhem onemocnění, odpovědí na léčbu a také prognosticky (Krejsek a kol., 2004).

Crohnova choroba je granulomatózní a transmurální zánětlivé onemocnění postihující jakoukoli část gastrointestinálního traktu, a to segmentálně nebo plurisegmentálně. Většinou probíhá chronicky s obdobími zhoršení (relapsů) a zklidnění (remisí) (Volf, 2004). Choroba má celosvětovou incidenci 4-9 pacientů/100 000 obyvatel/rok, nejvyšší je přitom v USA, u nás dosahuje 1,6-2,0 pacientů/100 000 obyvatel/rok (Zbořil, 2003). Prevalence dosahuje 18-22 na 100 000 obyvatel (Volf, 2004). Maximum postižených je mezi 15-30 lety věku, u obou pohlaví stejnoměrně (Zbořil, 2003).

Ulcerózní kolitida, rovněž označovaná jako idiopatická proktokolitida, je zánětlivé onemocnění sliznice tlustého střeva postihující vždy rektum a šířící se kontinuálně na různě rozsáhlou část tlustého střeva (Volf, 2004). Incidence choroby činí 6-10 pacientů/100 000 obyvatel/rok celosvětově, u nás přibližně ve stejných hodnotách (Zbořil, 2003). Prevalence asymptomatické ulcerózní kolitidy se odhaduje asi na 34/100 000 obyvatel. V severozápadní Evropě je ustálená mezi 35-70. V České republice je prevalence 40-45 (Lukáš K., 1997). Ženy jsou nepatrně častěji postiženy než muži, maximum výskytu je mezi 20.-40. rokem (Zbořil, 2003). Častější je mezi bělochy, zejména Židy. Popisován je familiární výskyt a vysoká konkordance CN u dvojčat (Lukáš M. a kol., 1998).

Mortalita na idiopatické střevní záněty je v USA, Severní Evropě a Velké Británii 0,2-0,4/100 000 za rok. Přes pokroky v léčbě není v posledních 30-ti letech zaznamenán pokles mortality.

Ulcerózní kolitida byla koncem devatenáctého století odlišena od infekčních zánětů tlustého střeva a před první světovou válkou byla akceptována jako samostatná klinická jednotka (*Lukáš M. a kol.*, 2003). Jako taková byla UC popsána v roce 1875 Wilksem a Moxonem (*Lukáš K.*, 1997). V roce 1909 se v Londýně konalo první velké sympozium o ulcerózní kolitidě, kde bylo referováno celkem o 317 nemocných hospitalizovaných v letech 1888 až 1907 v sedmi londýnských nemocnicích. V roce 1913 dostala ulcerózní kolitida samostatné místo na mezinárodním lékařském kongresu v Paříži. V první polovině 20. století dominovala ve výzkumné i klinické činnosti specialistů zabývajících se záněty střev. Předpokládané infekční agens nebylo nikdy odhaleno a později se všeobecně přijalo, že UC je typickým psychosomatickým onemocněním. Po druhé světové válce, v souvislosti s rozvojem imunologie, byla a dosud je považována za autoimunitní onemocnění. Dnes již víme, že není typickým autoimunitním onemocněním, nicméně autoimunitní rysy nemoci jsou evidentní.

Historie Crohnovy choroby je mnohem kratší a datuje se do roku 1932. Ve staré lékařské literatuře však existují popisy nemocných, které věrně připomínají současné pacienty s Crohnovou nemocí. Mezi takové popisy patří i zpráva z roku 1612 podaná W. H. Fabrym, který při sekci adolescenta, jenž zemřel krátce po vzniku bolestí břicha a horeček, našel výraznou stenózu terminálního ilea s nápadně zesílenou střevní stěnou, jež byla příčinou neprůchodnosti a perforace střeva. Podobný popis pochází také od G. B. Morgagniho z roku 1769. I v naší literatuře se objevují zprávy o takových pacientech, a to již mnoho desítek let před popisem B. B. Crohna. V legendárním spisu Thomayerově z roku 1893 (*Pathologie a therapie nemocí vnitřních*) jsou popsány případy nemocných s „počasným katharem střevním“, kde klinický průběh nemoci a patologicko-anatomický nález při sekci věrně připomínají onemocnění označované dnes jako Crohnova choroba. Je patrné, že mnoho lékařů se setkalo desítky let před Crohnem s pacienty trpícími chronickým zánětem střev, který dnes nese jeho jméno.

V roce 1932 popsal B. B. Crohn celkem 14 nemocných s neobvyklým transmurálním zánětem terminálního ilea a vyloučil u nich možnost mykobakteriózy. Nové chorobě dal název regionální ileitida, ta pak v průběhu několika desetiletí po zásluze dostala jeho jméno. Jestliže v první polovině 20. století byla populárnější lépe prozkoumaná UC, v posledních třiceti letech je tomu právě naopak. Závěr století je ve znamení zvýšeného zájmu o Crohnovu chorobu. To je podmíněno nejen stále se zvyšující incidencí a prevalencí této nemoci, ale také obrovským polymorfismem jejích projevů.

Až do osmdesátých let minulého století dominovala klinickému a základnímu výzkumu IBD britská škola, jejíž tradici založil zesnulý S. Truellove z Oxfordu a dále na ní pokračovali pracovníci z londýnského centra St. Marks, z Liverpoolu a Birminghamu. Devadesátá léta byla ve znamení drtivé převahy Američanů. V současné době představují centra v Rochesteru, Chicagu, Los Angeles, New Yorku a Bostonu absolutní špičky v oblasti základního a klinického výzkumu.

V českých zemích se o poznání těchto chorob zasloužil prof. Mařatka se svými žáky, doc. Nedbalem, doc. Bittnerem a doc. Šetkou. Z chirurgů vynikli především prof. Niederle (*Lukáš M. a kol., 2003*).

Cíl práce:

Cílem této práce bylo ověřit diagnostický přínos nových sérových markerů: **ACCA** (Anti- Chitobiosid – Carbohydrate Antibodies) a **ALCA** (Anti-Laminarobioside –Carbohydrate Antibodies), pro stanovení diagnózy UC a CN u pacientů s nespecifickými střevními záněty v porovnání s markery dosud používanými.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Etiologie a etiopatogeneze IBD

U obou onemocnění nebyly v průběhu celého dvacátého století etiologie ani patogeneze uspokojivě vysvětleny. S rozvojem medicíny a přírodních věd obecně, se měnil pohled i na etiologické faktory těchto chorob (*Lukáš M. a kol.*, 2003). Nejvíce informací v posledních třiceti letech přináší imunologie, ale žádná z imunologických teorií však zatím jednoznačně nevysvětluje všechny projevy těchto nemocí. V současné době lze na základě dosud získaných informací a hypotéz rozlišit čtyři okruhy etiopatogenetických faktorů : faktory imunologické, genetické, infekční a faktory zevního prostředí.

2.1.1 Faktory imunologické

V současné době lze imunologické poznatky o etiologii a patogenezi IBD shrnout do tří oblastí:

- oblasti autoimunitních chorob
- autoimunitní reaktivita navozená superantigeny
- dysregulace slizniční imunity (*Matulka*, 2001).

2.1.1.1 Chronické střevní záněty jako autoimunitní choroby

Autoimunitní proces je patrně zahájen nespecifickým poškozením sliznice tlustého střeva. Uvolněním antigenů z kolonocytů dojde k navození autoimunitní reakce protilátkové i buněčné. Významné jsou zřejmě protilátky typu IgG proti proteinu 40 kDa, který je součástí cytoskeletu kolonocytů a je nazýván též tropomyozin. Vyskytuje se také v kůži, rohovce a ve žlučových cestách, což by mohlo souviset s extraintestinálními projevy onemocnění. Protilátky proti tomuto proteinu mají patrně klíčovou roli při vzniku ulcerózní kolitidy a označují se též jako CCA-IgG-Ab (colon colitis associated IgG antibody). Jsou specifické pro UC, lze je prokázat asi u 85% nemocných. U jiných onemocnění tlustého střeva, ani u Crohnovy nemoci se nevyskytují. (*Klener a kol.*, 2005)

V poslední době byly u pacientů s IBD popsány *protilátky proti pohárkovým buňkám*. Vyskytují se u 29% pacientů s UC a 33% pacientů s CN. Protilátky zde nejsou příčinou poškození tkáně, ale jsou markerem nemoci.

Pacienti s touto pozitivitou mají také pozitivitu *ANCA protilátek*. Stejně tak ANCA protilátky žádný imunopatologický stav nezprostředkují, ale jsou pouze indikátorem genetické vlohy pro vznik UC.

U 38% nemocných s UC a u 52% nemocných s CN byly prokázány *protilátky proti kartáčovému lemu enterocytů-ABBA*.

Protilátky proti acinárním buňkám zevně sekretorických struktur pankreatu jsou zjišťovány u 64% dětí s CN a jen u 10% dětí s UC.

V séru pacientů s IBD jsou prokazovány autoprottilátky orgánově nespecifické (*Bartůňková a kol., 2005*). Mezi nejdůležitější patří *ANCA protilátky*. Jedná se zejména o pacienty s UC, kde jsou prokazovány ve 40-80% případů. Naopak u pacientů s CN jsou nalézány výjimečně. Průkaz těchto protilátek je běžně realizován pomocí nepřímé imunofluorescence. Rozlišujeme perinukleární typ těchto protilátek, který je namířen většinou proti určité komponentě cytoplazmy neutrofilních granulocytů (pANCA) nebo proti složkám jádra neutrofilů (laminy), na rozdíl od protilátek cANCA, typických pro Wegenerovu granulomatózu, kdy tyto protilátky jsou nacházeny v cytoplasmě difuzně. pANCA protilátky jsou obecně považovány za genetické markery vlohy pro UC. Cílovým antigenem pro pANCA protilátky u nemocných s IBD je v 90% myeloperoxidáza, ale pomocí speciálních metod lze dnes již stanovit i protilátky proti jiným antigenům obsaženým v cytoplasmě neutrofilů, které mohou ve screeningovém testu jevit rovněž perinukleární fluorescenci, např. protilátky proti BPI (bactericidal permeability increasing factor), peptid s antimikrobiální aktivitou, který je důležitou složkou obrany proti G- bakteriím v rámci přirozené imunity. Vyskytují se u více jak 43% pacientů s IBD. Dalším antigenem je laktoferin, elastáza, katepsin-G nebo lysozym vyskytující se v mnoha slizničních sekretech (*Conrad et al., 2002; Skogh et al., 1991; Hoffenberg et al., 1999*). Klinický význam pANCA protilátek u pacientů s UC není zcela zřejmý, ale bývá užitečný v diferenciální diagnostice mezi UC a CN. Jejich nález nekoreluje s aktivitou, rozsahem, ani délkou trvání nemoci (*Olives et al., 1997; Papp et al., 2007; Mařatka, 1988*).

Asi 60-70% dětí a dospělých s CN má cirkulující *protilátky proti Saccharomyces cerevisiae-ASCA*. Cílovým antigenem pro tyto protilátky je antigenně aktivní fosfopeptidomannan ve stěně buňky uvedené plísně. Význam pro diferenciální diagnostiku mezi UC a CN je veliký. Přítomnost ASCA

protilátek a chybění pANCA protilátek v séru pacienta má 49% senzitivitu a 97% specifitu pro CN, a naopak přítomnost pANCA protilátek a chybění ASCA protilátek má 57% senzitivitu a 99% specifitu pro UC.

Dalším orgánově specifickým ukazatelem je *revmatoidní faktor*, který je častěji prokazován u CN než u UC. Byla zjištěna zvýšená spontánní sekrece revmatoidního faktoru mononukleárními buňkami sliznice tlustého střeva u nemocných s CN v porovnání s buňkami ve zdravé sliznici nebo sliznici nemocných s UC. Produkce revmatoidního faktoru korelovala s aktivitou nemoci (*Matulka, 2001*).

Dále jsou zjišťovány u pacientů s UC vyšší hladiny *antiendotelových protilátek*, které korelují s aktivitou nemoci a koncentrací cirkulujícího von Willebrandova faktoru, uvolněného do cirkulace z poškozených endotelových buněk spolu s endotelinem, proti kterému jsou endotelinové protilátky namířeny. Podle některých teorií se předpokládá, že IBD jsou důsledkem vaskulitidy, která postihuje drobné cévy v mezenteriu a stěně střeva. Nálezy antiendotelových protilátek nepřímo tyto teorie podporují a endotel by se tak významně mohl podílet na etiopatogenezi IBD (*Matulka, 2001*).

V polovině osmdesátých let bylo upozorněno na cytotoxicitu cirkulujících lymfocytů k autologním epitelovým buňkám tlustého střeva u pacientů s IBD. Tato cytotoxicita je zprostředkována protilátkami a modifikována CD8+ buňkami. Větší spontánní cytotoxicita mononukleárních buněk byla nalezena v lamina propria u pacientů s CN. To může být projevem odlišných etiopatogenetických mechanismů nebo jen projevem odlišné produkce cytokinů u obou chorob. Soudí se, že střevní mononukleární buňky mohou být indukovány k cytotoxicitě interleukinem 2 (IL-2). U pacientů s CN byla prokázána zvýšená transkripce genu pro IL-2 (*Matulka, 2001*).

2.1.1.2 Autoimunitní reaktivita navozená superantigeny

Termín superantigen použili poprvé v roce 1989 Kappler a Marack. Popsali skupinu antigenů, zásadně se odlišujících od běžných proteinových nebo peptidových antigenů. T-receptor lymfocytu, jímž je poznáván a vázán antigen, je vytvořený z řetězců α, β nebo $\gamma \delta$ (TCR- α, β jsou nečastější). Pro vazbu

superantigenu a indukci imunitní reakce postačuje, aby byl antigen lokalizován na části β řetězce heterodimeru $TcR_{\alpha,\beta}$, tedy mimo vazebné místo pro antigen. Superantigeny se zároveň napojují na molekuly HLA, rovněž mimo vazebné místo pro antigenní peptid (Krejsek a kol., 2004). Při aktivaci T lymfocytů nemusí být superantigen vždy nabídnut imunokompetentní buňce prostřednictvím receptoru HLA II. třídy, ale může sám aktivovat vhodné místo variabilní části beta řetězce TCR receptoru. Z toho vyplývá, že superantigen obvykle aktivuje daleko větší množství T-lymfocytů než běžný proteinový nebo peptidový antigen. Superantigeny mohou být virového a bakteriálního původu nebo jsou endogenní a jejich produkce je zakódována retroviry, inkorporujícími svou DNA do genomu buňek (Lukáš M. a kol., 1997).

U pacientů s CN byl nalezen v mezenteriálních uzlinách zvýšený počet T-lymfocytů, obsahujících receptor $V\beta 8+$ receptor, tedy takových, které jsou aktivovány superantigeny. Aktivace a expanze tohoto typu T-buněk je dominantním histologickým buněčným nálezem u pacientů s CN a yersiniózou. Tento fenomén nebyl zjištěn u pacientů s UC. Existuje velké množství bakteriálních produktů, které mají superantigenní vlastnosti, například stafylokokový enterotoxin, streptokokový M-protein skupiny A, toxiny *Mycoplasma artritidis* a *Yersinia enterocolitica*. Většina nemocí způsobených nebo spuštěných superantigeny je spojena s autoimunitními důsledky (Lukáš M. a kol., 1998).

2.1.1.3 Dysregulace slizniční imunity v etiopatogenezi nespecifických střevních zánětů

Další možností uplatnění imunitních procesů v nastartování patogenního procesu vedoucího ke vzniku UC a CN může být *porucha koordinace lokální imunitní reakce*. Ta probíhá za spoluúčasti buněk T a B. Za normálních okolností jsou četné imunogenní molekuly, které fyziologicky ovlivňují slizniční imunitní systém a jsou hojně obsaženy v lumen střeva, tolerovány a nedojde k vyvolání imunitní reakce. Rozhodující úlohu zde plní sekreční imunoglobulin IgA, který je hlavním imunoglobulinem pokrývajícím povrch sliznice tenkého a tlustého střeva. Brání vzniku imunitní reakce tím, že vylučuje antigeny z kontaktu s mohutným imunitním systémem lokalizovaným ve sliznici.

U pacientů s IBD je abnormální produkce IgA, a to kvantitativně i kvalitativně. Mononukleární buňky mají sníženou schopnost tvořit protilátky třídy IgA a navíc oproti zdravým lidem, které tvoří převážně IgA2, je ze 70% tvořen IgA1. Tyto změny mají za následek vystupňovanou tvorbu IgG (*Matulka, 2001*).

U UC je v nadbytečném množství tvořen IgG1, u CN IgG2. Odlišná tvorba imunoglobulinů u CN a UC připouští odlišný mechanismus při jejich stimulaci. Nadprodukce IgG1 a IgG3 je obvykle důsledkem stimulované protilátkové odpovědi zprostředkované T-buňkami, které jsou aktivovány proteinovými antigeny. Vysoká tvorba IgG2 je projevem protrahované imunitní odpovědi na trvalý a neeradikovaný chronický infekční proces. Výše uvedené změny ve složení imunoglobulinů na sliznici střeva mají za následek jejich sníženou ochranu před spuštěním patologické imunitní reakce. Navíc IgG1 velmi intenzivně stimuluje složky komplementu. Jeho ochranný vliv na sliznici je daleko menší než IgG2. Další změny se objevují u nemocných s IBD ve tvorbě sekrece J-řetězce, a to jak u IgG1, tak IgG2. To má za následek obtížné uvolňování již tak malého množství IgA z buněk na povrch sliznice (*Matulka, 2001*).

U pacientů s IBD je celkový počet lymfocytů v lamina propria v době remise několikanásobně vyšší oproti zdravým jedincům. Počet buněk obsahujících IgG je oproti zdravým osobám až třicetinásobný, kdežto počet plazmocytů s IgA je zhruba asi dvojnásobný a počet buněk obsahujících IgM je zvýšen minimálně. Bylo zjištěno, že se u nemocných s UC a CN většina T- a B-lymfocytů nachází ve stavu vysoké aktivace. To může svědčit o trvalé antigenní stimulaci imunitního systému. Intenzivnější stimulace T-buněk se odehrává v tlustém střevě (*Matulka, 2001*).

2.1.2 Faktory genetické

Genetické faktory mají patrně rozhodující místo v etiopatogenezi IBD. Důvodem je častý výskyt obou nemocí u více členů rodiny, v určitých etnických skupinách, častá konkordance obou nemocí u monozygotních dvojčat a souběžný výskyt u jiných, geneticky determinovaných chorob. Incidence v rodinách se podle různých zdrojů pohybuje od 10 do 35%, což je mnohokrát víc, než by se dalo předpokládat podle prevalence IBD v běžné populaci. Riziko vzniku onemocnění pro zdravé členy rodiny je patnáctinásobně zvýšené. Navzdory těmto údajům se vyšetřováním HLA antigenů I. a II. třídy nenašla jasná souvislost s výskytem IBD. Dokonce v jednotlivých rodinách pacienti s touto chorobou nemusí zákonitě mít stejný HLA typ. Přesto se zdá, že CN má u bílé rasy zvýšenou asociaci s HLA-A2 a UC s HLA-B27 a HLA-B35.

V současné době je pozornost upřena především na antigeny HLA II. třídy, protože mají zásadní význam v počáteční fázi imunitní reakce, spojené s nabízením antigenů imunokompetentním buňkám. Jejich abnormální exprese na buňkách, kde se normálně nevyskytují, provází řadu autoimunitních chorob. V posledním období se z hlediska HLA antigenů II. třídy popisuje zvýšená asociace CN s HLA-DR1/DQw5 a UC s HLA-DR2 (*Matulka, 2001*).

IBD jsou nápadně časté u některých vzácných chorob s jasnou genetickou příčinou. Jasná je koincidence CN s Turnerovým syndromem. To může naznačovat, že geny odpovědné za vznik této choroby by se mohly vyskytovat i na X-chromozomu. Vedle toho se IBD často nacházejí u pacientů s různými imunodeficientními stavy, které ve většině případů také mají genetickou predispozici. Relativně vyšší incidence UC byla zjištěna u primární hypogamaglobulinémie a vrozených poruch funkce komplementu.

V poslední době dva vědecké týmy z USA identifikovaly **mutaci genu na 16. chromozomu**, která je pravděpodobně odpovědná za predispozici CN. Toto zjištění umožňuje nejen lépe porozumět patogenezi CN. Tato mutace se nevyskytuje u nemocných s UC (*Matulka, 2001*).

2.1.3 Faktory infekční

O významné úloze mikrobiální střevní mikroflóry v etiopatogenezi IBD svědčí řada klinických pozorování a laboratorních výsledků. U laboratorních zvířat dochází ke spontánnímu vzniku zánětu tlustého střeva podobnému UC a CN pouze tehdy, jestliže jejich trávicí trubice je mikrobiálně osídlena. U zvířat imunologicky defektních, která žijí ve sterilním prostředí, nelze zánětlivé změny na trávicí trubici vyvolat. Z etiologicko-patofyziologického hlediska lze úlohu hypotetického infekčního agens rozdělit do tří skupin :

- **specifická infekce primárně patogenním mikroorganizmem**, který indukuje protrahovanou střevní reakci s následným poškozením tkáně. Zvažována jsou tři možná patogenní agens : *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *paramyxoviry*, *Listeria monocytogenes* (Abubakar et al. , 2007).

