

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zdravotnická technika a informatika (MZTI, 5345T018)

Studijní obor: Specializace ve zdravotnictví



Immunofluorescenční detekce endomysálních protilátek (EmA) v diagnostice celiakie

**Immunofluorescent detection of endomysial antibodies (EmA) in the coeliac
diagnostics**

(Diplomová práce)

Autor: Bc. Petr Martikán

Vedoucí diplomové práce: as. MUDr. Petr Kocna, Csc.

Konzultant: MUDr. Zdislava Vaníčková

Pracoviště: Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN

Praha 2010

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl v seznamu literatury. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze dne 25. 8. 2010

.....

podpis autora

Poděkování

Diplomová práce byla vypracována pod odborným vedením as. MUDr. Petra Kocny, kterému tímto děkuji za cenné rady a připomínky. Dále děkuji slečně Ing. Táně Dvornákové za pomoc při zpracování statistických výsledků. V neposlední řadě patří poděkování i mým rodičům, za podporu, kterou mi věnovali během celého studia.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo srovnání několika imunofluorescenčních metod a substrátů pro detekci endomysiálních protilátek (EmA). Rutinní metoda (Anti-Endomysium antibodies AEA) používaná Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky ve Všeobecné fakultní nemocnici dává u některých vzorků nejednoznačné výsledky vlivem jiných autoprotilátek (např. ANA, AMA, ASMA). Bylo provedeno porovnání rutinní metody s jinými soupravami (IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10, ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit). Dalším cílem bylo naučit se pracovat s touto metodou a umět co nejlépe hodnotit vzorky z fluorescenčního mikroskopu.

Testovaných bylo 40 vzorků, každý vzorek byl 7x hodnocen za pomoci EmA metod. Pro srovnání byly vyhodnoceny protilátky IgA, IgG, atTG.

Po mikroskopickém hodnocení bylo zjištěno, že žádná ze souprav nedokázala eliminovat vliv jiných autoprotilátek. Nejlepší poměr mezi kontrastem pozitivita/negativita měl set IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10.

Po statistickém hodnocení bylo zjištěno, že ačkoliv souprava IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10 poskytuje velmi kvalitní fluorescenční výsledky, dává více negativní hodnoty.

Tato práce přinesla velmi cenných zkušeností v práci v laboratoři a zároveň mě velmi dobře naučila hodnotit protilátky proti endomysiu metodou nepřímé fluorescence.

Klíčová slova: celiakie, protilátky proti endomysiu, EmA, imunofluorescence

ABSTRACT

The aim of this thesis was comparing of a several immunofluorescence methods and substrates for detection endomysial antibodies (EmA). The common method (Anti-Endomysium antibodies AEA) is used by UKLBD in VFN and by the some samples gives ambiguous results owing to another autoantibodies (e.g. ANA, AMA, ASMA). The common method was compared with another sets (IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10, ImmuGlo anti-Endomysial Antipody EMA IFA Kit). Another aim of the work was how to work with this method and be able to evaluate samples by the fluorescence microscope.

40 samples were tested and each sample was 7 times evaluated by EmA methods. For comparing were evaluated these antibodies - IgA, IgG, atTG.

After microscopic evaluation was revealed that none of the sets eliminated the influence of other autoantibodies. The set IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10 had the best ratio in contrast to the negativity / positivity, but it gives more negative values. This thesis brought me a lot of valuable experiences in laboratory and also taught me how to evaluate endomysium antibodies by indirect immunofluorescence method.

Key words: coeliac disease, endomysium antibodies, EmA, immunofluorescence

1.	Úvod.....	1
2.	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Celiakie	2
2.1.1.	Patogeneze onemocnění.....	3
2.1.2.	Gliadiny a gluteniny	4
2.1.3.	Klinické projevy	5
2.1.4.	Prevalence onemocnění	7
2.2.	Diagnostika celiakie.....	8
2.2.1.	Sérologické testy	10
2.2.2.	Biopsie.....	11
2.3.	Imunofluorescence	12
2.3.1.	Fluorescenční markery při vyhodnocení EmA.....	13
2.3.2.	Fluorescenční mikroskopie.....	13
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1.	Přístrojové a materiálové vybavení	20
3.1.1.	Přístrojové vybavení.....	20
3.1.2.	Diagnostické spoupravy.....	21
3.1.3.	Pacientská séra	23
3.2.	Metodika měření	23
3.2.1.	Princip metod.....	23
3.2.2.	Set Anti-Endomysium antibodies AEA – rutinní metoda laboratoře ÚKBLD	23
3.2.3.	Set ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit.....	24
3.2.4.	Set IFA-EmA–IgA – AEMAk 03a-10.....	25
3.3.	Statistické zpracování výsledků	26
4.	Výsledky	29
4.1.	Mikroskopické hodnocení.....	29
4.1.1.	Vyhodnocení výsledků setu Anti-Endomysium antibodies AEA	29
4.1.2.	Vyhodnocení výsledků setu ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit	30
4.1.3.	Vyhodnocení výsledků setu IFA-EmA–IgA – AEMAk 03a-1032	

4.1.4.	Mikroskopické vyhodnocení nejednoznačných vzorků.....	33
4.2.	Statistické hodnocení souprav	37
5.	Diskuze	44
6.	Závěr	46
7.	Literatura	47

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AGA - anti-gliadin antibodies
- AMA – anti-mitochondrial antibodies
- ANA – anti-nuclear antibodies
- APC – antigen prezentující buňka
- ASMA – anti-smooth muscle antibodies
- atTG - anti-tissue transglutaminase
- DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
- EmA – endomysial antibodies
- FITC - fluorescein isothiokyanát
- GDP – guanosindifosfát
- GTP – guanosintrifosfát
- HLA – human leukocyte antigen
- IF – imunofluorescence
- IgA – protilátka - imunoglobulin třídy A
- IgG – protilátka - imunoglobulin třídy G
- PBS - Phosphate Buffered Saline

1. ÚVOD

Céliakie patří k autoimunitním onemocněním a prokazujeme proto přítomnost řady autoantigenů, např. k endomysiu, což je pojivový, tkáňový protein hladkého svalu, lokalizovaný mezi myofibrilami. Endomysiální protilátky jsou velmi spolehlivým markerem céliakie (senzitivita 83-95% a specificita 94-99%), a ve screeningových algoritmech jsou doporučeny jako druhý krok, indikující histologický průkaz. Metoda detekce je imunofluorescenční, jako substrát byla původně použita svalovina jícnu opic, ověřeny jsou nyní i další substráty např. svalovina pupečníku. Laboratorní technika vyžaduje imunofluorescenční mikroskop, hodnocení testu není zcela jednoduché a vyžaduje dlouhodobé zkušenosti. [14]

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Celiakie

Celiakie, jinak také zvaná celiakální sprue nebo glutenová enteropatie je autoimunitní onemocnění s geneticky podmíněnou vazbou (HLA-DQ2/DQ8) (HLA- lidské leukocytární antigeny) a specifickou odpovědí na spouštěcí faktor peptidy pšeničného gliadinu (lepku) resp. zásobní proteiny (prolaminy) příbuzných obilovin, ječmene, žita a ovsa [1].

Podstata autoimunitních chorob spočívá ve vzniku imunitní reakce (ať už zprostředkované humorální nebo buněčnou imunitou), při které dochází k napadení struktur vlastního těla a k jejich poškození. Spouštěcím faktorem je agens, proti kterému je namířena imunitní reakce a jehož antigenní struktura se podobá orgánu či tkáni, která je potom vlastními protilátkami či buněčnou imunitou poškozena.

V případě celiakie je takovým spouštěčem pšeničný peptid gliadin, resp. jeho součást alfa-gliadin (přesněji sekvence aminokyselin, kterou musí peptid vzniklý štěpením obsahovat, aby byl schopen tuto imunitní reakci vyvolat). Alfa-gliadin je v žaludku, duodenu a tenkém střevě enzymaticky štěpen na menší peptidy, které se potom vážou v submukóze buněk tenkého střeva na povrchové glykoproteiny HLA-DQ2 a HLA-DQ8 pozitivních imunokompetentních buněk. Tím tedy gliadiny spouštějí ve sliznici tenkého střeva imunitní odpověď, a to jak buněčnou (aktivace cytotoxických T lymfocytů), tak humorální (dochází ke vzniku protilátek proti tkáňové transglutaminase a gliadinu pomocí B lymfocytů).

Na základě této reakce dochází k poškození buněk sliznice tenkého střeva (enterocytů) a k typickému histologickému obrazu poškozené sliznice, který se může objevit v široké škále od minimálního postižení sliznice (změny na úrovni kartáčového lemu enterocytů) až k totální atrofii klků, hypertrofii Lieberkuhnových krypt a infiltraci submukózy lymfocyty. Všechny tyto změny mohou v různém časovém úseku při dodržování bezlepkové diety regredovat (v závislosti na stupni poškození).

O vrozené genetické podstatě svědčí to, že se celiakie vyskytuje prakticky výlučně u jedinců s HLA-antigeny DQ2 nebo DQ8. I to, že bývá častěji sdružena

s dalšími autoimunitními onemocněními a její četnost je vyšší u příbuzných pacientů postižených celiakií [2].

2.1.1. Patogeneze onemocnění

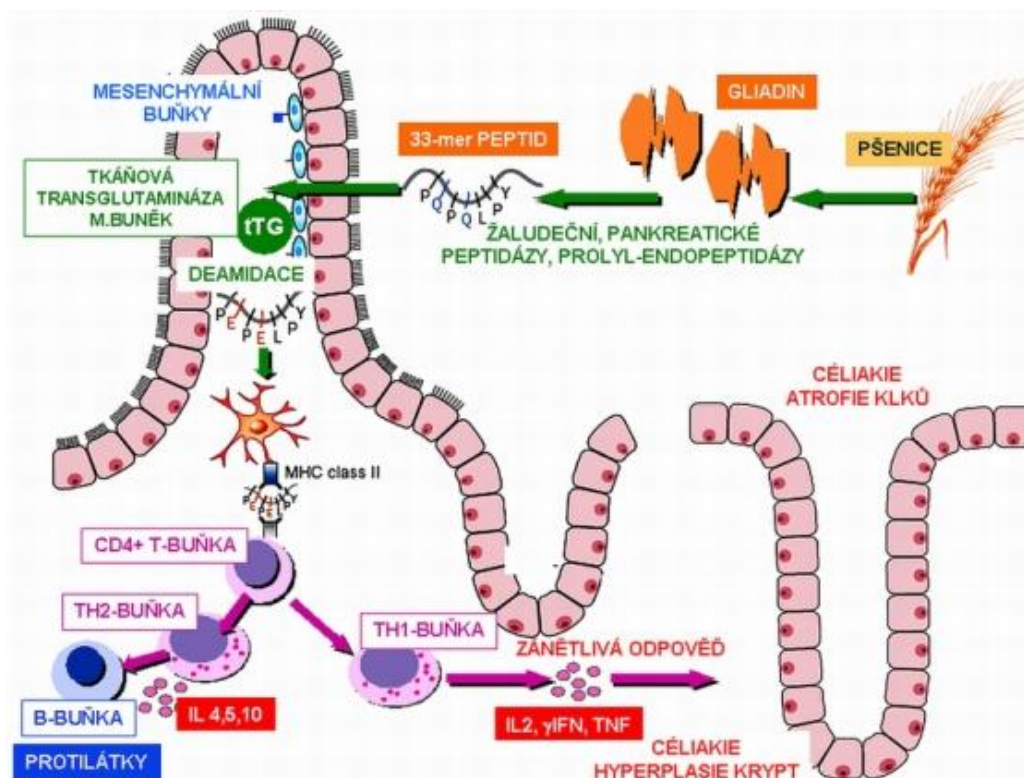
Ačkoli je celiakie považována za nejlépe prostudované autoimunitní onemocnění, patogeneze této nemoci je velmi složitá a některé kroky zůstávají stále neobjasněny.

Rozvoj onemocnění je jednoznačně podmíněn přítomností glutenu v potravě. Po jeho požití dojde k hydrolýze pšeničných proteinů trávicími enzymy - pepsinem, trypsinem, chymotrypsinem, elastasou, enteropeptidasami, karboxypeptidasami a enzymy kartáčového lemu enterocytů, čímž dojde k vzniku krátkých peptidů o délce maximálně několik desítek aminokyselin, které nejsou dále štěpitelné trávicími enzymy.[20]

Peptidy se potom transportují přes epitel tenkého střeva, do subepiteliální vrstvy, kde se nachází enzym tkáňová transglutaminasa. Mechanismus transportu není stále zcela objasněn a je vysoce pravděpodobné, že právě způsob, jakým jsou tyto krátké peptidy schopny prostoupit přes epiteliální vrstvu složenou z enterocytů, je jedním z klíčových kroků vzniku a rozvoje onemocnění [21]. Bylo potvrzeno, že některé genetické modifikace proteinů myosinového typu mají za následek zvýšení permeability buněčných membrán. Například gen MYO9B kóduje protein myosin typu IX, který obsahuje doménu pro Rho-GTPasa aktivující protein. Tato GTPasová doména katalyzuje přeměnu aktivního Rho-GTP na neaktivní Rho- GDP, čímž zasahuje do regulačních drah přestavby cytoskeletu a s tím spojených dějů a také mimo jiné ovlivňuje vlastnosti buněčných membrán [22]. Zvýšená permeabilita může být také ovlivněna nadměrnou expresí zonulinu, proteinu, který reguluje mezibuněčný transport.[23]

Fragmenty gliadinu jsou poté vysoce pravděpodobně modifikovány tkáňovou transglutaminasou [6]. Deaminované peptidy jsou zachyceny na buňkách prezentujících antigen (APC) navázáním na receptory HLA-DQ2 popř. HLA-DQ8 a tyto buňky je dále prezentují nezralým T buňkám. Ty je rozeznají jako antigen a díky vzájemné interakci dojde k diferenciaci T-buněk [24]. Enteropatie je potom indukována uvolněním interferonu g a dalších

prozánětlivých cytokinů produkovaných efektorovými T buňkami [25]. Rovněž dochází k uvolňování matrixových methaloproteinas, které mohou poškozovat sliznici tenkého střeva [21]. Průběh patogeneze zobrazen na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1. Průběh patogeneze. Gliadin v potravě je vystaven působení trávicích enzymů, včetně prolylendopeptidas, za vzniku dále neštěpitelných krátkých peptidů. Ty jsou poté transportovány do subepiteliální vrstvy a vystaveny působení tkáňové transglutaminasy (tTG), která specificky modifikuje některé glutaminové zbytky na glutamátové. Modifikované peptidy jsou pomocí APC (buňky prezentující antigen) prezentovány CD4+ T buňkám a dochází k interakci s HLA DQ2 nebo DQ8. Následkem toho dojde k rozvoji imunitní odpovědi, a to jak ke vzniku zánětlivé reakce, která poškozuje sliznici tenkého střeva, tak ke stimulaci B lymfocytů a produkci protilátek proti gliadinu a tkáňové transglutaminase. [25]

