



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

# Stanovení výskytu autoprotilátek v diagnostice celiakie

Vypracoval: Budská Veronika

Vedoucí práce: RNDr. Vrajová Zdeňka

České Budějovice 2015

## Abstrakt

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovit výskyt autoprotilátek důležitých pro diagnostiku celiakie a stanovit jejich dynamiku v průběhu onemocnění. Stanovení protilátek se provádí pomocí sérologických laboratorních testů imunofluorescence a ELISA. Pro diagnostiku celiakie je důležité stanovení protilátek proti endomysiu, deaminovanému gliadinu a tkáňové transglutamináze. Výsledky byly diskutovány na základě poznatků, získaných z dostupné literatury.

V teoretické části jsem se zaměřila především na charakteristiku celiakie, zmínila jsem příčinu vzniku nemoci - lepek, podrobněji jsem se zaměřila na genetiku, se kterou vznik celiakie výrazně souvisí, v neposlední řadě jsem nastínila laboratorní diagnostiku celiakie a léčbu.

V praktické části jsem se věnovala laboratornímu vyšetření celiakie. Laboratorní vyšetření zahrnuje vyšetření protilátek proti endomysiu ve třídě IgA imunofluorescenční metodou, kdy je výsledek vyhodnocován pod fluorescenčním mikroskopem. Protilátky proti deaminovanému gliadinu a tkáňové transglutamináze se stanovují ve třídě IgA a IgG metodou ELISA, kdy je výsledné zbarvení vzorku hodnoceno fotometricky.

Vyšetření protilátek jsem provedla celkem u osmnácti vzorků. U dvou patientských vzorků byla, na základě pozitivitu protilátek proti endomysiu, deaminovanému gliadinu a tkáňové transglutaminázy prokázána celiakie. Jedenáct patientských vzorků bylo negativních na všechny stanovované protilátky. U zbylých pěti patientských vzorků byla prokázány pouze protilátky proti deaminovanému gliadinu.

Dynamiku protilátek v průběhu onemocnění jsem stanovovala u pacientů, kterým byla diagnostikována celiakie. V grafech je zachyceno, kdy pacienti správně dodržovali bezlepkovou dietu, tzn. stanovované protilátky klesají. Pokud bezlepkovou dietu nedodržovali, protilátky IgA a IgG opět stoupají.

Celiakie patří, kvůli své vysoké prevalenci, k jedním z nejdůležitějších onemocnění trávicího ústrojí. Nedostatečná diagnostika souvisí s výskytem netypických symptomů

pro celiakii. Velmi důležitým opatřením, jak včas diagnostikovat celiakii je cílený screening, zameřený na skupiny s vyšší pravděpodobností výskytu tohoto onemocnění.

**Klíčová slova :** celiakie, protilátky, imunofluorescence, ELISA, dynamika protilátek

## **Abstract**

The goal of my thesis was to determine an incidence of autoantibodies important for a diagnosis of celiac disease and determine their dynamics in a course of the disease. The determination of antibodies is performed by using serological laboratory tests called immunofluorescence and ELISA. For the diagnosis of celiac disease is important to detect antibodies against endomysium, deaminated gliadin and tissue transglutaminase. Results were discussed on the basis of findings from available literature.

In a theoretical part I focused especially on the characteristics of celiac disease. I mentioned the cause of the disease - gluten, I focused more detail on genetics, which is strongly related to the emergence of the celiac disease. Last but not least, I outlined a laboratory diagnosis of celiac disease and the treatment.

In a practical part I devoted to laboratory examination of celiac disease. Laboratory tests include tests for antibodies against endomysium IgA by immunofluorescence method. The outcome is evaluated under a fluorescence microscope. Antibodies against deaminated gliadin and tissue transglutaminase are determined in IgA and IgG antibodies by ELISA method. The resulting sample is evaluated photometrically.

I conducted antibody testing a total of eighteen samples. Two patient samples were based on the positivity of antibodies against endomysium, deaminated gliadin and tissue transglutaminase proven celiac disease. Eleven patient samples were negative for all antibodies assayed. In the remaining five patient samples were detected only antibodies against deaminated gliadin.

Dynamics of antibodies during the disease were determined by a patients who were diagnosed with celiac disease. The graphs shows when the patients properly adhere a gluten-free diet, ie. determined antibodies decline. If patients do not comply gluten-free diet, IgA and IgG rise again.

Celiac disease belongs, because of its high prevalence, to one of the major diseases of a digestive tract. Insufficient diagnosis associated with an occurrence of atypical

symptoms for celiac disease. Very important measure to early diagnose celiac disease is targeted screening, aimed at groups with a higher probability of occurrence of this disease.

