

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**Protilátky proti deamidovanému gliadinu jako nový diagnostický ukazatel u pacientů s celiakální
sprue**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Renata Výtisková
Vedoucí práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.
Konzultant: Doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

2012

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškerá data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného kvalifikačního titulu.

V Hradci Králové dne

.....

podpis

Poděkování

Mé velké díky patří Doc. RNDr. Ctiradu Andrysovi, Ph.D za poskytnuté konzultace, ochotu, vstřícnost a čas, jenž mi věnoval při psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce.

ABSTRAKT

Bc. Renata Výtisková

Protilátky proti deamidovanému gliadinu jako nový diagnostický ukazatel u pacientů s celiakální sprue

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalýtika

Cílem této diplomové práce je zaměřit se na možnosti laboratorního průkazu celiakální sprue. Stanovit vyhovující senzitivitu a specificitu a navrhnout CUT – OFF hodnoty pro jednotlivé testy. Dále se zaměřit na nový diagnostický ukazatel - protilátky proti deamidovanému gliadinu (DGP) - a srovnat ho s protilátkami proti nativnímu gliadinu.

Do studie bylo zařazeno 82 pacientů, kteří splňovali kritérium minimálně 1 pozitivního sérologického testu specifických protilátek u celiakie. Hladiny anti - tTG IgA, anti - DGP IgA a IgG a anti - gliadin IgA a IgG byly vyšetřeny pomocí ELISA testu. Pro stanovení protilátek proti endomysiu IgA byla využita nepřímá imunofluorescence.

Pomocí testovací statistiky byly zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách protilátek proti tkáňové transglutamináze IgA a v hladinách IgA protilátek proti DGP mezi skupinami s negativní a pozitivní enterobiopsií. V obou případech byl tento rozdíl statisticky velmi významný ($p < 0,001$).

Byly určeny hodnoty mezí positivity pro jednotlivé testy. Pro anti tTG ve třídě IgA 1,9 U/ml (senzitivita 83,3 %, specificita 75,0 %, plocha pod křivkou 0,890), pro anti DGP IgA 9,9 U/ml (senzitivita 81,0 %, specificita 77,5 %, plocha pod křivkou 0,785), pro anti DGP IgG 11,4 U/ml (senzitivita 71,0 %, specificita 40,0 %, plocha pod křivkou 0,575), pro anti AGA IgA 10,14 U/ml (senzitivita 66,7 %, specificita 47,5 %, plocha pod ROC křivkou 0,566) a pro anti AGA IgG 8,42 U/ml (64,3 % senzitivita, 40 % specificita, plocha pod křivkou 0,555).

Metoda srovnání ROC křivek byla použita při porovnání klinické použitelnosti provedených laboratorních testů. Mezi anti – tTG IgA a anti – DGP IgA nebyla nalezena

statistická významnost ($p = 0,054$, rozdíl mezi jednotlivými plochami pod ROC křivkami byl $0,105$). Testy jsou tedy vzájemně zaměnitelné a poskytují stejné klinické výsledky. Při srovnání ROC křivek anti – DGP IgA a anti – AGA IgA byl nalezen významný statistický rozdíl mezi oběma testy ($p = 0,001$, rozdíl mezi plochami pod ROC křivkami je $0,219$). Testy mají rozdílné hodnoty sensitivity a specificity a nelze je zaměnit. Při srovnání ROC křivek anti – DGP IgG a anti – AGA IgG nebyl nalezen významný statistický rozdíl mezi oběma testy ($p = 0,774$, rozdíl mezi plochami pod ROC křivkami $0,020$). Testy jsou tedy z hlediska klinické využitelnosti vzájemně zaměnitelné.

Klíčová slova: celiakie, diagnostika celiakie, protilátky asociované s celiakií, deamidovaný gliadin

ABSTRACT

Renata Výtisková, Bc.

Antibodies reacting with deamidated gliadin as a new diagnostic biomarker in patients with celiac sprue

Diploma Thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Healthcare Bioanalytics

This thesis is aiming the laboratory diagnosis of celiac sprue to determine the sensitivity and the specificity of individual laboratory tests. The sensitivity and specificity of a recently introduced determination of antibodies against deamidated gliadin in comparison with classical determination of antibodies against native gliadin were compared. The aim of this thesis also focuses on new diagnostic marker, antibodies against deamidated gliadin and its comparison to antibodies against native gliadin.

Together 82 patients were enrolled in to this study. The inclusion criterion was at least one positive result in the presence of specific antibodies for celiac sprue. To determine anti-tTG IgA, anti-DGP, and anti-gliadin IgA and IgG antibodies, ELISA tests were used. Anti-endomysial antibodies were tested by immunofluorescence.

The statistically significant differences ($p < 0.001$) were found comparing values of anti-tTG IgA and anti-DGP IgA antibodies in context of positivity of histological examination of biopsy samples of gut mucosa.

We found the cut-off level of anti-tTG IgA 1.9 U/ml (sensitivity 83.3 %, specificity 75.0 %, the area under the ROC curve 0.890), anti-DGP IgA 9.9 U/ml (sensitivity 81.0 %, specificity 77.5 %, the area under the ROC curve 0.785), anti-DGP IgG 11.4 U/ml (sensitivity 71.0%, specificity 40.0 %, the area under the ROC curve 0.575), anti-AGA IgA 10.14 U/ml (sensitivity 66.7 %, specificity 47.5 %, the value of the area under the ROC curve 0.566) and anti-AGA IgG 8.42 U/ml (64.3 % sensitivity, 40 % specificity, the area under the ROC curve 0.555).

No statistically significant difference ($p = 0.054$) was found when compared the level of anti-tTG IgA and anti-DGP IgA. The difference between areas was 0.105. When comparing the ROC curves of anti-GP IgA and anti-AGA IgA antibodies statistically significant difference were found ($p = 0.001$). The difference between areas was 0.219. When compared the ROC curves for anti-DGP IgG and anti-AGA IgG antibodies, no significant difference was found ($p = 0.774$). The difference between areas was 0.020.

Keywords: celiac sprue, diagnostics of celiac disease, antibodies associated with celiac sprue, deamidated gliadin

Obsah

1	ZADÁNÍ - CÍL PRÁCE.....	11
2	ÚVOD.....	12
3	CELIAKIE.....	13
3.1	Historie	13
3.2	Epidemiologie	13
3.3	Klinické příznaky	14
3.3.1	Abdominální příznaky.....	14
3.3.2	Extraabdominální příznaky.....	14
3.4	Formy celiakie	15
3.4.1	Klasická forma	15
3.4.2	Atypická forma	15
3.4.3	Silentní celiakie.....	15
3.4.4	Latentní celiakie	15
3.4.5	Potenciální celiakie	16
3.4.6	Dühringova herpetiformní dermatitida.....	16
3.4.7	Refrakterní celiakie	16
3.5	Celiakie a přidružená onemocnění	17
3.6	Patogeneze	18
3.6.1	Exogenní faktory.....	18
3.6.2	Endogenní faktory.....	20
3.6.3	Imunologické faktory	21
3.7	Léčba	24
3.7.1	Bezlepková dieta.....	24
3.7.2	Alternativní léčba.....	25
3.8	Komplikace.....	25
4	DIAGNOSTIKA CELIAKIE.....	27
4.1	Histologické vyšetření.....	27
4.2	Genetické vyšetřovací metody	29
4.3	Screening celiakie	30
4.4	Sérologický průkaz celiakální sprue	31
4.4.1	Protilátky proti endomysiu	32
4.4.2	Protilátky proti tkáňové transglutamináze.....	33

4.4.3	Protilátky proti gliadinu.....	33
4.4.4	Protilátky proti deamidovanému gliadinu	34
4.5	Možnosti stanovení protilátek asociovaných s celiakií.....	35
4.5.1	ELISA.....	35
4.5.2	Imunofluorescence	36
5	METODIKA A MATERIÁL	37
5.1	Soubor pacientů.....	37
5.2	Laboratorní metodiky	37
5.2.1	Kvantitativní stanovení protilátek proti tTG ve třídě IgA.....	37
5.2.2	Kvantitativní stanovení protilátek ve třídě IgA a IgG proti deamidovaným gliadinovým peptidům (DGP).....	39
5.2.3	Kvantitativní stanovení IgA a IgG protilátek proti gliadinu	41
5.2.4	Stanovení protilátek proti endomysiu ve třídě IgA.....	42
6	VÝSLEDKY.....	45
6.1	Statistické zpracování dat	45
6.2	Přehled naměřených dat	46
6.3	Porovnání hodnot testů u pacientů s pozitivní a negativní biopsí.....	52
6.4	ROC analýza.....	54
6.4.1	Stanovení hraniční hodnoty u protilátek anti - tTG IgA	54
6.4.2	Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům ve třídě IgA.....	56
6.4.3	Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům ve třídě IgG.....	58
6.4.4	Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti nativnímu gliadinu IgA.....	60
6.4.5	Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti nativnímu gliadinu IgG.....	62
6.4.6	Srovnání ROC křivek pro protilátky proti tTG IgA a pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA	64
6.4.7	Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA a protilátek proti nativnímu gliadinu IgA.....	65
6.4.8	Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgG a protilátek proti nativnímu gliadinu IgG.....	66
6.4.9	Hodnocení positivity EMA ve srovnání s enterobiopsí	67
	DISKUSE.....	68

ZÁVĚR	71
SEZNAM LITERATURY	72
SEZNAM ZKRATEK	75
SEZNAM OBRÁZKŮ	76
SEZNAM TABULEK	76
SEZNAM GRAFŮ.....	77

1 ZADÁNÍ - CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je zaměřit se na možnosti laboratorního průkazu celiakální sprue, stanovit u vybraných laboratorních parametrů hraniční hodnoty s vyhovující senzitivitou a specificitou a provést verifikaci těchto laboratorních stanovení v reálném provozu imunologické laboratoře.

Jmenovité cíle diplomové práce jsou:

1. Vytipovat v laboratorním provozu vhodnou skupinu pacientů s biopticky prokázanou celiakií a odpovídající kontrolní skupinu s negativním bioptickým nálezem tak, aby u každého vybraného pacienta (odběru) byl alespoň jeden z dále uvedených laboratorních parametrů pro celiakii pozitivní
2. U všech vybraných pacientů změřit v séru hladiny protilátek proti nativnímu gliadinu ve třídě IgG a IgA, hladinu protilátek proti deamidovaným gliadinovým peptidům ve třídě IgG a IgA, hladinu protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a provést průkaz autoprotiátek proti endomyziu ve třídě IgA
3. Pomocí testovací statistiky určit případné rozdíly v hodnotách laboratorních parametrů mezi skupinami pacientů s negativní a pozitivní biopsií
4. Pomocí ROC analýzy určit meze positivity (hraniční hodnoty) pro všechny kvantitativní laboratorní parametry pro optimální poměr sensitivity a specificity
5. Pomocí porovnání ROC křivek zjistit možnost záměny testů v provozu v případech, kdy se plochy pod ROC křivkami u dvojice testovaných laboratorních parametrů neliší
6. Zhodnotit obecně diagnostický přínos všech testovaných laboratorních parametrů

2 ÚVOD

Celiakie neboli celiakální sprue (CS), gluten – senzitivní enteropatie, netropická sprue je celoživotní onemocnění způsobené nesnášenlivostí lepku (glutenu). Samotné projevy tohoto onemocnění jsou vyvolány autoimunitními mechanismy, které jsou spuštěny vlivem bílkovin - prolaminů, které jsou obsaženy v povrchní části obilných zrn žita, ječmene, pšenice a ovsa. Hlavní proteinové složky glutenu jsou gliadin a glutenin. Účinkem gliadinu u geneticky vnímavých jedinců dochází následně k slizničním změnám, vyplavení antigliadinových protilátek a protilátek proti tkáňové transglutamináze. Dochází k poškození sliznice zánětlivým procesem, především na sliznici jejunu. Celiakie není dětské onemocnění, jak se dříve předpokládalo, i když většina prvních projevů se vyskytuje již v dětství. Mezi klasické příznaky patří abdominální obtíže, jako je průjem, bolest břicha, nadýmání. U dospělých se vyskytuje onemocnění velmi často bez příznaků či s netypickými příznaky, a to sťažuje diagnostiku tohoto onemocnění. V posledních letech výskyt této nemoci stoupá. Celiakie se dvakrát častěji vyskytuje u žen než u mužů. Diagnostika se zakládá na sérologickém stanovení autoprottilátek, pro potvrzení je však nutná enterobiopsie. Jedinou dostupnou léčbou je celoživotní dodržování bezlepkové diety.

3 CELIAKIE

3.1 Historie

Celiakie není novodobé onemocnění. První zmínky o této nemoci jsou datovány do poloviny 2. století našeho letopočtu. V té době řecký lékař Aretaeus z Kappadokie zveřejnil kapitolu nazvanou v anglickém překladu "The Coeliac Affection", kde v popisu je nemoc s mastnými průjmy (steatorrhea), doprovázené nadýmáním. Dále si u pacientů všiml únavy, úbytku hmotnosti a celkového neprospívání. Nemoc nazval „koiliakos“. Výraznější pokrok v poznání celiakie přichází až o sedmnáct století později, v 19. století. Anglický lékař Samuel Gee zjistil, že se dá stav ovlivnit stravou. Během čtyřiceti let vymezovali lékaři postupně potraviny, které zlepšují a zhoršují zdravotní stav pacientů. Největší rozvoj přišel v průběhu 2. světové války, kdy holandský lékař Dicke vyzoroval zlepšení symptomu při nedostatku obilovin v důsledku války. A naopak při obnovení zásobování a dostatku chleba došlo k recidivě projevů. Další velký průlom přišel v polovině padesátých let minulého století, kdy lékaři provedli první enterobiopsii. Postupem času z histologického nálezu určili charakteristický rys celiakie, a to zánětlivou reakci ve sliznici tenkého střeva a atrofii klků. Postupně získali představu o patologickém procesu, který probíhá ve střevě, i když některé nejasnosti přetrvávají dodnes (Guandalin, 2007; James, 2008).

3.2 Epidemiologie

Z epidemiologického hlediska můžeme o celiakii mluvit jako o fenoménu ledovce. Typické klinické příznaky má přibližně jen 10 % celkově nemocných a to je ta špička ledovce, kterou vidíme. Informace o rozšíření celiakie se opírají především o screeningové studie v evropských zemích, USA a zemích severní Afriky, které zjistily prevalenci 1:70 – 550, což znamená dramatické zvýšení oproti předchozím údajům. Udává se, že celiakií trpí 1 % světové populace. Výskyt celiakie se liší jak podle jednotlivých geografických oblastí, tak i podle výskytu lepku v potravě. Nejvyšší je v zemích Středního východu, severozápadní a východní Afriky, Jižní Ameriky a jižní Asie. Celiakie v rozvojových zemích je mimořádně významný problém veřejného zdravotnictví, neboť chybí program umožňující diagnostiku a léčení všech postižených a bezpečné suroviny a potraviny nejsou z různých důvodů dostupné. Celiakie však přibývá také v rozvinutých zemích. Podle odhadů trpí

v České republice celiakální sprue přibližně 50 000 lidí, z toho jen desetina je diagnostikována a léčí se. Hlavní příčinou tohoto stavu je fenotyp onemocnění: atypický anebo bezpříznakový. Vzestup je způsoben nejen lepší diagnostikou, ale pravděpodobně se na něm podílejí také faktory prostředí (Frühauf, 2007; Frič 2008).

3.3 Klinické příznaky

Variabilita příznaků u pacientů s celiakií je velmi vysoká. Udává se až tři sta symptomů tohoto onemocnění. Hlavní příznaky celiakie lze rozdělit na abdominální (klasická forma celiakie) a extraabdominální, způsobené malabsorpcí živin.

3.3.1 Abdominální příznaky

Mezi gastrointestinální příznaky patří opakující se bolest břicha a nadýmání, nadměrná flatulence. Další symptom je atypická stolice. Objevují se průjmy nebo naopak zácpa. Stolice je objemná, váha přesahuje 300g. Typická je steatorea, stolice s velkým množstvím tuků, je kašovitá, nepříjemně zapáchající a lesklá. Průjmy se mohou vyskytovat trvale či občasně. Objevuje se i nauzea či zvracení. U dlouhodobě nerozpoznané nemoci může být střevo postižené natolik, že nedokáže vstřebávat ani laktózu a dochází k tzv. laktózové intoleranci. Tyto příznaky jsou typické pro děti trpící celiakií a po zahájení bezlepkové diety symptomy rychle vymizí (Kohout, 2006, Nevoral 2005).

3.3.2 Extraabdominální příznaky

Jsou typičtější pro dospělé pacienty, jedná se o projevy malabsorpce způsobené celiakií. Nedávný průzkum ukázal, že jen 1/3 dospělých pacientů trpí průjmy. Nejčastějším příznakem celiakie v dospělosti je nedostatek železa a tím způsobená anemie, která nereaguje na léčbu železem. Neschopnost vstřebávat tuky a cukry způsobí celkové neprospívání člověka, únavu a úbytek na váze. V důsledku toho se nevstřebávají vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K). Často se u celiaků setkáváme s osteomalácií či s osteoporózou, což je právě následek malabsorpce vitamínu D a kalcia. Nedostatek těchto dvou látek může způsobit i problémy se sklovinou a zbarvením zubů. Pokud se nevstřebává vitamín K, může dojít k poruše srážlivosti krve. Typický je i výskyt hypovitaminózy vitamínů rozpustných ve vodě, a to konkrétně B komplexu s následnou neuropatií, glossitidou a stomatitidou. Oxalátová nefrolitiáza a cholesterolová cholelitiáza jsou taktéž důsledkem malab-

sorpce. Celiakie může mít vliv i na nervovou soustavu, a to především u žen, kdy se mohou vyskytovat deprese (Prokopová, 2008; Kohout 2006).

3.4 Formy celiakie

Jak již bylo popsáno výše, celiakie se může projevovat různými příznaky a v různých formách. Podle toho je můžeme rozdělit na klasickou, atypickou, silentní, latentní, potencionální a Duhringovu herpetiformní dermatitidu (Tabulka 1.).

3.4.1 Klasická forma

U dětí se projevuje abdominálními příznaky, celkovým neprospíváním, úbytkem hmotnosti, poruchou růstu, hypovitaminózou, nedostatkem železa a vápníku.

U dospělých se manifestuje celiakie většinou oligosymptomaticky, např. únavností, slizničními změnami, záněty dutiny ústní, neurologickými a psychickými poruchami. Závažnost příznaků odpovídá stadiu choroby a poškození střevní sliznice. Je přítomen různý stupeň snížení výživy a od toho se odvíjející problémy.

Bioptické vyšetření je pozitivní a v séru se objevují specifické protilátky.

3.4.2 Atypická forma

Jedná se o formu, kde příznaky nejsou specifické a nemusí se projevovat v gastrointestinálním traktu. Histologické, imunochemické i serologické vyšetření je pozitivní.

3.4.3 Silentní celiakie

U této formy onemocnění se nevyskytují příznaky a tak často uniká pozornosti. Sliznice tenkého střeva je však typicky poškozena. Vyšetření specifických protilátek je taktéž pozitivní.

3.4.4 Latentní celiakie

U těchto pacientů je pozitivní sérologické vyšetření, avšak histologický nález je negativní, mimo počet reaktivních lymfocytů v submukóze.

3.4.5 Potenciální celiakie

Tuto formu můžeme definovat jako zvýšené riziko vzniku onemocnění, bioptické vyšetření i sérologie jsou negativní. Nejčastěji je diagnostikováno při screeningu (Kohout a další, 2006; Nevoral 2005).