- **kvalitativní a kvantitativní porucha složení primárně nepatogenní mikrobiální flóry.**

Jedná se především o zmnožení fyziologicky se vyskytujících kmenů Eubacteriae, Peptostreptococcus, Bacteroides a Coprococcus. Tato skutečnost může způsobit vyvolání zánětlivé reakce několika mechanismy, kdy produkty bakteriálního metabolismu jednoho bakteriálního kmene mohou sekundárně zvyšovat virulenci kmenů jiných. Produkty bakteriálního metabolismu mohou působit toxicky na povrchový epitel sliznice tlustého střeva a mohou spouštět celou zánětlivou reakci.

- **protrahovaná imunitní reakce na normální složení střevní flóry**, kdy porušená střevní bariéra umožňuje průnik antigenů běžné střevní flóry do vnitřního prostředí, což navozuje nepřiměřeně silnou imunitní odpověď. U nemocných s UC bylo zjištěno abnormální složení střevního hlenu, snížení jeho vrstvy, porucha metabolismu enterocytů a kolonocytů, jejich snížená schopnost získávat energii. To může být právě příčinou zvýšené propustnosti pro makromolekuly cestou transcelulární a paracelulární. Navíc porucha metabolismu kolonocytů a snížená odolnost epitelové výstelky napomáhají k destrukci sliznice a chronickým zánětlivým změnám (Matulka, 2001).

2.1.4 Faktory zevního prostředí

Vlivům zevního prostředí v etiopatogenezi IBD je věnována značná pozornost. Důvodem je prudký vzestup incidence a prevalence těchto onemocnění v zemích s vyšší životní úrovní za posledních padesát let.

Velká pozornost je věnována zejména **stravovacím návykům**. Zvýšená spotřeba rafinovaných cukrů, nižší příjem nenasycených mastných kyselin řady ω -3, nižší spotřeba nevstřebatelné vlákniny, syrové zeleniny a ovoce jsou nejnápadnějšími odchylkami u pacientů s IBD. Bylo zjištěno, že délka kojení u postižených dětí CN byla 3x kratší než u nepostižených. Třikrát častěji měly postižené děti průjmová onemocnění v časném postnatálním období.

Chronické střevní záněty se častěji vyskytují u lidí s dobrou nebo **vyšší socioekonomickou úrovní**, s náročným zaměstnáním a častými **stresy**.

Ženy užívající **hormonální kontraceptiva** mají vyšší incidenci IBD než ženy, které hormonální antikoncepci neužívají. Riziko je 3.4 násobné. Uvažuje se o možnosti mezenterální ischemie při zvýšené trombogenezi. Ještě větší riziko je u žen kuřaček. Přesvědčivě bylo prokázáno, že aktivní **kouření cigaret** snižuje riziko výskytu UC o 60%. U bývalých kuřáků je toto riziko naopak vyšší než u nekuřáků. Vztah mezi kouřením a vznikem CN je právě opačný, než je tomu u UC. Kouření cigaret může svým dráždivým účinkem na sliznice vyvolávat hypersekreci hlenu v trávící trubici, a tím působit pozitivně u UC. Naopak u CN jsou prokazovány vaskulitické změny v oblasti arteriol, které jsou kouřením ještě prohlubovány.

Nesteroidní antirevmatika jsou často zhoršujícím faktorem pro průběh IBD. Jejich podáním může dojít k relapsu již existující UC nebo CN.

U pacientů s CN je známo, že relapsu nemoci často předchází větší **psychický stres**. Je pravděpodobné, že emoční vlivy mohou mít velký dopad na aktivitu imunitního systému u predisponovaných lidí a mohou být spouštěcím faktorem vzniků nemoci nebo jejího relapsu (*Matulka, 2001*).

2.2 KLINICKÝ OBRAZ

2.2.1 Ulcerózní kolitida

2.2.1.1. Příznaky

Dominantním příznakem UC je **průjem**, který je obvykle, ale ne vždy, spojen s příměsí krve ve stolici. Vyprazdňování je časté, ale stolice jsou málo objemné, což je důsledek dráždivosti zánětlivě změněného rekta.

Při proktitidě si nemocný může stěžovat i na **tenesmy, rektální bolest a nucení na stolici**, při kterém může odcházet jen nevelké množství krve nebo krvavého hlenu. Často se objevují kumulované ranní defekace, někdy se zlepšením stavu během dne a s opětovným večerním zhoršením. V některých případech při bolestivých spasmech v oblasti anorektální může dojít, zejména u starších nemocných, k funkční obstrukci a následné **zácpě**. Pokud je zánět omezen jen na rektum, krev je jen na povrchu stolice, která může být formovaná, při rozsáhlejší postizení je krev přimísena do stolice. Proti tomu výkladu ale stojí fakt, že enteroragie perzistuje i při diverzi toku stolice při ileostomii.

Z dalších symptomů se mohou vyskytovat **bolesti v břiše**, které jsou výrazné zejména při fulminantním průběhu. Bolest může být tupá nebo ostrá a je obvykle lokalizována do dolní poloviny břicha, nebo může sledovat postižený anatomický úsek střeva. Bolest se může objevovat po jídle, pak je křečovitá a obvykle mizí po vyprázdnění. Břišní bolest je důsledkem spasmů muscularis mucosae a střevní dispenze.

Dalším projevem nemoci bývá **teplota**, která je častá u středně těžké a těžké formy UC. Často se vyskytuje večerní špička, kdy teplota stoupá nad 38°C, při fulminantním průběhu až na 40-41°C.

Častým příznakem u UC je **anorexie**, způsobená nauzeou, častým pocitem sytosti, celkovou únavou a bází, že jídlo může vyvolat průjem a abdominální bolesti. **Zvracení**, při nepřítomnosti mechanické obstrukce, je časté u těžkého průběhu, ale mechanismus je nejasný. Variabilní je u nemocných s UC **úbytek na váze**, který je tím větší, čím rozsáhlejší je postižení tlustého střeva. Příčiny úbytku na váze jsou multifaktoriální: anorexie, zvracení, odmítání potravy pro bolesti objevující se po jídle, hypoproteinémie, a předpokládá se při

zánětlivém procesu metabolická reakce, kdy dochází ke zvýšení hladiny kortikosteroidů a katecholaminů, které podporují mobilizaci tuků a svalových proteinů do aminokyselin pro glukoneogenezi. Systémové projevy-teplota, nevolnost a úbytek na váze – jsou častější při rozsáhlém postižení tračníku (Lukáš K., 1997).

2.2.1.2 Klasifikace UC dle anatomické lokalizace

Nejčastěji užívaná klasifikace UC je dle rozsahu postižení:

- Pankolitida - postižení celého tračníku
- Subtotální forma – tračník je postižen od rekta po hepatální ohbí
- Levostranná forma – tračník je postižen od rekta po lienální ohbí
- Proktosigmoiditida –postižení rekta a sigmoidea
- Proktitida – je postiženo jen rektum

U 10-14% nemocných s pankolitidou je nalézáno zánětlivé postižení tenkého střeva (erytém, granulace, vředy), tzv. backwash ileitis, která vzniká regurgitací obsahu tračníku insuficientní ileocekální chlopní, může dosahovat délky až 40 cm v distální části ilea.

Pro praxi je obvykle vyhovující dělení na:

- Tvar lehký (rektální), který je v 30-50% případů
- Tvar středně těžký (levostranná kolitida), která je u 30-50% nemocných
- Tvar těžký (pankolitida), která bývá v 15-20% případů

Za diagnosticky nejcennější známku pro UC je považováno postižení konečníku. V raritních případech může být rektum ušetřeno. Někdy je ulcerózní proktitida považována za nemoc odlišnou od UC (Lukáš K., 1997).

2.2.2 Crohnova nemoc

2.2.2.1 Příznaky

Převažujícími symptomy Crohnovy nemoci je triáda: **průjem, bolesti břicha a úbytek na váze**. Kterýkoli z těchto projevů nemoci může být dominantní, na rozdíl od UC, kde průjem je převládajícím projevem nemoci. Úvodní projevy CN nemusí být dramatické. Pacienti si mohou po dobu mnoha měsíců (až let) stěžovat na neurčité bolesti v břiše a na intermitentní průjem. Časový interval od začátku symptomů do diagnózy je široce variabilní, diagnóza může mít prodlení mnoho let (průměrně 4,1- 5,4 roků, ale rozpětí je 0-31 let). **Průjem** je častý, ale závisí na anatomické lokalizaci Crohnovy nemoci. Při postižení tlustého střeva je průjem v 65-90% případů. U nemocných s postižením rekta mohou být **málo objemné stolice** spojené s naléhavým **nucením** a s **tenesmy**.

Při postižení tenkého střeva jsou stolice objemné a nejsou spojeny s naléhavým nucením a s tenesmy. Při strukturách na tenkém střevě dochází i k bakteriálnímu přerůstání s dekonjugací žlučových solí a k tukové malabsorbci s následnou **steatoreou**. Vnitřní píštěle jsou cestou ke kolonizaci tenkého střeva. Rychlý tranzit může být způsoben i urychleným průchodem střevního obsahu píštělemi. Příčinou průjmu bývá i laktázová deficiente při postižení tenkého střeva.

Okultní **krvácení** je ve stolici časté. **Hematochézie** je asi u 1/3 případů CN, zejména při kolitidě. Masivní krvácení při postižení tlustého střeva se vyskytuje asi ve 2%.

Lokalizace bolesti obvykle koreluje s lokalizací onemocnění. Akutní bolest v břiše, je-li prvním projevem nemoci, může být příčinou laparotomie. Nejčastější jsou křečovitě rekurentní bolesti v pravém dolním kvadrantu u nemocných s ileokolitidou. U nemocných s kolitidou se bolesti v břiše vyskytují v 70-90% případů. Bolest se objevuje po jídle, pravděpodobně souvisí s částečnou intermitentní obstrukcí zúženého střevního lumen a je způsobena napětím stěny střeva v dilatovaném segmentu proximálně od obstrukce a kontrakcemi svaloviny tenkého střeva, které se snaží protlačit střevní obsah zúženým segmentem. Viscerální bolest vzniká při zánětu serózy, jehož příčinou je transmurální zánět.

Abdominální dispenze, nauzea a zvracení mohou bolest doprovázet. U anorektální formy jsou asi ve 40% **tenesmy**. 10-20% nemocných má úbytek na váze až o 20% tělesné hmotnosti. Někdy je úbytek na váze důsledkem malabsorpce, ale většinou je příčinou porušený příjem, kdy pacienti odmítají přijímat potravu, protože přináší bolest nebo průjem a často je důvodem anorexie. Postižení tlustého střeva je spojeno s vysokým výskytem enteroragie a perianálního postižení, ale s nízkým výskytem vnitřních píštělí a obstrukce. Naopak postižení tenkého střeva je spojeno s vysokým výskytem obstrukce, ale s nízkým výskytem krvácení a perianálního postižení. Často jsou prvními projevy CN **extraintestinální manifestace** nebo postižení oblasti perianální, které mohou diagnózu CN předcházet i o několik let.

Postižení jícnu CN se projevuje **pyrózou, dysfagií a odynofagií** nebo **bolestí za sternem**.

Klinické projevy **postižení žaludku a duodena** jsou variabilní. Nemoc může být symptomatická, nebo se projevuje nespecifickými **dyspeptickými potížemi, úbytkem na váze, bolestí v epigastriu**. Při stenóze pyloru a duodena je **nauzea a zvracení**. Krvácení je raritní. Postižení Vaterské papily se může projevit **biliární kolikou**. CN horní části zažívacího traktu je obvykle provázena dalšími manifestacemi nemoci (*Lukáš K., 1997*).

2.2.2.2 Klasifikace CN dle anatomické lokalizace

- **Ileitida-** (Regionální ileitida) – terminální ileum je často postiženo dlouhou dobu před závažnými projevy nemoci. Vyskytuje se ve 25-35% případů. Po mnoho let mohou být jen kolikovitě bolesti v břiše a zvýšená sedimentace červených krvinek. Nemoc se projevuje krvácením, perforací tenkého střeva, strikturami, píštělemi, tvorbou abscesů. Po chirurgickém výkonu často rekuruje.

- **Jejunoileitida.** Současné postižení jejunu a ilea je formou s pomalejším průběhem a vyskytuje se asi v 5% případů CN. Nepravidelně vyžaduje operační řešení, zejména po obstrukci, ale i pro vnitřní píštěle a abscesy. Po chirurgickém výkonu je častá rekurence.

- **Ileokolitida** – Jak název napovídá, je postiženo terminální ileum a přilehlá část tračnicku, buď jen cékum (ileocekální forma) nebo vzestupný tračník

(ileokolonická forma). Je nejčastější formou CN (45%) s vysokou morbiditou, která je způsobena s největší pravděpodobností přítomností vnitřních píštělí a perianální nemoci, které vyžadují více operačních řešení než ostatní formy. Ileokolitida se projevuje krvácením, perforacemi, tvorbou striktur s následnou obstrukcí, tvorbou píštělí a abscesů a častou rekurencí po chirurgickém výkonu.

- **Kolitida.** Bývá asi ve 30% případů. Nemocní s postižením tračníku mají často perianální postižení a hlavní akutní komplikací je toxické megakolon, které je méně časté než u UC. Nezřídka se vyskytují extraintestinální manifestace. **Distální kolitida** s postižením rekta a sigmoidea je častější u starších nemocných (v 11-20%).

- **Anorektální onemocnění** – bývá často sdruženo s kolitidou nebo ileokolitidou a jeho projevy mohou být první manifestací CN, které zřejmě předcházejí zánětu proximálnějších partií střeva. Anorektální postižení bývá až ve 30-40% případů.

- **Postižení apendixu** je časté (50%) při ileokolitidě. Izolovaná CN apendixu je méně obvyklá. Po apendektomii je riziko tvorby píštěle.

- **Orální postižení** bývá zpravidla ve spojení s ileokolitidou, ale může být i jediným projevem nemoci.

- **Gastroduodenální postižení** není časté (0,5-4%).

- **Miliární Crohnova nemoc** je neobvyklá varianta nemoci, kdy na seróze tenkého střeva jsou makroskopicky patrné miliární uzlíky. Klinicky se projevuje břišní bolestí, úbytkem na váze, průjmem, teplotou. Rentgenové vyšetření nalezne změny na tenkém střevě. Po chirurgické resekcí prokáže histologické vyšetření změny typické pro CN (*Lukáš K., 1997*).

2.2.2.3 Klasifikace CN dle komplikací perforujících a neperforujících

Existuje s největší pravděpodobností více forem CN, které jsou nezávislé na anatomické distribuci nemoci. Nejagresivněji probíhá perforující forma projevující se akutně volnou perforací, subakutně tvorbou abscesů nebo vnitřních píštělí. Tato forma je téměř refrakterní na konzervativní léčbu a vyžaduje chirurgické řešení, po kterém obvykle recidivuje.

Forma neperforující, stenózující, obvykle lokalizovaná v oblasti ileocekální, se projevuje poruchou střevní průchodnosti. Forma stenózující je indikována k chirurgickému řešení pro nezvládnutelnost při konzervativní léčbě nebo pro střevní obstrukci. Po resekci postiženého úseku střeva nejúseku střeva nejsou častější recidivy (*Lukáš K., 1997*).

2.2.2.4 Stanovení aktivity Crohnovy nemoci

Ke stanovení aktivity CN je nejčastěji používán Crohn's Disease Activity Index (CDAI), kdy pacient registruje symptomy v průběhu 7 dní. Započítává se 8 proměnných veličin (řídké stolice, břišní bolest, denní pocit tělesné pohody, příznaky nebo nálezy spojené s CN, léčba průjmu antidiaroiiky, rezistence v břiše, hematokrit, tělesná váha). Jsou užívány i jiné indexy aktivity, např. Harvey & Bradshaw CDAI, Dutch AI, IOIBD (*Lukáš K., 1997*).

2.2.3 Mimostřevní příznaky IBD

- Kožní – erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, ekzémy, psoriáza, Sweetův syndrom
- Slizniční – afty, pyostomatitis vegetans, fisury ústní
- Kloubní – artralgie, artritidy, paličkové prsty, sakroileitida, revmatoidní artritida
- Oční – konjunktivitidy, keratitidy, iridocyklitidy, uveitidy
- Cévní – flebotrombózy, vaskulopatie
- Jaterní – primární sklerozující cholangitida, granulomatozní hepatitida
- Relativně vzácné – perikarditidy, nefritidy, amyloidosa aj.

Erytema nodosum, pyoderma gangrenosum, artritidy a oční záněty signalizují vysokou aktivitu IBD a vyžadují léčbu jako akutní vzplanutí CD a UC. Primární sklerozující cholangitida patří k nejzávažnějším chronickým komplikacím, nejčastěji UC, neboť nezávisle na terapii je provázena vznikem jaterní cirhózy po 10-15 letech trvání. Navíc je tato diagnóza spojena s vyšším výskytem cholangiokarcinomu (*Zbořil, 2002*).

2.2.4 Komplikace IBD

- Masivní krvácení – (UC, CD)
- Perforace střevní – (UC, CD)
- Strikтуры – (UC, CD)
- Toxické megakolon – (UC, CD)
- Nádorová přeměna – (UC, CD)
- Abscesy a píštěle (CD, UC naprosto výjimečně)
- tzv. metastatická CD

Perforace, masivní krvácení a toxické megakolon představují závažné akutní stavy, směřující s velkou pravděpodobností k akutní chirurgické intervenci. Nádorová přeměna představuje nedořešený problém u IBD, předpokládá se, že riziko stoupá s dobou onemocnění (3-5% po 15letém trvání, až 30% po 30letém průběhu nemoci) (Zbořil, 2002).

2.3 PRŮBĚH A VÝVOJ

2.3.1 Ulcerózní kolitida

Důležitou charakteristikou UC je průběh nemoci. Je nutné znát i faktory, které jej mohou ovlivnit. Nejdůležitějšími z nich jsou věk a rozsah postižení v době prvních projevů nemoci, trvání a tíže symptomů při prvních projevech. U 18% nemocných s UC je jen **jedna ataka** akutní kolitidy. Je jistě otázkou, zda byla diagnóza UC u těchto nemocných korektní, zda se nejednalo o jinou kolitidu (infekční, přechodnou). 7,2% nemocných má **chronický kontinuální průběh** s perzistentními symptomy a nekompletní remisí, z nichž někteří vyžadují podávání kortikoidů i v remisi. Většina nemocných (64,4%) má **chronický intermitentní průběh** s relapsy a remisemi. Část pacientů (8%) má **průběh fulminantní**, který může skončit fatálně (4%). 8% pacientů se podrobí totální kolektomii v průběhu první ataky.

Počáteční ataka UC může být fulminantní, ale většinou nemoc začíná nenápadně průjmem, který později bývá krvavý. Příznaky postupně narůstají v průběhu několika týdnů. 54% pacientů s UC má první ataku lehkou. Takový průběh je u proktitidy a proktosigmoidity, ale může být dokonce u pankolitidy. Při lehkém průběhu, který má většina nemocných, je obvykle jedinou stížností průjem s příměsí krve. Lehké onemocnění, zejména je-li omezeno jen na rektum, může být často spojeno s normálním nálezem při fyzikálním a laboratorním vyšetření.

Od počátku může být postižené celé tlusté střevo (ve 20%), ale 75% nemocných má proktitidu nebo proktosigmoiditidu. Většina pacientů s proktitidou je ve věku mezi 20-40 roky, těžší formy se vyskytují u mladších a starších pacientů. Aktivita na počátku může být mírná, ale prvním projevem může být i toxické megakolon.

Středně těžké onemocnění se projeví 5-6 stolicemi s příměsí krve za den, bolestí v břiše, únavou, teplotou. Břicho je palpačně bolestivé, auskultace břicha je normální. Asi u 1/5 nemocných se UC projeví při první atace těžkým onemocněním s krvavým průjmem s častou frekvencí defekací. Pacient se cítí slabý, což jej upoutává na lůžko. V dalším průběhu ubývá na váze, objeví se hypoalbuminémie, anémie, teplota a tachykardie. Při palpaci je výrazná bolestivost v průběhu tlustého střeva. Do remise přechází při první atace více

než 90% nemocných s lehkým onemocněním a jen 38% nemocných s těžkým průběhem. A naopak chirurgickou léčbu při první atace vyžaduje 29% nemocných s těžkým průběhem a žádní nemocní s lehkým průběhem.

Tíže klinického průběhu je obvykle úměrná rozsahu postižení střeva a intenzitě zánětu. Pankolitida je obvykle spojena s těžkými zánětlivými změnami. Nemocní s pankolitidou mají ve více než 30% provedenu kolektomii pro konzervativní léčbou nezvládnutelné onemocnění, pacienti s levostrannou formou mají kolektomii provedenu v 10% a nemocní s proktitidou jen ve 2%. Nemocní, u nichž v průběhu života začalo onemocnění později, mají rozsáhlejší postižení a refrakternější nemoc, než ti, u kterých začalo onemocnění dříve.