**Key words** : celiac disease, antibodies, immunofluorescence, ELISA, antibodies dynamics

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2016

.....  
Veronika Budská

## **Poděkování**

Velmi ráda bych poděkovala své vedoucí práce RNDr. Zdeňce Vrajové za odborné vedení mé bakalářské práce, vstřícnost a hlavně trpělivost, které mi věnovala.

Chtěla bych tímto také poděkovat svým rodičům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	10
Úvod.....	11
Teoretická část .....	13
1 Historie celiakie.....	13
2 Charakteristika onemocnění .....	15
3 Lepek .....	16
4 Genetika.....	17
5 Klinické projevy celiakie.....	20
5.1 Klasická forma.....	20
5.2 Atypická forma .....	21
5.2.1 Kožní forma .....	21
5.3 Tichá forma.....	22
5.4 Asymptomatická forma .....	22
5.5 Latentní forma .....	22
5.6 Potencionální forma.....	23
5.7 Refrakterní forma .....	23
6 Prevalence onemocnění .....	24
6.1 Rizikové skupiny pro výskyt celiakie.....	24
6.2 Cílený screening celiakie.....	25
7 Laboratorní diagnostika celiakie .....	26
7.1 Protilátky proti tkáňové transglutamináze.....	26
7.2 Protilátky proti endomysiu .....	27
7.3 Protilátky proti gliadinu/deaminovaný gliadin .....	27
8 Léčba .....	29



Cíle práce .....	30
Metodika .....	31
9 Vyšetřované vzorky.....	31
9.1 Nepřímý imunofluorescenční test.....	31
9.1.1 Pracovní pomůcky.....	32
9.1.2 Pracovní postup.....	33
9.1.3 Vyhodnocení pod mikroskopem .....	34
9.2 ELISA test .....	34
9.2.1 ELISA test, vyšetření protilátek proti deaminovanému gliadinu .....	35
9.2.1.1 Pracovní pomůcky .....	35
9.2.1.2 Pracovní postup .....	36
9.2.2 ELISA test, vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze .....	38
9.2.2.1 Pracovní pomůcky .....	39
9.2.2.2 Pracovní postup .....	39
Výsledky .....	44
Diskuze .....	49
Seznam informačních zdrojů .....	56

## Seznam použitých zkratek

pANCA	perinukleární protilátky proti cytoplazmě neutrofilu
anti-tTG	protilátky proti tkáňové transglutamináze
Ab	protilátka
Ag	antigen
APC	buňky prezentující antigen
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
FITC	fluoresceinizoithiokyanát
HLA	lidský leukocytární antigen
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
TCR	receptor T lymfocytu
Th1, Th2	subtypy T lymfocytu
tTG	tkáňová transglutamináza

## Úvod

Celiakie je dědičné autoimunitní střevní onemocnění vyvolané intolerancí lepku. Imunitní systém pacientů trpících celiakií reaguje na přítomnost lepku v trávicí soustavě nepřiměřenou imunitní reakcí. Dochází k tvorbě protilátek proti štěpným produktům lepku a později k tvorbě protilátek proti endomysiu a tkáňové transglutamináze. Dochází k poškození sliznice tenkého střeva. Doposud jedinou účinnou léčbou je celoživotní dodržování bezlepkové diety.

V současné době je celiakie velmi diskutovaným tématem. Prevalence onemocnění je dnes mnohonásobně vyšší, než tomu bylo zhruba před dvaceti lety. V České republice se prevalence odhaduje na 1:200-250, což znamená, že touto chorobou trpí okolo 40-50 tisíc lidí. Ovšem odborně sledováno a diagnostikováno je pouhých 10-15%. Vysoký výskyt onemocnění je dán především změnou manifestace onemocnění. Dnes už se jen málokdy setkáváme s klasickým obrazem neprospívání dítěte, mnohem častější jsou atypické, tedy mimostřevní příznaky, což je důvod, proč bývá celiakie často diagnostikována pozdě.

Jako cíle mé bakalářské práce jsem si zvolila : vypracování rešerše, na téma celiakie, seznámení se s metodami imunofluorescence a ELISA, které se používají v diagnostice celiakie, stanovení výskytu autoprotilátek podílejících se na patogenezi celiakie a stanovení jejich dynamiky v průběhu onemocnění.

V teoretické části jsem se zabývala především charakteristikou celiakie. Zmínila jsem lepek, jehož intolerance je hlavní příčinou vzniku celiakie. Podrobněji jsem se pokusila vysvětlit genetickou souvislost s celiakií a vznik a průběh autoimunitní reakce ve střevě predisponovaného jedince. Popsala jsem jednotlivé formy celiakie, které jsou v současné době rozpoznávány. Nastínila jsem stanovení protilátek, důležitých pro diagnostiku celiakie a na závěr jsem se krátce zmínila o léčbě celiakie.