2.1.2. Gliadiny a gluteniny

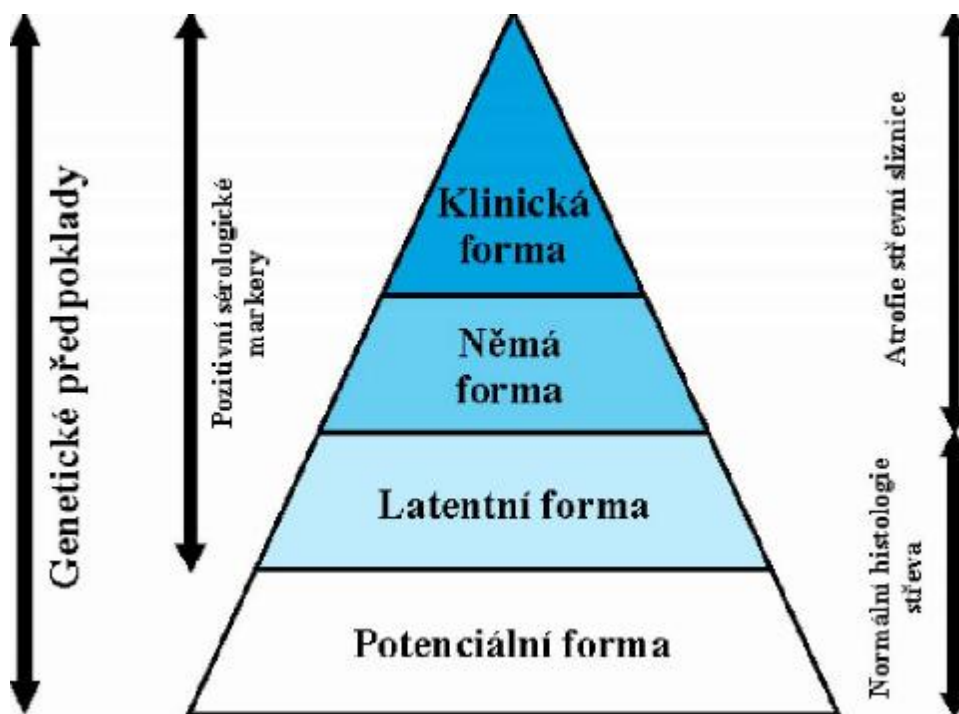
Gliadiny a gluteniny se řadí mezi zásobní proteiny prolaminy. Prolaminy jsou zásobními proteiny cereálií, nerozpustné ve vodě a roztocích solí, ale rozpustné ve 40-70% ethanolu [3]. Jsou uloženy v obalové vrstvě obilky - endospermu, bohaté na aminokyseliny: asparagin, glutamin, arginin nebo prolin. Naopak velice chudé jsou na esenciální aminokyseliny lysin, tryptofan a methionin [4]. Prolaminy pšenice (gliadiny), žita (sekaliny) a ječmene (hordeiny) jsou považovány za toxické ve vztahu k celiakii, zatímco prolaminy kukuřice (zeiny) a rýže (oryziny) jsou považovány za netoxické a názory na toxicitu prolaminů ovsa (aveniny) se různí [3].

Gliadiny jsou děleny do čtyř frakcí nazývaných alfa-, beta-, gama- a omega-gliadiny po rozdělení elektroforézou prováděnou v nízkém pH [5].

Gluteniny se dělí na nízkomolekulární a vysokomolekulární [6]

2.1.3. Klinické projevy

Příznaky onemocnění celiakií bývají velmi nespecifické a z tohoto důvodu většina případů není stále ještě diagnostikována. Pomůckou při klasifikaci celiakie je tzv. teorie ledovce. (Obrázek č. 2) [7]



Obrázek č. 2 - Teorie ledovce. Rozdělení jednotlivých forem celiakie na základě klinických projevů [7]

Klasická forma

Celiakie se může projevovat klasickými klinickými příznaky, které se liší v dětství a v dospělosti.

V dětství se u dětí po přidání obilných kaší do stravy objeví objemné mastné průjmy a dítě přestane prospívat (růst a přibývat na váze), může mít nafouklé břicho.

V dospělosti jsou typickými příznaky objemné mastné stolice, hubnutí, proteinoenergetická malnutrice a bolesti břicha. Tak se však v dospělosti projevuje celiakie jen u malého počtu pacientů, častěji jsou přítomny atypické příznaky, například zácpa, kombinovaná kostní nemoc (osteoporóza a osteomalacie) s možností zlomenin dlouhých kostí či obratlů, anémie, občasné pobolívání břicha, izolované zvýšení transaminas, únavový syndrom, plešatost - alopecie, neplodnost, aftózní stomatitida, epilepsie i deprese a další.

Celiakie se však může projevit až příznaky komplikací, například perforací střeva při maligním lymfomu, zlomeninou kostí při osteoporóze, nebo tzv. selháním střeva, kdy tenké střevo není schopné absorbovat žádné živiny, dochází k profúzním průjmům a je nutná úplná parenterální výživa. Rozlišujeme několik forem celiakie, přičemž klinicky diagnostikována je většinou forma symptomatická - s typicky vyjádřenými příznaky.

Pacient se symptomatickou formou celiakie má typické či atypické příznaky, pozitivní nález na sliznici tenkého střeva a pozitivní sérologické markery. Stejně se chová forma oligosymptomatická, kdy příznaky jsou málo vyjádřeny či atypické, nález na sliznici tenkého střeva je typický a jsou pozitivní sérologické ukazatele [2].

Tichá forma

Při tiché formě onemocnění pacient netrpí žádnými gastrointestinálními příznaky, ovšem výsledek sérologického screeningu je pozitivní a následná biopsie tenkého střeva diagnózu celiakie potvrdí [8].

Latentní forma

Jedinci trpící latentní formou onemocnění nemají žádné klinické příznaky a obvykle bývají diagnostikováni pomocí sérologických markerů. Histologický rozbor tenkého střeva je normální, ovšem s velkou pravděpodobností dojde během života k patologickým změnám v tenkém střevě [8].

Potenciální forma

Potenciální forma celiakie zahrnuje formy s negativními klinickými příznaky, negativním histologickým vyšetřením i negativními sérologickými markery. Pacienti však mají genetickou predispozici tohoto onemocnění, tedy ve svých enterocytech mají navázané HLA-antigeny DQ2 nebo DQ8 a také mohou mít zvýšený počet gama/delta lymfocytů v submukóze sliznice [2].

Kožní forma

Duhringova herpetiformní dermatitida je samostatná jednotka, jde o kožní manifestaci celiakie, která se projevuje puchýřky v typických místech (nad extenzory, napínači v kožních rýhách, na vlasaté části hlavy), které nereagují na běžné masti, ale reagují na sulfony - Dapson [2].

Na sliznici střeva jsou jen minimálně znatelné změny, nebo je postižení střevní sliznice mozaikovitě [9].

Stejně jako u celiakie je pozitivní reakce na bezlepkovou dietu, která umožní snížit či úplně vysadit léčbu sulfony [2].

2.1.4. Prevalence onemocnění

Prevalence (udává poměr nemocných jedinců k celkovému počtu jedinců ve sledované populaci) se v České republice odhaduje na 1:200-250, to znamená, že

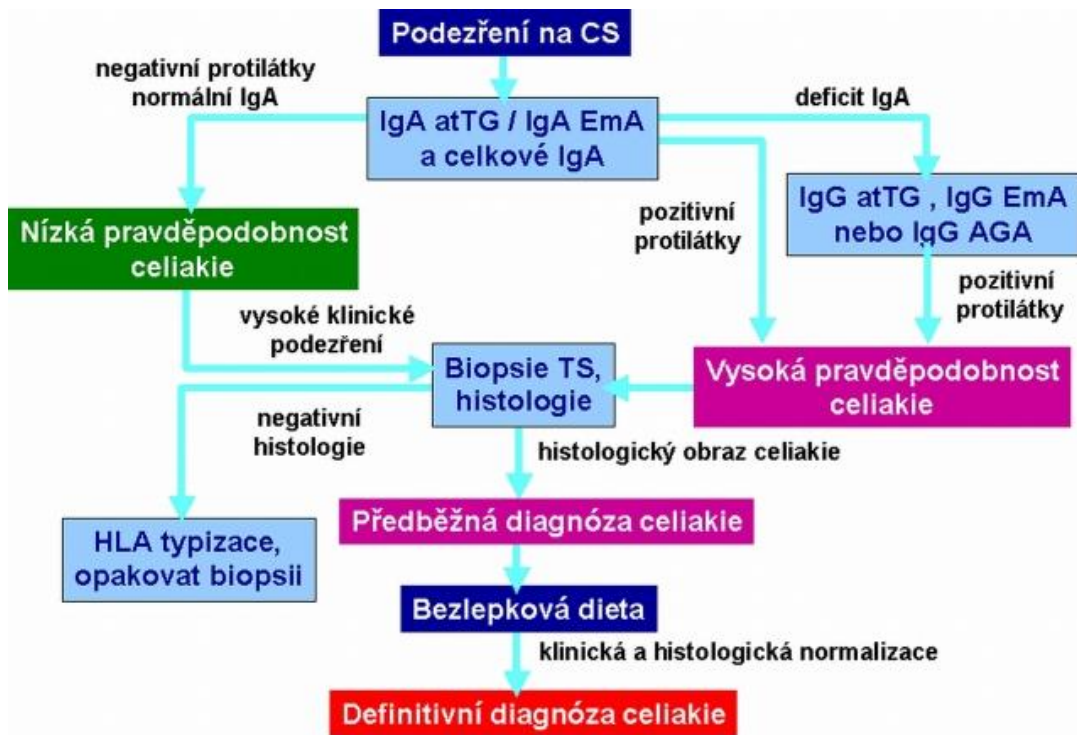
touto chorobou trpí okolo 40-50 tisíc osob, ze kterých je sledována v současné době pouze asi desetina [10].

2.2. Diagnostika celiakie

Přesná diagnostika celiakie je dosažena následujícími současnými diagnostickými směrnici a má na paměti, že intestinální biopsie zůstává stále jediným obecně přijatelným zlatým standardem diagnostiky. Stanovení je založené na doporučení odbornou společností ESPGAN (European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition = Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii a výživu), dále NASPGHAN (North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition = Severoamerická společnost pro dětskou gastroenterologii, hematologii a výživu).

Sérologicky se stanovují protilátky třídy IgA a IgG proti gliadinu, protilátky třídy IgA ke tkáňové transglutaminase a endomysiu. Pokud jsou výsledky testů pozitivní, je doporučena enterobiopsie. Ta se provádí ještě u neléčeného pacienta, aby se ukázalo, zda je sliznice porušena či nikoliv [11].

K rozvoji onemocnění může dojít v jakémkoli věku, ale nejčastěji bývá celiakie diagnostikována během prvních dvou let života, tedy v době, kdy se gliadin stává složkou potravy, dále potom v pubertě a ve středním věku. Z hlediska pohlaví bývá diagnostikováno více žen než mužů, ale současné studie se přiklánějí k tomu, že incidence bude ekvivalentní [8]. Na obrázku č. 3 je nakreslen postup při diagnostice celiakie.



Obrázek č. 3. Postup při diagnóze celiakie [25].

2.2.1. Sérologické testy

Antigliadinové protilátky - AGA (Anti-gliadin antibodies)

Detekce protilátek třídy IgA a IgG proti gliadinu (AGA) jsou nejčastěji a nejdéle používanými sérologickými markery. ELISA metody detekce AGA jsou běžně dostupné a z uvedených markerů celiakie jsou AGA nej levnější. Měření AGA je dobré pro dlouhodobé sledování aktuálního stavu pacienta dodávajícího bezlepkovou dietu. Ukazuje se, že IgG AGA dosahují lepší citlivosti, ale zároveň menší specifity v porovnání s IgA AGA [13].

Protilátky ke tkáňové transglutaminase - atTG (Anti-tissue translutaminase)

Protilátky třídy IgA ke tkáňové citlivosti (tTG), jsou pro diagnostiku velmi přínosné, protože poskytují dostatečnou citlivost a specifitu za rozumnou cenu. Pozitivní test na protilátky IgA tTG vede k odebrání histologického vzorku tenkého střeva. Pokud je test negativní, ale symptomy napovídají, že se jedná o celiakii, bývá doporučen test na IgG tTG. Je to z toho důvodu toho, že asi 3 procenta pacientů celiaků mají IgA deficienci [15]. Stanovení protilátek ke tkáňové transglutaminase (atTG) má velmi vysokou diagnostickou efektivitu (senzitivita 87-97 % a specifita 88-98 %) [14]

Protilátky k endomysiu - EmA (Endomysial antibodies)

Endomysium je pojivový protein hladkého svalstva nacházející se mezi myofibrilami. Pro stanovení protilátek proti endomysiu se používá metoda nepřímé imunofluorescence, jako substrát se používá například svalovina opičího jícnu [26]. Vyhodnocení fluorescence v mikroskopu není zrovna jednoduché a vyžaduje dlouhodobé zkušenosti. Endomysialní protilátky jsou rovněž velmi spolehlivým markerem celiakie (citlivost 83-95 % a specifita 94-99 %) [14].

2.2.2. Biopsie

Biopsie malého vzorku tenkého střeva se provádí dvěma metodami. A to častější enterobiopsií nebo méně častou hloubkovou duodenoskopií [13].

Enterobiopsie

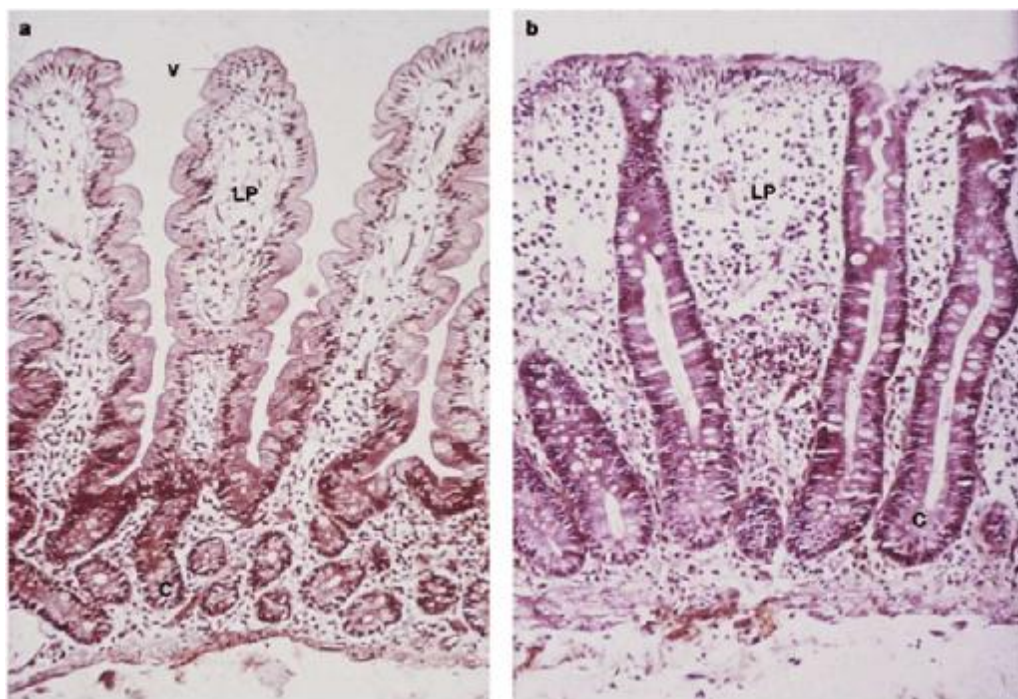
Navzdory příchodu klinicky přesných sérologických testů, je stále enterobiopsie důležitým vyšetřením vedoucím k vyvrácení nebo potvrzení celiakie. Může být také prováděna u rizikových pacientů, kteří mají sice sérologické testy negativní, ale lékař má velké podezření na toto onemocnění. Enterobiopsie se provádí i u pacientů trpících kožní formou Duhringovou herpetiformní dermatitidou.