Pro pacienty s IBD je život charakterizován „dobrymi časy“ (remise) a „špatnými časy“ (relaps), přičemž pro většinu z nich převažuje období dobré. Z nově diagnostikovaných pacientů má druhou ataku do 12 měsíců 80% nemocných. Tíži relapsu nelze předpovědět, stejně tak, zda bude průběh kontinuální nebo intermitující. Jak pacient s proktitidou, tak pacient s pankolitidou může mít rekurentní epizody. Pravděpodobnost remise je větší u pacientů s onemocněním v distální části střeva. Pacienti s dlouhodobým onemocněním mají lepší klinický průběh, než ti s krátkou anamnézou. Je důležité si uvědomit, kdy končí aktivní onemocnění a kdy nastupuje **remise**, jejíž obecnou hranici je velmi obtížné určit. Tato hranice není nikdy zcela přesná. Za remisi u UC je považován stav, kdy je nemocný zcela bez potíží a endoskopický náález je zcela normální.

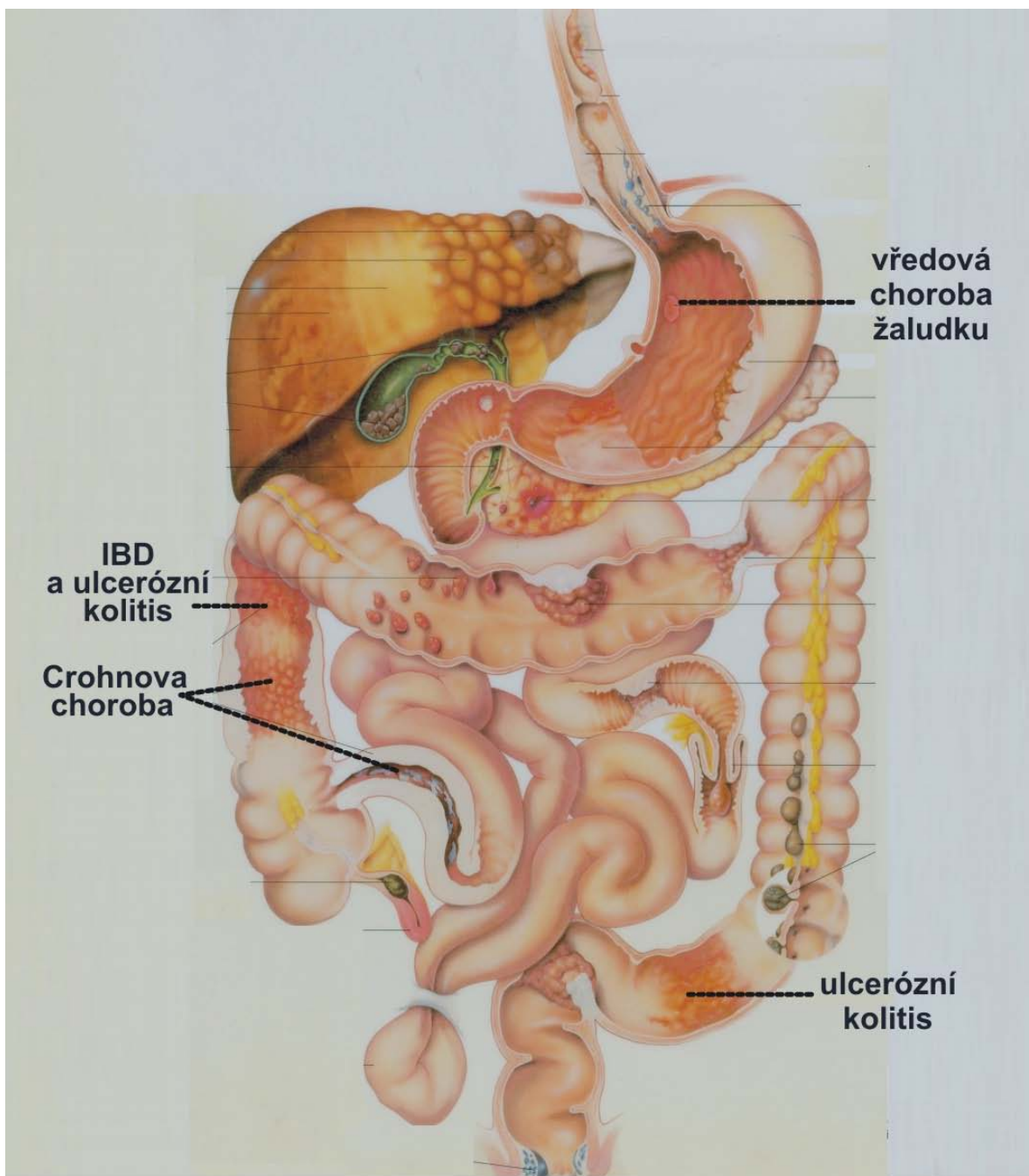
Průběh UC podle **periodicity** relapsů je rozdělován na **typ remitující** s relapsy častějšími než jednou ročně, **typ intermitující** s víceletými mezidobími. Trvá-li náraz déle než rok, imituje průběh **chronický**, druhým extrémem je průběh **perakutní**, s prudkým začátkem a rychlou progresí, často s fatálním zakončením. Mnohdy mají nemocní s UC bifázický roční průběh s relapsy na jaře a na podzim. Další charakteristikou UC je dlouhodobý vývoj, který může být :**1. progresivní**, nárazy se prodlužují, zhoršují a vyústí do stavu chronického nebo perakutního.

2. stacionární, choroba probíhá s pravidelnou periodicitou, **3. regresivní**, nemoc probíhá v postupně mírnějších nárazech (Lukáš K., 1997).

2.3.2 Crohnova nemoc

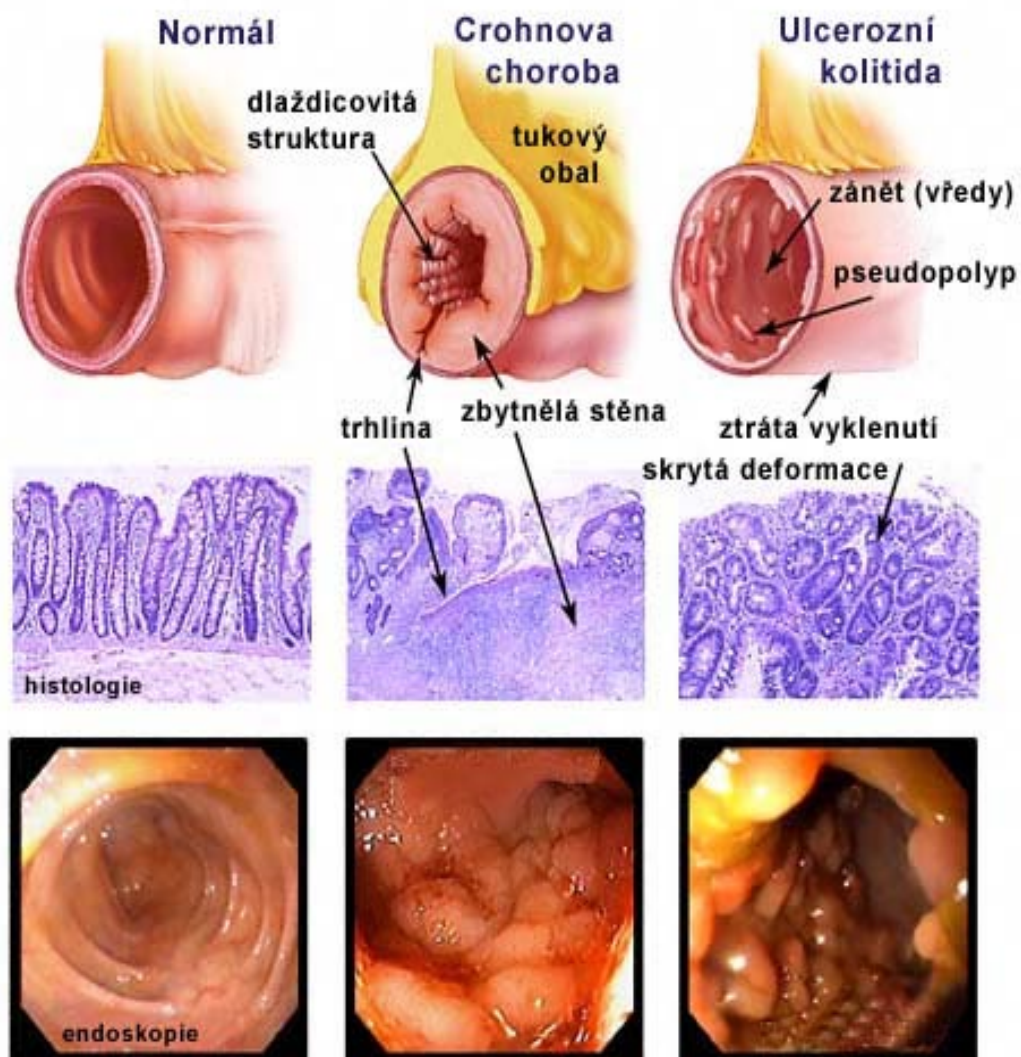
Stejně jako u UC, je nutné určení lokalizace a rozsahu zánětu i u CN. Z dalších charakteristik CN je to **vývoj nemoci**, který může být **progresivní** - aktivita se při léčbě neupravuje a tíže nemoci se zhoršuje. Nemoc je stabilizovaná na mírném stupni aktivity při relativně dobrém stavu při vývoji **stacionárním**. Při vývoji **regresivním** dochází k úpravě, nemoc přechází do stadia klidu nebo latence.

Hranice mezi aktivním onemocněním a remisí u CN je daleko problematičtější než u UC. Určení bodu remise je důležité, ale obtížné, protože u CN je obvykle velké množství manifestací a ložiska aktivity mohou „doutnat“ kdekoliv v zažívacím traktu. Zřejmě nejvýhodnější je stanovit aktivitu dle Crohn's Disease Activity Index (CDAI), který kalkuluje s numerickým skóre. Ale CDAI je kritizován pro svou komplikovanost a snadnou ovlivnitelnost, např. tělesnou vahou nebo počtem stolic. Za počátek remise je pokládán stav, kdy CDAI je nižší než 150. Za remisi je považován i stav, kdy je ukončena léčba kortikoidy, a takto lze také aktivitu Crohnovy nemoci hodnotit: **inaktivní onemocnění** – klinické a laboratorní parametry jsou normální bez léčby, **mírná aktivita** – vyžaduje udržovací dávku do 15 mg kortikoidů denně, **silná aktivita** – je zapotřebí vyšší dávky nebo nelze odchylky ani vysokými dávkami upravit (Lukáš K., 1997) .



Obrázek č. 1

www.prionord.cz/projects/colitiscrohn/product.asp



Obrázek č. 2

www.prionord.cz/projects/colitiscrohn/product.asp

Klinické projevy	Ulcerózní kolitida	Crohnova nemoc
Průjem	častý	Častý
Enteroragie	častá	může být
Bolesti břicha	mohou být	Časté
Palpační rezistence	nebývá	Častá
Píštěle	vzácné	Časté
Stenózy	jen nahodile	Časté
Postižení tenkého střeva	nebývá, de facto jen v rámci tzv. „backwash ileitis“	Časté
Postižení konečníku	časté, téměř pravidlem, min. v 95 %	Příležitostné až časté, v cca 50 %
Extraintestinální příznaky	mohou být	mohou být
Toxické megakolon	příležitostně	Vzácné
Rekurence onemocnění po kolektomii	nikdy	Příležitostná
Maligní zvrát u dlouhotrvajícího onemocnění	může být	Vzácný
Projevy malabsorpce	nebývají	Časté
Endoskopické a rtg nálezy		
Lokalizace změn	difúzní, postižení konečníku téměř vždy	regionální, postižení konečníku někdy
Šíření	kontinuální	diskontinuální
Počáteční stadium	slizniční cévní kresba	cévy jsou patrné, afty,
Onemocnění	vymizelá, sliznice hyperemická, fragilní	fokální zarudnutí
Stadium floridní	mnohočetné vředy, mapovité	fisury, na sliznici obraz „dlažebních kostek“ solitární vředy
Pozdní stadium	absence hauster, zánětlivé polypy, slizniční atrofie	deformace střevního lumen, stenózy, píštěle
Histopatologické nálezy		
Zánětlivé postižení	difúzní, submukózní	ložiskové, transmurální

Hyperémie	výrazná	Lehká
Edém	minimální	Výrazný
Lymfoidní hyperplazie	vzácně ve sliznici a submukóze	častá, transmurální
Kryptové abscesy	časté	Vzácné
Metaplazie Panetových bb.	častá	Možná
Přítomnost granulomů	nebyvá	Častá
Pohárkové bb.	výrazně redukované	Normální
Zánětlivé polypy	časté	méně časté

Tabulka č. 1

www.prionord.cz/projects/colitiscrohn/product.asp

2.4 Diagnostika IBD

Diagnóza onemocnění IBD je vždy založena na souhrnu anamnestických údajů, fyzikálního vyšetření, laboratorních, endoskopických, histologických a rentgenologických nálezů (*Gracey et al.*, 1993; *Mařatka*, 1988; *Lukáš M. a kol.*, 1998; *Walker et al.*, 1996).

2.4.1 Laboratorní vyšetření

U všech pacientů s IBD před stanovením diagnózy je základní podmínkou vyloučit střevní infekci. Limitovat onemocnění může *Salmonella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Yersinia*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Giardia lamblia*, *Histoplasma* a *Entamoeba histolytica*. Vyloučena musí být rovněž tuberkulóza. Na druhé straně, pacienti s UC mívají častější střevní infekce (*Matulka*, 2001).

Ke stanovení IBD se využívá celá řada laboratorních ukazatelů s cílem získat hodnoty, které by spolehlivě ukázaly na podezření na onemocnění IBD.

Mezi základní laboratorní parametry patří zejména **sedimentace erytrocytů**, jako spolehlivý ukazatel aktivity IBD. Nejcitlivější je u pacientů s UC, kde vysoká hodnota spolehlivě ukazuje na vysokou aktivitu zánětu. Naproti tomu, u nemocných s CN je velmi často její hodnota normální nebo mírně zvýšená i při vysoké aktivitě nemoci.

Krevní obraz a diferenciální počet bílých krvinek náleží mezi základní vyšetření. U pacientů s floridním zánětem se nachází leukocytóza s posunem doleva. Jinou typickou změnou je mikrocytární sideropenická anémie. Bývá následkem protrahovaného krvácení z postižené střevní sliznice. Dalším nálezem v krevním obraze je výrazná trombocytóza, častější u CN, kde může signalizovat tromboembolické komplikace. (*Gracey et al.*, 1993; *Issenmann*, 1997; *Lukáš M. a kol.*, 1998; *Mařatka*, 1988; *Walker et al.*, 1996).

Dalším testem je **stanovení proteinů akutní fáze zánětu**, především **CRP**, který je vhodný k monitorování účinnosti terapie IBD. Vyšších hodnot dosahuje u pacientů s CN než u UC. S aktivitou IBD nejlépe koreluje hladina **orosomukoidu**. **Albumin, prealbumin a ceruloplazmin** jsou vhodné k posouzení závažnosti choroby. Jejich koncentrace v průběhu aktivního zánětu

významně klesá. Hodnota albuminu je vhodná k hodnocení nutričního stavu pacienta (*Lukáš M. a kol., 1998*).

Imunologické známky zánětu ve fázi aktivity IBD se projevují zvýšením plazmatických hodnot **imunoglobulinů**. Nejvyšší hodnoty jsou nalézány v izotypu IgA, což je připisováno stimulaci slizniční imunity. Hodnoty ostatních imunoglobulinů mohou být naopak sniženy. V sérech pacientů prudce narůstá hladina **IL-6**, který je citlivější než CRP. Jiným serologickým markerem by mohl být **solubilní receptor pro IL-2 (sIL-2R)** rutinně se však ani jeden ze dvou posledně citovaných parametrů dosud nestanovuje. U pacientů s UC v akutní fázi dochází k prudkému zvýšení hodnot **prostagalndinu E2** a **leukotrienu B4** ve sliznici a obsahu střeva. Hodnoty korelují s aktivitou nemoci (*Lukáš M. a kol., 1998*). **Složky komplementu C3 a C4** jsou v tomto případě málo senzitivní a se zánětlivou reakcí korelují jen slabě (*Lukáš M. a kol., 1998*). Mezi dnes již běžně stanovované imunologické parametry asociované s IBD patří u pacientů s UC protilátky proti neutrofilům (**ANCA**) a u většiny nemocných s CN protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (**ASCA**) (*Israeli et al., 2005; Bossuyt, 2006; Vasiliasukas et al., 2000*).

2.5 Serologické markery nespecifických střevních zánětů

2.5.1 Protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*

ASCA(anti *Saccharomyces cerevisiae* antibody) jsou protilátky namířené proti manózovým zbytkům 200 kDa- fosfopeptidomannanu, složce buněčné stěny zejména pekařských a pivovarských kvasnic *Saccharomyces cerevisiae*. Manosa je nejen součástí buněčné stěny kvasnic, ale také mykobakterií a dalších mikroorganismů. Za hlavní epitopy jsou považovány manotetraosa nebo manotriosa. Protilátky ve třídě IgG a IgA tvořené proti manose jsou detekovány pomocí testu ELISA. ASCA se častěji vyskytuje u pacientů s CN (50-80%) oproti pacientům s UC (2-14%). Pro srovnání u zdravých osob je to (1-7%) . Přibližně 2/3 pacientů s UC jsou pozitivní jak na ASCA IgG, tak i IgA. Zbývající část pacientů tvoří pouze ASCA IgA protilátky (*Papp et al., 2007*) .Obecně je vyšší titr protilátek ASCA spojen s časnějším rozvojem onemocnění, s postižením tenkého střeva, s perforující a vazivově-stenozující, agresivní formou onemocnění a časnějším chirurgickým zákrokem (*Pintér a kol., 2007; Forcione et al., 2004*) .

2.5.2 Protilátky proti složkám cytoplazmatických granulí neutrofilních granulocytů

Autoprotilátky namířené proti složkám cytoplazmatických granulí neutrofilních granulocytů byly popsány před zhruba 16 lety. Od té doby se stanovení tzv. protilátek ANCA (Antibodies against Neutrophil Cytoplasmatic Antigens) našlo své pevné místo v diagnostice některých autoimunitních imunopatologických nemocí. (*Krejsek a kol., 2004; Bradwell et al., 1999 ; Conrad et al., 5-2007; Conrad et al., 2007; Peyrin-Biroulet et al., 2007*). ANCA byly poprvé popsány v roce 1982 a jejich přítomnost byla dáována jen do vztahu s Wegenerovou granulomatózou a některými typy vaskulitid. Od roku 1983 je nález těchto protilátek opakovaně popisován u UC a u menšího počtu jedinců s CN, sklerotizující cholangitidy a dalších onemocnění.

Jsou známy 4 podtypy:

- cANCA(cytoplazmatická)
- pANCA (perinukleární)
- atypická ANCA
- GS-ANA (protilátky proti jádru neutrofilů)

(*Bradwell et al.*, 1999 ; *Conrad et al.*, 5-2007; *Conrad et al.*, 2007; *Peyrin-Biroulet et al.*, 2007).

pANCA - perinukleární typ těchto protilátek je namířen proti určité komponentě cytoplazmy neutrofilních granulocytů. Nejčastěji je cílovým antigenem enzym myeloperoxidáza (MPO), na rozdíl od protilátek cANCA, typických pro Wegenerovu granulomatózu, kdy tyto protilátky jsou nalézány v cytoplasmě difúzně - cílovým antigenem je ve většině těchto případů enzym proteináza 3 (PR-3). K průkazu těchto podtypů se využívá metody nepřímé imunofluorescence. Jako substrát slouží etanolem fixované neutrofilní granulocyty periferní krve. Jednotlivé složky cytoplazmatických granúl se během etanolové fixace redistribuují v cytoplasmě, zvláště v závislosti na elektrickém náboji. Silně kationické proteiny, především myeloperoxidáza, se akumulují okolo jádra granulocytu. Autoprotilátky, které reagují s myeloperoxidázou, potom vytvářejí tzv. perinukleární vzor. Naopak, slabě kationické nebo neutrální proteiny, především proteináza-3, zůstávají rovnoměrně distribuovány v cytoplasmě. Protilátky ANCA namířené proti těmto antigenům vytváří zrnitý cytoplazmatický typ fluorescence.

Perinukleární ANCA protilátky jsou považovány za genetické markery vloh pro UC nebo sklerózující cholangitidu. Pacienti s UC a autoimunitní hepatitidou typu 1 mají autoprotilátky třídy IgG1 pANCA, kdežto většina pacientů se sklerózující cholangitidou vytváří typy pANCA IgG1 a IgG3.

Cílovým antigenem pro pANCA je u nemocných s IBD nejspíše myeloperoxidáza. Imunochemické postupy, které umožnily přesně definovat molekulové terče pANCA a cANCA, ukázaly, že kromě základních antigenů proteinázy-3 a myeloperoxidázy, protilátky ANCA reagují i s dalšími složkami cytoplazmatických granúl neutrofilů. Jsou to především elastáza, katepsin G, azurocidin, laktoferin, BPI a lysozym. Autoprotilátky proti všem těmto uvedeným terčům reagují většinou pod obrazem pANCA. Protilátky namířené

proti proteinu BPI vytvářejí vzor p i cANCA. Je však třeba poznamenat, že u řady onemocnění a mnohých nemocných se zatím nepodařilo přesně definovat molekulové terče pro protilátky ANCA (atypické ANCA). GS-ANA (protilátky proti jádru neutrofilů) jsou zahrnovány mezi ANCA. Cílovým antigenem je pravděpodobně lamin jádra neutrofilů. *Papp et al., 2007* prokázala vyšší výskyt tzv atypických ANCA protilátek ve spojení s diagnózou UC.