V praktické části jsem se věnovala laboratornímu vyšetření celiakie. Laboratorní vyšetření zahrnuje stanovení protilátek proti endomysiu ve třídě IgA a vyšetření protilátek proti deaminovanému gliadinu a tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG.

Protilátky proti endomysiu se vyšetřují imunofluorescenčně a protilátky proti deaminovanému gliadinu a tkáňové transglutamináze pomocí metody ELISA.

# Teoretická část

## 1 Historie celiakie

Před 8 000 - 10 000 lety lidé zjistili, že lov zvěře a sběr plodů nejsou jediným způsobem obživy. Zejména v oblastech Turecka, Iráku a Íránu došlo v tomto období ke vzniku a vývoji zemědělství. Lidé začali pěstovat a zpracovávat obilniny a někteří onemocněli, právě pokud jejich jídelníček obilniny obsahoval (9).

Nejstarší dochované záznamy o onemocnění, které se nápadně podobá celiakii pocházejí ze starého Řecka, kdy byl popsán obraz dítěte s nafouklým bříškem. Podobný popis se objevuje také v lékařských pojednáních ze starého Egypta (15).

Název celiakie byl odvozen od řeckého pojmu „koiliakos“ (abdominální, břišní) (15). Svůj nynější název celiakie získala až v 19. století, kdy Samuel Gee popsal nemoc jako druh chronických zažívacích potíží, vyskytujících se ve všech věkových kategoriích, ale především u dětí (19, 20).

Holandský pediatr W. K. Dicke v roce 1950 popsal souvislost obilovin s celiakií. Přispěl ke zlepšení stavu dětí tím, že vyřadil pšenici, žito a oves z jídelníčku postižených a nahradil je kukuřičným škrobem či rýžovou moukou. Dětem se následně vracela chuť k jídlu a zlepšilo se i vstřebání živin v těle. Na Dickeho navázal van de Kamer a v roce 1953 identifikoval v obilovinách hlavní příčinu vzniku celiakie - lepek (19, 25, 15).

Další významný objev byl o čtyři roky později učiněn doktorem J. W. Palleym, který při operaci dospělého člověka trpícího celiakií popsal abnormalitu střevní výstelky. Změny na sliznicích tenkého střeva potvrdil také Margot Shiner pomocí orální biopsie v roce 1957. Nález atrofie střevní sliznice vedl k lepšímu chápání onemocnění (12, 16, 19).

V roce 1992 popsal Marsh různé stupně onemocnění sliznice tenkého střeva a na tomto základě rozdělil onemocnění do několika forem. Vysvětlil tak výskyt atrofií na sliznicích, typických pro celiakii, u lidí bez klasických celiakálních příznaků (15).

## 2 Charakteristika onemocnění

Celiakie, celiakální sprue nebo také glutenová enteropatie, je autoimunitní zánětlivé střevní onemocnění vyvolané intolerancí ke gliadinové frakci proteinů (nejčastěji k pšeničnému lepku nebo k příbuzným proteinům žita a ječmene).

Obecnou podstatou autoimunitních chorob je rozvoj humorální a buněčné imunitní reakce, která napadá a poškozuje struktury vlastního organismu. Spouštěcím faktorem takové reakce je agens, proti kterému je imunitní reakce namířena a jehož antigenní struktura se podobá orgánu či tkáni, která je následně vlastními protilátkami nebo buněčnou imunitou poškozena (10, 16, 18).

Celiakie je považována za nevyлéčitelné, tedy celoživotní onemocnění. Vyskytuje se u geneticky disponovaných jedinců v dětství i dospělosti. V dětském věku nejčastěji vzniká po přechodu z mateřského mléka na kašovitou stravu, v dospělosti se projevuje převážně mezi dvacátým a třicátým, nebo mezi padesátým a šedesátým rokem života (15, 25).

Při tomto onemocnění dochází především k poškození sliznice tenkého střeva, hlavně jejunu. Imunitní systém pacientů trpících celiakií reaguje na přítomnost lepku v trávicí soustavě tvorbou protilátek, které se vyšetřují sérologicky (25). Štěpné produkty lepku nejsou u geneticky disponovaných jedinců tolerovány imunitním systémem a vyvolávají nepřiměřenou imunitní reakci. Během reakce dochází k tvorbě protilátek proti těmto štěpům a později k trvalé tvorbě autoprotiátek, tedy protilátek proti vlastním bílkovinám lidského organismu. Imunitní systém je pod trvalým antigenním tlakem a je tak vystaven neustálé zátěži (7).