3.4.6 Dühringova herpetiformní dermatitida

CS se může klinicky manifestovat i pod obrazem Dühringovy herpetiformní dermatitidy (DH). Nejde o přidruženou chorobu ani komplikaci, ale rovnocennou formu projevu CS, se shodnou patogenezi, léčbou, komplikacemi i prognózou.

Choroba byla považována za čistě kožní onemocnění do roku 1966, kdy bylo prokázáno, že sliznice tenkého střeva až u 3/4 nemocných vykazuje stejné funkční a morfologické změny jako u CS. Poté, co byl zjištěn příznivý efekt bezlepkové diety nejen na střevní, ale i kožní změny, byla pro DH užívána řada názvů, naznačující určitý vztah k CS. Obě formy jsou na sobě zcela nezávislé, mohou se vyskytnout společně i samostatně a mají kvalitativně shodné laboratorní, histologické i funkční odchylky (Lata a další, 2010; Dvořák, 2005).

Kožní obraz odpovídá názvu, jde o erupce typických herpetiformních, silně svědivých puchýřků různého počtu, velikostí i stupně vývoje, s predilekční lokalizací nad extenzory končetin, na trupu, ramenou, hýždích i ve kšticí. Většina nemocných nemá žádné obtíže gastrointestinálního traktu. Pozitivní je průkaz protilátek proti endomysiu, gliadinu i tkáňové transglutamináze. Změny v enterobiopsii jsou prokazatelné u 70–80 % pacientů a identické se změnami u CS, atrofie klků, zánětlivý lymfoplazmocytární infiltrát, edém proprie, výrazná redukce enzymatického vybavení enterocytů.

Jediným kauzálním léčebným opatřením je trvalá a úplná bezlepková dieta. Kožní nález ustupuje po podání DDS-Sulfonů, po jejich vysazení se dermatitida ale rychle obnovuje (Dvořák, 2005; web NIH).

3.4.7 Refrakterní celiakie

V současnosti se zavádí nový pojem celiakie neodpovídající na léčbu (CNL, refrakterní celiakie), který označuje nemocné bez léčebného účinku bezlepkové diety aplikované po dobu nejméně šesti měsíců (od stanovení diagnózy nebo po přechodném zlepšení), s

přetrváváním nebo znovuobjevením příznaků a laboratorních změn typických pro celiakii. CNL se vyskytuje u 7–30 % nemocných s původní diagnózou celiakie a má různou příčinu. Nejčastější příčinou je neúplná bezlepková dieta s přetrvávající vědomou nebo nevědomou konzumací lepku. Další možností je jiná autoimunitní enteritida nebo jiné onemocnění napodobující symptomatologii celiakie.

U pacientů je histologický nález pozitivní. Kritéria zahrnují výraznou atrofii střevní sliznice a zvýšený počet intraepiteliálních T-lymfocytů (IEL). Při refrakterní celiakii je léčba zahájena většinou glukokortikoidy podle stavu pacienta perorálním nebo parenterálním podáním (Frič, 2009).

Tabulka 1. Formy celiakie (Krejsek a další, 2004)

Forma	Protilátky	Biopsie	Příznaky
Klasická	+	+	+ Klasické
Atypická	+	+	Mimostřevní
Silentní	+	+	0, často RA
Latentní	+	↑IEL	0
Potenciální	+ nebo 0	↑IEL nebo 0	Většinou 0
Refrakterní	+	+	+ Klasické
M. Duhring	+	+	Specifické, kožní

Pozn.: + pozitivní, 0 negativní, RA rodinná anamnéza, ↑IEL zvýšeny intraepiteliální lymfocyty

3.5 Celiakie a přidružená onemocnění

Autoimunitní onemocnění se vyskytují u pacientů s celiakií 10–30krát častěji než v ostatní populaci. Symptomy celiakie mohou být maskovány přidruženou chorobou. Rozpoznání celiakie a zahájení její léčby jsou významné, neboť tento postup může zlepšit terapeutickou kontrolu přidružené nemoci. Přidružené onemocnění může být buď orgánově specifické, kdy autoreaktivita imunitního systému je namířena specificky proti cílům na

určitých orgánech, nebo orgánově nespecifické, kdy je namířena proti cílům v celém organismu.

Mezi orgánově specifické přidružené onemocnění patří autoimunitní tyreoiditida, která se vyskytuje podle studií až u 10 % celiaků. U onemocnění jsou pozitivní specifické protilátky proti endomysiu (Fesano, 2006).

Diabetes mellitus 1. typu (DM) je autoimunitní onemocnění, které se také vyskytuje u celiaků jako přidružené onemocnění. Spojitost mezi oběma nemocemi může být způsobena genetickým pozadím spojeným s HLA DQ2 nebo 8, a podobnými spouštěcími mechanismy pro autoimunitní proces. Prevalence diabetu při celiakii je 20x vyšší než u ostatní populace, procentuálně se pohybuje okolo 5 %. Pozdní diagnostika celiakie může být spojena s vyšším rizikem rozvoje DM 1. Typu (Požgaj, Metelko, 2003).

Mezi další onemocnění spojenými s celiakií patří revmatoidní artritida, selektivní deficit IgA, Sjögrenův syndrom, mikroskopická kolitida, Addisonova choroba, autoimunitní hepatitida, IgA mesangiální glomerulonefritida, primární biliární cirhóza, primární cholangitida, neuropatie a psoriáza. Mezi orgánově nespecifické přidružené onemocnění řadíme systémový lupus erythematosus, Downův a Turnerův syndrom (Frühauf, 2001).

3.6 Patogeneze

Celiakie je multifaktoriální onemocnění, tudíž musí působit více faktorů, aby se onemocnění projevilo. Celiakie v sobě spojuje mechanismy potravinové intolerance s rysy autoimunitního onemocnění. Na geneticky disponovaném podkladě je hlavním spouštěčem zánětlivá reakce lepek. Zjistilo se, že k rozvoji onemocnění mohou přispět i další vnější vlivy, jako je délka kojení, infekční onemocnění, traumata či stres. Na patogenезi se podílí dva vlivy: exogenní a endogenní, ty se dále dělí na genetické a imunologické.

3.6.1 Exogenní faktory

Za nejvýznamnější iniciátor celiakie je považován právě lepek neboli gluten. Jedná se o směs bílkovin, která představuje zásobní proteiny v pšenici, ječmenu, žitu a ovsu. Předpokládané množství glutenu v zrna obilniny je 78 – 85 % z celkového množství bílkovin. Gluten se skládá z proteinů rozpustných v alkoholu, které jsou označovány jako gliadiny (prolaminy). Další složkou jsou v alkoholu nerozpustné proteiny gluteniny. Hlavní úloha při patogenезi celiakie je právě přisuzována gliadinům. Na základě molekulové

hmotnosti je můžeme rozdělit na α , β , γ a ω . Typické pro tyto gliadiny je vysoký obsah aminokyselin glutaminu a prolinu. Obsah glutaminu dosahuje u gliadinu obsaženého v pšenici a prolaminech z žita (sekaliny), ječmene (hordeiny) a ovesa (aveniny) více jak 30 %. Obsah prolinu je asi 15 % (Tabulka 2.). Některé studie ukazují, že prolaminy ovesa nejsou toxické a jen velké množství může vyvolat poškození tenkého střeva (Krejsek, 2004; Wieser a další, 2008).

Tabulka 2. Obsah jednotlivých aminokyselin v obilninách (Krejsek a další, 2004)

Obilnina	Prolaminy	Obsažené AMK	Toxicita
Pšenice	Gliadin	36 % Gln 17 – 23 % Pro	+++
Ječmen	Hordeiny	36 % Gln 17 – 23 % Pro	++
Žito	Sekaliny	36 % Gln 17 – 23 % Pro	++
Oves	Aveniny	↑Gln ↓Pro	+

Některé studie prokazují, že časové rozvržení zavedení lepku do stravy u dětí může mít pozitivní vliv na vznik celiakie. S tím má taky souvislost doba kojení. Mateřské mléko obsahuje obranné faktory, jako jsou sekreční protilátky IgA, lysozym a lactoferrin, které chrání sliznice kojence. Tato ochrana je zvláště důležitá v době, než si dítě vytvoří vlastní imunitu. Studie prokázaly, že pokud je během zavádění lepku do stravy dítě kojeno, snižuje se riziko rozvoje celiakie (Sollid, 2002).

Další z faktorů, které napomáhají vzniku celiakie, je střevní permeabilita. Za fyziologických podmínek je střevní epitel nepropustný pro makromolekuly, jako je například lepek. U pacientů s celiakií je zvýšená propustnost epitelu a tím je usnadněn přechod glutenu do lamina propria. Zvýšená permeabilita není způsobena poškozením epitelu, ale je přičítána různým faktorům, např. působením prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL 17), bakteriální infekcí, vnějším působením toxických látek (Craig a další, 2007).

Infekce je jeden z významných vnějších faktorů. Je prokázáno, že riziko vzniku celiakie se zvyšuje s počtem infekčních gastrointestinálních onemocnění v prvních šesti měsících života. Infekce může zvýšit propustnost střevní bariéry a také zvýší sekreci intracelulární transglutaminázy (tTG). Adenoviry mají podobnou strukturu jako α gliadin (Herrera a další, 2009).

3.6.2 Endogenní faktory

Jak už bylo mnohokrát zmíněno, celiakie je geneticky podmíněná. Toto tvrzení dokládá mnoho studií, které zjistily výskyt celiakie mezi jednovaječnými dvojčaty 70 – 75 %. U dvojvaječných dvojčat je incidence 20 %. Hlavní úlohu v celiakii hrají MHC glykoproteiny (major histokompatibility komplex), u lidí označovány jako HLA systém. Je to složitý genetický systém, který se výraznou měrou podílí na zprostředkování imunitní odpovědi organismu. HLA glykoproteiny jsou molekuly, které jsou součástí komplexního mechanismu, umožňujícího imunitnímu systému rozpoznat imunodominantní peptidy. Funkcí HLA molekul je imunodominantní peptidy prezentovat T – lymfocytům. Ty rozpoznají cizorodý antigen a spustí obrannou reakci. HLA glykoproteiny dělíme do dvou tříd, podle toho na jakých buňkách jsou exprimovány. HLA antigeny II. třídy jsou složeny ze dvou nekovalentně vázaných transmembránových jednotek α a β . Geny, které kodují HLA antigeny, jsou umístěny na krátkém ramínku 6. chromozomu v oblasti 6p21 (Hořejší a další, 2009; Utiyama a další, 2004).

Celiakie má úzkou vazbu s glykoproteiny HLA II. třídy, které jsou přítomny jen na buňkách prezentujících antigen (APC; dendritických buňkách, monocytech, makrofázích a B lymfocytech). Zde jsou potom rozpoznány CD4+ pomocnými induktořovými T lymfocyty. U celiakie hrají důležitou roli HLA-DQ geny, které kodují HLA-DQ glykoproteiny. Pomocné induktořové T lymfocyty rozpoznají peptidy lepku vázané na DQ2 nebo DQ8 molekulách. DQ2 heterodimer buď v cis nebo trans formě se nachází přibližně u 90 % celiaků s alelami DQA1*05/DQB1*02. Zbýlých 5 – 10 % připadá na transmembránový heterodimer HLA – DQ8 kódovaný DQA1*03/DQB1*0302. Afinita peptidů glutenu lepku pro DQ2 a DQ8 molekuly není u nativního glutenu příliš vysoká, jelikož molekuly jsou schopny poutat negativně nabitě aminokyseliny na kotevních pozicích. K tomu přispívá tkáňová transglutamináza, která glutamin deaminací převede na kyselinu glutamovou, a tím zvýší jeho afinitu k vazebným místům. Většina pacientů s celiakií jsou nositeli DQ2, avšak u 20 – 30 % zdravé populace se vyskytuje také. Z toho vyplývá, že jeho přítomnost pro rozvoj nemoci je nutná, nikoliv však dostačující (Kagnoff, 2007, Utiyama a další, 2004).

Proto se pátralo dále po dalších genech, které by mohly mít souvislost s celiakií. Non – HLA oblast, která je nejvíce s celiakií spojována, je na chromozomu 5. Zde leží mnoho genů, které jsou zapojené do regulace imunitního systému a kodují T - buněčný specifický transkripční faktor a prekurzory interleukinů. Na toto téma byly prováděny stu-

die, které nezávisle na sobě potvrdily informaci, že tato oblast má vliv na patologii celiakie. Další vliv na celiakii by mohl mít gen CTLA – 4 na chromozomu 2. Ten kóduje protein, který poskytuje negativní signál proti aktivaci T- lymfocytů. Studie z různých evropských zemí se však ve výsledcích rozcházejí, což může naznačovat geografické rozdíly v tomto faktoru. Takových podobných oblastí je v současnosti prozkoumáno ještě několik, některé nové se podrobují genetickému mapování (Cerf- Bensusan a další, 2003; Utiyama a další, 2004).

3.6.3 Imunologické faktory

Jak již bylo mnohokrát řečeno, hlavním spouštěčem imunopatologické reakce je gluten, tedy spíše jeho část gliadin. V trávicím traktu dochází k jeho částečnému štěpení pomocí peptidáz. Vznikají tak peptidové frakce převážně α -gliadinu (glutenové peptidy). Ten musí nejprve projít přes stěvní stěnu. Peptidy lepku procházejí přes stěvní epitel různými způsoby. První možnost je paracelulární trasa. Peptidy mohou takto procházet díky zvýšené expresi zonulinu. Tato forma přechodu však není příliš častá. Dále mohou být peptidy lepku transportovány do lamina propria transcytózou, kdy α gliadin přechází přímo přes enterocyt za účasti INF γ . Jako třetí možnost je využití retrotranscytárního přenosu, kdy se peptid naváže na sekreční IgA, který se nachází na povrchu enterocytu (Herrera a další, 2009; Sabbatino, 2009).

Když přejdou fragmenty gliadinu přes stěvní epitel do lamina propria, mají nízkou koncentraci negativně nabitých aminokyselinových zbytků. Tento problém řeší tkáňová transglutamináza 2, která je schopna gliadin deaminovat a glutamin přeměnit na kyselinu glutamovou. Pokud je přítomný lysin, dochází k vytvoření tzv. crosslinking, ireverzibilní kovalentní vazby mezi glutaminem a lysinem tzv. ϵ - (γ -glutamyl) - lysinová vazba. Tkáňová transglutamináza katalyzuje reakci vedoucí k jejímu vzniku. Stačí jen malé množství gliadinu, aby došlo k deaminaci. Takto pozměněný peptid má negativně nabitý aminokyselinový zbytek a ten má větší afinitu a schopnost se navázat na specifická místa molekul HLA DQ2 a DQ8. Pro vazbu antigenních peptidů je rozhodující aminokyselina na pozici 6, ta je schopna vázat kyselinu glutamovou, vzniklou předešlou deaminací (Molberg a další, 2000).

Enzym tTG2 je intracelulární enzym závislý na Ca^{2+} . Při poškození (mechanický stres, zánět) však může být uvolněn z buňky. Za fyziologických podmínek hraje tTG2 roli

v buněčném růstu a diferenciaci, tvorbě extracelulární matrix, reparaci tkání a apoptóze (Molberg a další, 2000).

Deamidovaný gliadin tvoří komplexy buď s dalším gliadinem anebo vzniká komplex gliadin - tTG2. Tyto komplexy jsou zpracovávány antigen prezentující buňkou (APC) a dále prezentovány receptorům T lymfocytům (TcR). Aktivované CD4+ T - lymfocyty regulují imunopatologický zánět ve střevní sliznici a to tak, že dochází k jejich přeměně na Th 1 lymfocyty, produkující velké množství prozánětlivých cytokinů především INF γ a TNF α . Dále také dochází k přeměně na Th2 lymfocyty, které pomoci Th2 cytokinů aktivují B lymfocyty. Dochází k následné přeměně na plazmatické buňky, které tvoří gliadino- vé protilátky a protilátky proti tkáňové transglutamináze (Obrázek 1.). Předpokládá se, že vazba autoprotilátek na tTG2 má za následek jednak zesílení její schopnosti deaminovat gliadin a v důsledku toho zesílit celou imunopatologickou reakci a jednak vazba autoproti- látek inhibuje jiné vlastnosti transglutaminázy. Především její schopnost aktivovat trans- formující růstový faktor β (TGF β) (Hořejší a další, 2009, Craig, a další, 2007).

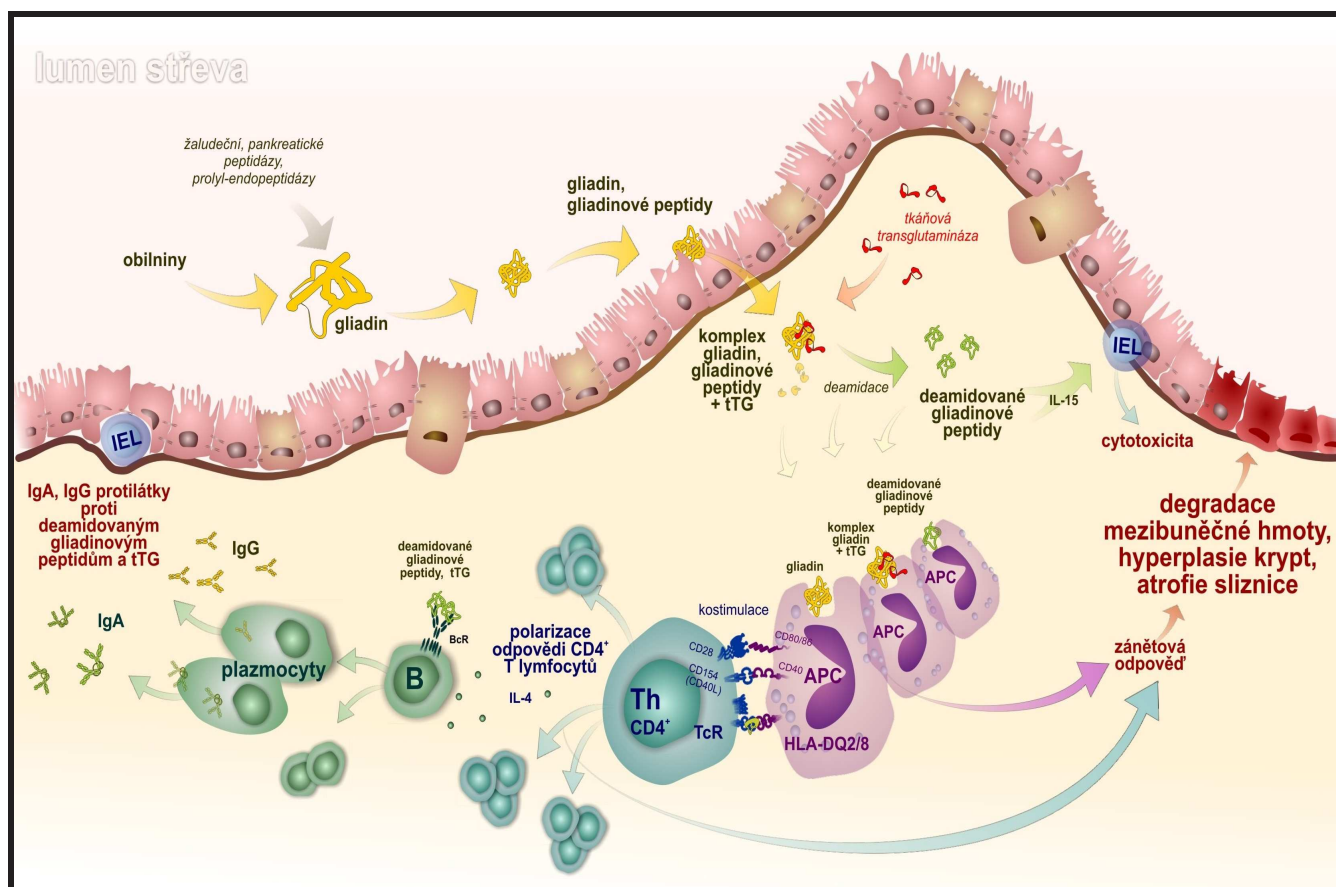
Tento významný pluripotentní růstový faktor je produkován jako neaktivní prekur- zor, který musí být proteolyticky štěpen, aby byl plně biologicky aktivní. TGF β se zapoju- je do imunopatogeneze celiakie hned několikrát. Zaprvé je to významný růstový faktor, který reguluje diferenciaci epitelových buněk. Zadruhé stimuluje fibroblasty k tvorbě me- zibuněčné hmoty. Ta je u nemocných s celiakií rozkládána prostřednictvím matrixových metaloproteináz, především typu 1 a 3, které jsou produkovány různými buňkami po sti- mulaci TNF α . Nedostatek aktivní formy TGF β má za následek jednak zastavení diferenciaci epitelových buněk a jednak chybí tlumivý efekt na Th1 lymfocyty (Kagnoff, 2007; Cerf – Bensussan,2003).