Změny na střevní sliznici se mohou velice lišit: počínaje od částečné po totální atrofii klků. Mohou se také objevovat rozptýlená ložiska atrofovaných klků po celé délce tenkého střeva. Ukazatelem bývá i vysoká koncentrace epiteliálních lymfocytů [15].

Enterobiopsie se provádí za úplného vědomí, pouze u dětí se podávají sedativa. Ústy se vpraví do těla bioptická kapsle, která je připevněna na vodič. Posouvá se skrze jícn a žaludek až do duodena (dvanáctník), což je první oddíl tenkého střeva. Na rozdíl od endoskopie, bioptická kapsle se může zavést až do jejunu (lačník), kde je atrofie klků pravděpodobnější a pro diagnostiku přesnější [13]. Poloha kapsle v trávicí trubici se kontroluje pomocí rentgenových snímků břišní dutiny. Když je kapsle na správném místě v jejunu, působením podtlaku se kapsle otevře a odřízne se bioptický vzorek sliznice. Po vytáhnutí kapsle ven se zkontroluje, zda byl vzorek odebrán, a pokud ano, zašle se k histologickému vyšetření. Bioptický vzorek za pomoci mikroskopu vyhodnotí patolog [16].

Endoskopie

Za částečného znečítlivení lékař vede dlouhou úzkou trubicí, zvanou endoskop, skrze pacientova ústa, jícn a žaludek až do duodena. Endoskop má kameru, takže vyšetřující lékař přímo vidí, v které části trávicího systému se právě nachází. Endoskop se dostane nejdále na konec duodena. Oproti enterobiopsii může endoskopie vykazovat falešně negativní výsledky, protože se zánět může vyskytovat zatím jen v jejunu [17]. Biopsický vzorek za pomoci mikroskopu vyhodnotí patolog [16]. Na obrázku č. 4 je vidět porovnání zdravé sliznice a sliznice při onemocnění celiakií.



Obrázek č. 4. Zdravá sliznice a sliznice při onemocnění celiakii **a.** Histologie normální sliznice, s klky (V) a kryptami (C). Lamina propria neboli subepiteliální vrstva (LP) se nachází mezi kryptami a uvnitř každého klku. Nachází se tam mnoho krevních i lymfatických vlásečnic, kde dochází k absorpci produktů trávení. **b.** Sliznice při onemocnění celiakii je charakteristická atrofií klků, hyperplasií krypt a zvýšenou infiltrací lymfocytů v epitelu a subepiteliální vrstvě [18].

2.3. Imunofluorescence

Imunofluorescence (IF) patří mezi běžné laboratorní metody v současné medicíně. Slouží k detekci různých antigenů ve tkáních i buňkách, umožňuje však

také kvalitativní i kvantitativní průkaz protilátek. K vyhodnocování se používá fluorescenční mikroskop.

Přímá imunofluorescence používá značenou protilátku proti specifickým antigenům, přítomným ve tkáni nemocného. Protilátka pochází buď z imunizovaného zvířete nebo se může jednat o průmyslově produkovanou monoklonální protilátku. Antigen je detekován ve tkáni odebrané nemocnému biopsií.

Nepřímá imunofluorescence slouží k detekci autoprotilátek v séru nemocného. Tyto protilátky (sérum pacienta) reagují se substrátem. Jako substrát může sloužit normální tkáň jiného pacienta nebo (častěji) tkáň zvířecí nebo buňky standardních buněčných kultur. Navázané protilátky jsou detekovány pomocí jiných, značených protilátek, specifických vůči jednotlivým třídám lidských protilátek. [27]

2.3.1. Fluorescenční markery při vyhodnocení EmA

Endomysiální protilátky vytvářejí nepravidelné tenké sítě kolem sarkolemy. Ty jsou v ostrém kontrastu s jinými autoprotilátkami k hladkému svalstvu, které reagují se sarkoplazmou. Ostatní detekovatelné protilátky kromě protilátek ASMA obsahují také nukleární protilátky ANA, antimitochondiální protilátky AMA. Přítomnost ASMA, ANA, AMA protilátek je příčinou falešně negativních/pozitivních výsledků při stanovení endomysiálních protilátek.[38]

2.3.2. Fluorescenční mikroskopie

Metoda je založena na skutečnosti, že některé chemické látky (fluorochromy) po dopadu světla o kratší vlnové délce září světlem o delší vlnové délce - tedy světlem jiné barvy. Tento jev se nazývá fluorescence. Je projevem intramolekulové energetické změny vzbuzené v látce absorbovaným zářením.

Princip nejčastěji užívaného postupu spočívá ve vazbě fluorochromu na určitou buněčnou složku (polysacharid, protein), která pak při určité budící vlnové délce světla září světlem jiné vlnové délky. Aby světlo budící fluorescenci nevadilo při pozorování, musí být odstraněno bariérovým filtrem. Ten pohltí světlo vycházející z preparátu do objektivu a do okuláru propustí jen světlo

emitované fluorchromem. Výsledkem je tedy obraz různě barevných (v závislosti na použití typu fluorochromu) zářících struktur v temném poli.

Varianta této metody s použitím mnoha různých fluorochromů se užívá k vizualizaci buněčných jader, chromozomů, jadérek, cytoskeletu a jeho složek, specifických buněčných antigenů a dalších struktur. V mikrobiologii slouží k mikroskopickému průkazu mikroorganismů v klinických vzorcích (sputum, moč, kožní šupiny aj.). V imunodiagnostice se užívá k detekci buněčných antigenů sdružených s určitými chorobami. Podstata této imunofluorescenční metody je v tom, že molekuly protilátky (zpravidla monoklonální) označené navázaným fluorochromem se specificky vážou s molekulami buněčných a tkáňových antigenů, čímž vznikají komplexy (antigen+protilátka+fluorochrom), které ve vhodném budícím záření v mikroskopu fluoreskují a tím indikují přítomnost antigenu v buňce či tkáni. [30]

Některé které používané fluorochromy

FITC (fluorescein isothiokyanát) – maximum emise mezi 500-600 nm. Široce používán při imunofluorescenci. (Obrázek č. 5)

Hoechst (bisbenzimid) – barví DNA.

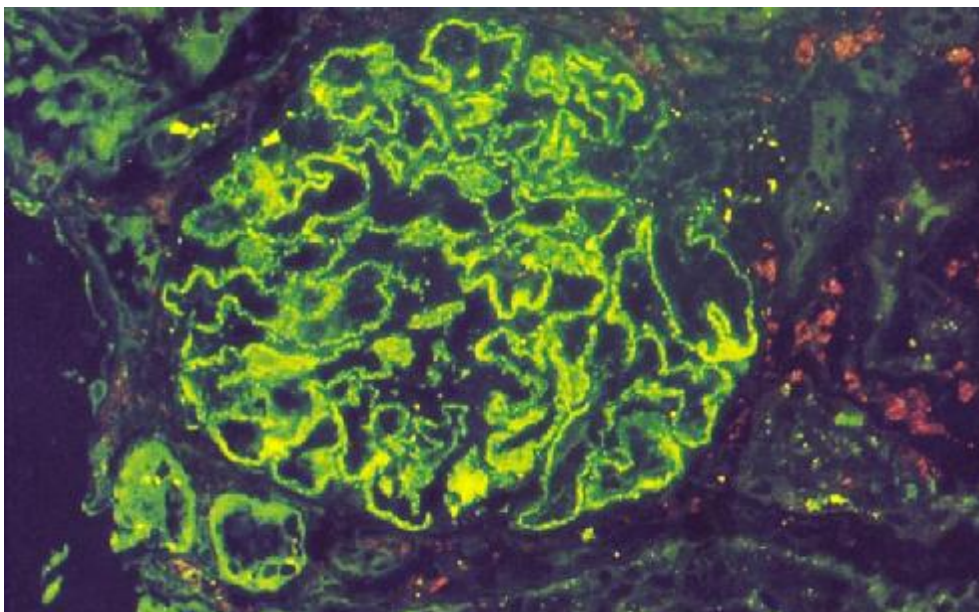
DAPI – váže se na DNA a RNA (barví se modře). (Obrázek č. 6)

Ethidium bromid – váže se na dvouřetězcovou DNA a RNA (barví se oranžově).

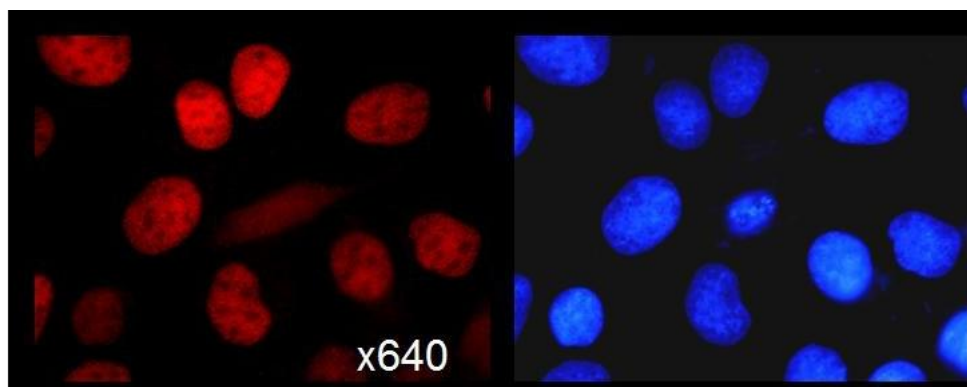
Propidium Jodid – Barví DNA (barví se červeně). (Obrázek č. 6)

Acridinová oranž – váže se na DNA (barví se zeleně) a RNA (barví se tmavě červeně).

Congo Red – váže se na amyloid (barví se růžově). [31]



Obrázek č. 5 - Imunofluorescence s použitím fluorochromu FITC [31]



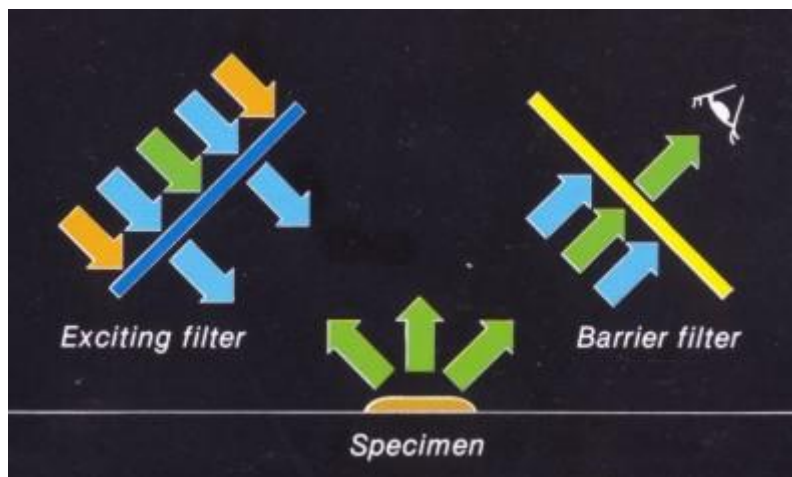
(Zdroj - <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2121-10-50-S1.jpeg>)

Obrázek č. 6 – Příklad dalších používaných fluorochromů - zleva propidium jodid, DAPI. [33]

Fluorescenční mikroskop

Pro dobré pozorování emisního záření jehož intenzita je vždy mnohem nižší než intenzita excitačního záření, je použita dvojice filtrů – bariérový filtr a excitační (obrázek. č. 7). Excitační filtr propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí. Bariérový filtr propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu.

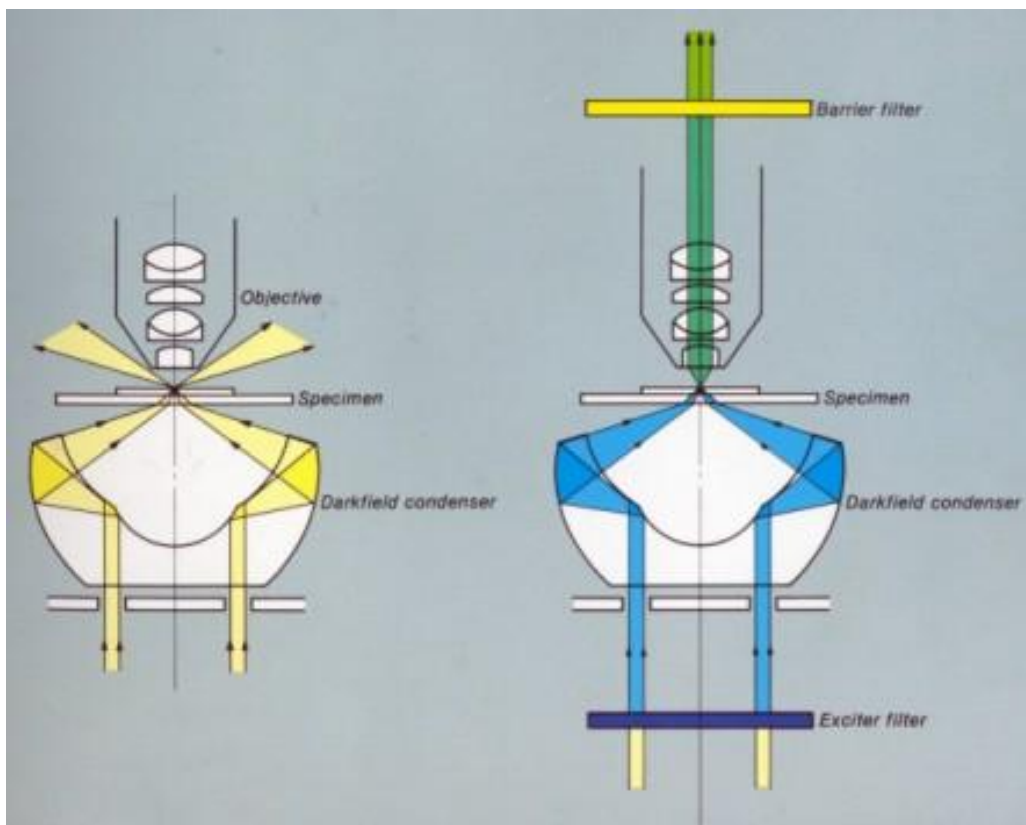
Jako zdroj světla se u fluorescenčního mikroskopu používá rtuťová výbojka. Podle konstrukce se fluorescenční mikroskopy dělí na dvě skupiny. [28]