Klinický význam pANCA protilátek u pacientů s UC není zcela zřejmý, ale bývá užitečný v diferenciální diagnostice mezi UC a CN. Jejich nález nekoreluje s aktivitou, rozsahem, ani délkou trvání nemoci (*Krejsek a kol., 2004; Matulka, 2001; Papp et al., 2007; Castro-Santos et al., 2007; Fleshner et al., 2001; Vasiliauskas et al., 2000; Nevoral a kol., 2003*).

2.5.3 Nově objevené serologické markery

V nedávné době byly objeveny nové serologické markery-protilátky proti glykanům, které můžou být spojovány s IBD, zejména s CN (*Dotan N. et al., 2006; Ferrante et al., 2007; Dotan I. et al., 2006; Ferrante et al., 2007*). Nejvyšší rozlišující schopnost mezi CN a UC je uváděna u :

- Anti – Laminaribioside Carbohydrate antigens (ALCA)
- Anti- Chitobioside Carbohydrate antigens (ACCA)
- Anti- Mannobioside Carbohydrate antigens (AMCA).

Laminaribiosid, chitobiosid, mannobiosid představují hlavní struktury v glykokalyxu patogenetických kvasnic a bakterií.

Laminariobiosid je stavební jednotkou laminarinu, který je nalézán v buněčné stěně saprofytů, patogenetických hub a kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*), stejně jako v ovsu a řasách.

Chitobiosid je komponenta chitinu, což je polysacharid , složený z molekul N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny do diméru 1,4- β -glykosidickou vazbou. Chitin je hlavní složkou exoskeletu členovců (např. krabů, raků, hmyzu). Je také součástí buněčné stěny hub.

Mannobiosid je složka mananu vyskytujícího se u patogenetických hub a kvasnic (*Dotan N. et al., 2006; Dotan, 2007; Dotan I. et al., 2006; Ferrante et al., 2007*).

Laminariobiosid, Chitobiosid a Mannobiosid nelze řadit mezi humánní autoantigeny. Manan, glukany a chitin se mohou vázat na specifické receptory neutrofilů, makrofágů a NK buněk. Následkem této vazby je stimulace buněčné proliferace, fagocytóza a sekrece cytokinů (*Dotan N. et al.*, 2006).

Kombinace těchto markerů spolu s ASCA přispívá k upřesnění nebo stanovení diagnózy IBD (*Douglas*, 2006; *Dotan N.* , 2007, *Glycominds*, 2006). Pozitivní protilátky ALCA a ACCA mohou být přítomny až u 44% pacientů s CN ASCA negativních. Dosavadní zahraniční studie ukazují, že tyto protilátky proti glykanům by mohly být hodnotné nejen pro diagnostiku, ale také pro předpověď komplikací spolu s těžkým průběhem nemoci (*Dotan N. et al.*, 2006). Vysoké hodnoty gASCA, ALCA, ACCA, AMCA protilátek mají na svědomí komplikace u pacientů postižených CN. U těchto pacientů je také zvýšená četnost operačních zákroků (*Ferrante et al.* , 2007).

3. Experimentální část

3.1 Charakteristika souboru

Vyšetřovaný soubor obsahoval séra 122 osob, které byli v dispenzární péči Interní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, s diagnózou ulcerózní kolitidy nebo Crohnovy choroby. (61 žen, 61 mužů, průměrný věk činil 39 let). Kontrolní soubor tvořila séra zdravých osob, pocházejících z řad dárců krve (17 žen, 15 mužů, průměrný věk činil 41,5 let) Transfúzního oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

3.2 Použité metody

3.2.1 Stanovení protilátek proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA)

Princip metody: nepřímá imunofluorescence

Pufrem (PBS) ředěné sérum pacienta (20x) se nanese na mikroskopické sklo s nafixovaným nátěrem lidských granulocytů. Fixace pro screeningové vyšetření se provádí pomocí etanolu. V případě, že jsou v séru přítomné specifické protilátky proti komponentám primárních granul v cytoplazmě neutrofilů, utvoří se komplex antigen-protilátka. Tento komplex je detekován pomocí fluoresceinem značeného antihumánního imunoglobulinu. Prohlížíme fluorescenčním mikroskopem. (zvětšení 400x). Pokud byly v séru přítomny protilátky, objeví se zelená fluorescence cytoplazmy.

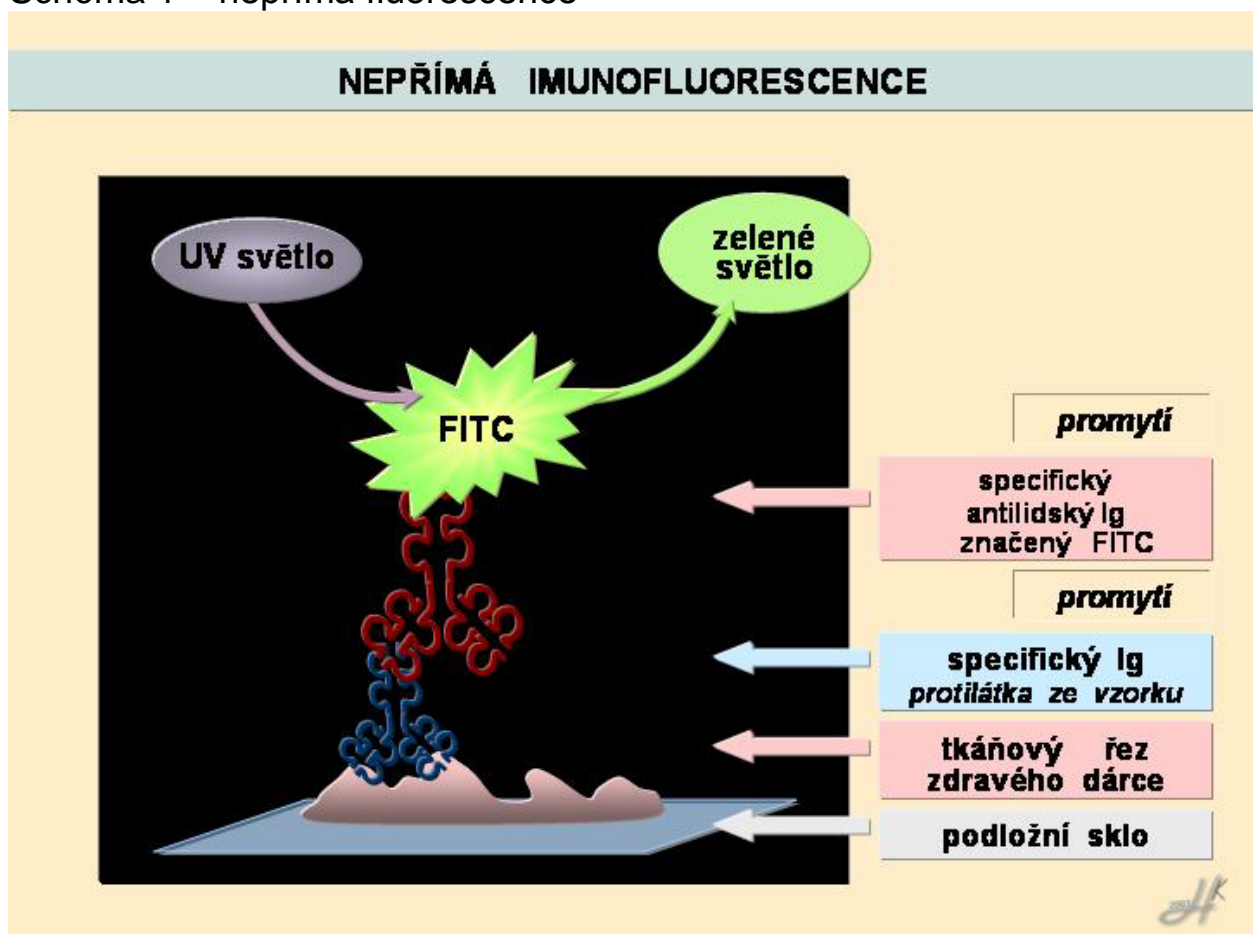
Pracovní postup:

1. Sklíčka s nafixovanými granulocyty necháme temperovat zabalené v originálním aluminiovém obalu asi 30 minut při pokojové teplotě.
2. Vyšetřovaná séra naředíme PBS 1:20 .
3. Sklíčka vyjmeme z fólie a nakapeme na ně 0,050 ml naředěného vyšetřovaného séra, pozitivní kontroly, a kontrolu negativní.
4. Inkubace 30 minut při pokojové teplotě. Ze skla opatrně odsajeme pomocí filtračního papíru zbytek séra.

5. Promýváme v kyvetách 4krát 5 minut, vždy s čerstvým PBS. Odsajeme zbytky PBS, nakapeme 0,050 ml konjugátu a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě.
6. Odsajeme zbytky konjugátu, promýváme v kyvetách 4 krát 5 minut, vždy v čerstvém PBS.
7. Barvíme 5 minut v kyvetě 1% roztokem Evansovy modře.
8. Promýváme v kyvetách 2krát 5 minut vždy s čerstvým PBS. Odstraníme zbytky PBS, kápneme malou kapku montovacího média a překryjeme krycím sklem.
9. Prohlížíme pomocí imunofluorescenčního mikroskopu. Hodnotíme intenzitu a typ fluorescence (perinukleární, cytoplazmatická)

Prováděno pomocí soupravy firmy Binding Site (Immunotech) (*Krejsek a kol., 2004; Bartůrková a kol., 2005; Výukový CD-ROM pro SZŠ*).

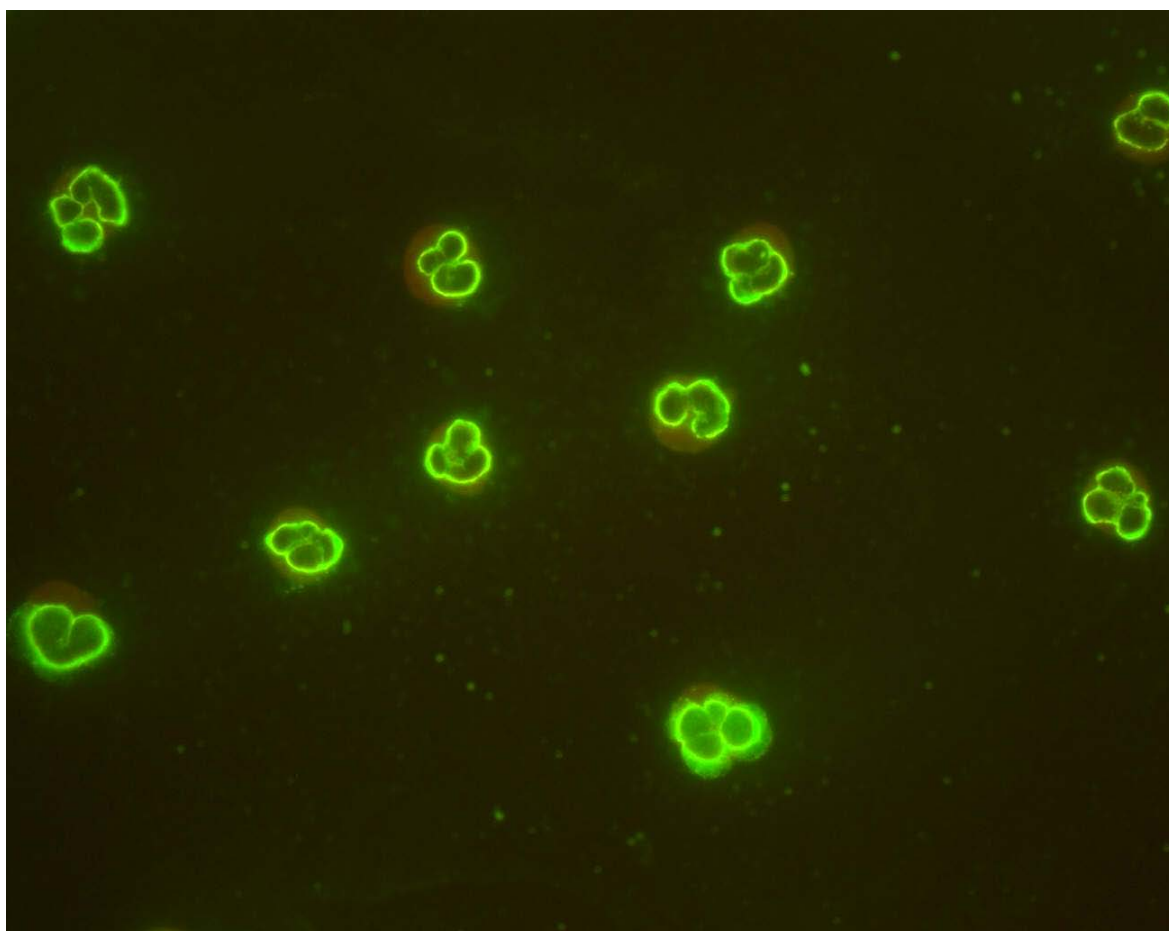
Schéma 1 – nepřímá fluorescence



Obrázek 4

pANCA

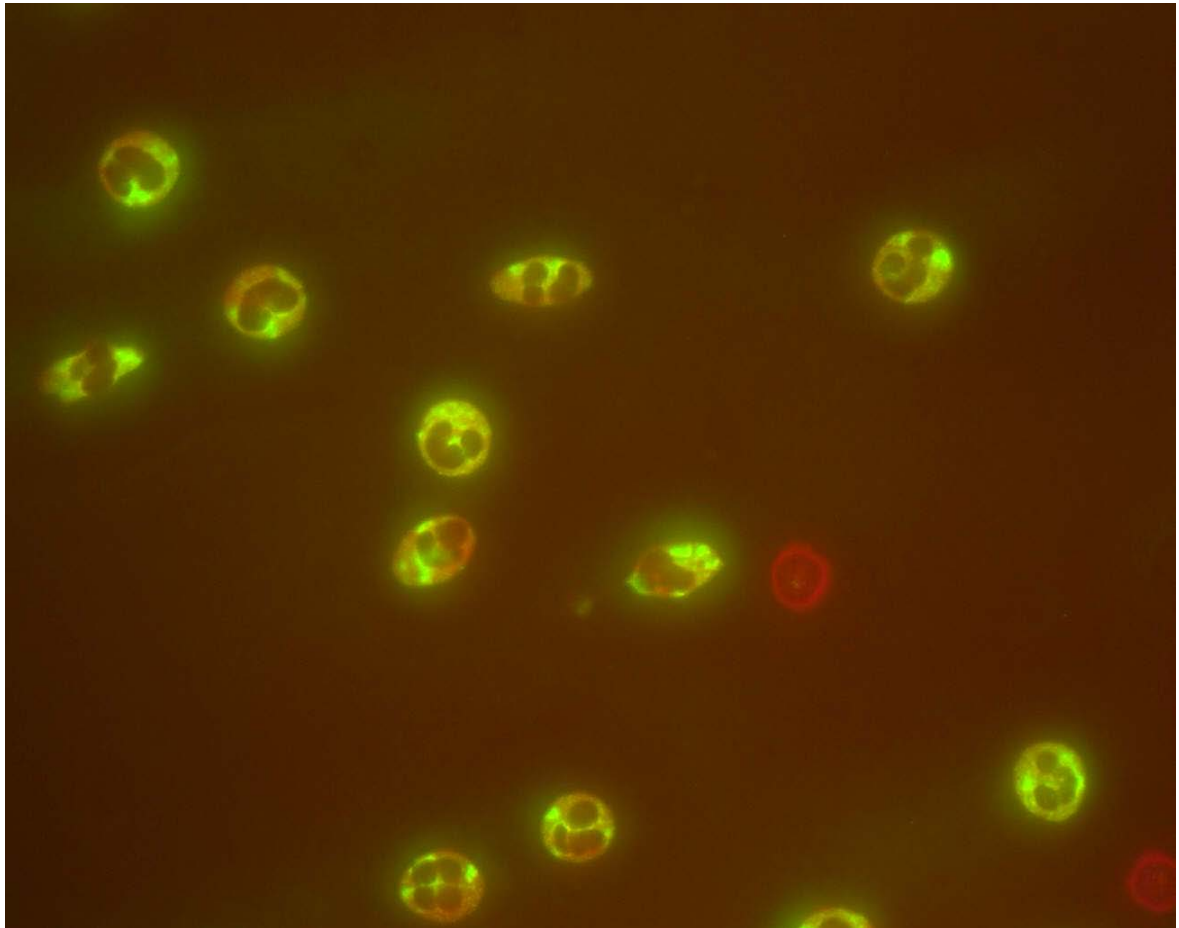
Protilátky MPO (perinukleární fluorescence) na lidských neutrofilech



Obrázek 5

cANCA

Protilátky PR-3 (cytoplazmatická fluorescence) na lidských neutrofilech



3.2.2 Stanovení protilátek proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)

Princip metody: ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Na dně jamek mirotitrační destičky je pevně naadsorbován antigen, kterým je vysoce purifikovaný manan. Přidáním zředěného séra pacienta do jamky dojde k navázání IgG, resp. IgA protilátek (jsou-li přítomny) na antigen. Do pečlivě vymyté jamky od zbytků séra přidáme konjugát, což je anti- IgG, resp. IgA monoklonální protilátka konjugovaná s enzymem peroxidázou, která se specificky naváže na v předchozím stupni na antigenu zachycené protilátky. Po promytí přidáme substrát (TMB), který po rozložení enzymem způsobí vznik zbarvení imunokomplexu v jamce. Měříme spektrofotometricky intenzitu zbarvení výsledného produktu. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanovených protilátek.

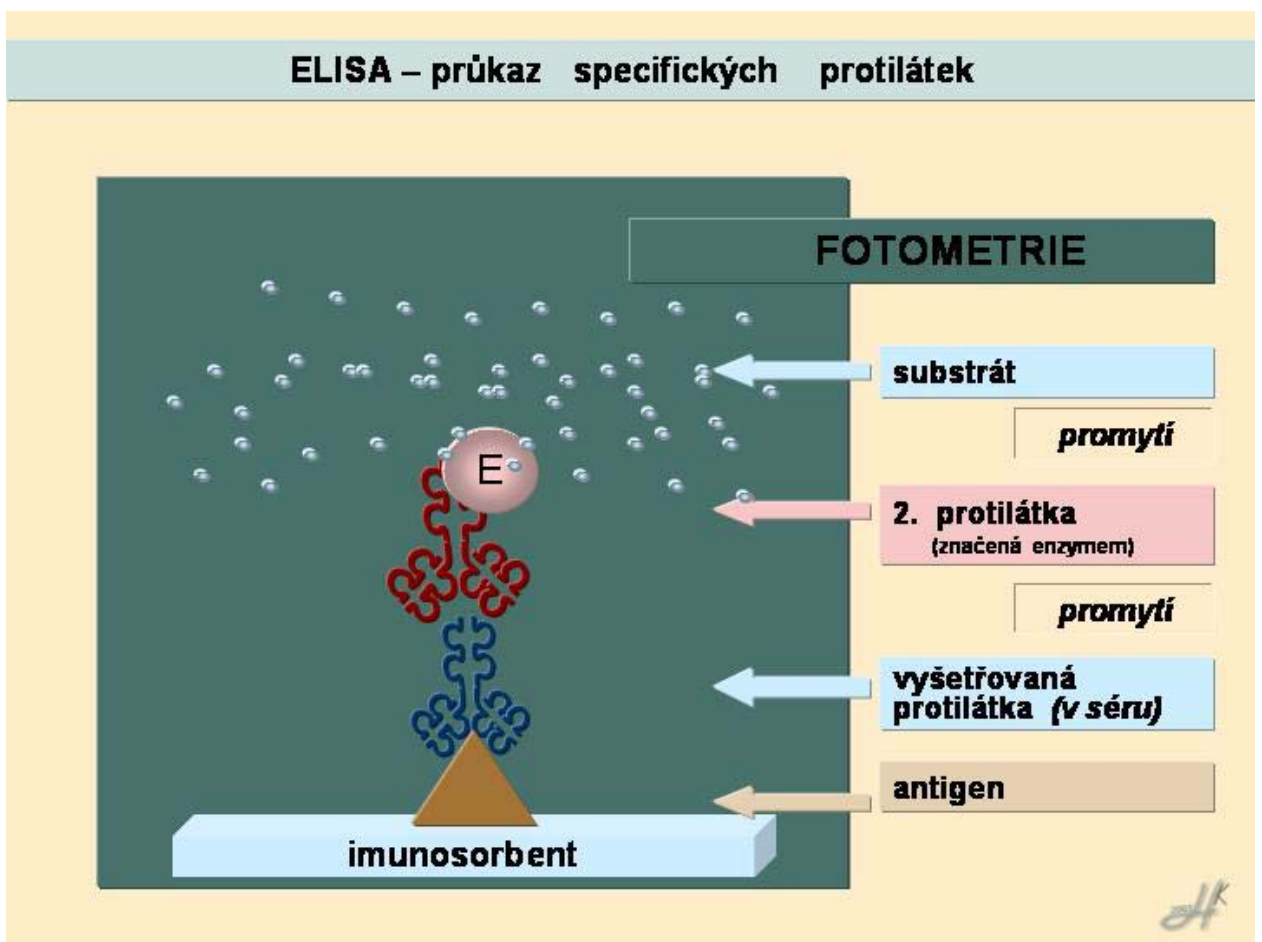
Pracovní postup:

1. Celou soupravu necháme asi 30 minut při pokojové teplotě.
2. Naředíme všechna testovaná séra ředícím roztokem v poměru 1:100 (například 5 μ l séra v 495 μ l ředícího roztoku).
3. Napipetujeme 100 μ l ~~každého~~ z každého ze šesti přítomných standardů do šesti námi zvolených jamek. Do ostatních jamek nepipetujeme 100 naředěných sér, pozitivní, hraniční a negativní kontrolu.
4. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě (18-20 °C).
5. Promyjeme jamky promývacím pufrem (nejméně třikrát).
6. Do každé jamky nepipetujeme 100 μ l konjugátu.
7. Inkubujeme 15 minut při pokojové teplotě.
8. Opakujeme promývání stejným způsobem jako v kroku 5.
9. Do každé jamky nepipetujeme 100 μ l roztoku substrátu.
10. Inkubujeme 15 minut při pokojové teplotě v temnu.
11. Přidáme do každé jamky 100 μ l stopovacího roztoku (dojde k zastavení reakce).
12. Na spektrofotometru změříme absorbanci při 450 nm. (optimální je měření

při 450/620 nm) během 30 minut.