Významnou roli v patogenezi celiakie hraje INF γ . Jeho hladiny jsou u celiaků zvý- šeny. Ten také přispívá k degradaci extracelulární matrix, dále pak zvyšuje toxicitu intrae- piteliálních lymfocytů (IEL) a NK buněk, což vede k poškození enterocytů.

Do imunopatogeneze celiakie je zapojena jak adaptivní imunita, tak i vrozená (Ob- rázek 1.). Imunitní reaktivita je zprostředkována díky určitým fragmentům gliadinu, kon- krétně je nejvíce prozkoumaný fragment p 31 – 43. Tyto peptidy vyvolají imunitní reakci bez toho, aby došlo k aktivaci T- lymfocytů v lamina propria. Tento adaptivní systém je typický masivním nárůstem intraepitelových lymfocytů. Tyto lymfocyty se fenotypově i funkčně liší od CD4+ T – buněk v lamina propria. Právě u nemocných celiakií se třikrát

častěji vyskytují T lymfocyty s expresí TcR $\gamma\delta$ v intraepiteliální oblasti. Hlavní roli v přirozené imunitě hraje interleukin 15. Bylo prokázáno, že pokud je tento interleukin neutralizován, může dojít k zastavení patologické reakce. IL – 15 je produkován buňkami střevního epitelu, plazmocyty a dendritickými buňkami, pomocí fragmentu α – gliadinu (p31-43) (Kagnoff, 2007; Cerf – Bensussan,2003).

Peptidy α – gliadinu dále působí expresi ligandu MICA a MICB (neklasických molekul HLA I. třídy) a HLA – E u poškozených enterocytů. Tyto molekuly jsou rozpoznány NK – receptory NKG2D na intraepiteálních lymfocytech. Vazbou mezi receptorem NKG2D a jeho ligandem MICA dochází k aktivaci cytotoxických lymfocytů a tudíž k poškození enterocytů a zvýšení propustnosti střevního epitelu (Wieser a další, 2008).



Obrázek 1. Immunopatogeneze celiakie

3.7 Léčba

3.7.1 Bezlepková dieta

Jako jediná léčba celiakie je v dnešní době doporučeno přísné dodržování bezlepkové diety. Ze stravy musí být vyloučeny všechny obilniny (pšenice, ječmen, žito i oves). V některých zemích je oves povolen, v České republice je však považován pro celiaky za „toxický“. Normální strava obsahuje 7-20 g lepku za den a k vyvolání příznaků celiakie stačí 50 mg lepku. K tomu, aby byla potravinu pokládána za bezlepkovou, tak podle předpisů může obsahovat maximálně 10 mg gliadinu/100 g výrobku (Sabattino, 2009).

Při diagnostikování celiakie by měly být kontrolovány vitamíny a minerály. Nejčastěji je nutné dodávat kalcium a železo. Bezlepkovou dietu musí dodržovat všichni pacienti s jakoukoliv formou onemocnění tj. s klasickou, atypickou, latentní i potencionální. Řádné dodržování diety je podle různých studií udáváno u 45 – 81 % nemocných. Léčba celiakie je velmi jednoduchá, přesto compliance pacientů k bezlepkové dietě klesá při nedostatku informací či při připuštění jakéhokoliv zpochybnění nutnosti přísného vyloučení lepku z potravy. Rizikovým obdobím je puberta, v průběhu které může docházet k vymizení příznaků při porušování diety (Frühauf, 2007, Kohout 2007).

Pokud je bezlepková dieta dobře dodržována, dochází po různě dlouhé době k vymizení příznaků a obnově struktury sliznice tenkého střeva. Délka reparace závisí především na stupni atrofie střevní sliznice a důslednosti při dodržování bezlepkové diety. I občasné porušení diety (například 1x za 14 dní) může vést k přetrvávajícímu poškození sliznice tenkého střeva včetně rizika komplikací (Kohout, 2007).

Bezlepková dieta je pro celiaky velkou finanční zátěží, neboť bezlepkové suroviny a potraviny jsou 4 - 10x dražší než stejné komodity s obsahem lepku. Celoživotní dodržování bezlepkové diety může být velmi obtížné, protože lepek je přidáván i do potravin, které na první pohled vypadají, že splňují dietní kritéria např. čokolády, uzeniny, koření, jogurty. Vlastnosti lepku jsou využívány i v dalších oblastech jako například kosmetice (rtěnky), lékárenství a přidávají se i do lepidel (Frühauf, 2007; Kohout 2007).

3.7.2 Alternativní léčba

V současné době probíhá mnoho výzkumů, které částečně či zcela úplně mohou v blízké budoucnosti nahradit bezlepkovou dietu. Tyto studie jsou založeny na nových poznatcích o patogenezi a průběhu patologické reakce. Jednou z možností je využít genetického inženýrství a modifikovat kodon pro prolin v obilninách a tak snížit imunostimulaci T-lymfocytů střevní sliznice. Další možnost je upravit propustnost střevního epitelu. Hlavní protein způsobující zvýšenou permeabilitu je zonulin. Pokud by se tedy podařilo jeho funkci inhibovat, snížila by se propustnost lepku do lamina propria. Již byla vytvořena vakcína, která funguje na tomto principu a je v II. fázi klinického testování. Z dalších možností se nabízí inhibovat tTG2, ale jelikož tento enzym má různorodou biologickou úlohu, mohou se vyskytnout nepředvídatelné nežádoucí účinky. Byly navrženy i některé další postupy, které jsou založeny na inhibici INF γ nebo IL – 15, popřípadě inhibici reakce mezi ligandem MICA a receptorem NGK2D. Všechny tyto metody jsou zatím jen ve fázi výzkumu (McCallister 2012; Tye-Din, a další, 2010).

Jako další alternativní léčba byla navržena perorální enzymoterapie. Enzymy různých mikroorganismů (*Flavobacterium meningosepticum* a *Sphingomonas capsulate*, a *Myxococcus Xanthus*) byly testovány pro léčbu celiakie. Tyto enzymy jsou schopny *in vitro* degradovat prolin s obsahem peptidů, které jsou jinak odolné vůči degradaci proteázami v zažívacím traktu. Většina z těchto enzymů je nevratně inaktivována v žaludku pepsinem a kyselým pH a degradována. Vědci zkouší kombinovat enzymy z různých mikroorganismů či uzavřít enzymy do obalu, aby nepodlehly degradaci při průchodu žaludkem. Zatím bez kladného výsledku (Caputo, a další, 2010).

Uvažuje se také o využití enzymů mikroorganismů při zpracování obilovin. Konkrétně při pečení chleba se mohou použít laktobacily, které umožní hydrolyzu albuminu, globulinu a gliadinové frakce během doby kynutí. I tato teorie je stále ve fázi výzkumu (Caputo, a další, 2010).

3.8 Komplikace

Neléčená celiakie je z dlouhodobého hlediska život zkracující a potenciálně fatální onemocnění. Komplikace lze rozdělit na vyplývající z malabsorpce, z přidružených onemocnění a onkologické.

Nejčastější maligní komplikace u celiakie je vysoce agresivní non- Hodgkinův lymfom (NHL), obvykle definován jako s enteropatií související T lymfom (EATL). Jedná se o klonální proliferaci intraepiteliálních lymfocytů. V některých případech je EATL spojován s refrakterní celiakií, kdy až u 80 % pacientů nereagujících na léčbu je diagnostikován právě EATL. EATL se obvykle vyvíjí v jejunu, ale může také být nalezen v ileu a lymfatických uzlinách, méně často v žaludku a tlustém střevě. Různé studie ukázaly významný vztah mezi adenokarcinomem tenkého střeva a celiakií. U pacientů kromě NHL je zvýšené riziko i adenokarcinomu jícnu a dlaždicového karcinomu hltnu (Prokopová, 2008, web NIH).

Riziko malignity je u neléčených celiaků zhruba dvojnásobné. Přísná bezlepková dieta provázená trvalou normalizací protilátek vede k poklesu rizika všech komplikací na úroveň běžné populace (Malkusová a další, 2010).

Ke komplikacím způsobených malnutricí patří metabolická osteoporóza. Kostní změny vznikají nedostatkem vitamínu D a kalcia a vyplavením prozánětlivých cytokinů. Z dalších komplikací můžeme uvést neuropsychiatrické poruchy způsobené ovoidní aktivitou některých malých peptidů vzniklých štěpením gliadinu. Z důvodu malabsorpce může docházet ke snížené plodnosti a to u obou pohlaví (Nevoral 2005).

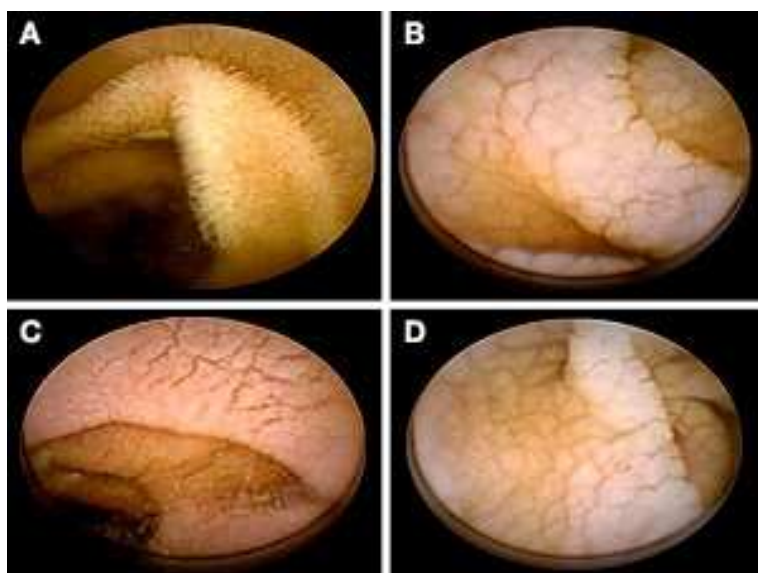
4 DIAGNOSTIKA CELIAKIE

Mimořádná rozmanitost klinických projevů znesnadňuje včasné zjištění celiakie. Zvolený diagnostický postup je ovlivněn fenotypem choroby. Při klasických gastrointestinálních projevech je pacient bez prodlení poslán na gastroenterologii. Jsou – li projevy choroby atypické, je vyšetření a léčba namířena především symptomaticky, buď praktickým lékařem, nebo příslušným specialistou. Pokud není celiakie součástí diferenciální diagnostiky, její rozpoznání se může výrazně opozdit anebo nemoc není zjištěna nikdy. Což může mít fatální následky. Celiakie je celosvětově výrazně poddiagnostikovaná. Zlatým standardem pro potvrzení celiakie stále zůstává endoskopické vyšetření tenkého střeva. Diagnostika celiakie se provede na základě zhodnocení souborů údajů klinických příznaků, positivity sérologických markerů celiakie, enterobiopsie a zřetelné klinické i sérologické odpovědi na bezlepkovou dietu. Tato kritéria byla vypracována Evropskou společností pro dětskou gastroenterologii a výživu (ESPGHAN) (Kohout, 2006).

4.1 Histologické vyšetření

V 70. letech bylo přijato schéma doporučující provedení 3 biopsií sliznice tenkého střeva. Pro stanovení diagnózy je nezbytný průkaz hyperplastických atrofických změn sliznice po expozici lepkem a další provedení biopsie po úpravě sliznice při dodržování bezlepkové diety. Při zavedení sérologických testů do diagnostiky bylo od těchto kritérií upuštěno. V současné době pokud není pochyby o správnosti diagnózy, je možné provést jen dvě biopsie, některé zdroje uvádějí dokonce jednu (Bánovčín a další, 2003).

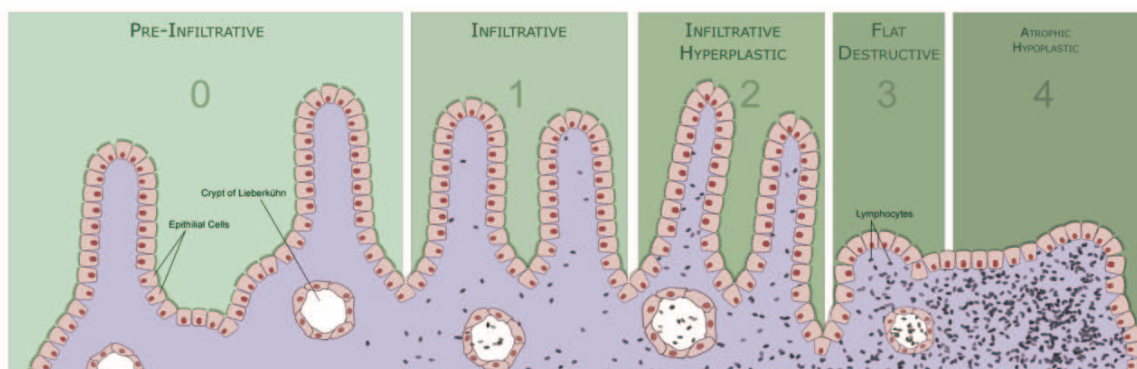
Pro histologický průkaz celiakie se preferuje vyšetření duodenální sliznice místo odběru sliznice jejunu enterobioptickou kapslí pro srovnatelnou senzitivitu a možnost cíleného odběru z makroskopicky suspektních ložisek, přičemž za optimální se považuje odběr 4–6 vzorků. Odběr enterobioptickou kapslí se provádí jen u menších dětí. Z makroskopického hlediska dochází u celiaků k vyhlazení Kerckringových řas, je patrný mozaikovitý reliéf sliznice (Obrázek 2 B, D) a fissury (Obrázek 2. 1 C) střevní sliznice a také je vidět nápadněji cévní kresba (Daum, a další, 2011).



Obrázek 2. Endoskopický obraz sliznice duodena (web Mayo Clinic, 2010)

Pozn.: A - normální sliznice, B, D – mozaiková struktura, C – fissura mukózy

Mikroskopický nálezní svědčí pro celiakii, pokud v biotickém preparátu nalezneme atrofii a tvarové změny klků, hyperplázii krypt, zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů. Buněčný infiltrát je tvořen především plazmocyty a lymfocyty. Změny, které jsou patrné u postižené střevní sliznice, popsal doktor Marsh v roce 1995 (Obrázek 3., Tabulka 3.) (Lata a další, 2010).



Obrázek 3. Změny sliznice podle Marshe (Maňásková, 2010)

U histologického vyšetření celiakie může docházet k falešně pozitivním výsledkům, protože atrofii klků způsobují i jiné příčiny, jako přecitlivělost na jiné potraviny, intolerance laktózy, gastroenteritida, užívání nesteroidních antirevmatik, dysregulace imunitního

systemu při autoimunních chorobách nebo imunodeficitech, idiopatické střevní záněty atd. (Goldemund, 2001).

Tabulka 3. Marshova klasifikace (Frič, 2011)

Typ	Popis
Normální - M0	Normální histologie, může se vyskytovat u nemocných s potenciální formou celiakie
Infiltrativní - M1	Normální slizniční struktura, zvýšený počet IEL (>40)
Hyperplastický - M2	Normální vzhled klků, prohloubení krypt, zvýšený počet IEL (>40)
Destruktivní - M3	Mírná, subtotální či totální atrofie klků, krypty hypertrofické, zvýšený počet IEL (>40)
Hypoplastický - M4	Konečný stupeň poškození, ireverzibilní atrofické změny klků, velmi zvýšený počet IEL

4.2 Genetické vyšetřovací metody

Jak již bylo zmíněno výše, na rozvoji celiakie se podílejí i genetické faktory. Je prokázána asociace mezi celiakií a heterodimerem HLA DQ2 kódovaným DQA1*05 a DQB1*02 alelami u 95 % nemocných. U zbývajících 5 % se vyskytuje heterodimer HLA - DQ8 kódovaný alelami DQA1*03 a DQB1*0302. Jelikož se asi u třetiny zdravé populace jeden z těchto heterodimeru vyskytuje, nemůžeme pomocí pozitivního výsledku HLA typizace potvrdit celiakii. HLA typizaci je vhodné provádět jako doplňkové vyšetření pokud je histologie nebo screening protilátek nejednoznačný, nebo u rizikových jedinců. Negativní výsledek však z 95 % může onemocnění vyloučit. Některé výsledky (pozitivní DQB1 * 0201) mohou odrážet závažnost onemocnění, kdy byla prokázána spojitost s touto alelou a výraznější atrofii klků, a pomalejší reakci na bezlepkovou dietu.

Vyšetření se provádějí nejčastěji z krve nebo ze stěru z bukální sliznice pomocí PCR s následnou hybridizací se sekvenčně specifickými sondami. Výhoda genetického vyšetření je, že není závislé na bezlepkové dietě a je možné provést kdykoliv (web Quest Diagnostics).

4.3 Screening celiakie

Záměrem screeningu je cíleně vyhledat dosud nedagnostikované celiaky. Jelikož je celiakie stále diagnostikována v české populaci buď nedostatečně často, nebo naopak pozdě. Příčinou je různorodý fenotyp nemoci. V současné době převládají střevní příznaky jen u malých dětí, kdežto u dospělých dominují atypické příznaky. Další příčinou jsou nestandardní a chybné diagnostické postupy. Cílem screeningu je časná diagnostika celiakie s následnou časnou léčbou (zavedení bezlepkové diety), odhalení atypických forem celiakie, zjištění skutečné prevalence celiakie v České republice, prevence komplikací celiakie, omezení a lepší kontrola přidružených autoimunitních chorob (Frič, 2011).

Cílený screening byl v České republice schválen ministerstvem zdravotnictví 28. 2. 2011. Screeningové vyšetření se skládá ze dvou kroků. První krok spočívá ve stanovení sérových autoprotilátek ke tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a stanovení celkového IgA. Pokud je výsledek pozitivní přistupuje se k druhému kroku což je enterobiopsie a následné histologické vyšetření vzorku. Při vysoce rizikových faktorech se doporučuje poslat pacienta na biopsii i při negativním výsledku. Cílený screening celiakie se provádí u přesně definovaných cílových skupin, u nichž lze předpokládat vyšší výskyt jedinců s nepoznanou celiakií (Frič, 2011).