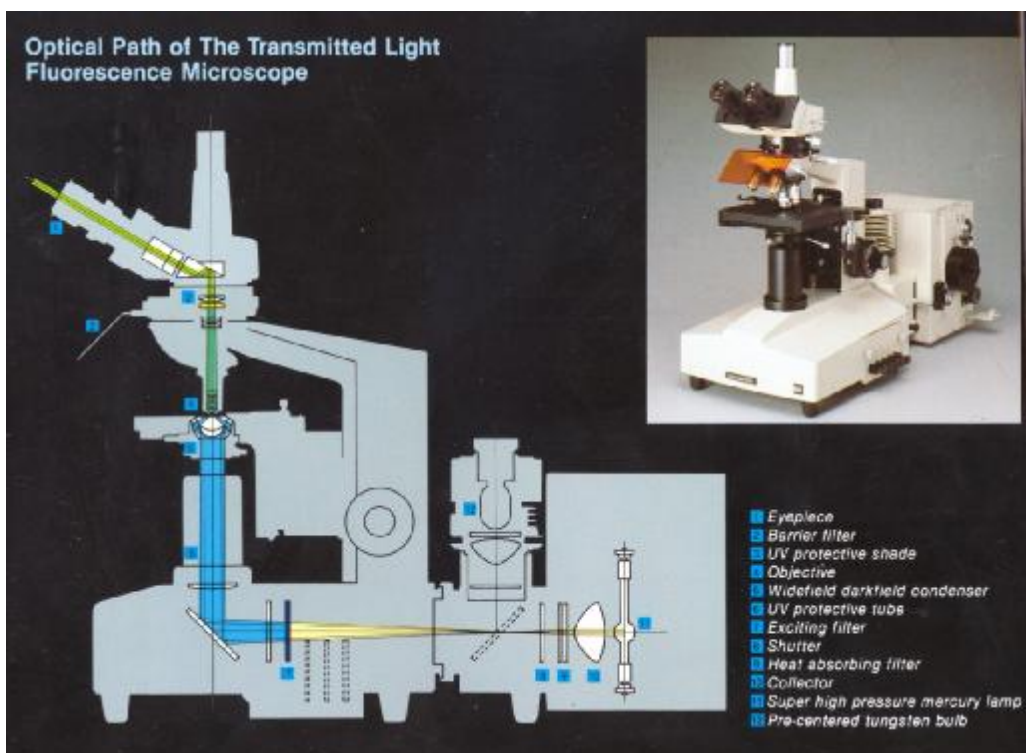
Obrázek č. 7 - Excitační a bariérový filtr. [31]

Transmisní fluorescenční mikroskop

U tohoto typu mikroskopu prochází světlo excitačním filtrem a na preparát přichází zespodu jako u klasického světelného mikroskopu. Pro osvětlení preparátu se používá kondenzor zástinový (obrázek č. 8), který odráží světlo tak, že dopadá na preparát světlo z boku. Procházející excitační světlo tak letí mimo objektiv a do objektivu se dostane emitovaná fluorescence.[28] Schéma tohoto typu mikroskopu je na obrázku č. 9.



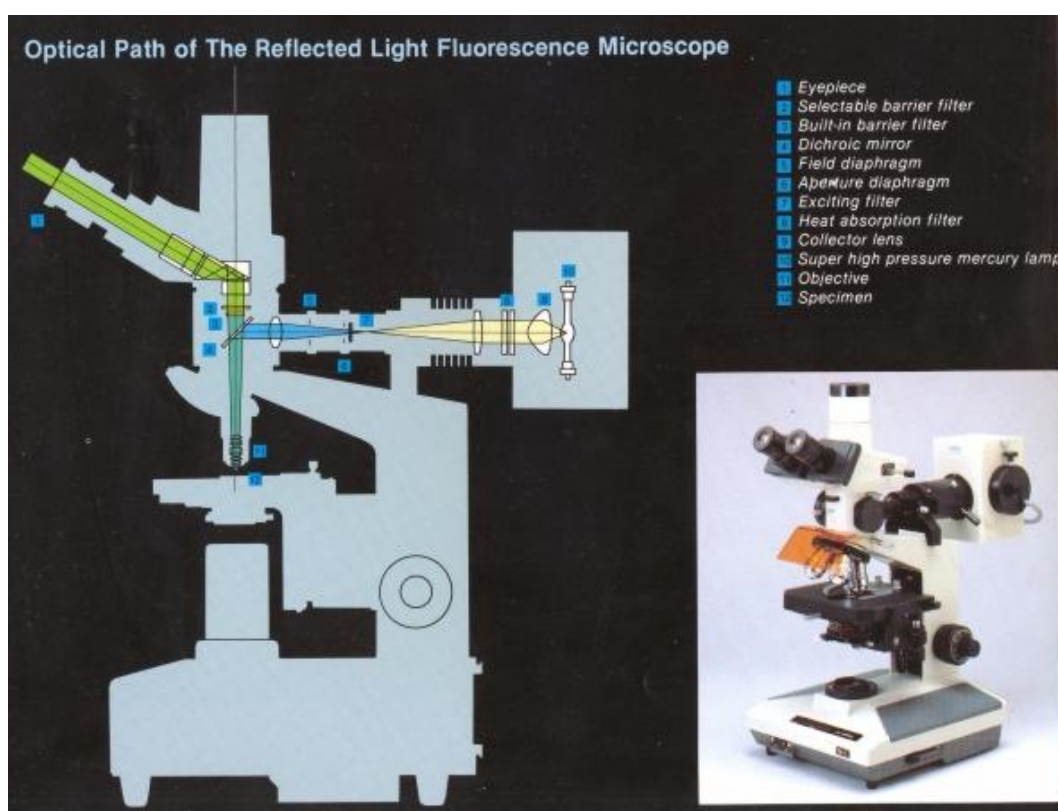
Obrázek č. 8 - Zástinový kondenzor používaný u transmisního fluorescenčního mikroskopu. [31]



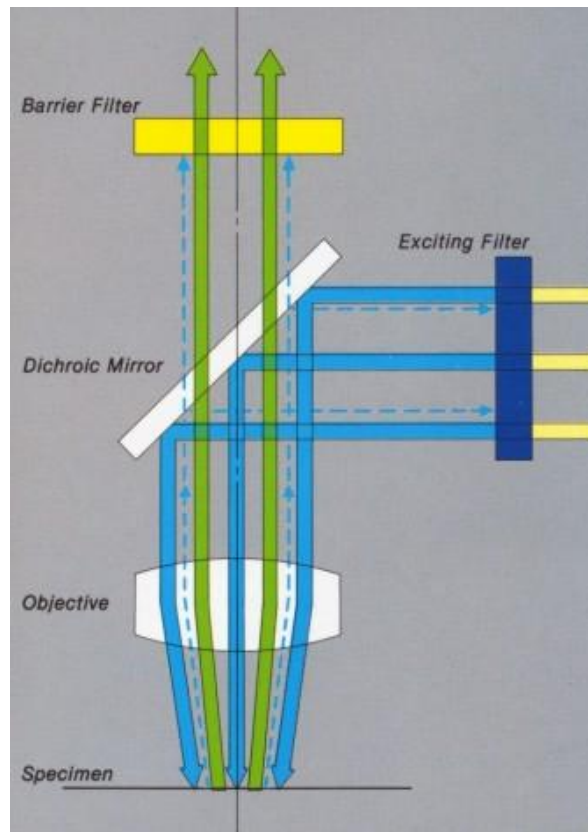
Obrázek č. 9 – Transmisní fluorescenční mikroskop. [31]

Epifluorescenční mikroskop

U tohoto typu mikroskopu prochází excitační světlo objektivem, dopadá na preparát shora a emisní světlo se vrací zpět do objektivu.[31] Schéma tohoto typu mikroskopu je na obrázku č. 10. Zde je třeba použít dichroické zrcadlo (obrázek č. 11). To propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Používá se takový typ zrcadla, který maximum excitačního světla odráží a maximum emisního světla propouští [31]



Obrázek č. 10 - Epifluorescenční mikroskop. [31]



Obrázek č. 11 - Uspořádání filtrů a dichroického zrcadla u epifluorescenčního mikroskopu. [31]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístrojové a materiálové vybavení

3.1.1. Přístrojové vybavení

K vyhodnocení byl použit fluorescenční mikroskop:

Zeiss Jena Modell Jenalumar

Carl Zeiss Jena

Fluorescenční nástavec IF FK11

Zdroj světla - SH 250



Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 12. – Fluorescenční mikroskop Zeiss Jena Modell Jenalumar

Pro pořízení snímků byl použit kompaktní digitální fotoaparát s redukčním nástavcem pro mikroskopy a tímto nastavením:

Olympus C-4040 Zoom

Manuální nastavení:

ExposureTime - 1/1.6 seconds

Clona-FNumber - 8.00
ISO Speed Ratings - 200
Exposure Bias Value - -1.30
2048 x 1536 bodů (3.15 MPixels)



(Zdroj - <http://www.create-designs.com/ewidgets/digitalcamera.html>)

Obrázek č. 13 – Digitální fotoaparát Olympus C-4040 Zoom

3.1.2. Diagnostické soupravy

K měření byly použity tyto 3 EmA soupravy (sety):

Anti-Endomysium antibodies AEA (výrobce BioSystems S.A)

Obsah:

- 1) Sklíčka -12 sklíček po 8 jamkách, každá jamka obsahuje řez opičím jícnu (endomysium)
- 2) PBS (10x) - 1 x 100 ml – fosfátový pufr (ředění 1:10 destilovanou vodou)
- 3) Pozitivní kontrola 2 x 0,3 ml – obsahuje lidské sérum
- 4) Negativní kontrola 2 x 0,3 ml - obsahuje lidské sérum

5) IgA FITC/Evansova modř 2 x 2,5 ml – (konjugát) - kozí anti-human IgA protilátky konjugované s fluorescein izothiokyanátem (FITC), Evansova modř

6) Montovací medium 1 x 3 ml

7) Odsávací papír 1 x 12

ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit (výrobce IMMCO Diagnostics)

Obsah:

1) Sklíčka - 8 sklíček po 6 jamkách, každá jamka obsahuje řez opičím jícnu (endomysium)

2) PBS – fosfátový pufr - 2 lahvičky, 1 lahvička – 1 litr PBS

3) Pozitivní kontrola 1 x 0,5 ml - obsahuje lidské sérum

4) Negativní kontrola 1 x 0,5 ml - obsahuje lidské sérum

5) IgA/IgG FITC/Evansova modř 1 x 5 ml – konjugát - anti-human polyvalentní protilátky konjugované s fluorescein izothiokyanátem (FITC), Evansova modř

6) Roztok na ředění vzorků – 1 x 60 ml

7) Montovací medium 1 x 5 ml

8) Krycí sklíčka 1 x 12

IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10 (výrobce ViroImmun LaborDiagnostika GmbH)

Obsah:

1) Sklíčka -10 sklíček po 5 jamkách, každá jamka obsahuje řez opičím jícnu (endomysium)

2) PBS 1x – fosfátový pufr – ředění s destilovanou vodou do 1 litru

3) Pozitivní kontrola 1 x 0,5 ml – obsahuje lidské sérum

- 4) Negativní kontrola 1 x 0,5 ml - obsahuje lidské sérum
- 5) FITC IgA anti-human konjugát 1 x 2 ml
- 6) Evansova modř 1x 3 ml
- 6) Montovací médium 1 x 3 ml
- 7) Odsávací papír

3.1.3. Pacientská séra

Bylo vybráno 40 zmražených patientských sér pocházející z gastroenterologické laboratoře ÚKBLD VFN v Praze. Séra byla již v minulosti vyhodnocena a vyfocena setem Anti-Endomysium antibodies AEA. Dále u všech sér již byly stanoveny protilátky IgA, IgG a atTG. Dle stanovených protilátek IgA, IgG a atTG a EmA bylo 20 pacientů negativních a 20 pacientů pozitivních. Věk testovaných pacientů byl od 11 do 67 let. Testováno bylo 29 žen a 11 mužů.

3.2. Metodika měření

Všechna séra pro všechny sety byla v laboratoři ÚKBLD ředěna v poměru **1:20**, jinak byl postup přísně dodržen dle pokynů výrobce.

3.2.1. Princip metod

Anti-endomysiální protilátky ze séra se vážou na odpovídající antigeny přítomné v řezu opičího jícnu. Ke zviditelnění komplexu antigen protilátka je použito sérum s anti-human imunoglobulinem A (IgA) značeným fluoresceinem. Vyhodnocení se provádí fluorescenčním mikroskopem.[37]

3.2.2. Set Anti-Endomysium antibodies AEA – rutinní metoda laboratoře ÚKBLD

Pracovní postup daný výrobcem:

1. Temperace reagentů a vzorků na pokojovou teplotu.
2. Kápnout 1 kapku (50 .l) naředěného vzorku (sérum zředit v poměru **1:5**), nebo kontroly do každé jamky s tkáňovým řezem. Kompletně pokrýt.

3. Inkubace sklíček 30 minut při pokojové teplotě (15-30 °C) uvnitř zvlhčovací komůrky.

4. Naklonit sklíčko a opatrným poklepáním o filtrační papír odstranit přebytečné kapky vzorku. Pozor na cross-kontaminaci.

5. Oplach krátce v lehkém proudu PBS

6. Sklíčka promýt v nádobě obsahující PBS po dobu **5 minut**. Poté PBS vyměnit a promývání zopakovat.

7. Opatrně sklíčko osušit s použitím odsávacího papíru. Jamky nevysušovat.

8. Do každé jamky přidat 1 kapku konjugátu. Sklíčka inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (15-30 °C) ve zvlhčovací komůrce.

9. Promýt podle bodu 6 a osušit podle bodu 7.

10. Přidat do každé jamky několik kapek montovacího média a opatrně přikrýt krycím sklíčkem tak, aby nevznikly vzduchové bubliny.

11. Vyhodnocení fluorescenčním mikroskopem s excitačním filtrem 495 nm a 525 emisním. [34]

Další nutné vybavení:

- Zvlhčovací komůrka
- Promývací nádoba
- Krycí sklíčka 24 x 60 mm

3.2.3. Set Immuglo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit

Pracovní postup daný výrobcem:

1. Temperace reagentů a vzorků na pokojovou teplotu.

2. Kápnout 1 kapku (50 .l) naředěného vzorku (sérum zředit **1:2,5**), nebo kontroly do každé jamky s tkáňovým řezem. Kompletně pokrýt.

3. Inkubace sklíček 30 minut při pokojové teplotě uvnitř zvlhčovací komůrky.

4. Naklonit sklíčko a opatrným poklepáním o filtrační papír odstranit přebytečné kapky vzorku. Pozor na cross-kontaminaci.