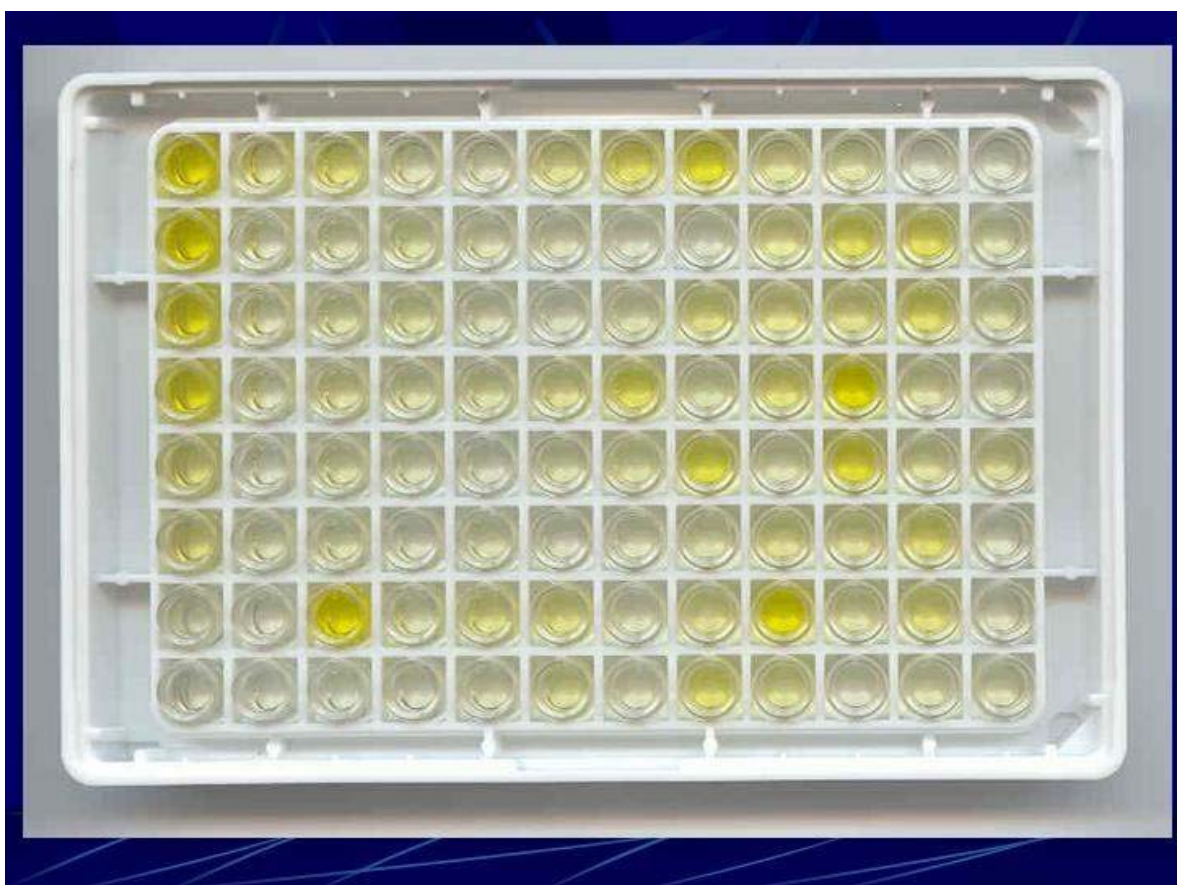
Provedeno soupravou AESKULISA ASCA-G, AESKULISA ASCA-M, firmy AESKU.DIAGNOSTICS, Německo. (Krejsek a kol., 2004; Bartůňková a kol., 2005; Výukový CD-ROM pro SZŠ).

Schéma 2 - ELISA



Obrázek 6

Sendvičová ELISA-průkaz protilátek proti antigenům cytoplazmy neutrofilů



3.2.3 Stanovení protilátek proti antigenu *Laminaribioside Carbohydrate (ALCA)*

Princip metody: ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Na dně jamky mikrotitrační destičky je pevně naadsorbován antigen, kterým je antigen *Laminaribioside*. Přidáním zředěného séra pacienta do jamky dojde k navázání IgG protilátek (jsou-li přítomny) na antigen. Do pečlivě vymyté jamky od zbytků séra přidáme konjugát, což je anti- IgG monoklonální protilátka konjugovaná s enzymem peroxidázou, která se specificky naváže na v předchozím stupni na antigenu zachycené protilátky. Po promytí přidáme substrát (TMB), který po rozložení enzymem způsobí vznik zbarvení imunokomplexu v jamce. Měříme spektrofotometricky intenzitu zbarvení výsledného produktu. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanovených protilátek.

Pracovní postup:

1. Celou soupravu necháme asi 30 minut při pokojové teplotě.
2. Naředíme všechna testovaná séra ředícím roztokem v poměru 1:100 (například 5 μ l séra v 495 μ l ředícího roztoku).
3. Napipetujeme 50 μ l ředěných sér, pozitivní a negativní kontrolu a kalibrátor.
4. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě (18-20 °C).
5. Promyjeme jamky promývacím pufrem (nejméně třikrát).
6. Do každé jamky nepipetujeme 100 μ l konjugátu.
7. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě.
8. Opakujeme promývání stejným způsobem jako v kroku 5.
9. Do každé jamky nepipetujeme 100 μ l roztoku substrátu.
10. Inkubujeme 15 minut při pokojové teplotě.
11. Přidáme do každé jamky 100 μ l stopovacího roztoku (dojde k zastavení reakce).
12. Na spektrofotometru změříme absorbanci při 450 nm.

Provedeno soupravou IBDX ALCA IgG ELISA Kit firmy GLYCOMINDS.

(Krejsek a kol., 2004; Bartůňková a kol., 2005; Výukový CD-ROM pro SZŠ).

3.2.4. Stanovení protilátek proti antigenu *Chitobioside Carbohydrate* (ACCA)

Princip metody: ELISA

Na dně jamek mikrotitrační destičky je pevně naadsorbován antigen, kterým je antigen *Chitobioside*. Přidáním zředěného séra pacienta do jamky dojde k navázání IgA protilátek (jsou-li přítomny) na antigen. Do pečlivě vymyté jamky od zbytků séra přidáme konjugát, což je anti- IgA monoklonální protilátka konjugovaná s enzymem peroxidázou, která se specificky naváže na v předchozím stupni na antigenu zachycené protilátky. Po promytí přidáme substrát (TMB), který po rozložení enzymem způsobí vznik zbarvení imunokomplexu v jamce. Měříme spektrofotometricky intenzitu zbarvení výsledného produktu. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanovených protilátek.

Pracovní postup:

1. Celou soupravu necháme asi 30 minut při pokojové teplotě.
2. Naředíme všechna testovaná séra ředícím roztokem v poměru 1:100 (například 5 μ l séra v 495 μ l ředícího roztoku).
3. Napipetujeme 50 μ l ředěných sér, pozitivní a negativní kontrolu a kalibrátor.
4. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě (18-20 °C).
5. Promyjeme jamky promývacím pufrem (nejméně třikrát).
6. Do každé jamky nepipetujeme 100 μ l konjugátu.
7. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě.
8. Opakujeme promývání stejným způsobem jako v kroku 5.
9. Do každé jamky nepipetujeme 100 μ l roztoku substrátu.
10. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě.

11. Přidáme do každé jamky 100 μ l stopovacího roztoku (dojde k zastavení reakce).
12. Na spektrofotometru změříme absorbanci při 450 nm.

Provedeno soupravou firmy IBDX ACCA IgA ELISA Kit firmy GLYCOMINDS. (*Krejsek a kol.*, 2004; *Bartůňková a kol.*, 2005; *Výukový CD-ROM pro SZŠ*).

4. VÝSLEDKY

Výsledky jsou uspořádány v tabulkách a grafech.

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí software MedCalc.

Základní statistika: pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu byla testována normalita rozložení hodnot sledovaných parametrů. Základní charakteristikou je aritmetický průměr nebo medián a směrodatné odchytky.

Testovací statistika: pro porovnání souborů byl použit t-test nebo neparametrický Wilcoxonův test. K závěrečnému zhodnocení senzitivity a specifity jednotlivých parametrů vzhledem k diagnózám CN a UC jsme použili ROC analýzu (program MedCalc)

ROC-analýza: (Receiver operating characteristic plot).

Grafické vyhodnocení diskriminačních schopností funkcí nebo veličin (např. používaných diagnostických testů). Sestrojuje se vynesemím hodnot klinické citlivosti (osa y) proti hodnotám klinické nespecifičnosti (osa x) pro všechny rozhodovací úrovně. ROC křivky poskytují hodnoty klinické senzitivity a specifity, pozitivních a negativních prediktivních hodnot a klinické věrohodnosti (Likelihood ratio-LR). Hodnota plochy pod křivkou (AUC) kvantifikuje diagnostickou správnost zkoušky. ROC analýza dovoluje optimalizovat hodnoty rozhodujících úrovní pro zvolený účel (dosažení vyšší citlivosti nebo specifity nebo optimální kombinace obou) (*Metrologická terminologie v analytické laboratoři*).

Výsledky provedených analýz

Pohlaví	věk	typ onemocnění	ALCA	ACCA	ANCA	ASCA G U/ml	ASCA U/ml
muž	70	CN	107,7	40,4	0	91,9	21,7
m	70	CN	18,4	21,5	0	14,1	35,6
m	62	CN	43,4	14,1	0	16,5	32,5
m	61	CN	22,8	44,8	1++p	0,9	2,5
m	59	CN	69,7	36,1	0	14,5	7,7
m	59	CN	54,8	28,4	0	79,5	14
m	56	CN	19,7	128	0	20,25	43,3
m	55	CN	31	49,6	0	125,5	1600
m	54	CN	69,1	54,6	0	15,15	35,5
m	52	CN	83,2	58,2	0	639,4	106
m	49	CN	11,3	28,1	0	3,75	20,2
m	49	CN	56,4	56,6	0	12	20,1
m	49	CN	51,7	16,8	0	1,5	18,3
m	46	CN	16,6	36,5	0	16,5	52,6
m	45	CN	6,4	19,4	0	4,6	18,7
m	45	CN	98	37,3	0	4,95	19,6
m	40	CN	27,2	72,5	1++p	12,75	13,7
m	39	CN	39,5	41,3	0	196,5	302,5
m	39	CN	26,9	52,9	0	14,9	1,7
m	38	CN	58,7	106,7	0	107,4	1830
m	37	CN	34	24	0	11,1	21
m	36	CN	56,9	38,3	0	21	2,3
m	35	CN	28,8	13,6	0	119,2	29,6
m	35	CN	44,3	26,8	0	191,3	126,7
m	34	CN	64	57,3	0	277,2	118,5
m	33	CN	65,2	76,2	0	53,8	3848,1
m	32	CN	31,9	38,5	0	3	25,5
m	32	CN	68,2	12,6	0	1,5	0,6
m	32	CN	78,4	47,9	0	27	213,1
m	30	CN	15,2	18,1	0	8,1	6,4
m	30	CN	26	16,9	0	17,7	17,2
m	30	CN	6,4	24,3	0	3	0,4
m	30	CN	135,3	9,4	0	13,5	17,3

m	29	CN	22,1	10,4	0	21,6	7,6
m	28	CN	100,6	23,4	0	14,7	21,2
m	28	CN	97,8	48,9	0	19,35	91
m	28	CN	20,4	23,8	0	1,8	5,3
m	27	CN	78,6	30,9	0	21,3	45
m	27	CN	20,2	30,1	0	15,6	23
m	27	CN	19,5	5	0	88,7	10,8
m	26	CN	23,9	16,6	0	11,25	42,5
m	23	CN	63,3	47,8	0	29,55	109,1
m	20	CN	58,8	84,2	0	10,35	24,4
m	20	CN	39,4	66,5	0	34,5	126,7
m	19	CN	61,9	47,1	0	99,6	1860
žena	71	CN	36,8	56,5	0	1,5	6,5
ž	65	CN	6,1	18,8	0	0,4	17,3
ž	62	CN	75,7	39,2	0	67,8	72,9
ž	61	CN	148,8	113,2	0	147,7	1000
ž	61	CN	26	17,6	0	16,5	373,5
ž	53	CN	12,6	40,6	0	1,5	23,6
ž	47	CN	11,7	42,4	0	3,45	10,2
ž	45	CN	105,1	10,6	0	0,4	3,8
ž	44	CN	36,5	32,2	0	47,2	25,1
ž	44	CN	45,3	34,5	0	4,5	29
ž	44	CN	34,7	45,1	1	222,6	301,3
ž	42	CN	25,8	48,5	0	6	4,8
ž	42	CN	27,2	14,8	0	130,5	69,8
ž	41	CN	42,6	90,8	0	7	56,9
ž	41	CN	34,5	17,5	0	4,05	6,7
ž	41	CN	57,5	30,1	0	65,6	9808,4
ž	40	CN	24,7	38,5	0	22,2	9,1
ž	39	CN	56	97,1	0	11,4	27,3
ž	38	CN	28,2	69,3	1++p	16,35	29,3
ž	38	CN	16,5	110,8	0	5,7	5,8
ž	37	CN	33,9	29,1	0	8,7	150
ž	36	CN	65,4	113,2	0	44,85	1889,7
ž	36	CN	50,7	99,7	0	2,9	19,5
ž	36	CN	51,2	59,3	0	15	22,8
ž	35	CN	74,6	79,8	0	31,3	114,3

ž	34	CN	26	71,6	0	4,7	16,1
ž	31	CN	48,2	63,9	0	55,9	667,7
ž	31	CN	17,5	56	0	1,53	34,4
ž	31	CN	35,7	28	0	10,05	13
ž	31	CN	51,2	59,3	0	8,4	17
ž	31	CN	13,3	45	0	89,2	3974
ž	30	CN	79,9	61,1	0	590,4	1000
ž	30	CN	37,1	29,4	0	151,9	149
ž	28	CN	20	27,4	1++p	9	3
ž	27	CN	23	12,5	1	1,04	12,1
ž	27	CN	40,9	16,8	1	17,4	22
ž	26	CN	17,3	26,6	0	40,7	33,2
ž	26	CN	28,7	37,4	0	31,5	31,5
ž	25	CN	50	16,2	0	3,5	5
ž	24	CN	71,9	35,3	0	42	35,5
ž	22	CN	21	14,2	0	46,95	20,6
ž	22	CN	42,9	16,4	0	11,9	3,6
ž	21	CN	69,9	37,5	0	103,9	1165,5
ž	20	CN	21,9	35,4	0	55,65	556,7
muž	64	UC	27,3	23,8	1	14,1	6,5
m	61	UC	18,5	25	0	1,35	2,4
m	50	UC	19,7	18,9	0	9,45	11
m	50	UC	25,9	97,2	1	4,35	8
m	49	UC	49,4	379	0	9,15	10
m	44	UC	21,6	75,3	1++p	5,55	12
m	36	UC	31,3	20,6	0	11,1	13,1
m	34	UC	14,3	10,5	0	1,05	2,2
m	32	UC	32,1	44,2	0	10,5	9
m	32	UC	10,9	26,8	0	8,1	15,4
m	31	UC	13,7	28,9	0	7,2	4,3
m	30	UC	18,7	15,7	1	12,15	1,2
m	28	UC	38	14,8	0	13,5	29
m	24	UC	30,7	25	1	9,5	5,5
m	24	UC	22,2	10,4	1	4,5	5
m	18	UC	13,2	20,5	0	3,9	1,8
žena	71	UC	77,6	20,3	1	3	0,2
ž	60	UC	14,3	8,4	1	18,5	1,3

ž	59	UC	11,8	13,2	0	3,9	1
ž	58	UC	11,1	28,7	0	9,8	9
ž	57	UC	13,2	38,1	1++p	0,9	2,8
ž	57	UC	19,5	21,4	0	1,2	5,3
ž	50	UC	9,3	15,4	1	4,5	3
ž	45	UC	45,3	25,1	0	1,5	4
ž	39	UC	41,7	17,1	1	1,65	6,7
ž	37	UC	44,5	36,2	1++p	12	44
ž	34	UC	33,5	19,8	1	65,9	16,8
ž	31	UC	36,6	22,3	1++p	7,8	7
ž	29	UC	67,8	37,9	1	6,3	9,4
ž	29	UC	16,4	39,2	1	1,05	2,9
ž	26	UC	38,2	59,4	1 at	2,55	13,6
ž	20	UC	29,6	13,6	0	3	6,7
ž	19	UC	56,2	54,5	1 text	1,65	4,8

	věk						
muž	28	Kontrola	56,6	183,1	0	1,95	18,8
m	33	K	32,5	23,2	0	11,25	4,4
m	33	K	58,9	26,6	0	0,15	2,1
m	38	K	43,6	20,3	0	2,7	4,5
m	40	K	51,6	46,5	0	0,15	1,1
m	43	K	39,5	59,4	0	0,75	7,3
m	43	K	12,8	47,4	0	2,25	4,2
m	44	K	22,5	39	0	1,5	7,3
m	46	K	46	27,6	0	1,05	2,7
m	46	K	9,3	27,7	0	4,8	2,2
m	48	K	42,5	29,8	0	0,15	1,8
m	50	K	21,2	88,5	0	2,4	7,8
m	51	K	31,75	43,7	0	1,95	3,2
m	52	K	51,3	39,6	0	0,6	1,7
m	56	K	29,2	37,1	0	9,3	2,7
žena	28	K	37,1	17,6	0	1,5	4,5
ž	28	K	20,6	16,6	0	6,15	6,3
ž	29	K	58,6	60,8	0	0,9	4,4
ž	30	K	44,1	20,2	0	3,3	3,2
ž	32	K	40,8	32,2	0	0,6	1
ž	35	K	52,6	29,2	0	1,35	2

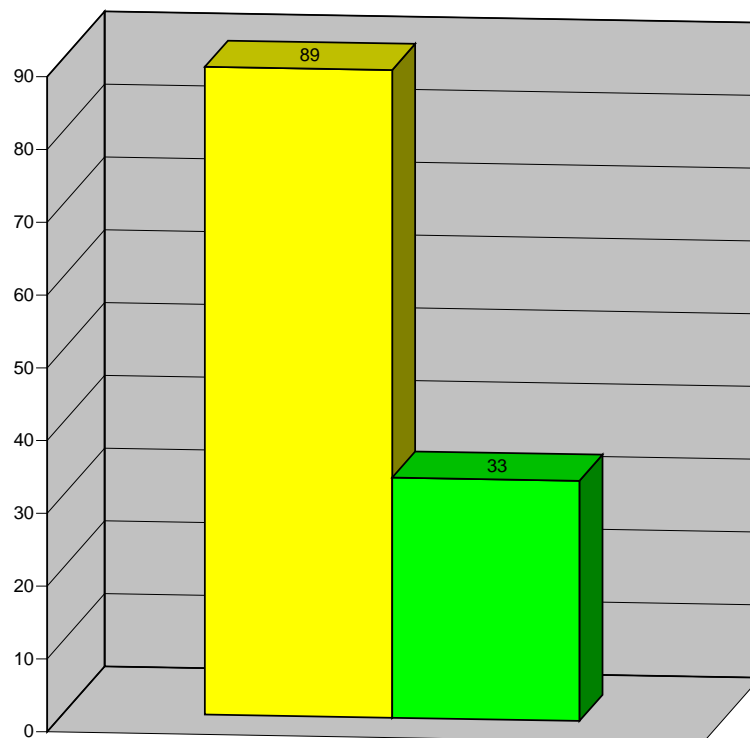
ž	36	K	21,5	29,5	0	0,45	4,4
ž	36	K	44,4	25,4	0	1,35	8,7
ž	36	K	49,5	4,6	0	1,05	2,8
ž	42	K	49,8	65,2	0	1,2	3,3
ž	43	K	6,5	34	0	2,55	1,7
ž	44	K	52,9	40,5	0	2,7	3,4
ž	46	K	46,6	25,4	0	18,45	1,4
ž	47	K	46,7	25,8	0	0,45	1
ž	55	K	18,8	28,9	0	14,7	10,9
ž	55	K	32,1	35	0	0,15	0,9
ž	59	K	23,5	77	0	5,4	3,6