A. Rizikové choroby a skupiny

- příbuzní celiaků 1. stupně (rodiče, sourozenci, děti), při jejich pozitivitě také 2. Stupně (prarodiče, strýcové, tety), zejména při výskytu podezřelého symptomu nebo jiné autoimunitní choroby
- dermatitis herpetiformis (Duhring)
- mikrocytární anemie nereagující na léčbu preparáty železa
- předčasná osteoporóza
- terapeuticky rezistentní průjemová forma syndromu dráždivého střeva
- polyneuropatie a myopatie nejasné etiologie
- ataxie nejasné etiologie
- deprese a poruchy chování
- amenorea, pozdní menarche
- infertilita a poruchy reprodukce
- Downův a Turnerův syndrom

B. Podezřelé symptomy

- opožděný psychosomatický vývoj
- nevysvětlený úbytek tělesné hmotnosti
- nízké sérové železo
- výrazné izolované zvýšení sérových aminotransferáz (AST, ALT)
- izolovaný deficit IgA
- recidivující aftózní stomatitida
- hypoplazie zubní skloviny

C. Přidružené autoimunitní choroby

- diabetes mellitus 1. typu
- autoimunitní thyreoiditida a jiné autoimunitní endokrinopatie
- autoimunitní hepatitida
- systémový lupus erythematoses
- primární sklerotizující cholangitida
- primární biliární cirhóza
- Sjögrenův syndrom
- choroby pojiva
- IgA nefropatie (Frič, 2011)

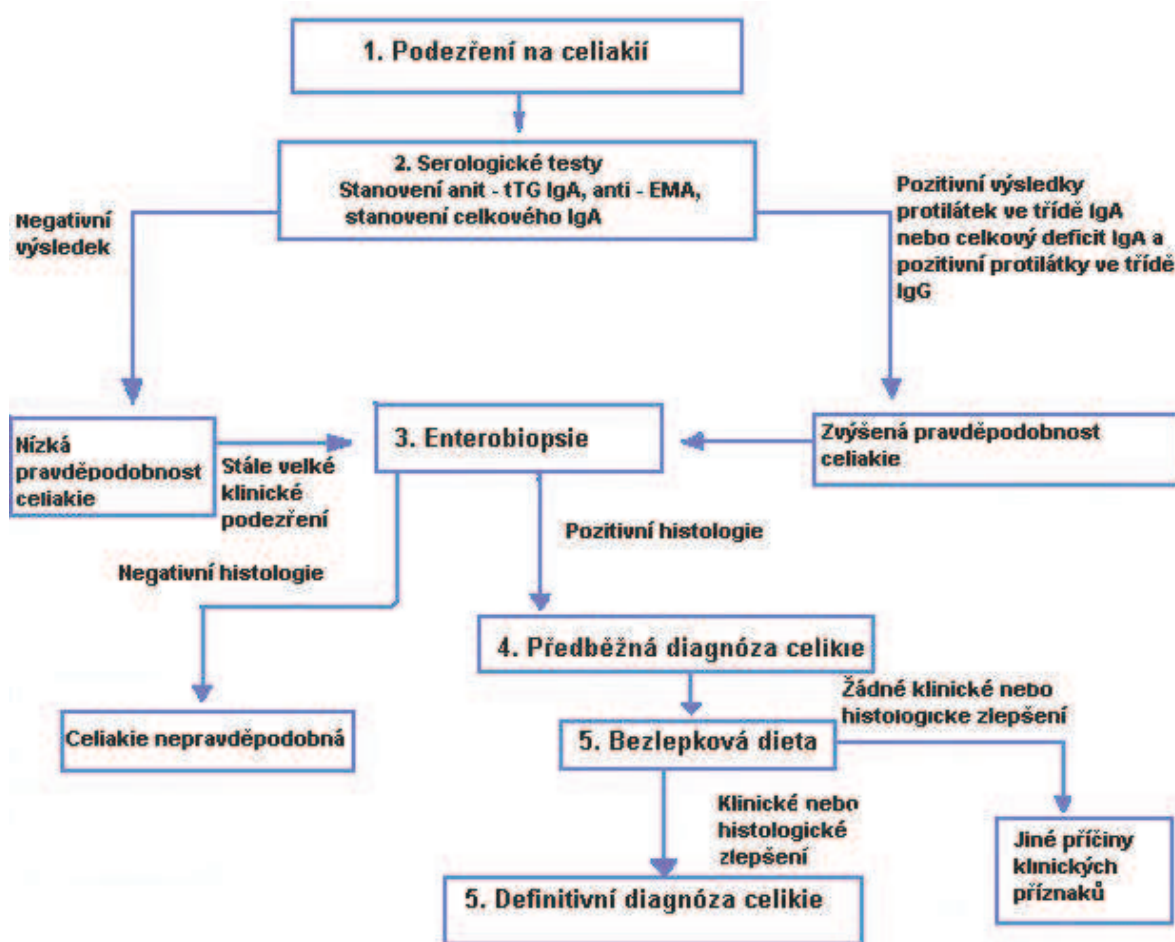
4.4 Sérologický průkaz celiakální sprue

Typická pro celiakální sprue je mohutná protilátková odpověď, která se využívá v diagnostice tohoto onemocnění. Do krve pacientů jsou vyplavovány protilátky v třídě IgA a IgG proti různým antigenním složkám lepku a tkáňovým strukturám. Primárně se stanovují protilátky ve třídě IgA, jelikož vykazují vyšší specifitu i senzitivitu. K detekci protilátek ve třídě IgG se přistupuje, pokud je u pacienta zjištěn deficit celkového IgA. Ten se vyskytuje asi u 3 % celiaků. Pro stanovení protilátek jsou v dnešní době převážně používány ELISA techniky nebo nepřímá imunofluorescence. Vyšetření protilátek nestačí pro definitivní diagnózu celiakie, i když toto vyšetření má svoje místo. Stanovení protilátek je vhodné jako doplňující vyšetření k enterobiopsii a klinickým příznakům a hodí se i ke kontrole dodržování bezlepkové diety (Obrázek 4.) (web Aetna).

První průkaz protilátek byl proveden v roce 1970, kdy Shiner a Ballard našli zvýšené množství imunoglobulinů, především IgA, v oblasti bazální membrány u pacientů

s neléčenou celiakií. Další studie prokázaly depozity u neléčených pacientů nejen v bazální membráně, ale také v kryptách, kolem subepiteliálních fibroblastů a ve stěnách cév tenkého střeva. Déle bylo zjištěno, že při důsledném dodržování bezlepkové diety depozita vymizela a naopak, při návratu k normální stravě se imunoglobuliny opět objevily.

Mezi protilátky asociované s celiakií patří protilátky proti endomysiu ve třídě IgA (anti - EMA), protilátky proti gliadinu ve třídě IgA (anti - AGA IgA) a ve třídě IgG (anti - AGA IgG), protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti - tTG) ve třídě IgA. V poslední době hrají významnou roli i protilátky proti deamidovanému gliadinu jak ve třídě IgA tak ve třídě IgG (anti - DGP IgA, IgG). (James, 2000; Adams, 1996)



Obrázek 4. Algoritmus pro stanovení celiakie

4.4.1 Protilátky proti endomysiu

Endomysium je pojivová tkáň hladkého svalu lokalizovaná mezi myofibrilami. Obklopuje jednotlivá svalová vlákna. Z toho vyplývá, že pro detekci endomysiózních protilá-

tek se používají tkáně, kde je velké zastoupení svalového vlákna. Používají se řezy opičího jícnu fixované na podložním sklíčku (James, 2000).

Stanovení protilátek proti endomysiu metodou nepřímé imunofluorescence jako první popsal Chorzelski v roce 1983. Cílový autoantigen při stanovení protilátek proti endomysiu je tkáňová transglutamináza. Z toho vyplývá, že jak protilátky proti tkáňové transglutamináze tak i endomysiu jsou namířeny proti stejnému antigenu. Stanovují se protilátky ve třídě IgA (James, 2000; Adams, 1996).

Tyto protilátky velmi rychle reagují na dietu, a proto se kromě diagnostiky mohou využít i v monitoringu léčby. Je prokázáno, že pomocí stanovení protilátek je možno zachytit latentní formu celiakie, kdy ještě nedošlo k poškození střevní sliznice. V kombinaci s protilátkami proti tTG ve třídě IgA lze dosáhnout téměř 100 % senzitivity i specificity. Test se nehodí pro diagnostiku celiakie u dětí do 2 let (snížená senzitivita i specificita) (James, 2000; Kopecký 2004).

4.4.2 Protilátky proti tkáňové transglutamináze

Jak již bylo popsáno výše, tkáňová transglutamináza hraje velmi důležitou roli nejen při celiakii, ale i v dalších biologických procesech. Tento enzym patří do velké rodiny transglutamináz, která se dělí na 8 druhů. Tkáňová transglutamináza patří do skupiny 2. Hlavní role tTG u celiakie spočívá v deaminaci gliadinu (Molberg a další, 2000).

V roce 1997 Dieterich a spol. prokázali tTG2 jako autoantigen u celiakie. V současné době jsou anti - tTG2 stanovovány pomocí ELISA a široce využívány v diagnostice celiakie. Problematickou zůstává nízká standardizace ELISA anti tTG testu a jeho závislost na kvalitě antigenu, kdy může docházet k falešně negativním a falešně pozitivním výsledkům. Nízké hladiny protilátek jsou popisovány i u jiných onemocnění, jako jsou jiné autoimunitní onemocnění, infarkt myokardu, nádory a infekce (Caja a další, 2011).

Stanovení těchto protilátek má velmi vysokou specificitu a senzitivitu a proto je doporučeno jako screeningové vyšetření (Frič, 2011).

4.4.3 Protilátky proti gliadinu

Gliadin je hlavní spouštěč celiakální sprue. Protilátky jsou stanovovány ELISA metodou. Protilátky proti gliadinu se stanovují jak ve třídě IgA tak ve třídě IgG. IgA protilát-

ky rychle reagují na přítomnost lepku v potravě a proto jsou vhodné k monitorování dodržování bezlepkové diety. IgG mají v tomto ohledu menší význam a odráží spíše zvýšenou střevní propustnost (Banovčin a další, 2003).

Uvádí se, že IgG protilátky mají větší senzitivitu, ale jsou méně specifické. U IgA protilátek je tomu naopak, ty se vyznačují nižší senzitivitou a vyšší specificitou. Kombinace těchto testů přináší senzitivitu okolo 95 % a specificitu 90 % (Adams, 1996).

4.4.4 Protilátky proti deamidovanému gliadinu

V současné době probíhá mnoho studií, týkajících se deaminovaného gliadinu a protilátek proti němu. Vznik deaminovaného gliadinu během imunopatologických procesů celiakie byl již popsán v kapitole 1.6.3.

Stanovení protilátek proti DGP je prováděno taktéž metodou ELISA. Rozdíl je však v antigenu, který je navázán na jamky mikrotitrační destičky. Na rozdíl od stanovení protilátek proti gliadinu, kdy antigen je nativní gliadin získaný extrakcí, při detekci protilátek proti deamidovanému gliadinu se jako antigen používají syntetické deamidované gliadinové peptidy (Rashtak a další, 2008, Caja a další, 2011).

Specificita i senzitivita je u jednotlivých testů různá a závisí na zdroji a kvalitě antigenu, kalibrátorech, měřící metodě. Proto je možné, že se výsledky z jednotlivých souprav liší. Přehled specificity a senzitivity jednotlivých testů nalezneme v Tabulce 4., i když různé literární zdroje uvádějí různé hodnoty (Volta a další, 2011).

Tabulka 4. Specificita a senzitivita jednotlivých testů (Volta a další, 2011)

	Senzitivita	Specificita
AGA-IgG	73 %	87 %
AGA-IgA	73 %	77 %
EMA	94 %	100 %
TTG IgA	97 %	91 %
DGP IgA	84 %	90 %
DGP IgG	84 %	99 %

4.5 Možnosti stanovení protilátek asociovaných s celiakií

V diagnostice celiakie se používají především imunoanalýzy. Tyto metody jsou založené na reakci antigen – protilátka a podle druhu vizualizace je rozdělujeme na enzymovou imunoanalýzu EIA (značení enzymem), imunofluorescenci (značení fluorochromem) a RIA (značení radioizotopem). Jako nejpoužívanější metoda pro laboratorní diagnostiku celiakie se využívá heterogenní enzymová imunoanalýza známá pod zkratkou ELISA (z anglického Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Dále se pro diagnostiku celiakie používá nepřímá imunofluorescence (Litzman a další, 1998; Lochmanová 2006).

4.5.1 ELISA

V tomto typu metody je jedna komponenta imunochemické metody (antigen nebo protilátka) nespecificky navázána na povrch pevné fáze. Jako pevné fáze se využívají různé materiály, např. zkumavky, jamky mikrotitračních destiček, magnetické částice. Pevná fáze usnadňuje oddělení vázaných a volných značených reaktantů. V diagnostice celiakie se pro stanovení protilátek nejčastěji používá nekompetitivní uspořádání.

Na pevné fázi je navázán antigen proti měřené protilátce. Takto navázané antigeny není možno při běžném promývání vymýt. Přidáme naředěné pacientovo sérum a po inkubaci vymyjeme. Pokud byly v séru přítomny dané protilátky, došlo k navázání. V druhém kroku přidáme konjugát, který obsahuje sekundární protilátku značenou enzymem. V poslední fázi přidáme substrát pro enzym, který po enzymatické reakci vytvoří barevný produkt. Výsledná barevná reakce je detekována fotometricky na přístroji tzv. ELISA reader. Jedná se o modifikovaný spektrofotometr umožňující měření barevné reakce při různých vlnových délkách a upravený na možnost odečítání z mikrotitračních destiček. Výsledky lze vyhodnotit jak kvalitativně tak kvantitativně. Kvantitativní vyhodnocení je prováděno pomocí kalibrátorů, kdy po sestrojení kalibrační křivky je možno ze změřených absorbancí odečíst výsledné koncentrace jednotlivých protilátek. Intenzita zbarvení jednotlivých jamek je přímo úměrná množství protilátek ve vzorku (Litzman a další, 1998; Lochmanová 2006).

4.5.2 Imunofluorescence

Tato metoda je založená na reakci antigen protilátka, ale na rozdíl od předchozí ELISA metody, je protilátka značena fluorochromy. Tuto metodu můžeme rozdělit na přímou, která je používána k průkazu antigenu a nepřímou, která je vhodná pro stanovení protilátek. V diagnostice celiakie se používá nepřímá imunofluoresce, kdy detekujeme protilátky proti endomysiu.

Důležité je vybrat vhodný antigenní substrát, což jsou ve většině případů u průkazu EMA řezy opičích jícnu. Využívají se i řezy lidského pupečníku. V první kroku k fixovanému řezu přidáme naředěný patientský vzorek. Pokud jsou specifické protilátky přítomny, naváží se na řezy. V druhém kroku přidáme zvířecí protilátky proti lidským imunoglobulinům konjugované s fluorochromem FITC. Mezikrokem je vždy promytí preparátu, které slouží k odstranění nenavázaných protilátek. Po zamontování je možno preparát pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu (Litzman a další, 1998; Lochmanová 2006).

Pozitivní výsledek se projevuje zelenou fluorescencí endomysia či hladké svaloviny. Pozitivní sérum na tkáni připomíná při fluorescenci včelí plástev. Odečítání provádí zkušený laboratorní pracovník, protože výsledek může být ovlivněn subjektivní chybou (Maňásková 2010).

V subjektivním hodnocení spočívá i nevýhoda této metody. Další z nevýhod je, že metoda nepřímé imunofluorescence je náročnější na provedení. Z těchto důvodů jsou upřednostňovány ELISA testy. Nicméně, bylo prokázáno, že stanovení EMA má vyšší specifitu i senzitivitu než stanovení protilátek proti nativnímu gliadinu ELISA metodou (Maňásková, 2010).

5 METODIKA A MATERIÁL

5.1 Soubor pacientů

Vyšetřovaný soubor pacientů pocházel z poraden gastroenterologické a dětské kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Soubor obsahoval 82 osob, z toho 28 mužů ve věku od 2 do 79 let. Průměrný věk byl 33let. Žen bylo 54, ve věku od 1 do 79 let s průměrem 35 let (Tabulka 5.). Pacienti byli vybráni podle následujícího kritéria: minimálně 1 pozitivní sérologický test specifických protilátek. U všech těchto pacientů byla provedena enterobiopsie jako zlatý standard diagnostiky celiakie.

5.2 Laboratorní metodiky

U všech vzorků byly stanoveny protilátky proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA, protilátky proti deamidovanému gliadinu ve třídě IgA a IgG, protilátky proti nativnímu gliadinu IgA a IgG. Pro stanovení těchto markerů byla použita ELISA metoda typu „sendvič“, kdy reaguje antigen s přítomnými protilátkami a značenými protilátkami. Antigen je navázán na mikrotitrační destičce. Značenou protilátkou je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgA nebo IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou. Stanovení peroxidázové aktivity se provádí pomocí substrátu. Pozitivita se projevuje modrým zbarvením, které se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté zbarvení. Jeho intenzita se měří na fotometru při vlnové délce 450 nm.

Pro průkaz protilátek proti endomysiu bylo využito metody nepřímé imunofluorescence, kdy na fixované řezy opičích jícnu jsou vychytávány protilátky proti endomysiu obsažené v patientských vzorcích (Tabulka 6.). Jejich přítomnost je prokazována sekundární protilátkou konjugovanou s FITC. Po obarvení a zamontování se sklíčko prohlíží fluorescenčním mikroskopem při vhodné excitační vlnové délce. Zářící struktury, proti nimž jsou ve vzorku přítomny autoprottilátky.

5.2.1 Kvantitativní stanovení protilátek proti tTG ve třídě IgA

Princip metody:

- Jedná se o sendvičovou ELISA metodu

Složení soupravy ORG 540A:

- Dělitelná mikrotitrační destička s 96 jamkami, každá z nich potažená lidskou rekombinantní tkáňovou transglutaminázou.
- Kombinované kalibrační roztoky (6 ampulí) s protilátkami třídy IgA proti tTG (0; 5; 10; 25; 75; 200 U/ml).
- Pozitivní a negativní kontroly.
- Pufř na ředění vzorků.
- Enzymový konjugát obsahující polyklonální králičí anti – humánní imunoglobulin A, značený křenovou peroxidázou
- Substrátový roztok TMB
- Zastavovací roztok, promývací roztok

Potřebné vybavení:

- Spektrofotometr na mikrotitrační destičky s měřením při vlnové délce 450nm
- Vícekanálová pipeta, pipety o objemech 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l
- Destilovaná voda

Příprava a uchování vzorků:

- Vzorek krve necháme srazit, centrifugujeme.
- Testovací sérum musí být čisté a bez hemolýzy.
- Skladovat vzorky lze v chladu při teplotě 2 – 8 °C po dobu až 5 dnů. Pro delší dobu (až 6 měsíců) se vzorek zmrazí na teplotu - 20 °C. Nedoporučuje se opakované zmrazování a rozmrazování. To může způsobit proměnlivou ztrátu aktivity autoprotilátek.
- Těsně před stanovením je potřeba vzorek naředit. Ředí se vzorkovým pufřem v poměru 1:100. Do 10 μ l vzorku přidáme tedy 990 μ l vzorkového pufřu. Kontrolní vzorky není třeba ředit.