5. Oplach krátce v lehkém proudu PBS
6. Sklíčka promýt v nádobě obsahující PBS po dobu **10 minut**.
7. Opatrně sklíčko osušit použitím papírového ručníku přiložením na okraj jamky. Obsah jamky nevysušovat.
8. Do každé jamky přidat 1 kapku konjugátu. Sklíčka inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě ve zvlhčovací komůrce.
9. Odebrat sklíčko ze zvlhčovací komůrky a znova promýt v nádobě obsahující PBS po dobu **10 minut**.
10. Zopakovat bod 7.
11. Nakapat rovnoměrně na sklíčko 3 kapky montovacího média tak aby po přikrytí krycího sklíčka bylo montovací médium rovnoměrně po celé ploše sklíčka bez vzduchových bublin. [35]

Další nutné vybavení:

- Zvlhčovací komůrka
- Promývací nádoba
- Papírový ručník

3.2.4. Set IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10

Pracovní postup daný výrobcem:

1. Temperace reagentů a vzorků na pokojovou teplotu.
2. Kápnout 1 kapku (20 - 50 .l) naředěného vzorku (sérum zředit v poměru **1:10**), nebo kontroly do každé jamky s tkáňovým řezem. Kompletně pokrýt.
3. Inkubace sklíček 30 minut při pokojové teplotě (15-30 °C) uvnitř zvlhčovací komůrky.
4. Naklonit sklíčko a opatrným poklepáváním o filtrační papír odstranit přebytečné kapky vzorku. Pozor na cross-kontaminaci.
5. Oplach krátce v lehkém proudu PBS.
6. Sklíčka promýt v nádobě obsahující PBS po dobu **3 x 5 minut**. Poté PBS vyměnit a promývání zopakovat.

7. Opatrně sklíčko osušit s použitím odsávacího papíru. Jamky nevysušovat.
8. Do každé jamky přidat 1 kapku konjugátu. Sklíčka inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (15-30 °C) ve zvlhčovací komůrce ve tmě.
9. Promýt podle bodu 6 a osušit podle bodu 7.
10. Přidá se 5 kapek Evansovy modři do 100 ml PBS roztoku a promýváme v nádobě 5 minut.
11. Sklíčka krátce opláchneme PBS roztokem, opatrně setřeseš přebývajícím PBS roztokem a aplikujeme 2 – 3 kapky montovacího média na sklíčko. Poté jemně přiložíme krycí sklíčko, aby nevznikaly vzduchové bubliny.
12. Do 30 minut odečítáme na fluorescenčním mikroskopu se zvětšením 400 až 800. [36]

Další nutné vybavení:

- Zvlhčovací komůrka
- Promývací nádoba
- Krycí sklíčka 24 x 60 mm

3.3. Statistické zpracování výsledků

Četnost

Provedeme-li náhodný výběr o rozsahu n , mohou se některé hodnoty opakovat vícekrát. Počet výskytů n_i hodnoty x_i označujeme jako (absolutní) četnost pozorování hodnoty x_i . Poměr n_i/n nazýváme poměrnou (relativní) četností pozorování x_i . Tedy součet četností je roven rozsahu n . Podobně je součet relativních četností roven 1.

Součet četností všech pozorování, která nepřevyšují hodnotu x_i , označujeme jako kumulativní četnost pozorování x_i . Součet poměrných četností všech pozorování, která nepřevyšují hodnotu x_i , se nazývá kumulativní poměrnou (relativní) četností pozorování x_i .

Základní přehled o zjištěných hodnotách určité proměnné poskytuje rozdělení četností jednotlivých kategorií. To může být prezentováno ve dvou

formách a to v tabulce nebo grafu. V sociálních vědách je tato základní analýza nazývána jako třídění 1. stupně. [39]

Korelace

Korelace znamená vzájemný vztah mezi dvěma procesy nebo veličinami. Pokud se jedna z nich mění, mění se korelativně i druhá a naopak. Pokud se mezi dvěma procesy ukáže korelace, je pravděpodobné, že na sobě závisejí, nelze z toho však ještě usoudit, že by jeden z nich musel být příčinou a druhý následkem. To samotná korelace nedovoluje rozhodnout.

V určitějším slova smyslu se pojem korelace užívá ve statistice, kde znamená vzájemný lineární vztah mezi znaky či veličinami x a y . Míru korelace pak vyjadřuje korelační koeficient, který může nabývat hodnot od -1 až po $+1$. [39]

Korelace ve statistice

Vztah mezi znaky či veličinami x a y může být kladný, pokud (přibližně) platí $y = kx$, nebo záporný ($y = -kx$). Hodnota korelačního koeficientu -1 značí zcela nepřímou závislost, tedy čím více se zvětší hodnoty v první skupině znaků, tím více se zmenší hodnoty v druhé skupině znaků, např. vztah mezi uplynulým a zbývajícím časem. Hodnota korelačního koeficientu $+1$ značí zcela přímou závislost, např. vztah mezi rychlostí bicyklu a frekvencí otáček kola bicyklu. Pokud je korelační koeficient roven 0 , pak mezi znaky není žádná statisticky zjištělná lineární závislost. Je dobré si uvědomit, že i při nulovém korelačním koeficientu na sobě veličiny mohou záviset, pouze tento vztah nelze vyjádřit lineární funkcí, a to ani přibližně. [39]

Kontingenční tabulky

Neparametrická metoda se používá k zjištění, zda mezi dvěma znaky existuje prokazatelný výrazný vztah. Znaky mohou být:

- kvalitativní,
- diskrétní kvantitativní,

- spojité kvantitativní, ale s hodnotami sloučenými do skupin.

Máme-li dva takové znaky, uspořádáme data do kontingenční tabulky. Kategorie jednoho znaku určují řádky a kategorie druhého znaku sloupce. Jednotlivá pozorování jsou zařazena do příslušné buňky kontingenční tabulky podle hodnot daných dvou znaků. Pokud jeden ze znaků má r kategorií a druhý znak má s kategorií, dostáváme kontingenční tabulku typu $r \times s$. Kontingenční tabulku typu 2×2 nazýváme čtyřpolní tabulka. [40]

Pro statistické zpracování byl použit program MS Excel 2003 ve kterém byly vytvářeny kontingenční tabulky a korelační analýzy.

4. VÝSLEDKY

4.1. Mikroskopické hodnocení

4.1.1. Vyhodnocení výsledků setu Anti-Endomysium antibodies AEA

Na obrázku č. 14 je vidět vyhodnocený negativní vzorek. Je ale patrné, že i když je negativní, není bez světélkující zelené, jak by měl být vzorek v ideálním případě.

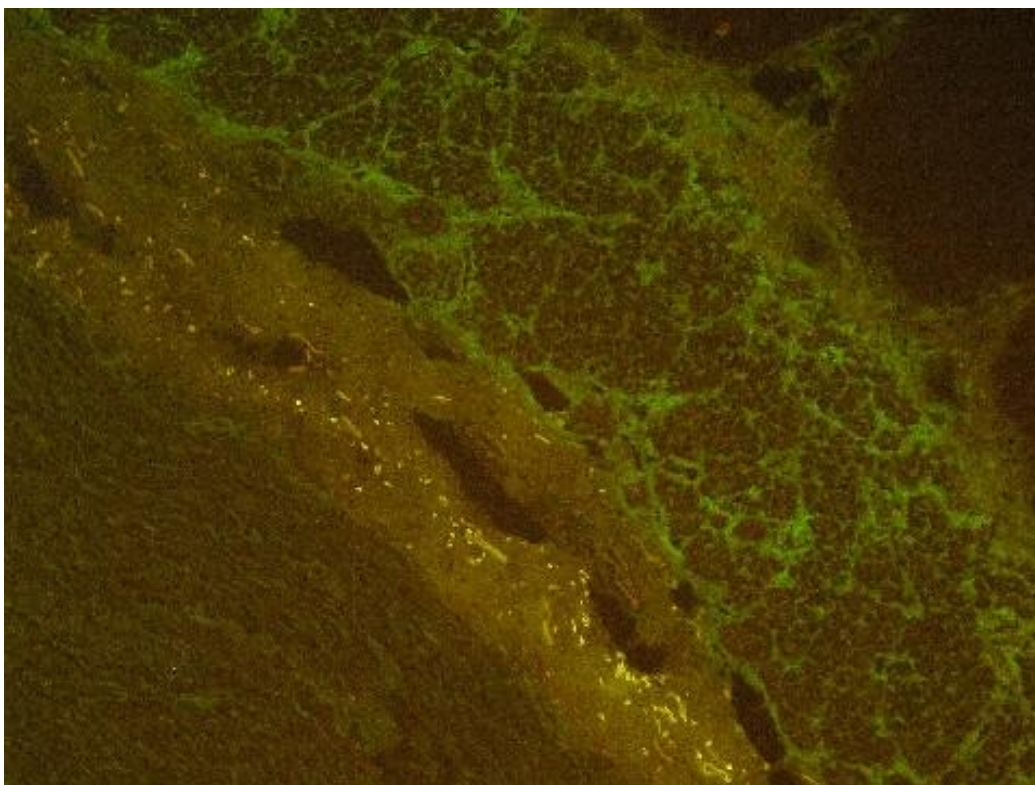


Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 14 - Příklad negativního vzorku soupravy Anti-Endomysium antibodies AEA

Na obrázku č. 15 je jasně zářící fluorescenční barvivo, které nám dělá vzorek jasně pozitivním, je ale patrné, že svítí i jiné struktury než je endomysium.

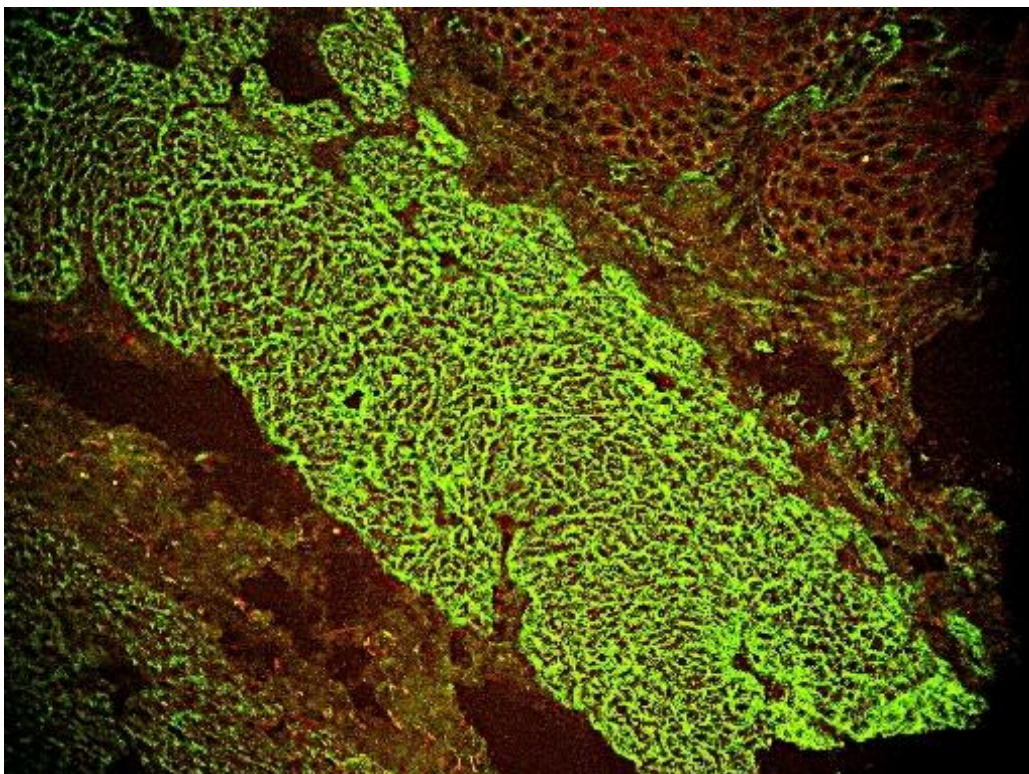


Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 15 – Příklad pozitivního vzorku soupravy Anti-Endomysium antibodies AEA

4.1.2. Vyhodnocení výsledků setu ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit

Na obrázku č. 16 je vidět velmi silné endomysium, které se velmi dobře ve fluorescenčním mikroskopu hledalo. Na tomto obrázku se vidět negativní vzorek.

Obrázek č. 17 jasně vystihuje pozitivní vzorek, kdy jasně září veliké endomysialní struktury.

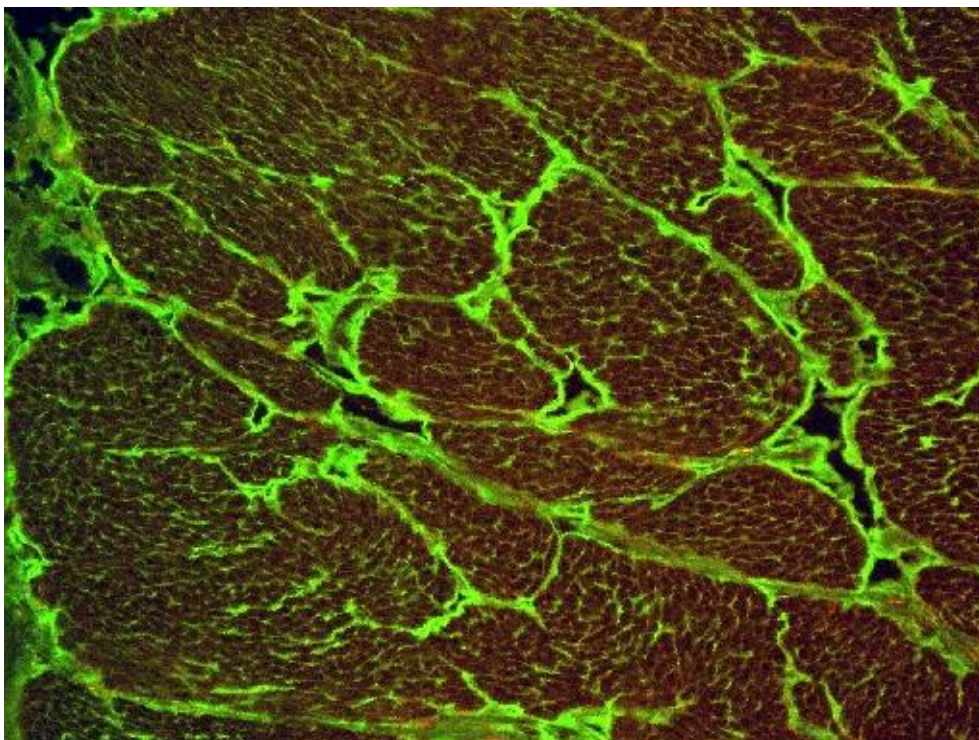


Foto Petr Kocna, ÚKB LD

Obrázek č. 16 – Příklad negativního vzorku soupravy ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit

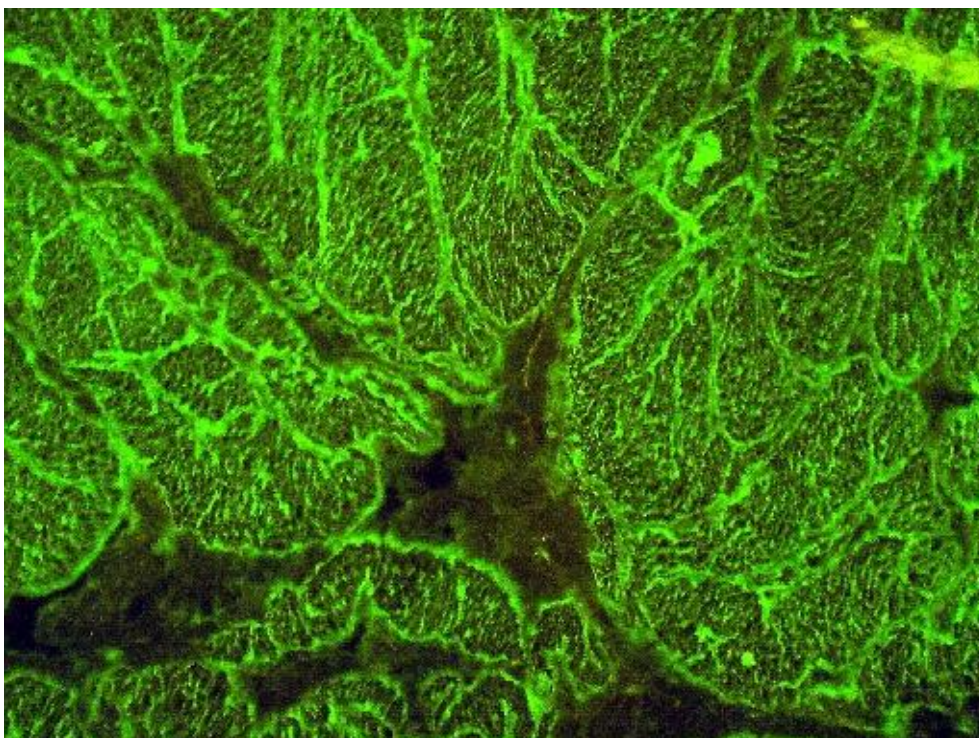


Foto Petr Kocna, ÚKB LD

Obrázek č. 17 – Příklad pozitivního vzorku soupravy ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit

4.1.3. Vyhodnocení výsledků setu IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10

Negativita u této soupravy je velmi čistá. (viz obrázek č. 18)

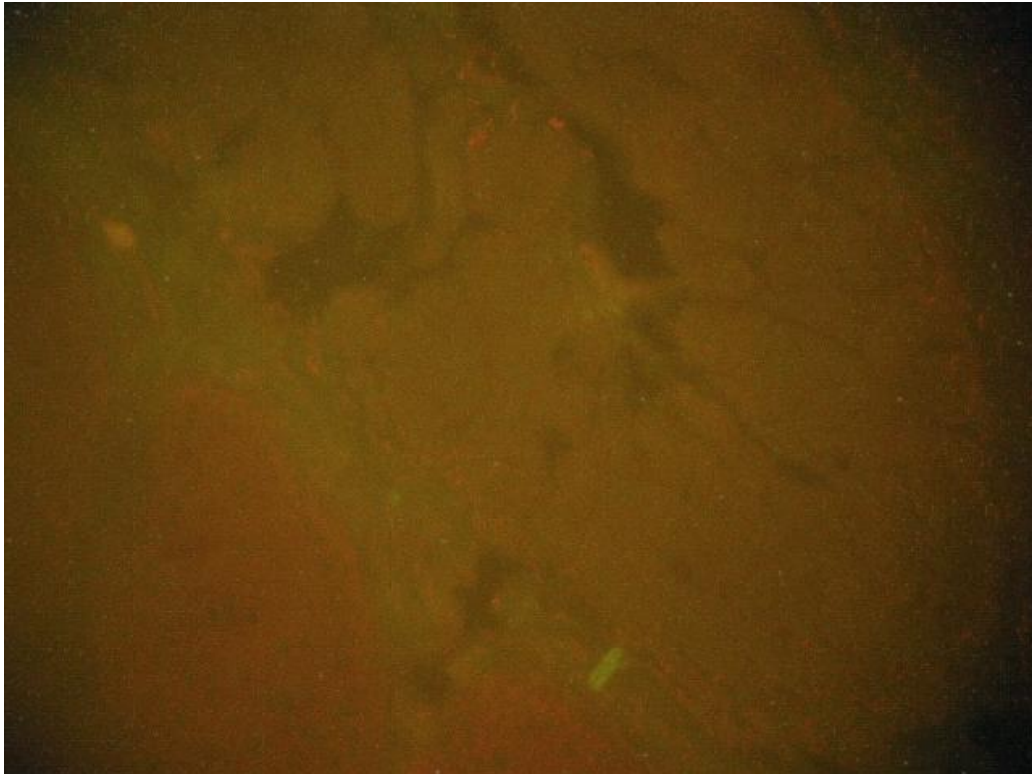


Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 18 – Příklad negativního vzorku soupravy IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10

Na obrázku č. 19 je vidět jasně pozitivní vzorek, kde svítí prakticky jenom endomysium a žádné jiné struktury.

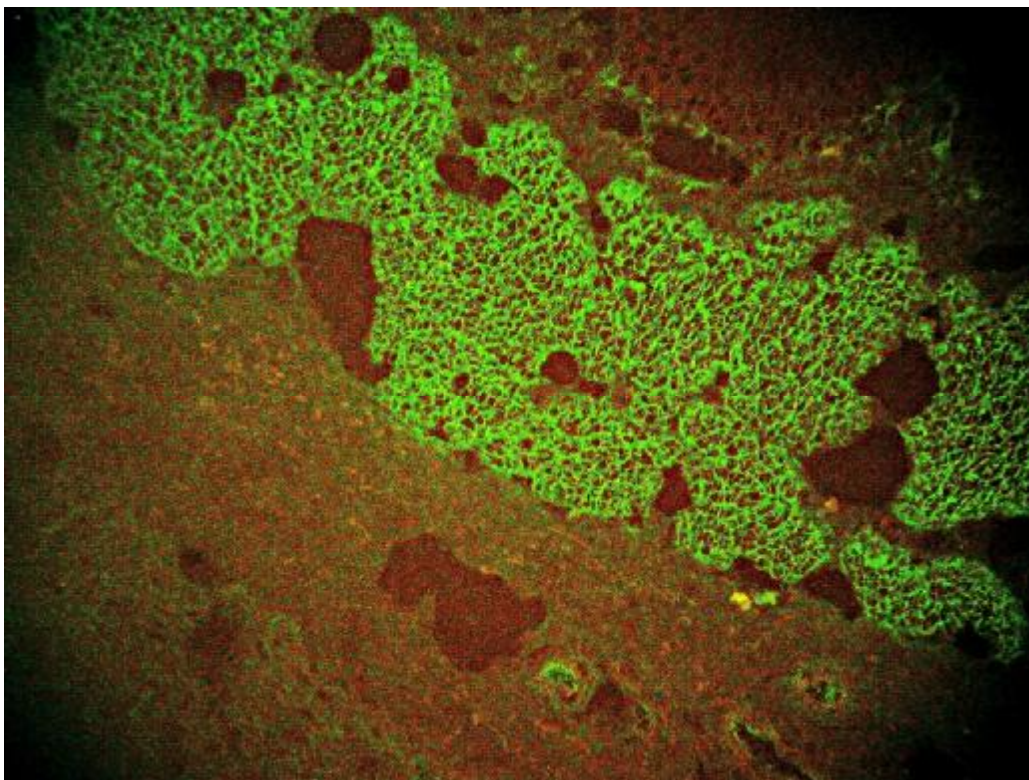


Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 19 – Příklad pozitivního vzorku u soupravy IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10

4.1.4. Mikroskopické vyhodnocení nejednoznačných vzorků

Všechny tři sety výrobců jsou u problematického vzorku nejednoznačné – je to způsobeno vlivem zvýšených jiných autoprotilátek např. AMA, ASMA, ANA.

Ve statistickém hodnocení jsou tyto vzorky popsány jako **negativita + X** v případě, že nesvíí endomysium, ale svítí stejně intenzivně jako pozitivní vzorek endomysia, jiná struktura tkáně. Pokud jasně svítí pozitivní struktura endomysia a zároveň svítí i jiné struktury, je vzorek označován termínem **pozitivita + X**. Tyto termíny jsou používány pouze v rámci laboratoře ÚKBLD pro jednoznačný popis vyhodnocení.

Na obrázcích 20, 21, 22 a 23 je vidět jak struktura hladkého svalstva svítí, ale nejsou tvořeny nepravidelné tenké sítě, které vytvářejí endomysialní protilátky (negativita + X). Tento obrázek vytvářejí protilátky k hladkému svalstvu reagující se sarkoplazmou.

Na obrázku č. 20 je vidět, že svítí jiné struktury, než na předchozím obrázku, jsou zobrazeny jiné protilátky než proti endomysiu.

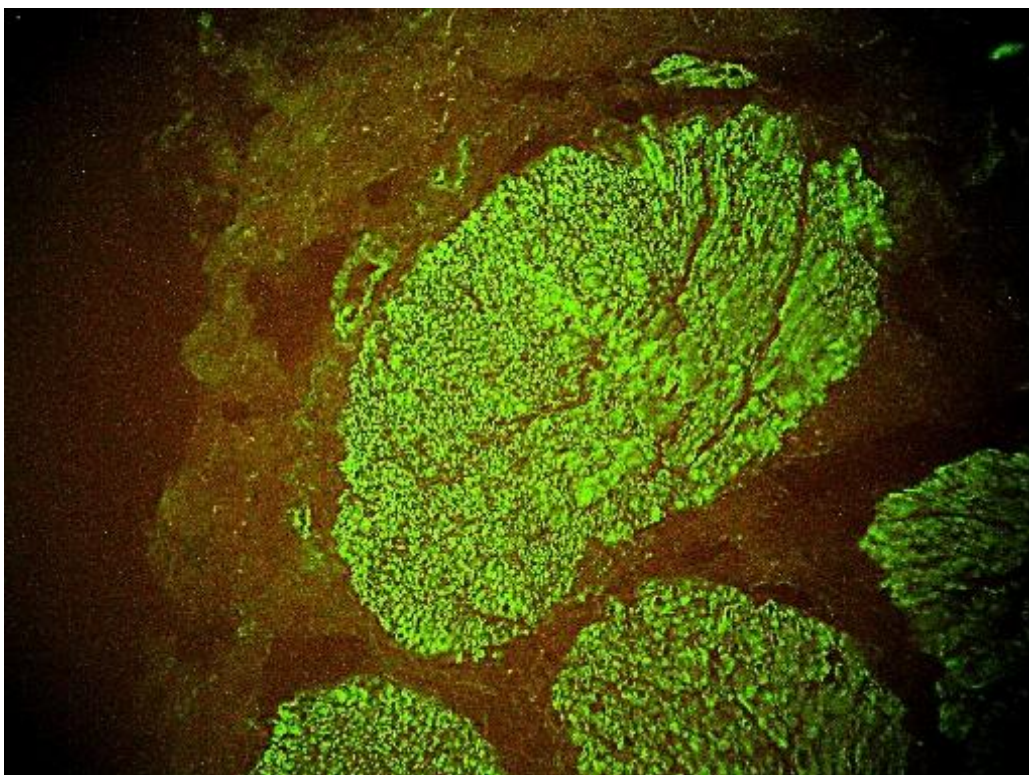


Foto Petr Kocna, UKBLD

Obrázek č. 20. Příklad falešně pozitivního vzorku u soupravy Anti-Endomysium antibodies AEA

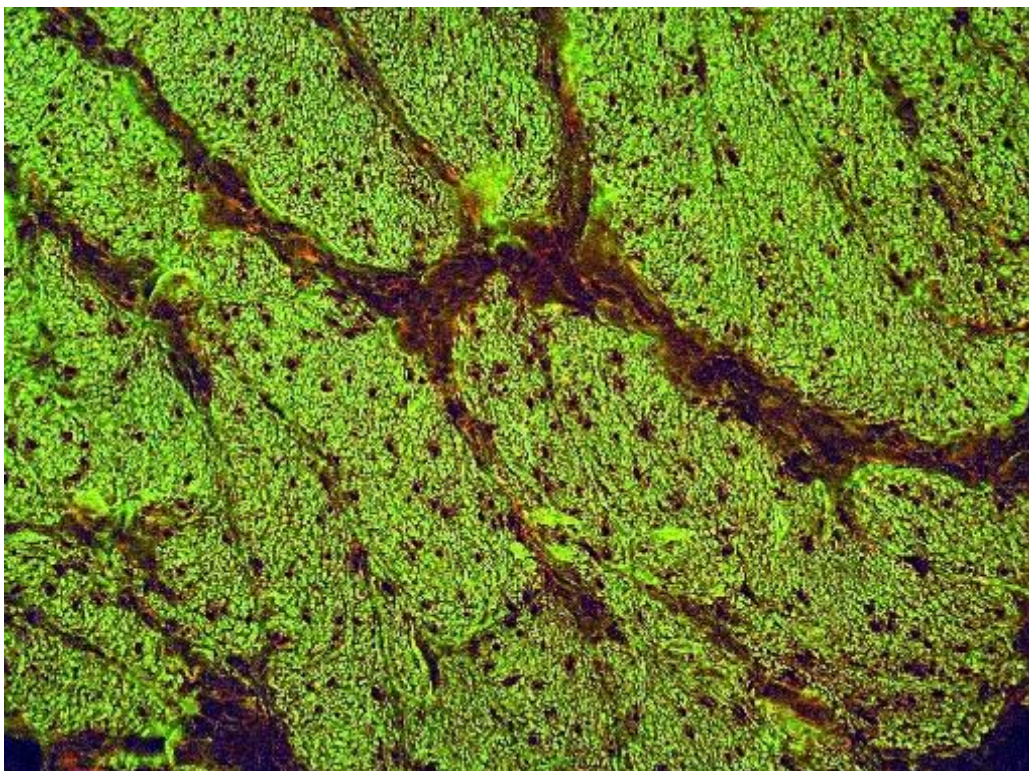


Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 21. Příklad falešně pozitivního vzorku u soupravy ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit

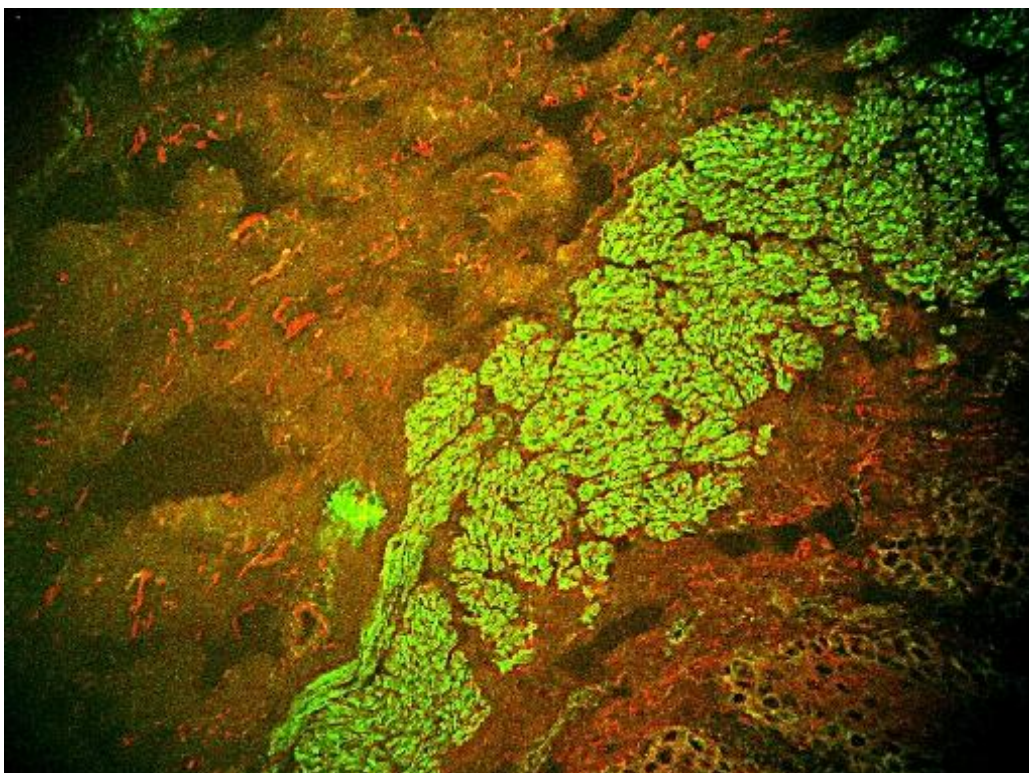


Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 22. Příklad falešně pozitivního vzorku u soupravy IFA-EmA-IgA – AEMak 03a-10