Tab.1: Hodnoty vyšetřovaných parametrů

Dané markery jsou pozitivní pokud :

- ALCA >60 EU/ml
- ACCA >90 EU/ml
- ASCA G >15 U/ml
- ASCA A >15 U/ml

Počet vyšetřovaných pacientů v souboru dle diagnózy

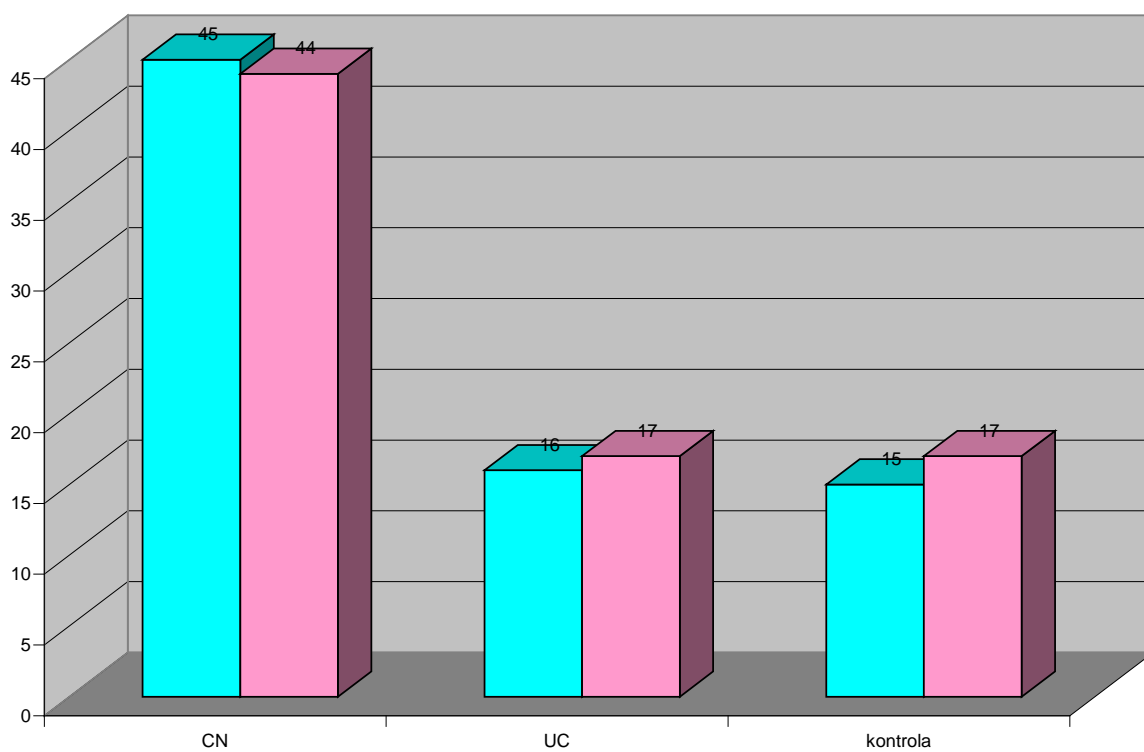


Počet vyšetřovaných pacientů v souboru dle diagnózy

CN	89
UC	33

Graf 1

Poměr mužů a žen

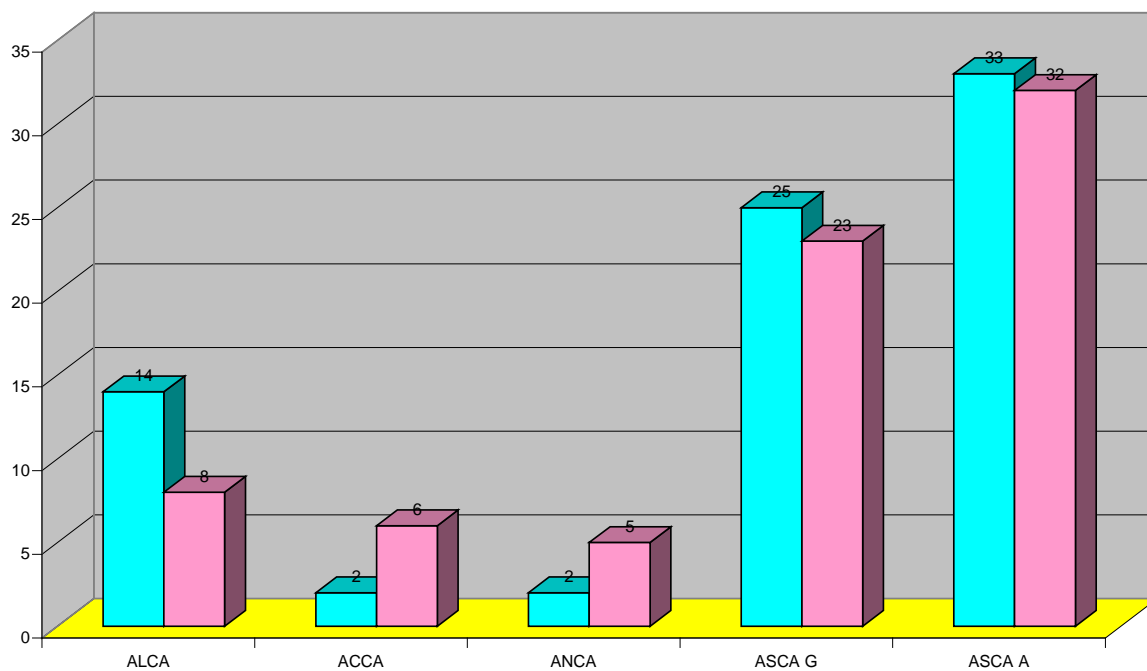


Poměr mužů a žen

	CN	UC	kontrola
muži	45	16	15
ženy	44	17	17

Graf 2

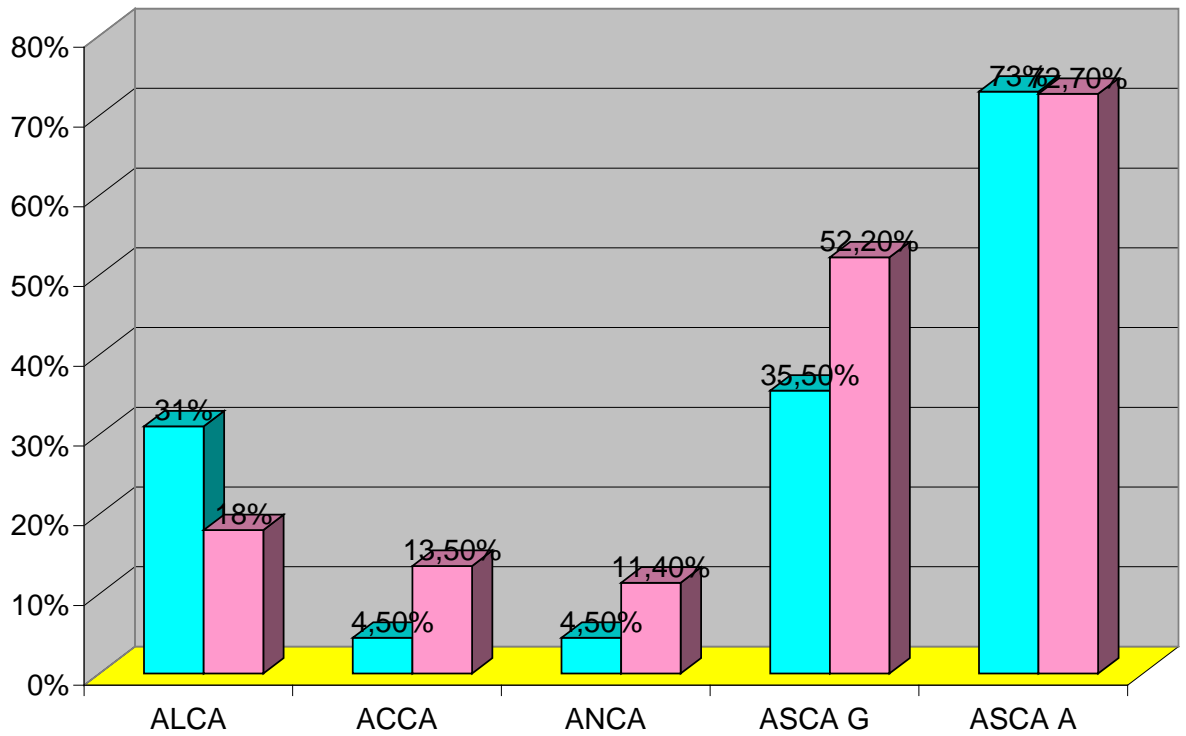
Pozitivita u CN



Pozitivita u CN	ALCA	ACCA	ANCA	ASCA G	ASCA A
muži	14	2	2	25	33
ženy	8	6	5	23	32

Graf 3

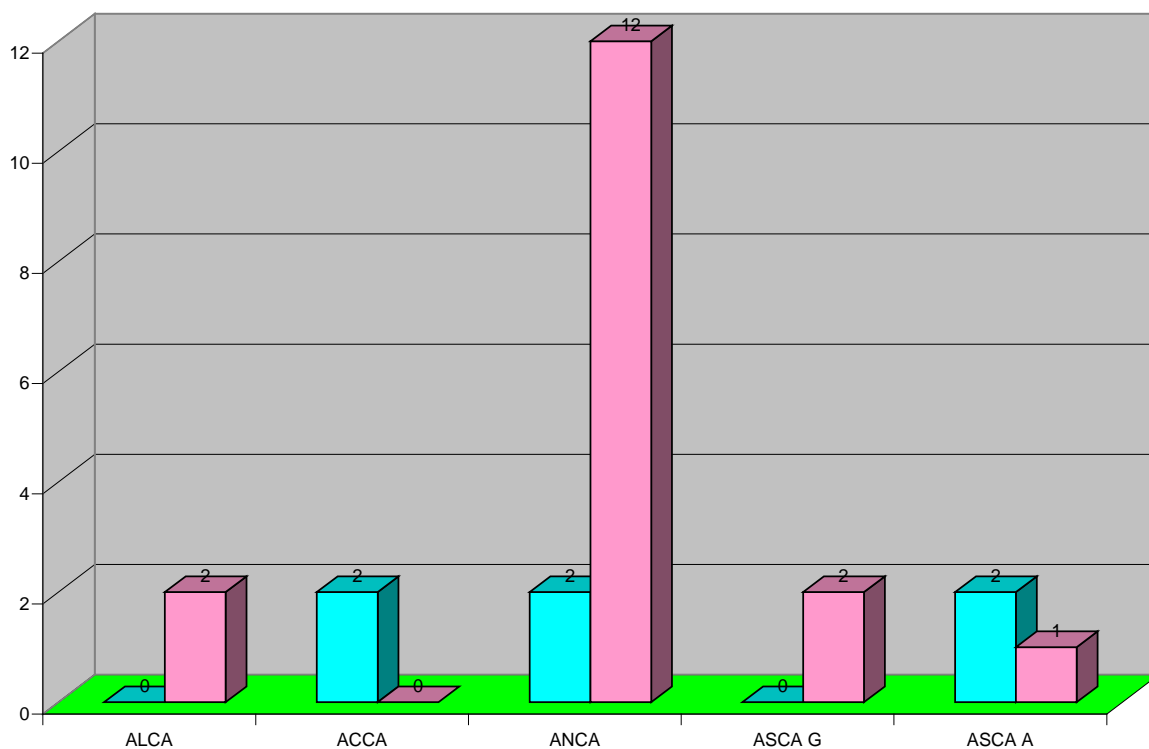
Pozitivita u CN %



Pozitivita u CN	ALCA	ACCA	ANCA	ASCA G	ASCA A
muži	31%	4,50%	4,50%	35,50%	73%
ženy	18%	13,50%	11,40%	52,20%	72,70%

Graf 4

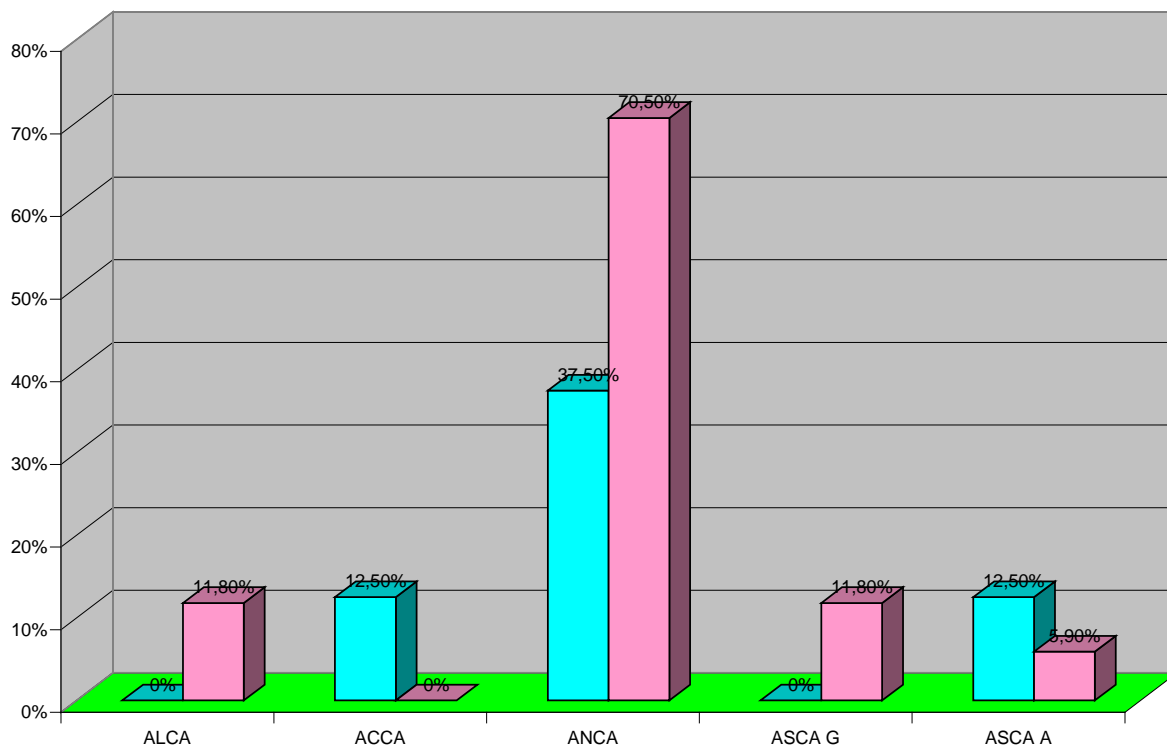
Pozitivita u UC



Pozitivita u UC	ALCA	ACCA	ANCA	ASCA G	ASCA A
muži	0	2	2	0	2
ženy	2	0	12	2	1

Graf 5

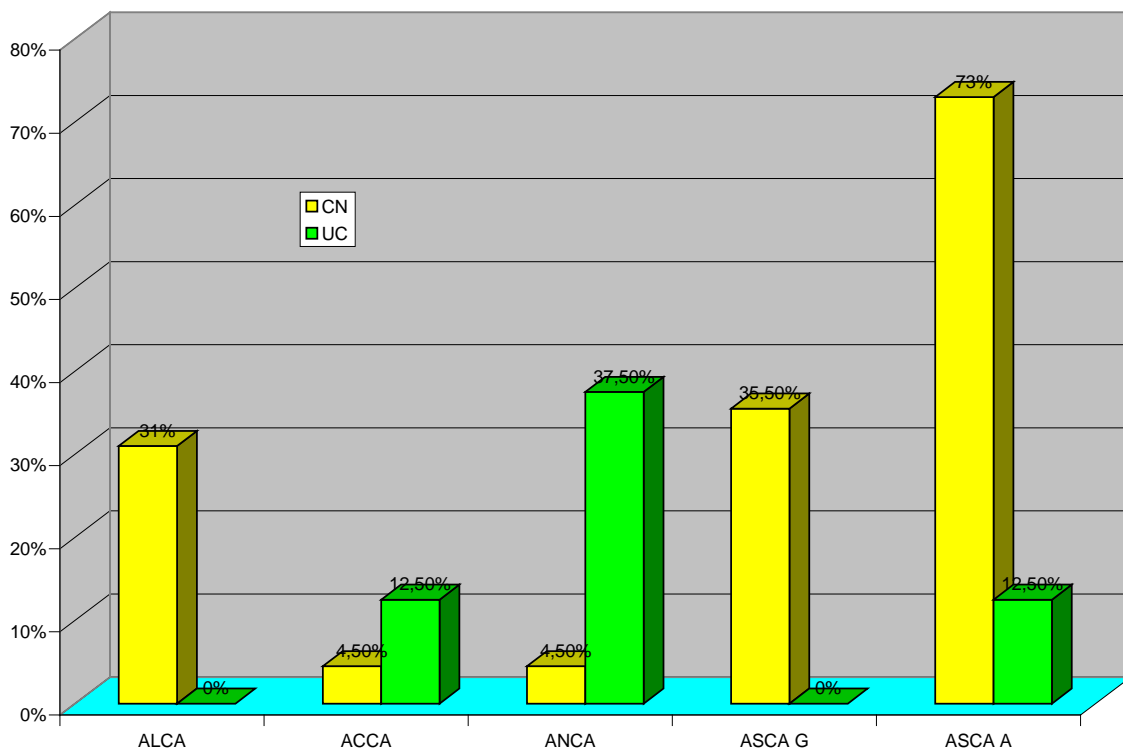
Pozitivita u UC



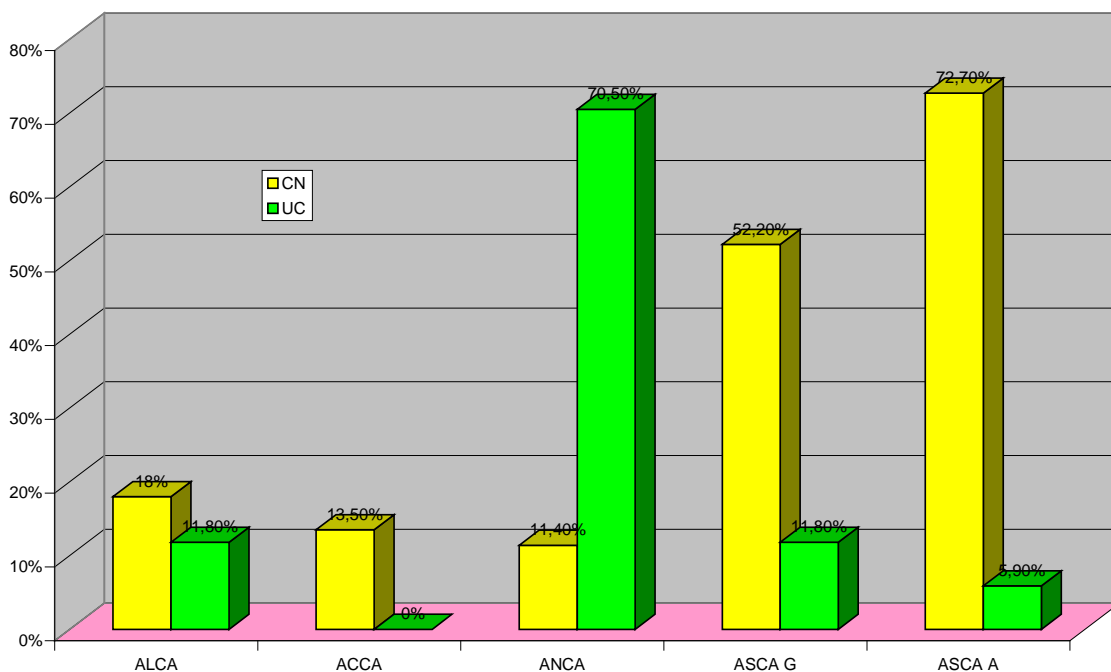
Pozitivita u UC	ALCA	ACCA	ANCA	ASCA G	ASCA A
muži	0%	12,50%	37,50%	0%	12,50%
ženy	11,80%	0%	70,50%	11,80%	5,90%

Graf 6

Pozitivita markerů u mužů %



Pozitivita markerů u žen %



Graf 7 a 8: Relativní četnost pozitivních nálezů ve vztahu k pohlaví

	ALCA	ACCA	ASCA G	ASCA A
u CN	45,14+/-28,71	42,94+/-27,35	52,46+/- 101,64	354,33+/- 1236,47
u UC	28,91+/-16,87	39,61+/- 63,88	8,20+/-11,33	8,33+/-8,67
kontrola	37,35+/-14,94	40,86+/-31,52	3,22+/- 4,36	4,22+/-3,62

Tab. 2: Průměrné hodnoty a SD u naměřených parametrů v jednotlivých vyšetřovaných souborech

Medián

	ALCA	ACCA	ASCA G	ASCA A
u CN	37,10	37,40	16,35	24,40
u UC	25,90	23,80	5,55	6,50
kontrola	41,65	31,00	1,50	3,25