Příprava dalších složek:

- Příprava vzorkového pufřu – Obsah každé ampule naředíme 5x destilovanou vodou na konečný objem 100 ml. Roztok je stabilní při teplotách 2 – 8 °C po dobu nejméně 30 dnů.
- Příprava promývacího roztoku – obsah ampule naředíme 50x destilovanou vodou na konečný objem 1000 ml před použitím. Uchováváme v chladu při 2 – 8 °C.

Pracovní postup:

1. Nejprve jsme do jamek mikrotitrační destičky napipetovali po 100 µl kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a naředěných patientských vzorků.
2. Celou destičku jsme nechali inkubovat po dobu 30 min. při pokojové teplotě 20 – 28 °C.
3. Odstranili jsme obsah jamek a promyli je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
4. Do každé z jamek jsme přidali 100 µl enzymového konjugátu.
5. Destičku jsme nechali opět inkubovat na dobu 15 minut při pokojové teplotě.
6. Poté jsme obsah jamek 3x promyli 300 µl promývacího roztoku.
7. Do každé jamky jsme přidali 100 µl substrátového roztoku TMB.
8. Destičku jsme nechali opět inkubovat na dobu 15 minut při pokojové teplotě.
9. Do každé jamky jsme dali 100 µl ukončovacího roztoku a inkubovali 5 minut při pokojové teplotě.
10. Výsledky jsme změřili na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm nejpozději do 30 minut od ukončení reakce.

Koncentrace tTG IgA se získají odečtením z kalibrační křivky. Hraniční rozmezí udávané výrobcem pro pozitivní vzorek je < 10 U/ml.

5.2.2 Kvantitativní stanovení protilátek ve třídě IgA a IgG proti deamidovaným gliadinovým peptidům (DGP)

Princip metody:

- Jedná se o sendvičovou ELISA metodu

Složení soupravy ORG 551A a ORG 551G:

- Dělitelná mikrotitrační destička s 96 jamkami, každá z nich potažená deamidovaným gliadinovým peptidem (DGP)
- Kombinované kalibrační roztoky obsahující: IgA(0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 U/ml)
IgG(0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 U/ml)
- Pozitivní a negativní kontrolní roztoky
- Pufr na ředění vzorků.
- Enzymový roztok obsahující polyklonální králičí protilátku proti lidskému IgA (IgG) značenou křenovou peroxidázou

- Substrátový roztok TMB
- Ukončovací a promývací roztok

Potřebné vybavení:

- Spektrofotometr na mikrotitrační destičky s měřením při vlnové délce 450 nm
- Vícekanálová pipeta, pipety o objemech 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Destilovaná voda

Příprava a uchování vzorků:

- Vzorek krve necháme srazit, centrifugujeme.
- Testovací sérum musí být čisté a bez hemolýzy.
- Skladovat vzorky lze v chladu při teplotě 2 – 8 °C po dobu až 5 dnů. Pro delší dobu (až 6 měsíců) se vzorek zmrazí na teplotu – 20 °C. Nedoporučuje se opakované zmrazování a rozmrazování. To může způsobit proměnlivou ztrátu aktivity autoprotilátek.
- Těsně před stanovením je potřeba vzorek naředit. Ředí se vzorkovým pufrům v poměru 1:100. Do 10 µl vzorku přidáme tedy 990 µl vzorkového pufru. Kontrolní vzorky není třeba ředit.

Příprava dalších složek:

- Příprava vzorkového pufru – Obsah každé ampule naředíme 5x destilovanou vodou na konečný objem 100 ml. Roztok je stabilní při teplotách 2 – 8 °C po dobu nejméně 30 dnů.
- Příprava promývacího roztoku – Obsah ampule naředíme 50x destilovanou vodou, na konečný objem 1000 ml před použitím a uchováváme v chladu při 2 – 8 °C.

Pracovní postupy:

1. Nejprve jsme do jamek mikrotitrační destičky napipetovali po 100 µl kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a naředěných patientských vzorků.
2. Celou destičku jsme nechali inkubovat po dobu 30 min. při pokojové teplotě 20 – 28 °C.
3. Odstranili jsme obsah jamek a promyli je třikrát pomocí 300 µl promývacího roztoku.
4. Do každé z jamek jsme přidali 100 µl enzymového konjugátu.
5. Následovala inkubace na dobu 15 minut při pokojové teplotě.
6. Poté jsme obsah jamek 3x promyli 300 µl promývacího roztoku.

7. Do všech jamek jsme přidali 100 µl roztoku TMB substrátu.
8. Destičku jsme nechali opět inkubovat; 15 minut při pokojové teplotě.
9. Do každé jamky jsme přidali 100 µl ukončovacího roztoku a nechali inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
10. Výsledky jsme změřili na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm nejpozději do 30 minut od ukončení reakce.

Koncentrace anti – DGP IgA i anti – DGP IgG se získají odečtením z kalibrační křivky. Hraniční rozmezí udávané výrobcem pro pozitivní vzorek je < 10 U/ml.

5.2.3 Kvantitativní stanovení IgA a IgG protilátek proti gliadinu

Princip metody:

- Jedná se o sendvičovou ELISA metodu

Složení soupravy AGA IgA096 a AGA IgG096:

- Dělitelná mikrotitrační destička s 96 jamkami, každá z nich potažená antigenem
- Pozitivní, CUT – OFF a negativní kontrolní roztoky. Tyto roztoky jsou využívány i jako kalibrátory. IgA, IgG: 5, 20, 45, 80 AU/ml
- Ředící roztok
- Enzymový roztok obsahující kozí imunoglobulin proti lidskému IgA (IgG) značený křenovou peroxidázou
- Substrátový roztok TMB
- Zastavovací a promývací roztok

Potřebné vybavení:

- Spektrofotometr na mikrotitrační destičky s měřením při vlnové délce 450nm
- Vícekanálová pipeta, pipety o objemech 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Termostat

Příprava a uchování vzorků:

- Vzorek krve necháme sražit, centrifugujeme.
- Testovací sérum musí být čisté a bez hemolýzy.
- Skladovat vzorky lze v chladu při teplotě 2 – 8 °C po dobu až 4 dnů. Pro delší dobu (až 6 měsíců) se vzorek zmrazí na teplotu – 20 °C. Nedoporučuje se opakované zmrazování a rozmrazování.

- Těsně před stanovením je potřeba vzorek naředit. Ředí se v poměru 1+100. Do 10 µl vzorku přidáme tedy 1000 µl ředícího roztoku. Kontrolní vzorky není třeba ředit.

Příprava dalších složek:

- Příprava promývacího roztoku – Obsah ampule naředíme 1+19. Do 25 µl koncentrovaného promývacího roztoku přidáme 475 µl destilované vody. Roztok uchovááme v chladu při 2 – 8 °C.

Pracovní postupy:

1. Nejprve jsme do jamek mikrotitrační destičky napipetovali po 100 µl kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a naředěných patientských vzorků.
2. Celou destičku jsme přikryli a nechali inkubovat po dobu 30 min. při 37 °C.
3. Odstranili jsme obsah jamek a promyli je čtyřikrát promývacím roztokem.
4. Do každé z jamek jsme přidali 100 µl konjugátu.
5. Destičku jsme přikryli a nechali opět inkubovat na dobu 30 minut při 37 °C.
6. Odstranili jsme obsah jamek a promyli je čtyřikrát promývacím roztokem.
7. Do všech jamek jsme přidali 100 µl substrátu TMB.
8. Destičku jsme přikryli víčkem a v termostatu nechali inkubovat při 37 °C po dobu 15 minut.
9. Do každé jamky jsme přidali 100 µl zastavovacího roztoku a nechali inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
10. Výsledky jsme změřili na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm nejpozději do 30 minut od ukončení reakce.

Koncentrace anti – AGA IgA i anti – AGA IgG se získají odečtením z kalibrační křivky. Hraniční rozmezí udávané výrobcem pro pozitivní vzorek je < 20 U/ml.

5.2.4 Stanovení protilátek proti endomysiu ve třídě IgA

Princip metody:

- Nepřímá imunofluorescence na řezech opičího jícnu

Složení soupravy:

- Podložní sklíčka s nafixovanými řezy opičího jícnu
- Pozitivní, negativní kontrola
- Antisérum proti lidskému IgA značené fluoresceinem (konjugát)

- Evansova modř
- PBS – fosfátový pufr
- Montovací médium
- Krycí sklíčka

Potřebné vybavení:

- Nastavitelná pipeta 50 μ l
- Vlhká komůrka
- Skleněná kyveta
- Fluorescenční mikroskop

Příprava a uchování vzorků:

- Vzorek krve necháme srazit, centrifugujeme. Testovací sérum musí být čisté a bez hemolýzy.
- Skladovat vzorky lze v chladu při teplotě 2 – 8 °C po dobu až 7 dnů. Pro delší dobu se vzorek zmrazí na teplotu – 20 °C. Nedoporučuje se opakované zmrazování a rozmrazování.
- Těsně před stanovením je potřeba vzorek naředit. Ředí se v poměru 1:10. Do 20 μ l vzorku přidáme tedy 200 μ l PBS.

Příprava dalších složek:

- Fosfátový pufr – ředí se 20x v destilované vodě. Do 50 ml pufru přidáme 950ml destilované vody.

Pracovní postup:

- Do každé jamky na sklíčku jsme napipetovali po 50 μ l naředěných patientských sér, do předposlední jamky negativní a do poslední jamky pozitivní kontrolu.
- Sklíčka jsme uložili do vlhké komůrky a nechali je inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.
- Poté jsme sklíčka opláchli puftrem a vložili do kyvety naplněné tímto puftrem. Pro-mývali jsme je 2x 5 minut. Následně jsme sklíčka osušili pomocí komerčních šablon tak, aby nedošlo k porušení nafixovaných řezů.
- Do každé jamky jsme přidali 1 kapku konjugátu (přibližně 50 μ l)
- Sklíčka jsme inkubovali 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě

- Následovalo opláchnutí pufrem a promývání v kyvetách naplněných tímto pufrem. Promývali jsme 2x5 minut. Do druhé lázně jsme přidali 3 – 5 kapek Evansovy modři a nechali barvit 5 minut.
- Sklíčka jsme opatrně promyli v čistém pufru, osušili a do každé jamky přidali kapku montovacího média a přikryli krycím sklíčkem
- Sklíčka jsme prohlíželi ve fluorescenčním mikroskopu a hledali fluorescenci endomysia či hladkého svalu.

Hodnotí se intenzita fluorescence pomocí křížků (-, +/-, ++, +++).

6 VÝSLEDKY

Všechny naměřené výsledky jsme zpracovávali ve statistickém programu MedCalc a Microsoft Excel.

6.1 Statistické zpracování dat

Nejprve jsme pomocí Kolmogorov – Smirnovova testu zjistili, zda soubory dat jednotlivých parametrů splňují požadavky na normální rozdělení. Tuto informaci jsme využili při porovnávání parametrů mezi sebou. Dále jsme vypočetli aritmetický průměr pro hodnoty normálního rozložení a medián při nenormálním rozložení hodnot.

Pro srovnávání hodnot parametrů mezi skupinami s pozitivní a negativní biopsií jsme použili:

- Parametrický t - test (tzv. Studentův test) - při normálním rozložení hodnot
- Neparametrický Wilcoxonův test – při nenormálním rozložení hodnot

Statistické rozdíly se vyhodnocují pomocí p – hodnoty kdy:

- | | | |
|----------------------|--------------------------------|-----|
| • $p > 0,05$ | není statisticky významné | ns |
| • $0,01 < p < 0,05$ | nízká statistická významnost | * |
| • $0,001 < p < 0,01$ | střední statistická významnost | ** |
| • $p < 0,001$ | vysoká statistická významnost | *** |

Dále jsme pro stanovení hraniční hodnoty využili ROC analýzu, kdy je stanoven nejhodnější poměr mezi senzitivitou a specificitou. Čím větší je plocha pod křivkou, tím se více od sebe liší pozitivní výsledky od negativních a tím větší je diagnostická významnost testu.

6.2 Přehled naměřených dat

Tabulka 5. Charakteristika patientských vzorků

č.	datum odběru	Dg	pohlaví	rok narození	věk
1	20. 01. 2012	D836	1	1954	58
2	20. 01. 2012	K900	1	2001	11
3	23. 01. 2012	N979	1	1977	35
4	24. 01. 2012	L130	0	1969	43
5	24. 01. 2012	J458	1	1959	53
6	24. 01. 2012	K900	1	2003	9
7	24. 01. 2012	K900	0	1980	32
8	24. 01. 2012	K30	0	1977	35
9	24. 01. 2012	D649	1	2005	7
10	05. 01. 2012	R104	0	1995	17
11	24. 01. 2012	E109	1	1978	34
12	05. 01. 2012	K529	0	1937	75
13	06. 01. 2012	K769	1	1942	70
14	06. 01. 2012	K900	1	1982	30
15	06. 01. 2012	K30	1	1970	42
16	06. 01. 2012	E039	0	1952	60
17	09. 01. 2012	K501	1	1965	47
18	13. 10. 2011	K900	1	1973	38
19	19. 10. 2011	R633	1	2010	1
20	19. 10. 2011	K900	1	1991	20
21	26. 10. 2011	E039	1	1966	45
22	21. 10. 2011	E039	1	1978	33
23	22. 07. 2011	K30	1	1961	50
24	27. 05. 2011	K900	0	1957	54
25	03. 05. 2011	K900	1	1955	56
26	05. 04. 2011	K900	0	2006	5
27	31. 01. 2011	J458	0	2006	5

č.	datum odběru	Dg	pohlaví	rok narození	věk
28	16. 12. 2010	A090	1	1975	35
29	17. 12. 2010	K529	0	1975	35
30	23. 12. 2010	K900	1	1972	38
31	20. 12. 2010	K760	0	1963	47
32	25. 01. 2011	K900	1	1979	32
33	22. 11. 2010	K900	1	1983	27
34	24. 11. 2010	K30	0	1940	70
35	23. 11. 2010	K900	1	1977	33
36	09. 11. 2010	K900	1	1989	21
37	09. 11. 2010	I509	0	1931	79
38	18. 11. 2010	K900	1	1961	49
39	18. 11. 2010	K900	1	1976	34
40	16. 11. 2010	K900	1	1945	65
41	29. 10. 2010	K294	1	1954	56
42	27. 10. 2010	K30	0	1981	29
43	02. 11. 2010	K900	1	1987	23
44	02. 11. 2010	K900	1	1987	23
45	27. 10. 2010	K30	1	1958	52
46	22. 10. 2010	K529	1	1955	55
47	22. 10. 2010	Z000	1	1931	79
48	20. 12. 2011	K590	1	1957	54
49	22. 11. 2011	L209	0	2009	2
50	14. 11. 2011	E109	0	1974	37
51	07. 11. 2011	E109	1	1988	23
52	21. 11. 2011	K900	1	1993	18
53	07. 11. 2011	L130	1	1986	25
54	11. 11. 2011	E109	0	1986	25
55	03. 11. 2011	K592	1	1970	41
56	12. 12. 2011	K900	0	2007	4
57	23. 11. 2011	L930	0	1948	63

č.	datum odběru	Dg	pohlaví	rok narození	věk
58	11. 11. 2011	E109	1	1986	25
59	23. 11. 2011	Z008	1	2007	4
60	11. 11. 2011	E119	1	1982	29
61	01. 12. 2011	E107	1	1981	30
62	30. 11. 2011	K900	1	1951	50
63	10. 01. 2012	K900	0	2001	11
64	21. 12. 2011	Z008	1	1946	65
65	01. 12. 2011	L130	1	1957	54
66	14. 11. 2011	K900	1	1988	23
67	21. 11. 2011	K900	1	1972	39
68	21. 12. 2011	K529	0	2005	6
69	20. 03. 2012	K599	0	2002	10
70	19. 03. 2012	K900	1	1977	35
71	15. 03. 2012	K900	1	1974	38
72	15. 03. 2012	Z008	1	2010	2
73	15. 03. 2012	D898	1	1979	33
74	14. 03. 2012	M8109	1	1975	37
75	20. 03. 2012	K900	1	1998	14
76	19. 03. 2012	K900	0	1976	26
77	21. 03. 2012	L130	0	1954	58
78	19. 03. 2012	D509	0	1971	41
79	19. 03. 2012	K589	0	1974	38
80	22. 03. 2012	K900	0	1993	19
81	22. 03. 2012	E061	1	2004	8
82	22. 03. 2012	K900	0	1994	18

Vysvětlivky: 0 – Muž, 1 – Žena

Tabulka 6. Přehled naměřených hodnot u vybrané skupiny pacientů

č.	biopsie	tTG IgA	EMA	DGP IgA	DGP IgG	AGA IgA	AGA IgG
1	n	0,1	n	1,85	10,03	31,46	18,29
2	p	119,2	p+++	18,5	14,2	3,85	8,39
3	p	4,1	n	15,4	2,5	4,75	3,89
4	p	242,9	p+++	35,6	24,8	50,08	53,27
5	n	1,3	n	2,5	18,5	8,45	4,5
6	p	54,8	p+	2,66	7,11	8,04	11,1
7	p	27,5	p+++	19,8	6,6	16,75	6,33
8	p	55,3	p+++	10,1	9,2	22,53	5,38
9	p	450,5	p+++	33,5	11,6	4,66	4,76
10	p	12,4	p++	25,3	12,4	11,04	13,36
11	p	32,4	p+++	29,2	18,4	11,97	8,82
12	p	116,2	p+++	32,4	18,6	148,75	11,89
13	p	98,9	p+++	27,4	11,5	19,53	5,42
14	p	262,7	p+++	15,5	7,8	6,58	4,72
15	p	1,7	p++	3,03	4,9	4,46	4,2
16	n	2,3	n	6,4	12,7	9,6	4,42
17	n	1	n	6,1	20,5	8,26	22,23
18	n	0,9	n	14,6	6,6	7,82	3,66
19	p	1,9	p+++	3,5	45,3	6,05	8,31
20	p	56,6	p+++	14,5	24,6	7,14	23,84
21	p	12	p+	19,8	23,2	18,81	39,18
22	p	10	n	0,96	12,7	8,87	11,32
23	p	1,8	p+++	5,5	15,6	3,69	10,65
24	p	10,1	p+	14	31,3	18,35	12,85
25	p	20,5	p+++	18,9	13,5	28,78	56,51
26	p	74,6	p+++	19,8	65,7	33,98	76,58
27	p	1,3	n	30,1	69,8	48,96	112,99
28	n	1,5	n	23,8	2,9	13,06	9,46

č.	biopsie	tTG IgA	EMA	DGP IgA	DGP IgG	AGA IgA	AGA IgG
29	n	1,9	n	19,4	3,2	29,5	10,47
30	p	74,8	p+	51,1	24,3	19,99	8,64
31	n	2,9	n	7,6	12,5	14,56	5,86
32	n	1,8	n	4	10,9	20,25	20,75
33	p	60,4	p+++	18,5	15,8	38,82	58,69
34	p	2,3	n	12,3	3,1	19,45	3,98
35	n	0,2	n	9,6	10,9	27,91	11,2
36	n	2,4	n	9,3	43,7	11,2	15,03
37	n	1,7	n	7,4	17,7	9,43	5,7
38	p	245,6	p+++	37,8	17,8	100,99	15,1
39	p	756,2	p+++	22	42,3	20,71	40,68
40	n	1,6	n	3,3	12,9	10,81	22,23
41	n	0,1	n	122,9	7,8	6,54	4,63
42	n	0,6	n	6,7	24,1	11,49	151,69
43	n	4,3	n	2,9	10,5	11,52	11,96
44	p	57,4	p+++	20,1	57,3	11,1	21,9
45	n	0,1	n	1,3	18,5	7,6	28,1
46	n	0,4	n	4,8	41,9	6,62	7,1
47	p	27,5	p++	3,36	42,4	7,6	5,78
48	n	0,7	n	6,4	14,8	5,17	4,11
49	n	2,4	n	1,3	11,6	7,33	15,51
50	n	0,1	n	6,9	19,9	12,25	3,42
51	p	2,1	n	11,8	7,5	24,23	4,33
52	p	15,3	p+++	11,9	22,8	10,81	9,56
53	n	0,8	n	4,6	19,4	11,65	15,03
54	n	0,8	n	1,6	12,2	7,14	45,78
55	n	2	n	4,4	11,4	8,3	7,95
56	p	187,2	p+++	39,3	1,1	4,41	71,98
57	p	0,7	n	10,1	4,2	7,52	6,53
58	n	1,8	n	7,7	16,7	23,1	8,42