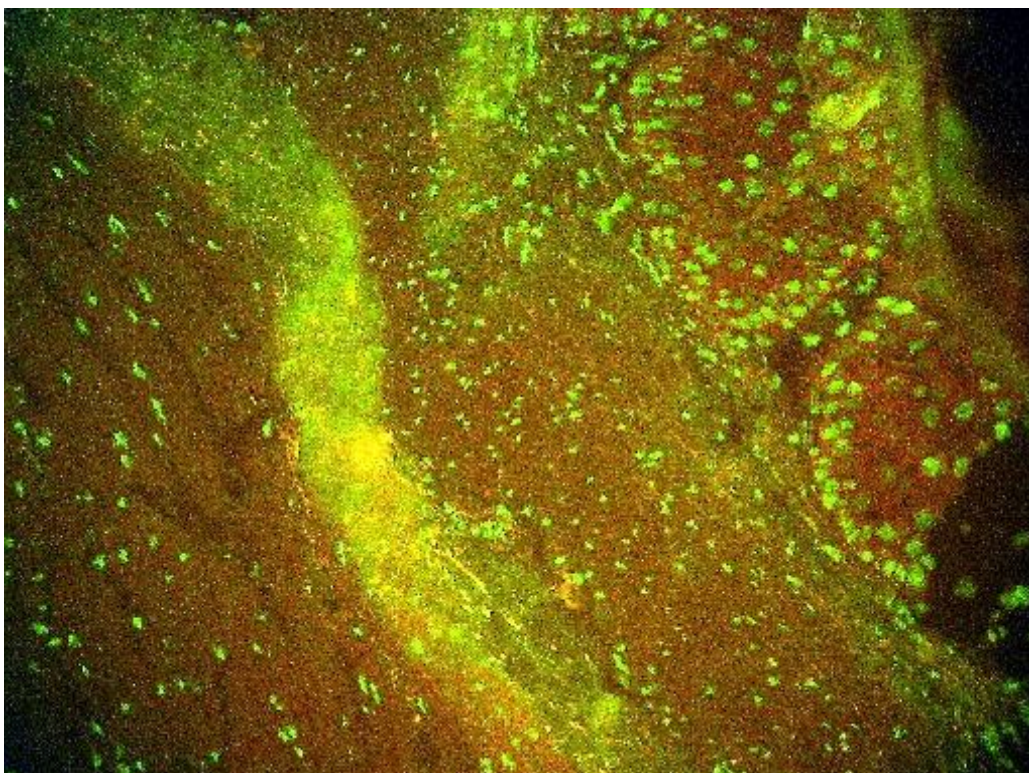


Foto Petr Kocna, ÚKBLD

Obrázek č. 23. Další příklad falešně pozitivního vzorku soupravy ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit

4.2. Statistické hodnocení souprav

Pro jednodušší popis zavedeme:

Souprava č. 1 = Set Anti-Endomysium antibodies AEA

Souprava č. 2 = Set ImmuGlo anti-Endomysial Antibody EMA IFA Kit

Souprava č. 3 = Set IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10

Vyhodnocení - Dr. Petr Kocna

Soupravy č. 2 a 3 se shodly na 15 pozitivních a 20 negativních vzorcích. U 3 vzorků nastala situace kdy souprava č. 3 projevila negativitu a souprava č. 2 pozitivitu. Ani v jednom případě nenastala situace, že by u soupravy č. 3 byly vzorky pozitivní a u soupravy č. 2 negativní. Z celkového součtu četností vychází, že souprava č. 2 byla z 47,4% pozitivní, resp. z 52,6% negativní, souprava č. 3 z 39,5% pozitivní, resp. 60,5% negativní. Viz tabulka č. 1.

	Souprava č. 3			
Souprava č. 2	pozitivita	negativita	celkový součet	%
pozitivita	15	3	18	47,4
negativita		20	20	52,6
celkový součet	15	23	38	
%	39,5	60,5		

Tabulka č. 1 - Kontingenční tabulka - srovnání četností positivity a negativity u souprav č. 2 a 3

Soupravy č. 1 a 3 se shodly na 15 pozitivních a 19 negativních vzorcích. U 1 vzorku se obě soupravy dopustily stejné chyby (negativita +X). U 1 vzorku souprava č. 3 dala nepřiliš jasný výsledek (pozitivita +X) na rozdíl od soupravy č. 1 kde byla pozitivita. U 4 vzorků nastala situace kdy souprava č. 3 projevila negativitu a souprava č. 1 pozitivitu. Viz tabulka č. 2.

	Souprava č. 1				
Souprava č. 3	pozitivita	negativita	negativita + X	celkový součet	%
pozitivita	15			15	37,5
negativita	4	19		23	57,5
negativita +X			1	1	2,5
pozitivita +X	1			1	2,5
celkový součet	20	19	1	40	
%	50	47,5	2,5		

Tabulka č. 2 - kontingenční tabulka - srovnání četností u rutinní metody (souprava č. 1) se soupravou č. 3

Souprava č. 1 a 2 se shodly na 18 pozitivních a 19 negativních vzorcích. V 1 vzorku souprava č. 1 projevila pozitivitu a souprava č. 2 negativitu. Každá ze souprav vykazala 1 nepřesný výsledek. Viz tabulka č. 3.

	Souprava č. 1				
Souprava č. 2	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet	%
pozitivita	18			18	45,0
negativita	1	19		20	50,0
negativita +X			1	1	2,5
pozitivita +X	1			1	2,5
celkový součet	20	19	1	40	
%	50	47,5	2,5		

Tabulka č. 3 - kontingenční tabulka - srovnání četností u rutinní metody (souprava č. 1) se soupravou č. 2

Vyhodnocení - Dr. Zdislava Vaničková

Soupravy č. 2 a 3 se shodly na 15 pozitivních a 20 negativních vzorcích. Ve 2 vzorcích souprava č. 3 projevila negativitu a souprava č. 2 pozitivitu. V 1 případě nastala situace, kdy souprava č. 3 projevila pozitivitu a souprava č. 2 negativitu. Z celkového součtu četností vychází, že souprava č. 2 byla z 44,7% pozitivní, resp. z 55,3% negativní, souprava č. 3 z 42,1% pozitivní, resp. 57,9% negativní. Viz tabulka č. 4.

	Souprava č. 3			
Souprava č. 2	pozitivita	negativita	celkový součet	%
pozitivita	15	2	17	44,7
negativita	1	20	21	55,3
celkový součet	16	22	38	
%	42,1	57,9		

Tabulka č. 4 - Kontingenční tabulka - srovnání četností positivity a negativity u souprav č. 2 a 3

Soupravy č. 1 a 3 se shodly na 16 pozitivních a 19 negativních vzorcích. V 1 vzorku se obě soupravy dopustily stejné chyby (negativita +X). V 1 vzorku souprava č. 3 dala nepřiliš jasný výsledek (pozitivita +X) na rozdíl od soupravy č. 1 kde byla pozitivita. U 3 vzorků nastala situace kdy souprava č. 3 projevila negativitu a souprava č. 1 pozitivitu. Viz tabulka č. 5.

	Souprava č. 1				
Souprava č. 3	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet	%
pozitivita	16			16	37,5
negativita	3	19		22	57,5
negativita +X			1	1	2,5
pozitivita +X	1			1	2,5
celkový součet	20	19	1	40	
%	50	47,5	2,5		

Tabulka č. 5 - kontingenční tabulka - srovnání četností u rutinní metody (souprava č. 1) se soupravou č. 3

Souprava č. 1 a 2 se shodly na 17 pozitivních a 19 negativních vzorcích. U 2 vzorků souprava č. 1 projevila pozitivitu a souprava č. 2 negativitu. Každá ze souprav vykázala 1 nepřesný výsledek. Viz tabulka č. 6.

	Souprava č. 1				
Souprava č. 2	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet	%
pozitivita	17			17	42,5
negativita	2	19		21	52,5
negativita +X			1	1	2,5
pozitivita +X	1			1	2,5
celkový součet	20	19	1	40	
%	50	47,5	2,5		

Tabulka č. 6 - kontingenční tabulka - srovnání četností u rutinní metody (souprava č. 1) se soupravou č. 2

Vyhodnocení - Petr Martikán

Soupravy č. 2 a 3 se shodly na 15 pozitivních a 19 negativních vzorcích. U 5 vzorků nastala situace kdy souprava č. 3 projevila negativitu a souprava č. 2 pozitivitu. Ani v jednom případě nenastala situace, kdy souprava č. 3 byla pozitivní a souprava č. 2 negativní. Z celkového součtu četností vychází, že souprava č. 2 byla z 51,3% pozitivní, resp. z 48,7% negativní, souprava č. 3 z 38,5% pozitivní, resp. 61,5% negativní. Viz tabulka č. 7.

	Souprava č. 3			
Souprava č. 2	pozitivita	negativita	Celkový součet	%
pozitivita	15	5	20	51,3
negativita		19	19	48,7
celkový součet	15	23	39	
%	38,5	61,5		

Tabulka č. 7 - Kontingenční tabulka - srovnání četností positivity a negativity u souprav č. 2 a 3

Soupravy č. 1 a 3 se shodly na 15 pozitivních a 19 negativních vzorcích. U 1 vzorku se obě soupravy dopustily stejné chyby (negativita +X). U 5 vzorků nastala situace kdy souprava č. 3 projevila negativitu a souprava č. 1 pozitivitu. Viz tabulka č. 8.

	Souprava č. 1				
Souprava č. 3	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet	%
pozitivita	15			15	37,5
negativita	5	19		24	62,5
celkový součet	20	19	1	40	
%	50	47,5	2,5		

Tabulka č. 8 - kontingenční tabulka - srovnání četností u rutinní metody (souprava č. 1) se soupravou č. 3

Soupravy č. 1 a 2 se shodly na 20 pozitivních a 19 negativních vzorcích. Obě ze souprav vykázaly 1 nepřesný výsledek. Viz tabulka č. 9.

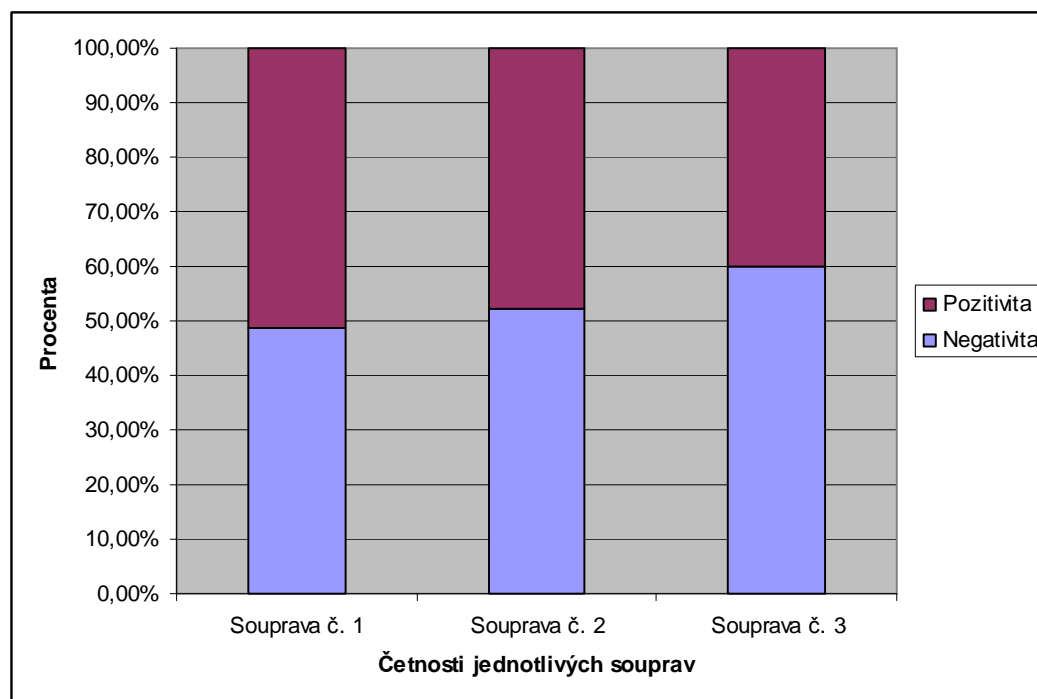
	Souprava č. 1			

Souprava č. 2	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet	%
pozitivita	20			18	50,0
Negativita		19		20	47,5
negativita +X			1	1	2,5
Celkový součet	20	19	1	40	
%	50	47,5	2,5		

Tabulka č. 9 - kontingenční tabulka - srovnání četností u rutinní metody (souprava č. 1) se soupravou č. 2

Celkové porovnání měřících souprav

Podle porovnání četností pozitivit a negativit všech souprav, vycházela průměrně od hodnotících osob negativita u soupravy č. 1 48,7%, soupravy č. 2 52, 2%, soupravy č. 3 60,0%. Pozitivita u soupravy č. 1 51,3%, soupravy č. 2 47,8% a u soupravy č. 3 40,0%. Viz graf č. 1.



Graf č. 1 – Procentuální výjádření průměrných četností pozitivit a negativit všech tří souprav

Po zpracování korelační analýzy všech měření (tabulka č. 10) se ukázalo, že s rutinní metodou 100% koreluje vyhodnocení Petrem Martikánem se soupravou č. 2. Dále z 92% Dr. Kocna se soupravami 2 a 3, stejnou shodu měla Dr. Vaníčková.