Tab. 3: Medián naměřených parametrů v jednotlivých vyšetřovaných souborech

Průměrná hodnota pozitivních nálezů

	ALCA	ACCA	ASCA G	ASCA A
u CN	76,60	107,40	91,64	502,60
u UC	72,70	238,10	42,20	20,40

Tab.4: Průměrná hodnota pozitivních nálezů v souborech pacientů dle diagnózy

ALCA-rozpětí hodnot (EU/ml)

Negativní <50	hraniční 50-60	pozitivní >60
-----------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------

ACCA-rozpětí hodnot (EU/ml)

Negativní <80	hraniční 80-90	pozitivní >90
-----------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------

ASCA IgG a IgA-rozpětí hodnot (U/ml)

pozitivní
>15

	n	ANCA +	ASCA +celkem	ASCA IgG + IgA -	ASCA IgA + IgG -	ASCA IgG+ IgA+
Crohnova choroba	89	7	70	5	22	43
Ulcerózní kolitida	33	14	4	1	2	1
Zdravé kontroly	32	0	2	1	1	0

Tab. 5: Souhrnné výsledky provedených analýz u jednotlivých skupin

ASCA +celkem = IgG+IgA+ nebo IgG+ nebo IgA+

ASCA IgG+ IgA- = pozitivní pouze izotyp IgG

ASCA IgG- IgA+ = pozitivní pouze izotyp IgA

ASCA IgG+ IgA+ = pozitivní oba izotypy současně

	n	ACCA + ASCA +	ACCA + ASCA A+	ALCA + ASCA +	ALCA + ASCA G+	ALCA + ACCA +
Crohnova choroba	89	7	3	19	0	2
Ulcerózní kolitida	33	0	0	0	0	0
Zdravé kontroly	32	0	0	0	0	0

Tab. 6: Souhrnné výsledky provedených analýz u jednotlivých skupin

ACCA + ASCA+ = pozitivní ACCA a současně ASCA jakýkoli izotyp nebo oba současně

ACCA+ ASCA A+ = pozitivní ACCA a současně pozitivní ASCA IgA

ALCA+ ASCA + = pozitivní ALCA a současně ASCA jakýkoli izotyp nebo oba současně

ALCA+ ASCA G+ = pozitivní ALCA a současně pozitivní ASCA IgG

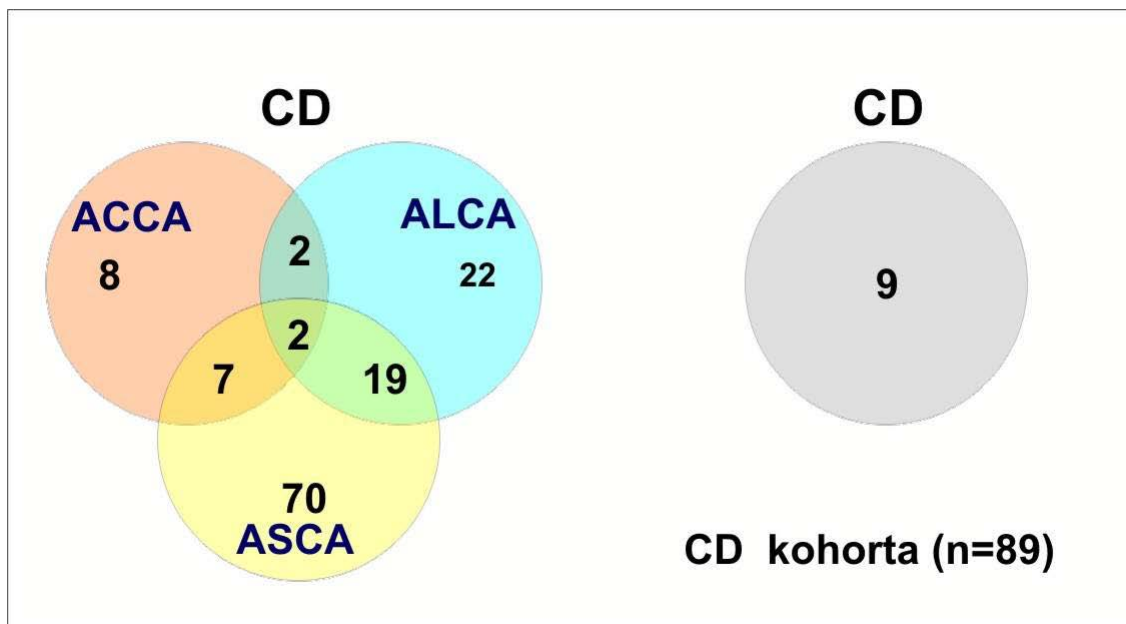
ALCA+ ACCA+ = pozitivní oba parametry současně

	n	ALCA	ALCA %	ACCA	ACCA%
CN	89	22	24,7	8	8,9
UC	33	2	6	2	6
kontrola	32	0	0	1	3,1

Tab.7: Pozitivita markerů (ALCA, ACCA) u jednotlivých diagnóz

	n	ALCA	ALCA%	ACCA	ACCA%	ASCA	ASCA%
NC	89	3	3.4%	1	1.1%	43	48.3%

Tab. 8 Pozitivita pouze jednoho markeru u nemocných s dg. CN



Obr. 1 Obrázek vyjadřující zastoupení jednotlivých markerů a jejich současný výskyt u nemocných s CN (n=89).

CD : 9 – počet nemocných s CN, kteří neměli pozitivní ani jeden marker

	ASCA	ALCA	ACCA
CN versus UC	p<0.0001	P=0.0028	P=0.0111

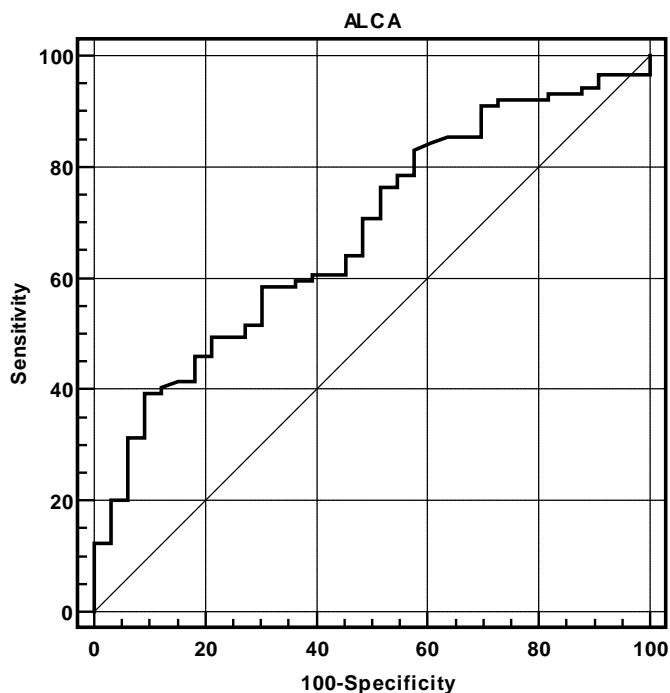
Tab. 9: Rozdíly v reaktivitě ASCA, ALCA a ACCA u pacientů CN a UC

Statistický rozdíl je vyjádřen pomocí parametru P

- Vysoce statisticky významný rozdíl p<0.001
- Středně významný rozdíl p (0.001-0.01)
- Nízká statistická významnost p (0.01-0.05)
- Nevýznamný rozdíl p>0.05

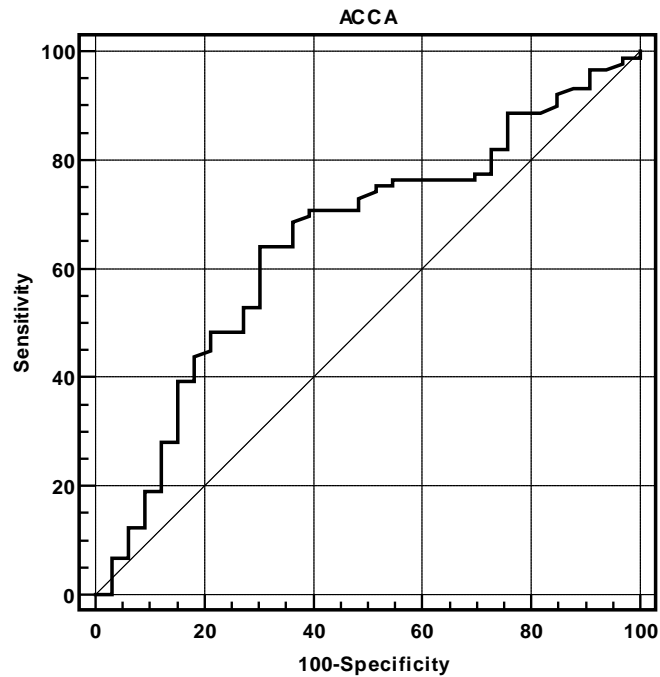
ROC Analýza

ROC ALCA u CN vzhľadom k pacientům s UC



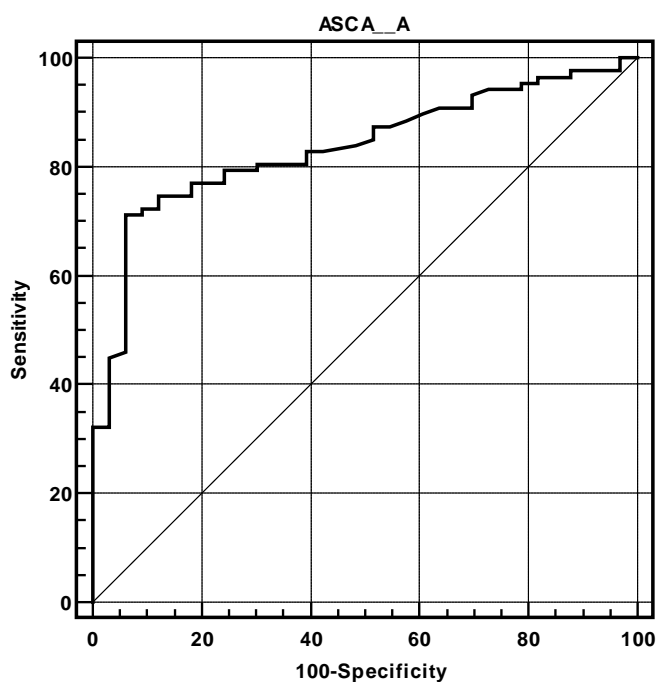
Kritéria	Sens.(95% C.I.)	Spec.(95% C.I.)
> 40,9	46,1 (35,4- 57,0)	78,8 (61,1- 91,0)
> 41,7	46,1 (35,4- 57,0)	81,8 (64,5- 93,0)
> 42,6	44,9 (34,4- 55,9)	81,8 (64,5- 93,0)
> 42,9	43,8 (33,3- 54,7)	81,8 (64,5- 93,0)
> 43,4	42,7 (32,3- 53,6)	81,8 (64,5- 93,0)
> 44,3	41,6 (31,2- 52,5)	81,8 (64,5- 93,0)
> 44,5	41,6 (31,2- 52,5)	84,8 (68,1- 94,8)
> 45,3	40,4 (30,2- 51,4)	87,9 (71,8- 96,5)
> 48,2	39,3 (29,1- 50,3)	87,9 (71,8- 96,5)
> 49,4 *	39,3 (29,1- 50,3)	90,9 (75,6- 98,0)
> 50	38,2 (28,1- 49,1)	90,9 (75,6- 98,0)
> 50,7	37,1 (27,1- 48,0)	90,9 (75,6- 98,0)
> 51,2	34,8 (25,0- 45,7)	90,9 (75,6- 98,0)
> 51,7	33,7 (24,0- 44,5)	90,9 (75,6- 98,0)
> 54,8	32,6 (23,0- 43,3)	90,9 (75,6- 98,0)
> 56	31,5 (22,0- 42,2)	90,9 (75,6- 98,0)
> 56,2	31,5 (22,0- 42,2)	93,9 (79,7- 99,1)
> 56,4	30,3 (21,0- 41,0)	93,9 (79,7- 99,1)
> 56,9	29,2 (20,1- 39,8)	93,9 (79,7- 99,1)

ACCA u CN vzhledem k UC



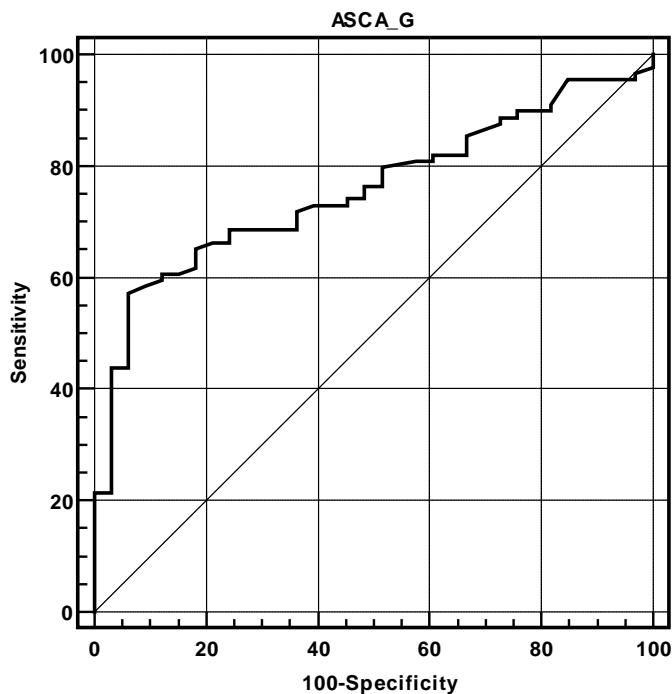
Kritéria	Sens.(95% C.I.)	Spec.(95% C.I.)
> 25	70,8 (60,2- 79,9)	57,6 (39,2- 74,5)
> 25,1	70,8 (60,2- 79,9)	60,6 (42,1- 77,1)
> 26,6	69,7 (59,0- 79,0)	60,6 (42,1- 77,1)
> 26,8	68,5 (57,8- 78,0)	63,6 (45,1- 79,6)
> 27,4	67,4 (56,7- 77,0)	63,6 (45,1- 79,6)
> 28	66,3 (55,5- 76,0)	63,6 (45,1- 79,6)
> 28,1	65,2 (54,3- 75,0)	63,6 (45,1- 79,6)
> 28,4	64,0 (53,2- 73,9)	63,6 (45,1- 79,6)
> 28,7	64,0 (53,2- 73,9)	66,7 (48,2- 82,0)
> 28,9 *	64,0 (53,2- 73,9)	69,7 (51,3- 84,4)
> 29,1	62,9 (52,0- 72,9)	69,7 (51,3- 84,4)
> 29,4	61,8 (50,9- 71,9)	69,7 (51,3- 84,4)
> 30,1	59,6 (48,6- 69,8)	69,7 (51,3- 84,4)
> 30,9	58,4 (47,5- 68,8)	69,7 (51,3- 84,4)
> 32,2	57,3 (46,4- 67,7)	69,7 (51,3- 84,4)
> 34,5	56,2 (45,3- 66,7)	69,7 (51,3- 84,4)
> 35,3	55,1 (44,1- 65,6)	69,7 (51,3- 84,4)
> 35,4	53,9 (43,0- 64,6)	69,7 (51,3- 84,4)

ASCA CN (IgA) vzhledem k UC



Kritéria	Sens.(95% C.I.)	Spec.(95% C.I.)
> 12	77,0 (66,8- 85,4)	81,8 (64,5- 93,0)
> 12,1	75,9 (65,5- 84,4)	81,8 (64,5- 93,0)
> 13	74,7 (64,3- 83,4)	81,8 (64,5- 93,0)
> 13,1	74,7 (64,3- 83,4)	84,8 (68,1- 94,8)
> 13,6	74,7 (64,3- 83,4)	87,9 (71,8- 96,5)
> 13,7	73,6 (63,0- 82,4)	87,9 (71,8- 96,5)
> 14	72,4 (61,8- 81,5)	87,9 (71,8- 96,5)
> 15,4	72,4 (61,8- 81,5)	90,9 (75,6- 98,0)
> 16,1	71,3 (60,6- 80,5)	90,9 (75,6- 98,0)
> 16,8 *	71,3 (60,6- 80,5)	93,9 (79,7- 99,1)
> 17	70,1 (59,4- 79,5)	93,9 (79,7- 99,1)
> 17,2	69,0 (58,1- 78,5)	93,9 (79,7- 99,1)
> 17,3	66,7 (55,7- 76,4)	93,9 (79,7- 99,1)
> 18,3	65,5 (54,6- 75,4)	93,9 (79,7- 99,1)
> 18,7	64,4 (53,4- 74,3)	93,9 (79,7- 99,1)
> 19,5	63,2 (52,2- 73,3)	93,9 (79,7- 99,1)
> 19,6	62,1 (51,0- 72,3)	93,9 (79,7- 99,1)
> 20,1	60,9 (49,9- 71,2)	93,9 (79,7- 99,1)

ASCA CN (IgG) vzhledem k UC



Kritéria	Sens.(95% C.I.)	Spec.(95% C.I.)
> 10,5	66,3 (55,5- 76,0)	78,8 (61,1- 91,0)
> 11,1	65,2 (54,3- 75,0)	81,8 (64,5- 93,0)
> 11,25	64,0 (53,2- 73,9)	81,8 (64,5- 93,0)
> 11,4	62,9 (52,0- 72,9)	81,8 (64,5- 93,0)
> 11,9	61,8 (50,9- 71,9)	81,8 (64,5- 93,0)
> 12	60,7 (49,7- 70,9)	84,8 (68,1- 94,8)
> 12,15	60,7 (49,7- 70,9)	87,9 (71,8- 96,5)
> 12,75	59,6 (48,6- 69,8)	87,9 (71,8- 96,5)
> 13,5	58,4 (47,5- 68,8)	90,9 (75,6- 98,0)
> 14,1 *	57,3 (46,4- 67,7)	93,9 (79,7- 99,1)
> 14,5	56,2 (45,3- 66,7)	93,9 (79,7- 99,1)
> 14,7	55,1 (44,1- 65,6)	93,9 (79,7- 99,1)
> 14,9	53,9 (43,0- 64,6)	93,9 (79,7- 99,1)
> 15	52,8 (41,9- 63,5)	93,9 (79,7- 99,1)
> 15,15	51,7 (40,8- 62,4)	93,9 (79,7- 99,1)
> 15,6	50,6 (39,8- 61,3)	93,9 (79,7- 99,1)
> 16,35	49,4 (38,7- 60,2)	93,9 (79,7- 99,1)
> 16,5	46,1 (35,4- 57,0)	93,9 (79,7- 99,1)
> 17,4	44,9 (34,4- 55,9)	93,9 (79,7- 99,1)

5. DISKUSE

Cílem naší práce bylo stanovit přínos a výtěžnost nových serologických markerů v diferenciální diagnostice IBD v porovnání s markery dosud používanými.

Nespecifické střevní záněty tvoří heterogenní skupinu chorob, jejichž etiopatogeneze však není dosud uspokojivě vysvětlena. Do této skupiny onemocnění patří především Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida.

Výskyt UC a CN je v ČR srovnatelný s hodnotami ze západní Evropy a ukazuje, že patříme mezi země s vysokou incidencí a prevalencí těchto chorob (Lukáš M. a kol., 1998). V současné době neexistuje ideální laboratorní marker, který by pomohl odhalit hrozící riziko vzniku IBD, případně dokázal odlišit CN od UC ve všech případech, a který by byl vysoce specifický pro jednotlivé choroby a zároveň vhodný pro zavedení do rutinní praxe. Senzitivita v současné době užívaných laboratorních markerů (ASCA a ANCA) je nižší, než by bylo žádoucí, avšak jejich specificita, zejména pokud jsou stanoveny oba parametry současně je vysoká (Peyrin-Biroulet et al., 2007; Malíčková a kol., 2001).

V roce 2005 se objevily první zprávy o nových markerech (ALCA, ACCA), specifických pro pacienty s diagnózou CN, ASCA negativních. Jejich objev je v literatuře vyzdvihován v souvislosti s upřesněním diagnózy právě u těchto pacientů. Jejich stanovení by bylo dalším významným přínosem pro imunologickou laboratorní diagnostiku IBD (Dotan N. et al., 2006; Dotan N, 2007; Israeli et al., 2005; Altstock et al., 2005).

Bylo vyšetřeno 89 sér pacientů s diagnózou CN, 33 sér pacientů s diagnózou UC a 32 sér zdravých kontrol. U všech pacientů byly současně stanoveny hladiny ASCA v obou izotypech (IgG, IgA) a ANCA.

Pozitivní nález ASCA byl zjištěn u 70 pacientů s CN (78%), u 4 pacientů s UC (12,1%). Pozitivní nález pANCA byl zjištěn u 14 pacientů s UC (42,4%) a u 7 pacientů s CN (7,8%). Podobný výsledků dosáhla řada autorů (Nevoral a kol., 2003; Malíčková a kol., 2001; Lecis et al., 2002; Pintér a kol., 2007).

Výrobce námi použitých souprav uváděl v roce 2007 ve svých materiálech senzitivitu testu ASCA IgA pro CN 68%, při hodnotě cut-off 15 U/ml. Námi zjištěná senzitivita ASCA IgA pro CN 71,3% a specificita 93,9% odpovídá

optimální hodnotě cut-off 16,8 U/ml, tedy pouze o 1.2U/ml vyšší. Ve stejné době, kdy jsme vyhodnotili naše výsledky, výrobce změnil cut-off na rozsah 12-18 U/ml, (normální hladina <12 U/ml, hraniční 12-18 U/ml, zvýšená hladina >18 U/ml), což je v souladu s našim pozorováním.