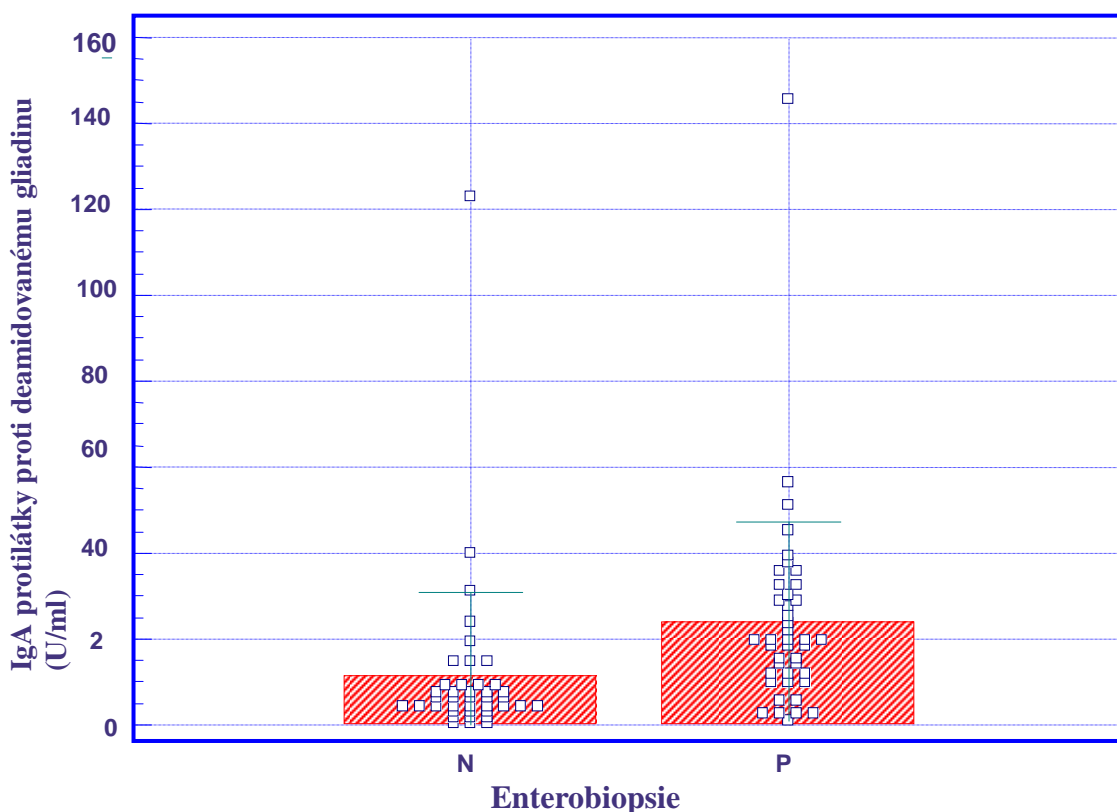
č.	biopsie	tTG IgA	EMA	DGP IgA	DGP IgG	AGA IgA	AGA IgG
59	p	14,5	n	6,7	14,9	10,81	21,43
60	n	0,2	n	5,3	11	10,14	7,25
61	n	1,3	n	5,3	10,8	8,94	4,97
62	p	1,5	n	9,7	20,5	13,89	14,38
63	p	20,5	p++	23,7	0,1	4,41	4,8
64	n	1,5	n	4,7	11,4	7,18	9,81
65	n	0,8	n	4,7	12,9	9,64	4,68
66	n	0,6	n	7,6	11,2	6,17	3,28
67	n	1,9	n	4,9	14,3	13,59	13,53
68	n	1,1	n	4,3	10,2	7,29	13,67
69	n	0,2	n	31,1	10,9	52,21	8,85
70	n	1,5	n	9,9	64,8	13,83	9,84
71	p	240	p+++	36,8	46,2	69,07	99,57
72	p	250,2	p+++	45,3	35,1	250	230
73	p	0,8	n	20,4	14,8	17,97	20,29
74	p	4,1	p+	145,5	8,9	26,55	8,57
75	p	207,5	p+++	56,3	28,9	12,25	7,65
76	n	3,1	n	14,8	10,8	15,51	5,82
77	n	47,8	p++	39,9	21,3	23,62	15,58
78	n	0,2	n	0,2	22,9	4,36	14,04
79	n	0,2	n	10,1	14,5	14,28	19,06
80	n	33,8	n	15,4	18,2	13,13	37,91
81	p	102,7	p++	28,9	19,8	11,39	20,36
82	n	20,9	n	8,6	12,3	25,28	106,82

Vysvětlivky: p – pozitivní, n – negativní

6.3 Porovnání hodnot testů u pacientů s pozitivní a negativní biopsií

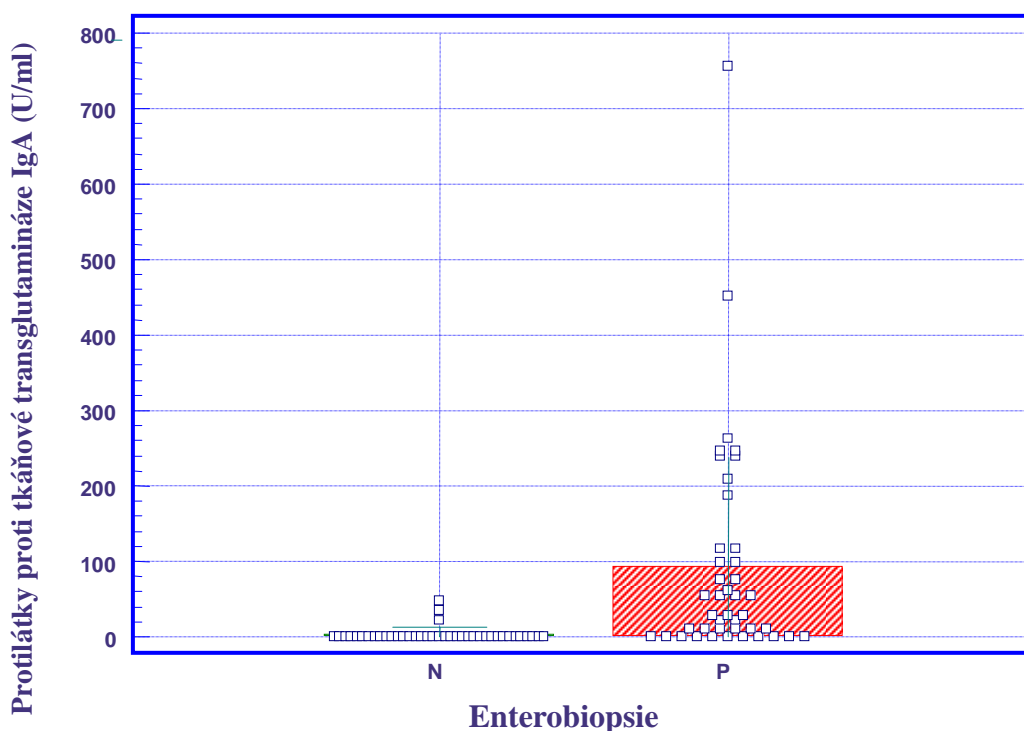
Při srovnání hodnot protilátek proti deamidovanému gliadinu ve třídě IgA u pacientů s pozitivní biopsií a u pacientů s negativní biopsií bylo zjištěno, že u pacientů s nediodagnostikovanou celiakií jsou statisticky nižší hodnoty protilátek než u pacientů s celiakií potvrzenou biopsií. (Tabulka 7.) Hranice statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,001$. Nalezené hodnoty tedy naznačují možnost využití stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu ve třídě IgA pro průkaz celiakie. Znárodnění této závislosti je v grafu 1.

Graf 1. Srovnání pozitivní a negativní biopsie a protilátek proti deamidovanému gliadinu IgA



Při srovnání hodnot autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA ve skupinách pacientů s pozitivní a negativní enterobiopsií bylo zjištěno, že rozdíl mezi těmito hodnotami je statisticky velmi významný (Tabulka 7.). Hranice vysoké statistické významnosti je $p < 0,001$. Grafický záznam je v grafu 2.

Graf 2. Srovnání protilátek proti tTG ve třídě IgA s pozitivní a negativní biopsií



Ostatní laboratorní parametry nevykazovaly statisticky významné rozdíly mezi skupinami s pozitivní a negativní enterobiopsií (Tabulka 7.)

Tabulka 7. Srovnání hodnot parametrů mezi skupinami s pozitivní a negativní biopsií

	Pozitivní biopsie			Negativní biopsie			p	Významnost	test
	Medián	Průměr	SD1	Medián	Průměr	SD2			
tTG IgA	29,95	93,78	144,08	1,3	3,72	9,22	$p < 0,001$	***	Wilcoxon
DGP IgA	19,8	23,98	23,11	6,4	11,35	19,54	$p < 0,001$	***	Wilcoxon
DGP IgG	15,7	20,93	16,84	12,6	16,23	11,11	$P = 0,147$	ns	t-test
AGA IgA	13,07	27,85	44,11	11,01	13,65	9,19	$P = 0,301$	ns	Wilcoxon
AGA IgG	11,21	27,81	41,19	10,16	18,68	27,47	$P = 0,393$	ns	Wilcoxon

6.4 ROC analýza

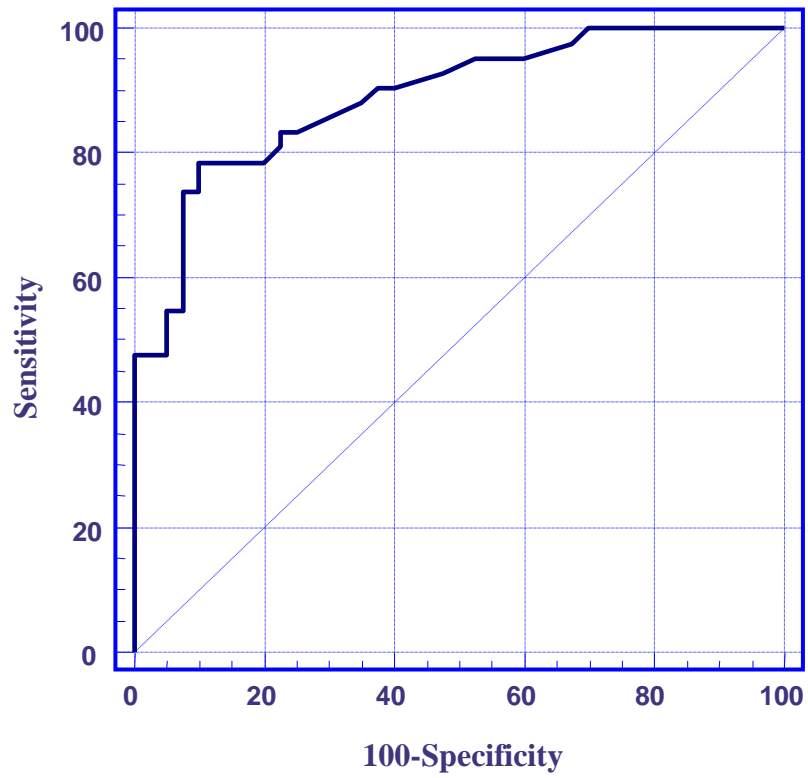
6.4.1 Stanovení hraniční hodnoty u protilátek anti - tTG IgA

Pomocí ROC analýzy byla zjištěna optimální hodnota pro anti – tTG ve třídě IgA 1,9 U/ml, kdy bylo dosaženo jak velmi vysoké senzitivity (83,3 %) tak i specificity (77,5 %) (Tabulka 8.). Grafické vyjádření výpočtu je v grafu číslo 3. Plocha pod křivkou představovala hodnotu 0,890.

Tabulka 8. Stanovení hraniční hodnoty protilátek proti tTG

Kritérium (U/ml)	Senzitivita %	Specificita %
> 1,1	95,2	47,5
> 1,3	92,9	52,5
> 1,5	90,5	60,0
> 1,6	90,5	62,5
> 1,7	88,1	65,0
> 1,8	85,7	70,0
> 1,9	83,3	75,0
> 2,0*	83,3	77,5
> 2,1	81,0	77,5
> 2,3	78,6	80,0
> 2,4	78,6	85,0
> 2,9	78,6	87,5
> 3,1	78,6	90,0
> 4,1	73,8	90,0
> 4,3	73,8	92,5
> 10	71,4	92,5
> 10,1	69,0	92,5
> 12,0	66,7	92,5

Graf 3. ROC křivka pro IgA anti - tTG



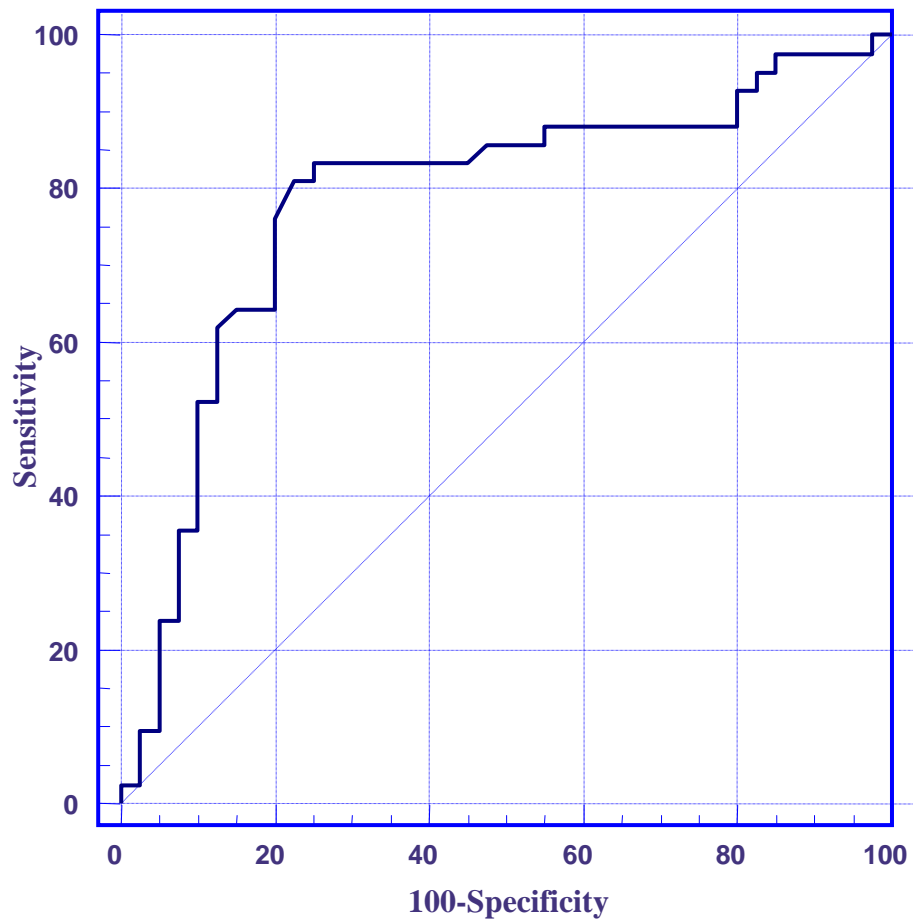
6.4.2 Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům ve třídě IgA

Pomocí ROC analýzy byla zjištěna optimální hodnota pro anti – DGP IgA 9,9 U/ml, kdy byla dosažena vysoká hodnota jak senzitivity (81,0 %) tak i specificity (77,5 %) (Tabulka 9.). Grafické vyjádření výpočtu je v grafu číslo 4. Plocha pod křivkou je 0,785.

Tabulka 9. Stanovení hraniční hodnoty anti – DGP IgA

Kritérium (U/ml)	Senzitivita %	Specificita %
> 6,9	83,3	57,5
> 7,4	83,3	60,0
> 7,6	83,3	65,0
> 7,7	83,3	67,5
> 8,6	83,3	70,0
> 9,3	83,3	72,5
> 9,6	83,3	75,0
> 9,7	81,0	75,0
> 9,9*	81,0	77,5
> 10,1	76,2	80,0
> 11,8	73,8	80,0
> 11,9	71,4	80,0
> 12,3	69,0	80,0
> 14,0	66,7	80,0
> 14,5	64,3	80,0
> 14,6	64,3	82,5
> 14,8	64,3	85,0
> 15,4	61,9	87,5

Graf 4. ROC křivka pro anti – DGP IgA



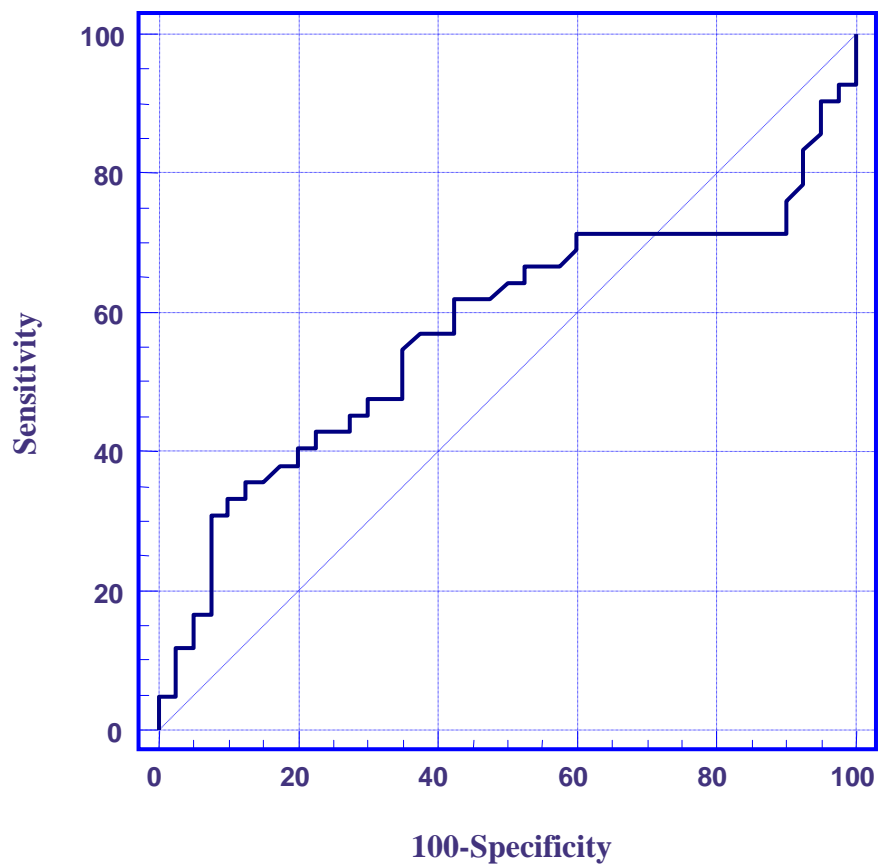
6.4.3 Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům ve třídě IgG

Pomocí ROC analýzy byla zjištěna optimální hodnota pro anti – DGP IgG 11,4 U/ml, kdy byla dosažena senzitivita 71,4 % a specificita 40,0 % (Tabulka 10.). Grafické vyjádření výpočtu je v grafu číslo 5. Byla vypočtena plocha pod křivkou 0,575.