	Soup. č. 1	Soup. č. 3 - PK	Soup. č. 3 - ZV	Soup. č. 3 - PM	Soup. č. 2 - PK	Soup. č. 2 - ZV	Soup. č. 2 - PM
Soup. č. 1	1						
Soup. č. 3 - PK	0,47929	1					
Soup. č. 3 - ZV	0,506776	0,978073	1				
Soup. č. 3 - PM	0,743237	0,7576684	0,7245688	1			
Soup. č. 2 - PK	0,604541	0,9244922	0,9432422	0,6390644	1		
Soup. č. 2 - ZV	0,579292	0,9424525	0,9211324	0,6674238	0,9816887	1	
Soup. č. 2 - PM	1	0,4792898	0,5067763	0,7432367	0,6045405	0,579292	1

Tabulka č. 10 - korelační analýza - výsledky ukazující jak se shodují jednotlivé výsledky měřené různými osobami a různými soupravami

Dále jsme korelační analýzou zpracovaly vyhodnocené soupravy všech tří osob (tabulka č. 11). Je vidět, že nejvíce mez sebou korelují soupravy č. 1 a soupravy č. 3.

	Soup. č. 1	Soup. č. 3	Soup. č. 2
Soup. č. 1	1		
Soup. č. 3	0,84610379	1	
Soup. č. 2	0,6045405	0,522868442	1

Tabulka č. 11 – korelační analýza vyhodnocených všech tří souprav

Porovnáním korelační analýzou všech tří souprav s protilátkami (tabulka č. 12) se ukázala největší shoda mezi protilátkami IgG a atTG se soupravou č. 1 (rutinní metodou).

	Soup. č. 1	Soup. č. 3	Soup. č. 2	IgA	IgG	atTG
Soup. č. 1	1					
Soup. č. 3	0,84610379	1				
Soup. č. 2	0,6045405	0,522868442	1			
IgA	0,77674983	0,6094494	0,336123	1		
IgG	0,91268033	0,739296087	0,47881	0,851064	1	
atTG	0,95951449	0,796972293	0,519462	0,9	0,95119	1

Tabulka č. 12 - korelační analýza vyhodnocených souprav s protilátkami

Po zjištění, že nejvíce spolu korelují protilátky s rutinní metodou (souprava č. 1) jsme vytvořili kontingenční tabulky četností s jednotlivými protilátkami a naší rutinní metodou (tabulka č. 13, 14, 15), ze kterých je vidět, že v 2 případech souprava prokazovala pozitivitu a protilátky IgA a IgG negativitu a zároveň set vždy udělal 1 chybu s nejasným výsledkem.

	Souprava č. 1			
IgA	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet
pozitivita	19		1	20
negativita	1	19		20
celkový součet	20	19	1	40

Tabulka č. 13 – kontingenční tabulka četností soupravy č. 1 s protilátkami IgA

	Souprava č. 1			
IgG	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet
pozitivita	19			19
negativita	1	19	1	21
celkový součet	20	19	1	40

Tabulka č. 14 – kontingenční tabulka četností soupravy č. 1 s protilátkami IgG

	Souprava č. 1			
atTG	pozitivita	negativita	negativita +X	celkový součet
pozitivita	20			20
negativita		19	1	20
celkový součet	20	19	1	40

Tabulka č. 15 – kontingenční tabulka četností soupravy č. 1 s protilátkami atTG

5. DISKUZE

Podle porovnání četností pozitivit a negativit souprav, vycházela průměrně od všech hodnotících osob nejvyšší negativita u soupravy č. 3 60,0%. Souprava č. 2 vykazovala negativitu 52, 2%, souprava č. 1 48,7%.

Pozitivita byla nejvyšší u rutinní soupravy (souprava č. 1) 51,3%, souprava č. 2 47,8% a souprava č. 3 40,0%.

Pokud se zaměříme na jednotlivé osoby co odečítaly, tak se dají výsledky hodnotit jako velmi vyrovnané. Dr. Petr Kocna vyhodnotil celkově 45,6% vzorků pozitivních, resp. 53,6% negativních. Dr. Zdislava Vaníčková 45,6%, resp 53,5% a Petr Matikán 46,7%, resp. 52,6%.

U korelační analýzy všech hodnotících souprav a všech hodnotících osob vyšla 100% shoda vyhodnocení Petra Martikána soupravy č. 3 s rutinní metodou (souprava č. 1) a dále 92% shoda ve vyhodnocení souprav č. 2 a 3 Dr. Petrem Kocnou a zároveň Dr. Zdislavou Vaníčkovou.

Po zhodnocení všech tří souprav nám korelační analýza ukázala, že z 84% koreluje rutinní metoda se soupravou č. 3 a pouze z 60% souprava č. 2.

Po porovnání souprav s dalšími markery celiakie – protilátkami IgA, IgG a atTG nám vyšla největší shoda s rutinní metodou a protilátkami IgG 91% a atTG 96%.

Naším cílem bylo zjistit, zda po srovnání souprav jiných imunofluorescenčních metod a substrátů pro detekci antiendomysálních protilátek budou některé přesněji hodnotitelné a čitelnější než rutinně používaná souprava u nejednoznačných vzorků, které občas komplikují vyhodnocení. Výsledek mikroskopického hodnocení nám ukázal, že žádná z testovaných souprav neuměla problém s interakcí jiných protilátek (a tím těžším odečítáním) vyřešit.

Dále jsme hodnotili jak dobře umí vzorek ukázat rozdíl mezi negativitou a pozitivitou. Jestli je vzorek úplně tmavý při negativitě, nebo i přes negativitu trochu fluorescenčně září. V tomto hodnocení vyšla nejlépe souprava č. 3, kde byl kontrast mezi pozitivním a negativním vzorkem největší.

Jak u rutinní soupravy, tak u soupravy č. 3 byly řezy endomysia přibližně stejně veliké a bylo někdy obtížnější je hledat. U soupravy č. 2 byly řezy několikrát větší a nutnost zdlouhavějšího hledání odpadala.

Jednotlivé soupravy byly přibližně stejně vybaveny až na rozdíly, že rutinní metoda a souprava č. 3 nedávají krycí sklíčka. Souprava č. 2 dává, ale místo toho nedává filtrační papír na sušení přebytečných reagensů.

Pracovní postup byl u všech velmi podobný, jen s výjimkou soupravy č. 3, kde nebyla evansova modř přímo v konjugátu a musela se přidávat do čtvrtého oplachu.

Souprava č. 1 a 3 používá jako substrát pro endomysiální protilátky opičí jícen. U soupravy č. 2 je použita neznámá svalovina opičího hladkého svalu. Nejvíce používanými substráty pro endomysiální protilátky je opičí jícen, svalovina pupečníku, opičí ileum aj.

Specifita i senzitivita svaloviny opičího jícnu, pupečníku a opičího ilea je velmi podobná [42, 43]

Průkaz endomysiálních protilátek by měl být proveden v několika ředěních vzorku séra od 1:5 (pro základní screening) až 1:40 (průkaz onemocnění). Vzhledem k finanční náročnosti testu je většinou prováděno hodnocení pouze v jediném ředění, nejčastěji 1:20. [14] Naše ředění bylo 1:20 a výsledky byly velmi dobré.

Specifita odečítané fluorescence soupravy č. 1 byla 95%, soupravy č. 2 95% a soupravy č. 3 96%, senzitivita odečítané fluorescence byla 100%, 95% a 100%.

V porovnání EmA a jiných ELISA testů, EmA stále vykazuje nejvyšší specifitu. [44]

Stanovení EmA je ve srovnání s testy ELISA technicky i finančně náročnější a test je vhodný k ověření hraničních výsledků. [41]

6. ZÁVĚR

Dle mikroskopického hodnocení vyšla nejlépe souprava č. 3 - IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10. Měla nejlepší kontrastní poměr mezi pozitivitou a negativitou, bohužel také nedokázala odstranit vliv ostatních autoprotilátek zkreslující vyhodnocení vzorku.

Podle statistického hodnocení měla souprava IFA-EmA-IgA – AEMAk 03a-10 nejvíce negativních výsledků, které byly způsobeny vyšším ředěním vzorků, které běžně používá laboratoř ÚKBLD. Pokud bychom opakovali vyhodnocení s nižším ředěním, pozitivita by se projevila, ale vyhodnocení by se prodražilo.

Celá tato souprava je 2x dražší než rutinně používaná a jelikož žádná ze souprav nedokázala odstranit nepříjemné chyby vlivem jiných autoprotilátek, laboratoř ÚKBLD zůstává u své rutinní soupravy Anti-Endomysium antibodies AEA.

Další přínos, a velmi pro mě důležitý, která tato diplomová práce přinesla je rozšíření obzorů a práce v laboratoři, jak už při přípravách vzorků pro vyhodnocení ve fluorescenčním mikroskopu, tak hlavně samotné vyhodnocení vzorků, které není snadným úkolem. Podle statistického srovnání všech zkušných osob co vzorky vyhodnocovali, jsem měl velmi srovnatelné výsledky.

7. LITERATURA

- [1] Schneiderka P. a kol., (2004), Kapitoly z klinické biochemie, 2.doplněné a přepracované vydání, Karolinum, Praha (<http://ukb.lf1.cuni.cz/vyuka/textbook.php>) 1.6. 2010
- [2] Kohout P., (2006), Diagnostika a léčba celiakie, Interní Medicína, 7;8: 324-326
- [3] Burkhard M., (2006), Imunochemické vlastnosti protaminů a jejich analytické využití, souhrn disertační práce
- [4] Abrol Y.P., Uprety D.C., Ahuja V.P., Naik M.S., (1971), Soil fertility levels and protein quality in wheat grains, Australian Journal Agriculture Reseach, 22: 197-202
- [5] Woychick J.H., Boundy J. A. and Dimler R. J., (1961), Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea, Archives of Biochemistry Biophysics 94: 477-482
- [6] Koning F, Gilissen L, Wijmenga C: Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease. Springer Semin Immunopathol (2005), 27(2):217-232
- [7] Mäki M, Collin P. Coeliac disease. Lancet. 1997 Jun 14;349(9067):1755–1759.
- [8] Meize-Grochowski, R. 2005. Celiac disease: a multisystem autoimmune disorder. Gastroenterology Nursing 28, no. 5: 394-404.
- [9] Marsh M. N., Celiac Disease: Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, 281s, (2000).

- [10] Kohout P., (2007), Celiakie v ambulatní praxi, *Medicína Pro Praxi*, 6: 250-252
- [11] Briani Ch., Samaroo D., Alaedini A., (2008), Celiac disease: From gluten to autoimmunity, *Autoimmunity Reviews*, 7: 644-650
- [12] Bai J., Zeballos E., Fried M., Corazza G.R., Schuppan D., Farthing M.J.G., Catassi , Greco L., Cohen H., Krabshuis J.H. [online]: WGO-OMGE Practice Guideline Celiac Disease.
Url:
http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/04_celiac_disease.pdf
- [13] Pietzak M.M., (2005) Follow-up of Patients With Celiac Disease: Achieving Compliance With Treatment, *Gastroenterology*, 128:135-141
- [14] Kocna P., *Gastrolab - Miniencyklopedie laboratorních metod v gastroenterologii*, <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/glab/glency1.htm> (10. 6. 2010)
- [15] Presutti R.J., Cangemi J.R., Cassidy H.D., Hill D.A., (2007), Celiac disease, *American Family Physician*, 76: 1795-1802
- [16] Green P.H., Moshe R., (2006) Capsule Endoscopy in Celiac Disease: Diagnosis and Management, *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*, 16: 307-316
- [17] Lapid N., (2008), A Celiac Disease Diagnosis Requires Blood Test And Biopsy, *Medical Review Board*
- [18] Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2, 647–55 (2002)

- [19] Marsh M.N., (1992), Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue), *Gastroenterology*, 102: 330-354
- [20] Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2275–9 (2002)
- [21] Kagnoff MF. Overview and pathogenesis of celiac disease . *Gastroenterology* 128, S10 (2005)
- [22] Monsuur AJ., de Bakker PI., Alizadeh BZ., Zhernakova A., Bevova MR., Strengman E., Franke L., van't Slot R., van Belzen MJ., Lavrijsen IC., Diosdado, Daly MJ., Mulder CJ., Mearin ML., Meijer JW., Meijer GA., van Oort E., Wapenaar MC., Koeleman BP., Wijmenga C.: Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet.* **37**, 1341 (2005).
- [23] Janatuinen EK., Kempainen TA., Julkunen RJ., Kosma VM., Maki M., Heikkinen M., Uusitupa MI.: No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut.* **50**, 332 (2002).
- [24] Hořejší V., Bartůňková J. v knize: *Základy Imunologie*, 2. vydání, Triton, Praha, 280s, (2001).
- [25] Mowat AM. Coeliac disease-a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet.* 2003 Apr 12;361(9365):1290-2
- [26] Palacios S.M., Riveso M.A., SanchezValverde V.F., Feijoo B.E, Ramos A.M., Olivera O.J., García M.S., (2000), Transglutaminase antibody: usefulness in the diagnosis of celiac disease, *Analys Españoles Pediatra*, 53: 542-546

- [27] Vlašín Z., Atlas dermatopatologie,
https://atlases.muni.cz/atlases/kuze/atl_cz/main+uvod+immunofluor.html (28. 6. 2010)
- [28] Olympus, The Use of the Olympus Fluorescence Microscope,
<http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html>
(28.6. 2010)
- [29] Kocna P., Gastrolab
<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/texty/celiak.htm>
(10.8. 2010)
- [30] Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci,
Fluorescenční mikroskopie
<http://biologie.upol.cz/mikroskopie/fluorescencni%20mikroskopie.htm>
(10.8. 2010)
- [31] Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta, Fluorescenční mikroskopie
<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescenci.htm>
(10.8. 2010)
- [33] BioMed Central
<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2121-10-50-S1.jpeg>
(10.8. 2010)
- [34] Biosystems S.A., Anti-Endomysium antibodies AEA, příbalový leták – ref 44715
- [35] IMMCO Diagnostics, Anti-Endomysial Antibody (EMA) Test System, příbalový leták, Code 1114

- [36] Viro-Immun Labor-Diagnostika, IFA EmA – IgA, příbalový leták AEMAk 03a-10
- [37] Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- [38] BRADWELL, A. R.; STOKES, R. P.; JOHNSON, G. D. Atlas of autoantibody patterns on tissues . Birmingham : A. R. Bradwell, 1997. Intestinal Tissues, s. 56-58.
- [39] Cyhelský, L.; Kahounová, J.; Hindls, R., Elementární statistická analýza, Havlíčkův Brod, Management Press, 2001, 2. vydání, str. 17 -18
- [40] Zvárová, J., Základy statistiky pro biomedicínské obory, Praha, 1998, str. 158
- [41] MALÍČKOVÁ, Karin, et al. Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii. INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI. 2005, 10, s. 440-443.
- [42] Rostami K., Kerckhaert JP6, Tiemessen R., Meijer JW., Mulder CJ.: The relationship between anti-endomysium antibodies and villous atrophy in coeliac disease using both monkey and human substrate. Eur J Gastroenterol Hepatol., 11(4):439-42 (1999)
- [43] Sategna-Guidetti C, Grosso SB, Bruno M, Grosso S., Is human umbilical cord the most suitable substrate for the detection of endomysium antibodies in the screening and follow-up of coeliac disease?. Eur J Gastroenterol Hepatol. 9(7) 657-60, (1997)

[44] Biagi F, Pezzimenti D, Campanella J, Vadalca GB, Corazza GR.: Endomysial and tissue transglutaminase antibodies in coeliac sera: a comparison not influenced by previous serological testing. *Scand J Gastroenterol.* 36(9): 955-8, (2001)