Situace v izotypu IgG je obdobná. Výrobce námi použitých souprav uváděl v roce 2007 ve svých materiálech senzitivitu testu ASCA IgG pro CN 68%, při hodnotě cut-off 15 U/ml. Námi zjištěná senzitivita při použití daných souprav ASCA IgG pro CN 57.3% (46,4- 67,7) a specifická 93.9% odpovídá hodnotě cut-off 14.1 U/ml, tedy pouze o 0.9 U/ml nižší. Ve stejné době, kdy jsme vyhodnotili naše výsledky, výrobce rovněž změnil cut-off na rozsah 12-18 U/ml, (normální hladina <12 U/ml, hraniční 12-18 U/ml, zvýšená hladina >18 U/ml), což je v souladu s našim pozorováním.

Rozsah cut-off se za daných podmínek jeví jako optimální. Při dalším zvyšování hodnoty cut-off by se výrazně snížila senzitivita testu. Viz ROC analýza ASCA CN vzhledem k UC. Vzhledem ke skutečnosti, že výrobce v nových soupravách uvádí rozsah cut-off 12-18 U/ml, naše pozorování je v souladu s údaji výrobce. Podle literárních údajů, činí specifická ASCA pro CN ve vztahu k UC 80-90% (*Malíčková a kol.*, 2001; *Dubinsky et al.*,1998; *Hoffenberg et al.*, 1999; *Murphy et al.*, 1996). Senzitivita je uváděna v rozmezí 50-70% (*Malíčková a kol.*, 2001; *Dubinsky et al.*,1998; *Hoffenberg et al.*, 1999; *Murphy et al.*, 1996).

Přítomnost ANCA protilátek, jako vhodného markeru pro dg. UC, byla v našem souboru prokázána u 14 pacientů s dg. UC, (42.4%) a u 7 pacientů s dg. CN (7.8%). Hodnoty uváděné řadou autorů kolísají mezi 40-80%, resp. 0-20%. *Hoffenberg et al.*, 1999 uvádí 60%, *Nielsen et al.*, 2000 50-70%, *Quinton et al.*, 1998 65%, *Fleshner et al.*, 2001 63%, *Malíčková a kol.*, 2001 46% u pacientů s UC a u 11% pacientů s CN, *Nevoral a kol.*, 2003 81.8%, *Papp et al.*, 2007 uvádí hodnotu 40% u pacientů s UC.

V souladu s literárními údaji je i námi stanovená senzitivita testu ANCA pro diagnózu UC, která činí 41.9%.

Námi stanovená specifická testu ANCA pro diagnózu UC je 92,1%. Hodnoty uváděné řadou autorů kolísají mezi 65-100%. *Hoffenberg et al.*, 1999 uvádí 65%, *Nielsen et al.*, 2000 >90 %, *Quinton et al.*, 1998 85%, *Malíčková a kol.*,2001 100%. Specifická testu může být snížena, vzhledem k přítomnosti

ANCA protilátek u některých pacientů s dg. CN. Toto zjištění lze přičíst skutečnosti, že někteří pacienti mohou mít současně s CN i kolitidu. V našem souboru pacientů jsme prokázali, že frekvence výskytu ANCA protilátek je výrazně vyšší u ženského pohlaví (70.5% žen, 37.5% mužů). Ulcerózní kolitidou onemocní v Evropě a USA o 30% výše žen, než mužů. Pohlavní diference v neprospěch žen v případě postižení autoimunitním onemocněním je známá.

Dotan et al., 2006 identifikovali nové antigeny vhodné ke snadnější identifikaci CN pacientů ASCA negativních. Cílem naší práce bylo odpovědět na otázku, jaký význam pro diagnostiku IBD mezi rutinně vyšetřovanými protilátkami ANCA a ASCA, mají nově objevené protilátky ALCA a ACCA. V ČR neexistuje laboratoř, která by toto vyšetření prováděla. Přínos těchto nových markerů pro diagnostiku jsme se snažili prověřit na souboru 89 pacientů s CN, 33 pacientů s UC. Kontrolní skupinu tvořilo 32 sér zdravých dárců krve.

Prevalence ALCA ve skupině CN byla 24.7%, tedy méně než v případě ASCA, kde činila 78.6%. Ve skupině UC byla prevalence ALCA výrazně nižší (6%). Prevalence ACCA činila ve skupině CN 8.9%, ve skupině UC 6%. *Abreu*, 2006, uvádí u pacientů s CN nález pozitivivity ALCA 37.5%, ACCA 36%.

Senzitivita ACCA u CN činila 64.0%, specificita 69.7% při cut-off odpovídající hodnotě pouze necelých 30 EU/ml, zatímco výrobce udává rozmezí cut-off v rozmezí 80-90 EU/ml. Při použití cut-off hodnoty dle výrobce pak klesne významně senzitivita testu na pouhých 7.9% -9.0%, specificita testu dosáhne 93,9% což je pro účely detekce pacientů a rozhodování mezi dg. UC a CN nevyhovující.

> 79,8	10,1 (4,7- 18,3)	93,9 (79,7- 99,1)
> 84,2	9,0 (4,0- 17,0)	93,9 (79,7- 99,1)
> 90,8	7,9 (3,2- 15,5)	93,9 (79,7- 99,1)

Franco et al., 2007 uvádí u portugalské populace senzitivitu pouze 2,2% a specificitu 97.4%. *Malíčková a kol.*, 2006 uvádí u české populace senzitivitu 48%, specificitu pouze 32%.

Senzitivita ALCA byla vzhledem k CN výrazně nižší, činila pouze 39.0%, ale specificita byla vysoká - 90,9%. Námi stanovená hodnota cut-off činila 49,4 EU/ml. Naše pozorování je v souladu s údaji výrobce, který uvádí

cut-off rozmezí hodnot 50-60 RU/ml. *Franco et al.*, 2007 uvádí u portugalské populace senzitivitu pouze 12.2% a specificitu 97.4% , *Malíčková a kol.*, 2006 uvádí u české populace senzitivitu 39%, tedy velmi podobnou našemu zjištění, avšak specificitu na rozdíl od nás pouze 64%, ačkoli k detekci tohoto markeru byly použity diagnostické soupravy jednoho výrobce.

„Falešná pozitivita“ u UC činila v případě ALCA 6%, v případě ACCA 6% a u zdravých kontrol činila v případě ACCA 3.1%. Falešně pozitivní výsledek ALCA u kontrolní skupiny nebyl zaznamenán.

Přibližně 50-70% CN pacientů je ASCA pozitivních. U ASCA negativních pacientů jsme prokázali pouze 3.4% výskyt markeru ALCA a 1.1% markeru ACCA. Podle literárních údajů, by ALCA a ACCA protilátky měli být detekovány až u 30% pacientů ASCA negativních (*Franco et al.*, 2007; *Douglas K*, 2006). Z uvedeného vyplývá, že kombinace všech tří testů (ASCA, ALCA a ACCA) by měla zvýšit úspěšnost rozlišení CN od UC pacientů. Pacienti s CN pozitivní alespoň na jednu protilátku mohou být odlišeni od pacientů s UC se senzitivitou 77.4% a specificitou 90.6%. Pacienti, kteří mají přítomny alespoň dvě z těchto protilátek, mohou být diagnostikováni se specificitou >99% (*Altstock RT et al.*, 2005; *Dotan N et al.*, 2006).

Rozdíl v reaktivitě anti-karbohydrátových protilátek u pacientů s CN a UC uvádí tab.9, ze které jasně vyplývá, že statisticky nejvýznamnější rozdíl ($p < 0.0001$) byl nalezen pro ASCA. Signifikantní rozdíl byl rovněž nalezen pro ALCA ($p = 0.0028$), pro ACCA ($p = 0.0111$). *Franco et al.*, 2007 udává ve skupině ASCA negativních pacientů signifikantní rozdíl v reaktivitě ALCA $p = 0.025$, pro ACCA $p = 0.048$, *Malíčková a kol.*, 2006, udává ve shodě s našim pozorováním signifikantní rozdíl pro ASCA, $p < 0.0001$, pro ACCA $p = 0.03$, pro ALCA $p = 0.4$ (nesignifikantní).

Na základě našich pozorování jsme dospěli k názoru, že rutinní stanovení nových serologických markerů ALCA a ACCA pro stanovení dg.CN a pro rozlišení pacientů s IBD, by za současné situace nebylo tak významným přínosem, jak by se dalo očekávat na základě některých literárních údajů. Výsledky několika málo studií nejsou přesvědčivé, jejich autoři dosahují rozdílných výsledků. Ve svých závěrech konstatují, že ACCA a ALCA nelze použít jako screeningový test pro identifikaci pacientů s CN. Přínos ACCA je z hlediska senzitivity tohoto testu pro diagnostiku CN bezvýznamný. Stejného

zjištění dosáhla i *Franco et al.*, 2007. Nadějnější výsledky v naší studii přineslo stanovení ALCA. Tento parametr by připadal v úvahu pro zařazení do dosud užívaného protilátkového profilu. *Ferrante et al.*, 2006 uvádí, jako nejlepší pro rozlišení IBD a non-IBD pacientů kombinaci ASCA, ANCA a ALCA. Doporučuje však nezbytnost dalších prospektivních studií.

Naše otázka zněla: „Jsou nově objevené anti-katbohydrátové protilátky použitelné v klinické praxi?“ Odpověď: Stanovení ASCA a ANCA zůstává i nadále nejvýznamnějším imunologickým laboratorním vyšetřením u pacientů s IBD. ALCA a ACCA jsou vysoce specifickými markery pro onemocnění CN, ale vzhledem k nízké senzitivě testu se nám nejeví jejich stanovení vhodné pro screeningové vyšetření a identifikaci pacientů s CN. Role ALCA a ACCA, jako doplňujícího vyšetření ke stávajícímu rutinně stanovovanému protilátkovému profilu, bude muset být ověřena v dalších klinických studiích.

6. ZÁVĚR

V této studii jsme se snažili na souboru pacientů s dg. CN a UC ověřit diagnostický přínos nově objevených serologických markerů ALCA a ACCA, sloužících k rozlišení pacientů s CN od UC, ASCA negativních. Námi zjištěné výsledky přesvědčivě nepodpořily teorii o významu stanovení nových markerů ALCA a ACCA v diagnostice IBD.

U ASCA negativních pacientů s dg. CN, jsme prokázali výskyt markeru ALCA pouze v 3.4% případů a přítomnost markeru ACCA u 1.1% případů s dg. CN. Parametry ALCA a ACCA mají u těchto pacientů vysokou specificitu, ale vykazují velmi nízkou sensitivitu. Bohužel se nehodí k vyhledávání pacientů s CN a k odlišení pacientů s dg. CN od pacientů s dg. UC, ASCA negativních. K rozlišení pacientů s IBD by se i nadále v blízké budoucnosti měly používat doposud stanovované serologické markery ASCA a ANCA. Hodnota těchto serologických testů je sice částečně omezena, jsou-li užívány samostatně, ale při jejich kombinaci je jejich specificita velmi vysoká.

Význam stanovení ALCA a ACCA, jako doplňujícího vyšetření ke stávajícímu rutinně užívanému protilátkovému profilu, bude muset být podroben dalšímu zkoumání.

7. SEZNAM LITERATURY

ABREU M T: Serologies in Croh's Disease: Can We Change the Gray Zone to Blaf and White? Gastroenterology Vol. 131, No 2, 2006, s. 664-66

ABUBAKAR I, DEBORAH J, MYHILL A, HART R, LAKE R, HARVEY I, RHODES M, ROBINSON R, LOBO J, PROBERT S J, HUNTER P R : A Case-Control Study of Dribling Water and Dairy Products in Crohn's Disease-Further Investigation of the Possible Role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. American Journal of Epidemiology 2007, 165(7),John's Hopkins Bloomberg Schoul of Public Health, s. 776-783

ALTSTOCK RT, SHTEVI A, KARBAN A, DOTAN N, HALPERN Z, DOTAN I: Improved IBD diagnosis via ELISA detection novel antibodies: Anti-Chitobioside Carbohydrate Antibodies(ACCA), Anti-Laminaribioside Carbohydrate Antibodies(ALCA) and Anti-Mannobioside Cardbohydrate Antibodies(AMCA). Gastroenterology 2005; 128(4); A-303

BARTŮŇKOVÁ J, PAULÍK M et al.:Vyšetřovací metody v imunologii, GRADA 2005, s. 37-39, 43-61

BOSSUYT X : Serological Markers in Inflammatory Bowel Disease. Clinical Chemistry 2006, 52, American Association for Clinical Chemistry,Inc ; s. 171-181

BRADWELL AR, STOKES RP, MEAD GP: Advanced Atlas of Autoantibody Patterns, 1999, s. 78-87

CASTRO-SANTOS P, SUAREZ A, MOZO L, GUTIERREZ C : Association of IL-10 and TNF α genotypes with ANCA appearance in ulcerative colitis. Clinical imunology 2007, 122, s. 108-114

CONRAD K et al.: Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases-A Diagnosis Reference. Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity. Volume 2-2002, PABST

CONRAD K et al.: From Etiopathogenesis to the Prediction of Autoimmune Diseases: Relevance of Autoantibodies. Volume 5-2007, PABST, s. 284-293

CONRAD K et al.: Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases-A Diagnosis Reference. Volume 2 ,second edition, 2007, s. 17-19

DOTAN I, FISHMAN S et al. : Antibodies against laminariobioside and chitobioside are novel serological markers in CD. Gastroenterology 2006, 131(2), s. 366-378

DOTAN N : Autoantibodies-Anti-glycan antibodies. ScienceDirect 2007, Glycominds Ltd. , s. 817-822

DOTAN N, ALTSTOCK R T, SCHWARZ M, DUKLER A : Anti-glycan antibodies as biomarkers for diagnosis and prognosis. Lupus 2006, 15, Glycominds Ltd, Lod, Izrael ; s. 1-10

DOUGLAS K : New antibody markers in Crohn Disease. Journal Watch Gastroenterology, 2006.

DUBINSKY M, TARGAN S, BRAUN J et al.: Predictive value of serological screening tests in pediatric inflammatory bowel disease. Abstrakt presented at American College of Gastroenterology 1998.

FERRANTE M, HENCKAERTS L , JOOSSENS M, PIERIK M, JOOSSENS S, DOTAN N, NORMAN G L, ALTSTOCK R T, VAN STEEN K, RUTGEERTS P, VAN ASSCHE G, VERMEIRE S : New serological markers in inflammmatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. Gut 2007

FLESHNER P R, VASILIAUSKAS E A, KAM LY, FLESHNER N E, GAIENNIE J, ABREU-MARTIN M T, TARGAN S R: High level perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody(pANCA) in UC patients before colectomy predicts the development of chronic pouchitis after ileal pouchanal anastomosis. *Gut* 2001, 49, s. 671-677

FORCIONE D G, ROSEN M J, KISIEL J B, SANDS : IBD-Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *BMJ Career Focus*, BMJ Publishing Group Ltd & British Society of Gastroenterology 2004, 53, s. 1117-1122

FRANCO M, RAMALHO M, ALBERTO S, NOVAIS L, DE SOUSA G: Differential diagnosis between Crohn's Disease vs non CD patients using a combination of Antiglycan Antibodies(gASCA, ALCA, ACCA and AMCA. 8th Dresden Symposium on Autoantibodies, Sep 12-15 2007

Glycominds, Instruction for use IBDX ACCA IgA ELISA Kit, 2006

GRACEY M, BURKE V : *Pediatric gastroenterology and Hematology* 1993, 3.vydání, 224-233 a 859-877

HOFFENBERG EJ, FIDANZA S, SAUAIA A: Serologic testing for inflammatory bowel disease. *The Journal of Pediatrics*, 1999; 134, s. 447- 451

ISSENMANN Rm : Inflammatory bowel disease: Presentation and Clinical Features. *International Seminars in Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 6, 1997;2: 2-5

ISRAELI E, GROTTO I, GILBURD B, BALICER R D, GOLDIN E, WIIK A, SHOENFELD Y : IBD- *Anti-Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut* 2005, 54, BMJ Publishing Group Ltd & British Society of Gastroenterology 2005, s. 1232-1236

KLENER P et al. : Vnitřní lékařství, Galen, Karolinum 2005, s.597-602

KOMAR V: Clinical relevance of autoantibodies in IBD. IMMCO Diagnostic, Inc. September 2006.

KREJSEK J, KOPECKÝ O.: Klinická imunologie, 2004, Nucleus HK: s. 592-593, 624-625

LECIS P, GERMANÁ B, PAPA N, BERTIATO G, DOGLIONI C, GALLIANI E, BIEDO FC: p-ANCA and ASCA antibodies in the differential diagnosis ulcerative rectocolitis and Crohn's disease. *Recenti Prog Med.* 2002; 93(5): s. 308-13

LUKÁŠ K :Idiopatické střevní záněty-diagnostika a léčba pro praxi, Triton 1997, s. 9, 25-37

LUKÁŠ M et al. :Idiopatické střevní záněty- Nejistoty, současné znalosti a klinický přístup. Galen 1998, s. 25-28, 43-69

LUKÁŠ M, CHALUPNÁ P, BORTLÍK M : Imunosupresivní a biologická terapie ulcerózní kolitidy a Crohnovy nemoci. *Remedia* 2003; 13(Supplementum 1): s. 75-86

MALÍČKOVÁ K, JANATKOVÁ I, FUČÍKOVÁ T, ADAMEC S, LUKÁŠ M: Naše první zkušenosti s vyšetřováním protilátek proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) u nemocných s primárními nespecifickými střevními záněty. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 50, 2001, č. 3, s. 131-135

MATULKA M : Imunopatologie chronických střevních zánětů , *Alergie* 3, 2001

MAŘATKA Z : Klinická gastroenterologie. Praha, Avicenum 1988, s.375-395

Metrologická terminologie v analytické laboratoři. SEKK s.r.o. Pardubice.
www.eqa.cz/terminologie/Text/terminologie.htm

MURPHY L K, TARGAN S R: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel diseases. In: Autoantibodies, J.B. Peter and Y. Shoenfeld, editors. 1996 Elsevier Science B.V

NEVORAL J, VALTROVÁ V, KOTALOVÁ R, NYČ O, BARTŮNKOVÁ J, TLÁSKAL P : Protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*(ASCA) a protilátky proti cytoplazmě neutrofilních leukocytů(ANCA) u dětí a mladistvých s nespecifickými zánětlivými střevními onemocněními. Čes.-slov. Pediatrie, 58, 2003, No.5, s.291-293

NIELSEN OH, VAINER B, MADSEN SM et al.:Established and Emerging Biological Activity markers of Inflammatory Bowel Disease. Am.J. Gastroenterol., 2000, 2, 95, 259-365

OLIVES JP, BRETON A et al.: Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Children with Inflammatory Bowel Disease: Prevalence and Diagnostic Value. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 25, 1997; 142-148

PAPP M, NORMAN GARY L, ALTORJAY I, LAKATOS P : Utility of serological markers in inflammatory bowel disease: Gadget or magic? World J Gastroenterology 2007, April 14; 13(14), s. 2028-2036

PEYRIN-BIROULET L, STANDAERT-VITSE A, BRANCHE J, CHAMAILLARD M: IBD Serological Panels: Facts and Perspectives. Inflamm Bowel Dis. Volume 13, Number 12, December 2007.

PINTÉR M, PINTEROVÁ KOLESÁROVÁ M, DRAHOŠOVÁ M, REJCHRT S, DOUDA T, TACHECÍ I, KOPÁČOVÁ M, BUREŠ J: Význam sérových protilátek ANCA, ASCA, ABBA u idiopatických střevních zánětů. Časopis lékařů českých 2007, 146; 863-867

QUINTON JF, SENDID B, REUMAUX D et al. : Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. Gut, 42, 1998, č.6, s. 788-791

SKOGH T, DAHLGREN C, HOLMGREN K, PEEN E, STENDAHL O:Anti-granulocyte antibodies(cANCA, pANCA, GS ANA) by confocal scanning laser fluorescence microscopy, ELISA, and chemiluminiscence techniques. Scand J Immunol, 1991, 34, s. 137-45.

VASILIAUSKAS E A, KAM L Y, KARP L C, GAIENNIE J, YANG H, TARGAN S R : Marker antibody expression stratifies Crohns disease into immunologically homogenous subgroup with distinct clinical characteristic. Gut 2000, 47, s. 487-496

VOLF V : Infliximab v terapii chronických zánětlivých onemocnění střevních u dětí a dospívajících. Remedia, 14.ročník 2004, 5/2004 , s. 429-433

Výukový CD-ROM pro zdravotnické školy-Vyšetřovací metody v klinické mikrobiologii a klinické imunologii

www.prionord.cz/projects/colitiscrohn/product.asp

WALKER W, DURIE PR, HAMILTON JR et al. .Pediatric gastrointestinal Disease. Volume one. Second edition, 1996; s. 692- 723

ZBOŘIL V : Idiopatické střevní záněty, www.practicus.cz/2003 s. 9-13

ZBOŘIL V : Patofyziologie zánětů střevních a jejich diferencíální diagnostika. IATRIKE TECHNE, CEBIKO s.r.o., 2/2002 s. 80-83