Tabulka 10. Stanovení hraniční hodnoty anti - DGP IgG

Kritérium (U/ml)	Senzitivita %	Specificita %
>10,8	71,4	22,5
> 10,9	71,4	30,0
> 11,0	71,4	32,5
>11,2	71,4	35,0
> 11,4 *	71,4	40,0
> 11,5	69,0	40,0
> 11,6	66,7	42,5
> 12,2	66,7	45,0
> 12,3	66,7	47,5
> 12,4	64,3	47,5
> 12,5	64,3	50,0
> 12,7	61,9	52,5
> 12,9	61,9	57,5
> 13,5	59,5	57,5
> 14,2	57,1	57,5
> 14,3	57,1	60,0
> 14,5	57,0	62,5
> 14,8	54,8	65,0

Graf 5. ROC křivka pro anti – DGP IgG



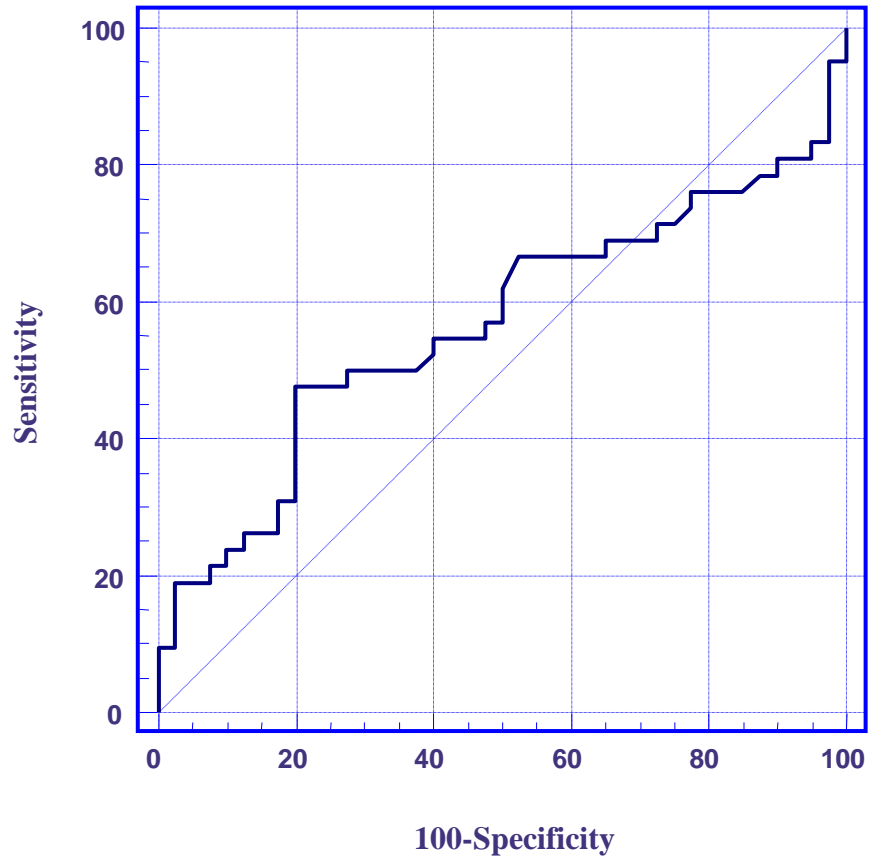
6.4.4 Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti nativnímu gliadinu IgA

Pomocí ROC analýzy byla zjištěna optimální hodnota pro anti – AGA IgA 10,1 U/ml, kdy byla dosažena sensitivita 66,7 % a specificita 47,5 % (Tabulka 11.). Grafické vyjádření výpočtu je v grafu číslo 6. Hodnota plochy pod křivkou je 0,566.

Tabulka 11. Stanovení hraniční hodnoty anti - AGA IgA

Kritérium (U/ml)	Sensitivita %	Specificita %
> 8,9	66,7	35,0
> 8,9	66,7	37,5
> 9,4	66,7	40,0
> 9,6	66,7	42,5
> 9,6	66,7	45,0
> 10,1*	66,7	47,5
> 10,8	61,9	50,0
> 11,0	59,5	50,0
> 11,1	57,1	50,0
> 11,2	57,1	52,5
> 11,4	54,8	52,5
> 11,5	54,8	55,0
> 11,5	54,8	57,5
> 11,7	54,8	60,0
> 12,0	52,4	60,0
> 12,3	50,0	62,5
> 13,1	50,0	65,0

Graf 6. ROC křivka pro anti - AGA IgA



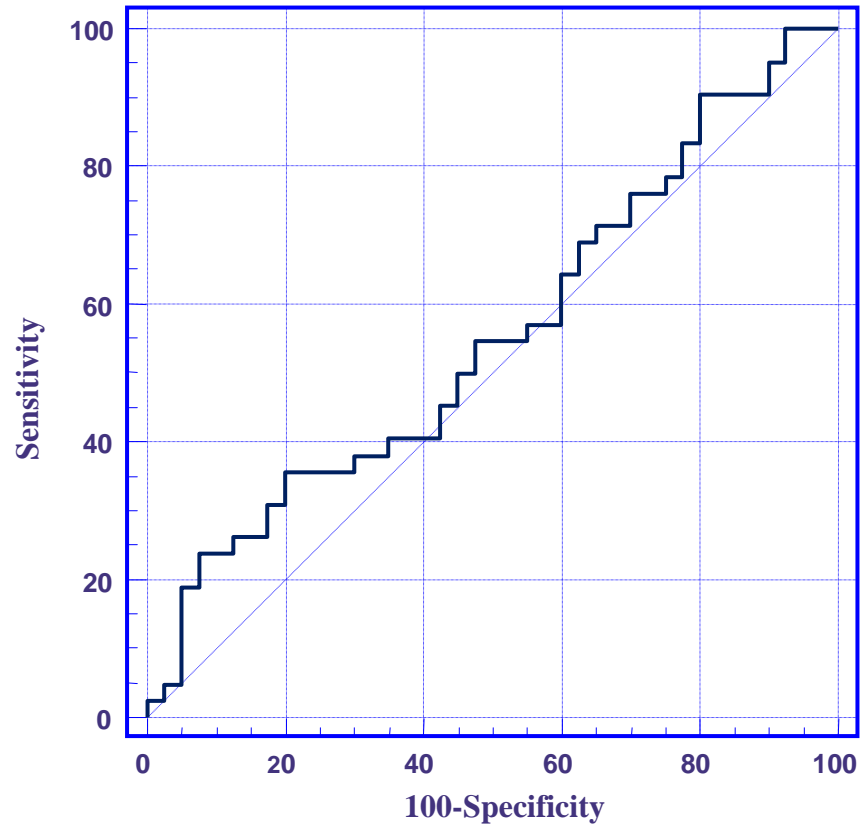
6.4.5 Stanovení hraniční hodnoty pro protilátky proti nativnímu gliadinu IgG

Pomocí ROC analýzy byla zjištěna optimální hodnota pro anti – AGA IgG 8,4 U/ml, kdy byla dosažena 64,3 % sensitivita a 40 % specificita (Tabulka 12.). Grafické vyjádření výpočtu je v grafu číslo 7. Plocha pod křivkou je 0,555.

Tabulka 12. Stanovení hraniční hodnoty anti - AGA IgG

Kritérium (U/ml)	Sensitivita %	Specificita %
> 7,1	71,4	32,5
> 7,3	71,4	35,0
> 7,7	69,0	35,0
> 8,00	69,0	37,5
> 8,3	66,7	37,5
> 8,4	64,3	37,5
> 8,4 *	64,3	40,0
> 8,6	61,9	40,0
> 8,6	59,5	40,0
> 8,8	57,1	40,0
> 8,9	57,1	42,5
> 9,5	57,1	45,0
> 9,6	54,8	45,0
> 9,8	54,8	47,5
> 9,8	54,8	50,0
> 10,5	54,8	52,5
> 10,65	52,4	52,5
> 11,1	50,0	52,5

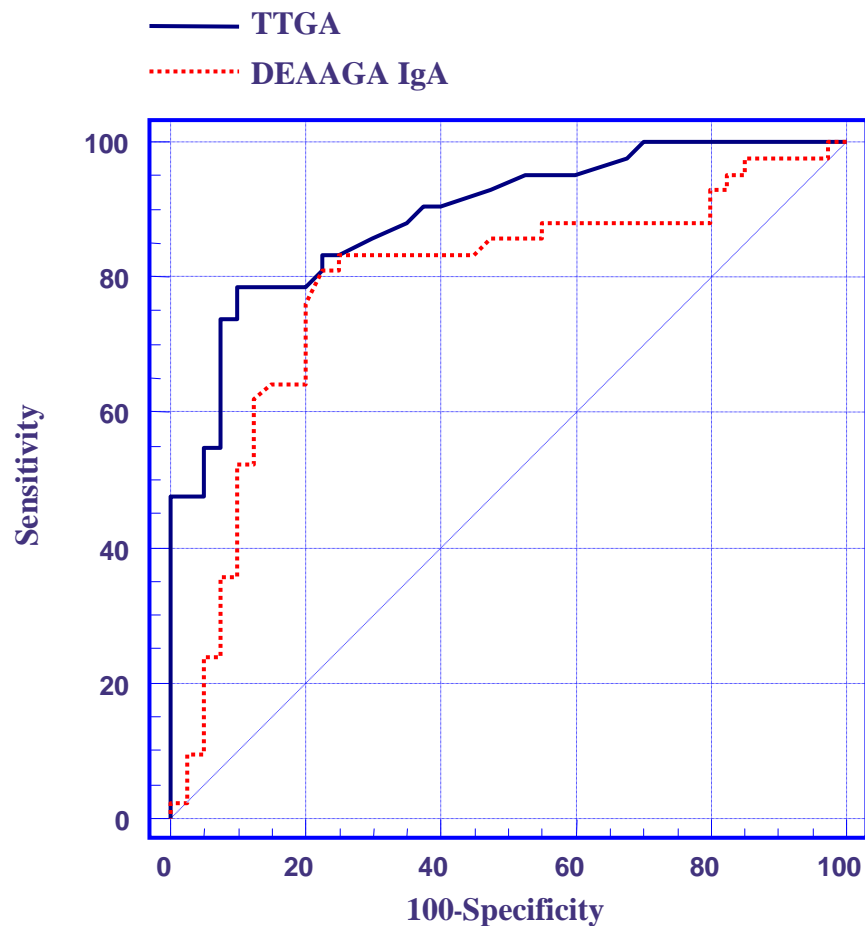
Graf 7. ROC křivka pro anti - AGA IgG



6.4.6 Srovnání ROC křivek pro protilátky proti tTG IgA a pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA

Při srovnání ROC křivek protilátek proti tkáňové transglutamináze IgA a protilátek proti deamidovanému gliadinu IgA nebyla nalezena statistická významnost mezi oběma testy, $p = 0,054$. Rozdíl mezi jednotlivými plochami byl stanoven 0,105 (Graf 8.).

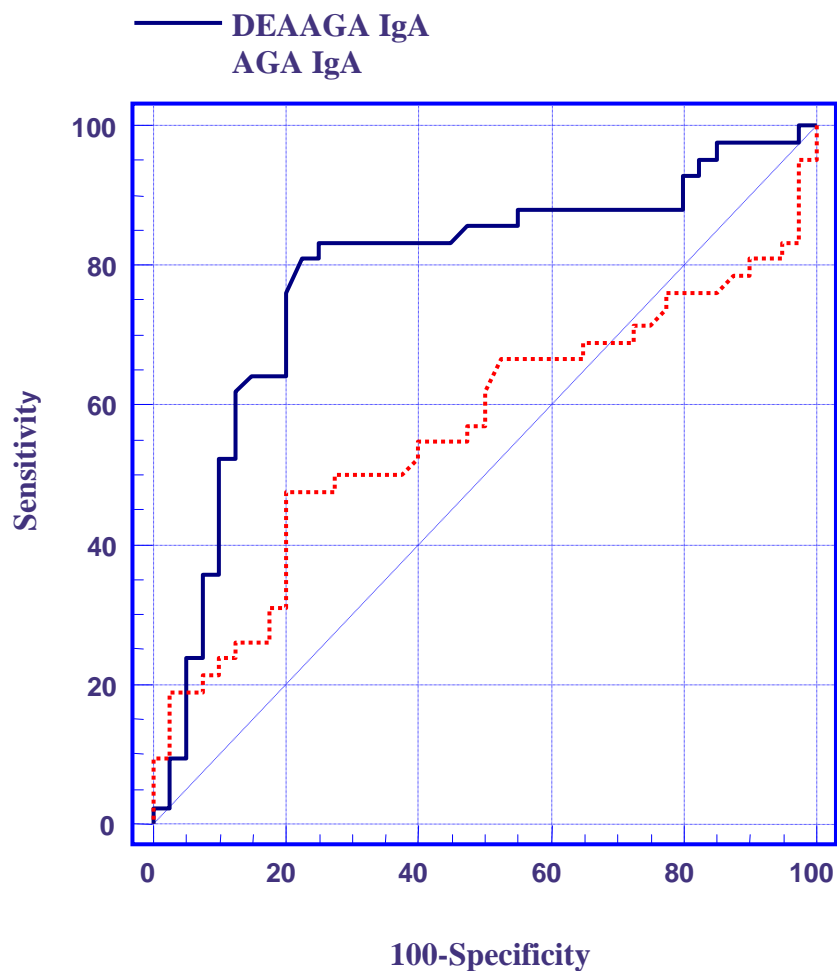
Graf 8. Srovnání ROC křivek pro protilátky proti tTG IgA a pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA



6.4.7 Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA a protilátek proti nativnímu gliadinu IgA

Při srovnání ROC křivek u protilátek proti deamidovanému gliadinu a protilátek proti gliadinu (oba parametry ve třídě IgA) byl nalezen významný statistický rozdíl mezi oběma testy, $p=0,001$. Rozdíl mezi plochami je 0,219 (Graf 9.).

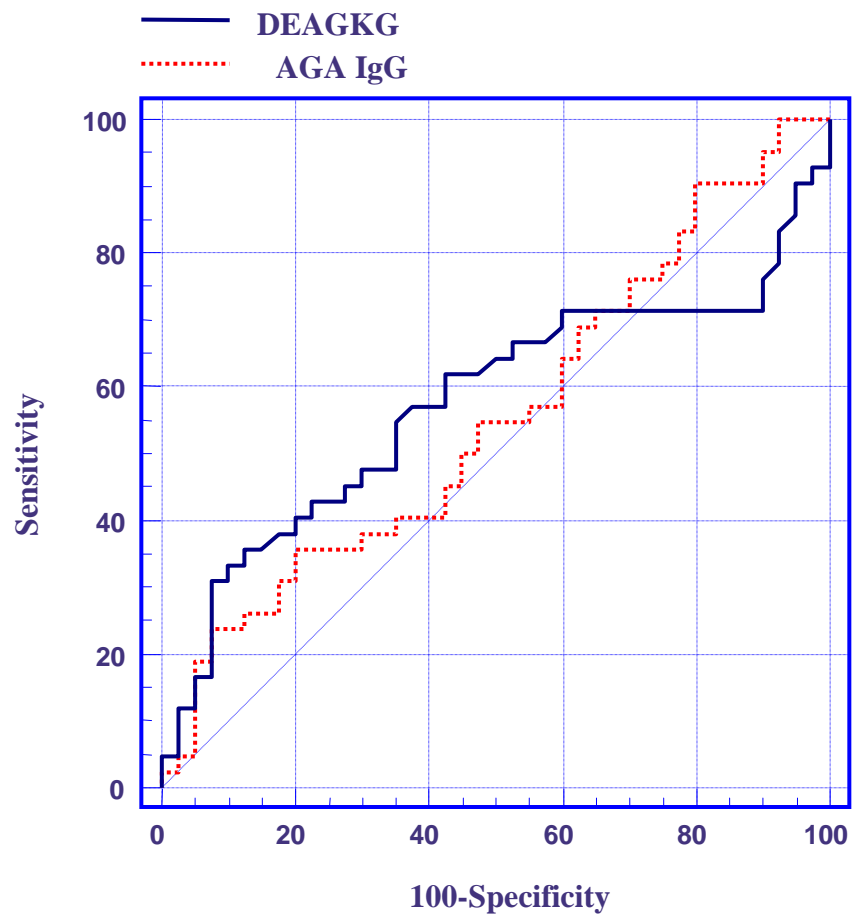
Graf 9. Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA a protilátek proti nativnímu gliadinu IgA



6.4.8 Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgG a protilátek proti nativnímu gliadinu IgG

Při srovnání ROC křivek u protilátek proti deamidovanému gliadinu a protilátek proti gliadinu (oba parametry ve třídě IgG) nebyl nalezen významný statistický rozdíl mezi oběma testy, $p=0,774$. Byl zjištěn rozdíl mezi plochami 0,020 (Graf 10.).

Graf 10. Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgG protilátek proti nativnímu gliadinu IgG



6.4.9 Hodnocení positivity EMA ve srovnání s enterobiopsií

Za použití χ^2 (chí kvadrát) testu byla prokázána statisticky významná závislost mezi pozitivitou protilátek proti endomysiu IgA a výsledkem enterobiopsie. Hodnota $p < 0,0005$.

Dále jsme z kontingenční tabulky (Tabulka 13.) pomocí statistických vzorců vypočítali senzitivitu a specifitu pro protilátky proti endomysiu IgA.

Senzitivita

- správně pozitivní / (správně pozitivní + falešně negativní) = $33 / (33 + 9) = 78,6 \%$

Specifita

- správně negativní / (správně negativní + falešně pozitivní) = $39 / (39 + 1) = 97,5 \%$

Tabulka 13. Hodnocení positivity EMA ve srovnání s enterobiopsií

	EMA				celkem
	n	+	++	+++	
Negativní biopsie	39	0	1	0	40
Pozitivní biopsie	9	5	5	23	42
celkem	48	5	6	23	82

DISKUSE

V této diplomové práci jsem se zaměřila na problematiku celiakie. Nejprve jsem se zabývala teoretickou stránkou věci. Podrobně jsem prostudovala dané téma jak z klinického hlediska s důrazem na příznaky, formy celiakie, léčbu komplikací, tak i z pohledu patogenetického s popisem endogenních a exogenních vlivů. Dále jsem se zabývala možnostmi diagnostiky celiakie. Za zlatý standard je stále považováno vyšetření histologického vzorku sliznice tenkého střeva odebraného při endoskopickém vyšetření. Toto vyšetření je dost zatěžující pro pacienta, a proto se pro vyhledávání nových případů a monitorování průběhu onemocnění s výhodou používají laboratorní vyšetření, zejména stanovení různých typů protilátek. Ty hrají v diagnostice celiakie důležitou roli, avšak definitivní diagnóza je stále závislá na výsledku histologického vyšetření.

V dnešní době se rutinně stanovují ve spojení s celiakií protilátky proti tkáňové transglutamináze, protilátky proti endomysiu, protilátky proti gliadinu a nově taky protilátky proti deamidovanému gliadinu.

Z literatury je známa celá řada studií zabývajících se problematikou laboratorních testů pro průkaz celiakie, určením jejich senzitivity a specifity a jejich klinické využitelnosti.

Vermeersch a kol. v roce 2010 porovnávali protilátky proti DGP ve třídě IgG s ostatními protilátkami (anti – tTG IgA i IgG, anti – DGP IgA, anti – AGA IgA, anti AGA IgG). Měření probíhalo na souboru 86 pacientů s celiakií a 741 kontrolních vzorcích různými komerčními sety. Došli k závěru, že pro stanovení celiakie je nejvhodnější použít kombinaci anti tTG IgA a DGP – IgG u všech pacientů s podezřením na celiakii, a tak zachytit i pacienty se selektivním deficitem IgA. Nejvyšší hodnoty senzitivity byly naměřeny u tTG IgA (83 – 88 %) a u DGP IgG (76 – 86 %). Všechny testy měly také velmi vysokou specifitu nad 90%. Nejnižší hodnota specifity byla naměřena u anti DGP IgA, 65,1%.

Také Rasthak a spolupracovníci dospěli k závěru, že stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu je velmi senzitivní a specifický test. Bylo testováno 216 vzorků, z toho 92 mělo pozitivní biopsii a 124 byly kontrolní vzorky. Výsledky ukázaly vyšší senzitivitu i specifitu jak ve třídě IgA, tak IgG než u nativního gliadinu. Nejvyšší citlivost i přesnost však byly u protilátek proti tkáňové transglutamináze.

V naší studii jsme porovnávali 6 různých testů (anti - tTG IgA, anti - DGP IgA a IgG, anti - gliadin IgA a IgG a anti - EMA). Pracovali jsme se souborem 82 pacientů z poraden 2. interní a dětské kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Pacienti byli vybráni podle kritéria: minimálně 1 pozitivní sérologický test specifických protilátek. U všech těchto pacientů byla provedena enterobiopsie.

Jelikož se stanovení protilátek využívá v praxi především ke screeningu, k vyhledávání nových případů celiakie, snažili jsme se stanovit hraniční hodnoty tak, aby měly co nejvyšší senzitivitu i na úkor specificity. Záměrem je zachytit při screeningu co největší počet nemocných.

Po statistickém vyhodnocení výsledků pomocí Wilcoxonova testu ($p < 0,001$), kdy jsme anti - tTG porovnávali s biopsií, jsme zjistili, že existuje spojitost mezi pozitivní biopsií a zvýšenou hladinou anti - tTG. Nalezené hodnoty tedy naznačují možnost využití stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA pro diagnostiku celiakie. Dále jsme se snažili určit vhodnou hraniční hodnotu pro rozlišení pozitivních a negativních výsledků. Výrobce soupravy doporučuje CUT - OFF hodnotu 10 U/ml, avšak naše měření vyhodnocené pomocí ROC analýzy stanovilo jako optimální hodnotu 1,9 U/ml při vysoké senzitivitě (83,3 %) i specificitě (77,5 %). Vyšší senzitivita byla upřednostněna z důvodu možného použití testu jako screeningového.

Další z testů, protilátky proti endomysiu ve třídě IgA, také prokázal korelaci mezi pozitivní enterobiopsií a zvýšenými hodnotami protilátek. I když výsledky ukázaly vysokou senzitivitu (78%) a velmi vysokou specificitu (98%), stále musíme brát v potaz, že toto vyšetření může být ovlivněno určitou subjektivní chybou danou manuální náročností metodického postupu a požadavkem na zkušenost pracovníka vyhodnocujícího mikroskopický fluorescenční obraz. Řada laboratoří volí z tohoto důvodu na provedení a vyhodnocení méně náročné vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze.

Jako parametr sloužící k dlouhodobému monitorování klinického stavu pacientů s celiakií je využíváno vyšetření protilátek proti gliadinu. I přes nízkou senzitivitu a specificitu, která je v literatuře dostatečně doložena, se stále protilátky proti gliadinu uplatňují v laboratorní diagnostice celiakie. Naše pozorování potvrdilo nízké hodnoty senzitivity jak ve třídě IgA (66,7%) tak i IgG (64,3%). Tyto hodnoty jsme získali na úkor specificity, které ve třídě IgA dosahovaly hodnoty 47,5% a ve třídě IgG 40,0%. Z toho důvodu se nejvíce stanovení protilátek proti gliadinu vhodné pro diagnostiku celiakie.

Nově byl popsán další laboratorní test pro diagnostiku i monitorování celiakální sprue, a to protilátky ve třídě IgA a IgG proti deaminovaným peptidům (DGP) pocházejícím z gliadinu. V literatuře se udává vysoká senzitivita i specificita tohoto testu. V našem měření měly lepší výsledky protilátky ve třídě IgA, kdy bylo dosaženo 81,0 % senzitivity a 77,5 % specificity. Tento test jsme porovnávali i s protilátkami proti tTG a nenašli jsme statisticky významný rozdíl. Tudíž je možno tyto testy zaměnit. Anti - DGP ve třídě IgA prokázaly také v porovnání s protilátkami proti nativnímu gliadinu (AGA) výrazně vyšší senzitivitu i specificitu, a proto je nepochybně mnohem přínosnější použití stanovení protilátek proti DGP ve třídě IgA ve srovnání s protilátkami proti nativnímu gliadinu ve stejném izotypu.

Stanovení anti DGP ve třídě IgG poskytlo mnohem horší výsledky, kdy senzitivita byla nižší než u IgA (71,0 %) a tento test měl rovněž výrazně nižší specificitu (40,0%). Také jsme porovnávali anti DGP IgG s protilátkami proti nativnímu gliadinu ve třídě IgG. Ze statistického hlediska není mezi metodami rozdíl, ale jelikož obě metody mají nízké hodnoty senzitivity a specificity, pro stanovení celiakie bychom nedoporučili ani jednu.

Jako vhodný test pro stanovení a screening celiakie bychom tedy doporučili již ověřený test protilátek anti tTG IgA a také nový test pro stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu ve třídě IgA. U pacientů s celkovým deficitem IgA bychom doporučili jako screening anti DGP IgG, jelikož má na rozdíl od protilátek proti nativnímu gliadinu ve třídě IgG, který se v řadě laboratoří stále používá, podle našich výsledků při stejné specificitě vyšší senzitivitu.

ZÁVĚR

V laboratoři jsme vytypovali 82 pacientů, kteří splňovali naše požadavky: byla u nich provedena biopsie (ať s pozitivním či negativním výsledkem) a u každého pacienta byl alespoň jeden z testů specifických protilátek pro celiakii pozitivní.

Pomocí testovací statistiky jsme z výsledků zjistili, že u IgA protilátek proti tTG a IgA protilátek proti deamidovanému gliadinu je statistický rozdíl mezi pozitivní a negativní biopsií. Tyto dva testy také měly nejlepší poměr senzitivity a specifity, kde senzitivita přesahovala 80 % a specifita 75 %. Dále jsme zjistili pomocí porovnání ROC křivek, že není statistický rozdíl mezi těmito testy a proto je možné testy zaměnit.

U protilátek proti endomysiu také bylo dosaženo vysoké senzitivity 78 % a velmi vysoké specifity 98 %. Ale jelikož je tato metoda závislá na precizním provedení zkušenou laborantkou a navíc subjektivně hodnocena lékařem a také dva předešlé testy měly lepší specifitu, doporučili bychom pro diagnostiku a screening celiakie stanovení anti tTG IgA a anti DGP IgA.

U pacientů s deficitem celkového IgA navrhujeme použít test anti DGP IgG, který měl při stejné specifitě jako protilátky proti gliadinu IgG vyšší senzitivitu, a to 71 %.

Stanovení protilátek proti nativnímu gliadinu má pro diagnostiku celiakie nedostatečnou senzitivitu i specifitu a není vhodné je v klinické praxi k těmto účelům využívat.

SEZNAM LITERATURY

- ADAMS, S. Interpretation of Celiac Disease Blood Test Results. *Celiac*. 1996, [online] [citace 2012-02-15]. www.celiac.com/articles/57/1/Interpretation-of-Celiac-Disease-Blood-Test-Results/Page1.html
- BÁNOVČIN, P., BUCHANEC, J. a ZIBOLEN M. *Detská gastroenterológia*. Martin: Osveta, 2003, 229 - 254 s., ISBN 80-806-3099-2
- CAJA, S., MÄKI, M. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cellular & Molecular Immunology*. 2011, roč. 8, 103–109 s.
- CAPUTO, I., LEPRETTI, M. Enzymatic Strategies to Detoxify Gluten: Implications for Celiac Disease. *Enzyme Research*. 2010, roč. 2010, 1 – 9 s.
- CERF-BENSUSSAN, N., CELLIER, CH. Coeliac Disease: An Update on Facts and Questions Based on the 10th International Symposium on Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2003, roč. 37, č. 4, 412 – 421s.
- Clinical Policy Bulletin: Celiac Disease Laboratory Testing. *Aetna*. [online] [cit. 2012-03-06]. http://www.aetna.com/cpb/medical/data/500_599/0561.html
- Consensus Development Conference on Celiac Disease. *National Institutes of Health (NIH)*. 2004, [online] [cit. 2012-02-14]. <http://consensus.nih.gov/2004/2004CeliacDisease118Program.pdf#page=40>
- CRAIG, D., ROBINS, G. Advances in celiac disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2007, roč. 23, č. 2, 142-148 s.
- DAUM, O., BENEŠ, Z., MICHAL, M. Odběr bioptického materiálu při endoskopickém vyšetření gastrointestinálního traktu pro vybraná zánětlivá onemocnění. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2011, roč. 65, č. 2, 84 – 89 s.
- DVOŘÁK, M. Dermatitis herpetiformis duhring – forma manifestace celiakální sprue. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2005, roč. 59, č. 1, s. 24
- FASANO, A. Systemic Autoimmune Disorders in Celiac Disease: Autoimmune Diseases Associated with Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2006, roč. 22, č. 6, 674-679 s.
- FRIČ, P. Celiakie - celosvětová choroba mnoha tváří. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*. 2008, č. 4, 187 – 189s.
- FRIČ, P. Cílený screening celiakie (metodický pokyn). *Česká gastroenterologická společnost*. 2011, [online] [cit. 2012-03-25]. [http://www.cgs-cls.cz/Public/cgs-cls/CILENYSCREENINGCELIKIE %20_METODICKY_ %20POKYN.pdf](http://www.cgs-cls.cz/Public/cgs-cls/CILENYSCREENINGCELIKIE%20_METODICKY_%20POKYN.pdf)

- FRICĚ, P. Refrakterní celiakie. *Medicína po promoci*. 2009, č. 3, 99 - 103 s.
- FRÜHAUF, P. Celiakální sprue. *Pediatric pro praxi*. 2007, roč. 8, č. 6, 333– 335 s.
- GOLDEMUND, K. Celiakie. *Pediatric pro praxi*. 2001, č. 3, 106 – 111 s.
- GUANDALINI, S. A Brief History of Celiac Disease. *Impact*. 2007, roč. 7, č. 3, 1– 3 s.
- HERRERA, M., HERMOSO, M. An update on the pathogenesis of celiac disease. *Revista médica de Chile*. 2009, roč. 137, č. 12. 1617-1626 s.
- HLA Typing for Celiac Disease. *Quest Diagnostics*. [online] [cit. 2012-03-16].
http://www.questdiagnostics.com/testcenter/testguide.action?fn=TS_HLA_Celiac.htm
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 72 – 76; 140 - 146 s. ISBN 978-807-3872-809
- JAMES, M., SCOTT, B. Endomysial antibody in the diagnosis and management of coeliac disease. *Postgraduate Medicine*. 2000, roč. 76, 466 – 468 s.
- JAMES, S. History of Celiac Disease. *The Gluten Free Neighborhood*. 2008, [online] [2012-03-25]. <http://beyondglutenfree.wordpress.com/2008/08/18/history-of-celiac-disease>
- KAGNOFF, M. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007, roč. 117, č. 1, 41 – 49 s.
- KOHOUT, P., PAVLÍČKOVÁ, J. *Celiakie a bezlepková dieta*. 3. vyd. Praha: Maxdorf, 2006, 16 – 31 s. ISBN 80-7345-070-4
- KOHOUT, P. Celiakie v ambulantní praxi. *Medicína pro praxi*. 2007, roč. 6, č. 6, 250 -252s.
- KOHOUT, P. Diagnostika a léčba celiakie. *Interní medicína pro praxi*. 2006, č. 7, 8. 324 –326 s.
- KOPECKÝ, O., ANDRÝS, C., DRAHOŠOVÁ, M., a kol. *Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii*. Hradec Králové: Garamon, 2004, 52 – 53 s. ISBN 80-86472-17-5
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, 831 - 838 s. ISBN 80-862-2550-X
- LATA, J., BUREŠ, J., VAŇÁSEK, T. *Gastroenterologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010, 67 - 71 s. ISBN 978-807-2626-922
- LITZMAN, J. *Vyšetřovací metody v klinické imunologii*. Brno: Masarykova Univerzita, 1998 14 – 18 s. ISBN 80-210-1807-0
- LOCHMANOVÁ, A. *Základy imunologie*. Ostrava: Ostravská Univerzita v Ostravě, 2006, 114 – 118 s. ISBN 80-7368-153-6

- MALKUSOVÁ, I., BLIHAR, K. Celiakie dospělých – často opomíjené onemocnění. *Sestra*. 2010, č. 6, 32 s.
- MAŇASKOVÁ, D. Celiakie, *Mediciman.cz*. 2010, [online] [cit. 2012-04-15]. <http://medicinman.cz/?p=cinnost/celiakie>
- MCCALLISTER, E. ImmusanT: Having their cake. *BioCentury*. 2012, 1 – 2 s.
- MOLBERG, Ø., MCADAM, N. Role of Tissue Transglutaminase in Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2000, roč. 30, č. 3, 232-240 s.
- NEVORAL J., Celiakální sprue v pediatrii a její diagnostika. *Postgraduální medicína*. 2005, č. 5, 593 s.
- POŽGAJ, F., METELKO, Ž. Celiac disease and diabetes mellitus. *Diabetologia Croatica*. 2003, roč. 32, č. 4, 157 – 162 s.
- PROKOPOVÁ, L. Celiakie: Co má vědět ambulantní internista. *Interní medicína*. 2008, č. 5, 233 - 239 s.
- RASHTAK, S., ETTORE, M. Comparative Usefulness of Deamidated Gliadin Antibodies in the Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenteology and Hepatology*. 2008, roč. 6, č. 4, 426 – 370 s.
- SABATTINO, A., CARROZA, G. Celiac disease. *Lancet*. 2009, roč. 373, č. 9673, 1480 – 1493 s.
- SOLLID, M. Breast milk against coeliac disease. *GUT*. 2002, roč. 51, č. 6, 767 – 768 s.
- TOMAN, B. Celiac Disease: On the Rise. *Mayo Clinic's Online Research Magazine*. 2010, [online] [cit. 2012-04-15]. <http://discoverysedge.mayo.edu/ceciac-disease/>
- TYE-DIN, J., STEWART, J., DROMEY J. Comprehensive, Quantitative Mapping of T Cell Epitopes in Gluten in Celiac Disease. *Science Translational Medicine*. 2010, roč. 2, č. 41, 41 – 51 s.
- UTIYAMA, S., REASON, R. Genetics and immunopathogenics aspects of the celiac disease: a recent vision. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2004, roč. 41, č. 2, 121-128 s.
- VERMEERSCH, P., GEBOES, K. Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. *Clinica Chimica Acta*. 2010, roč. 441, č. 13 -14, 931 – 935 s.
- VOLTA, U., VILLANACCI V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cellular & Molecular Immunology*. 2011, č. 8, 96–102 s.
- WIESER, H., KOEHLER, P. The Biochemical Basis of Celiac Disease. *Cereal Chemistry*. 2008, roč. 85, č. 1, 1 – 13 s.

SEZNAM ZKRATEK

Anti - DGP	Protilátky proti DGP
Anti – AGA	Protilátky proti gliadinu
Anti - EMA	Protilátky proti endomysiu ve třídě IgA
Anti – tTG	Protilátky proti tTG
APC	Antigen prezentující buňka
CNL	Celiakie nereagující na léčbu
CS	Celiakální sprue
CTLA gen	gen cytotoxických T lymfocytů
DGP	Deamidovaný gliadinový peptid
DH	Duhringova herpetiformní dermatitida
DM	Diabetes mellitus
EATL	S enteropatií související T lymfom
EIA	Enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme – linked immunosorbent assay
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex
IEL	Intraepiteální T lymfocyty
IgA	Imunoglobulin A
IgG	Imunoglobulin G
IL	Interleukin
INF γ	Interferon γ
MICA	Neklasická molekula HLA A
MICB	Neklasická molekula HLA B
NHL	Non – Hodgkinův lymfom
NKG2D	Receptor NK buněk
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RIA	Imunoanalýza značená radioizotopem
TcR	Receptor T lymfocytů
TGF β	Transformující růstový faktor β
TNF	Tumor nekrotizující faktor
tTG	Tkáňová transglutamináza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Imunopatogeneze celiakie.....	23
Obrázek 3. Změny sliznice podle Marshe (Maňásková, 2010)	28
Obrázek 2. Endoskopický obraz sliznice duodena (web Mayo Clinic, 2010).....	28
Obrázek 4. Algoritmus pro stanovení celiakie.....	32

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Formy celiakie (Krejsek, 2004).....	17
Tabulka 2. Obsah jednotlivých aminokyselin v obilninách (Krejsek a další, 2004).....	19
Tabulka 3. Marshova klasifikace (Frič, 2011).....	29
Tabulka 4. Specificita a senzitivita jednotlivých testů (Volta a další, 2011)	34
Tabulka 5. Charakteristika patientských vzorků	46
Tabulka 6. Přehled naměřených hodnot u vybrané skupiny pacientů.....	49
Tabulka 7. Srovnání hodnot parametrů mezi skupinami s pozitivní a negativní biopsií	53
Tabulka 8. Stanovení hraniční hodnoty protilátek proti tTG.....	54
Tabulka 9. Stanovení hraniční hodnoty anti – DGP IgA.....	56
Tabulka 10. Stanovení hraniční hodnoty anti - DGP IgG	58
Tabulka 11. Stanovení hraniční hodnoty anti - AGA IgA.....	60
Tabulka 12. Stanovení hraniční hodnoty anti - AGA IgG.....	62
Tabulka 13. Hodnocení positivity EMA ve srovnání s enterobiopsií	67

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Srovnání pozitivní a negativní biopsie a protilátek proti deamidovanému gliadinu IgA.....	52
Graf 2. Srovnání protilátek proti tTG ve třídě IgA s pozitivní a negativní biopsi.....	53
Graf 3. ROC křivka pro IgA anti - tTG.....	55
Graf 4. ROC křivka pro anti – DGP IgA.....	57
Graf 5. ROC křivka pro anti – DGP IgG.....	59
Graf 6. ROC křivka pro anti - AGA IgA.....	61
Graf 7. ROC křivka pro anti - AGA IgG.....	63
Graf 8. Srovnání ROC křivek pro protilátky proti tTG IgA a pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA.....	64
Graf 9. Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgA a protilátek proti nativnímu gliadinu IgA.....	65
Graf 10. Srovnání ROC křivek pro protilátky proti deamidovanému gliadinu IgG protilátek proti nativnímu gliadinu IgG	66