Gastrointestinální projevy onemocnění se zjišťují především biopsií tenkého střeva. Nejčastějšími nálezy jsou : vymizení klků, vznik krypt a případná normalizace architektury klků jako odpověď na správné dodržování bezlepkové diety (25).

### 3 Lepek

Spouštěčem imunitní reakce je v případě celiakie lepek. Lepek, neboli gluten se nachází ve vrchní části některých obilných zrn, zvané endosperm. Tato část zrna představuje 70-72% hmotnosti celého zrna a tvoří základ pro bílou mouku.

Z chemického hlediska je lepek bílkovina, která obsahuje dvě hlavní skupiny proteinů : prolaminy (gliadiny) a gluteliny (gluteniny) (25, 30).

Prolaminy jsou globulární bílkoviny s velkým obsahem prolinu a kyseliny glutamové, většinou jsou odpovědné za vznik imunitní reakce u pacientů trpících celiakií. Jedná se o zásobní proteiny cereálií. Jsou nerozpustné ve vodě a roztocích solí, ale rozpustné v 70% ethanolu.

Názvy prolaminů jsou různé v závislosti na druhu obilí, ve kterém se vyskytují. Prolaminy pšenice (gliadiny), žita (sekaliny) a ječmene (hordeiny) jsou považovány za toxické ve vztahu k celiakii, zatímco prolaminy kukuřice (zeiny) a rýže (oryziny) jsou považovány za netoxické a názory na toxicitu prolaminů ovsu (aveniny) se různí (15, 30).



## 4 Genetika

Na vzniku celiakie se výrazně podílí genetické faktory, tzn. typ lidského leukocytárního antigenu (HLA). Pro rozvoj imunitní reakce jsou důležité hlavně HLA I. a HLA II. třídy. HLA I. třídy se vyskytují na všech jaderných buňkách v organismu a HLA II. třídy se za fyziologických okolností vyskytují pouze na antigen prezentujících buňkách (APC). Mezi APC patří dendritické buňky, monocyty, makrofágy, B lymfocyty a endotelové buňky (10, 21).

Molekuly HLA jsou u člověka kódovány na krátkém raménku 6. chromozomu. V případě HLA glykoproteinů II. třídy rozlišujeme celkem tři izotypy, které se nazývají DR, DQ a DP (10).

Úloha HLA-DQ molekul spočívá v prezentaci antigenů (Ag) na APC T lymfocytům. Za rozvoj celiakie ze 40% případů zodpovídá typ molekul HLA II. třídy, zbylých 60% způsobují doposud neznámé geny (25).

V tenkém střevě dochází ke štěpení lepku na gliadinové peptidy a působením tTG se tyto peptidy deaminují. Deaminované gliadinové peptidy vykazují vyšší imunogenitu než nativní gliadin a podněcují tak spuštění imunitní reakce.

Deaminované peptidy často s tTG vytvářejí komplex, který je APC rozpoznán jako organismu cizí, a tak dojde k jeho pohlcení a zpracování. APC prezentuje část Ag na svých HLA molekulách II. třídy Th1 a Th2 lymfocytům. Th2 lymfocyty s APC reagují prostřednictvím TCR receptoru a dalších vedlejších vazeb. Dochází k dozrání Th2 lymfocytů a uvolňování interleukinů (např. IL-2, IL-4).

Vlivem interleukinů dochází, za pomoci Th2 lymfocytů, k vyžívání B lymfocytů na plazmatické buňky, které produkují protilátky, namířené proti antigenu prezentovanému na APC (viz. obr. 1).

Interleukiny uvolňované Th2 však také vedou k aktivaci cytotoxických T lymfocytů, které cytotoxicky poškozují epitelovou vrstvu a způsobují tak atrofii sliznic.

Rovněž dochází k uvolňování matrixových metaloproteináz z fibroblastů. Metaloproteinázy také poškozují sliznici tenkého střeva.

Vazba autoprotilátek na tTG vede k zesílení aktivity tTG a v důsledku toho se zvyšuje i deaminace gliadinu (1, 10, 18).

Molekula HLA-DQ (stejně jako ostatní molekuly HLA II. třídy) se skládá ze dvou různých řetězců alfa a beta, je označována jako heterodimer. Každý jedinec většinou produkuje dvě varianty řetězce alfa a dvě varianty řetězce beta. Celkem tedy čtyři izoformy DQ řetězců, z nichž pouze dvě jsou majoritní. Různé varianty řetězců umí vázat různé typy antigenů a prezentovat imunitním buňkám různé sekvence antigenů nebo autoantigenů odlišným způsobem.

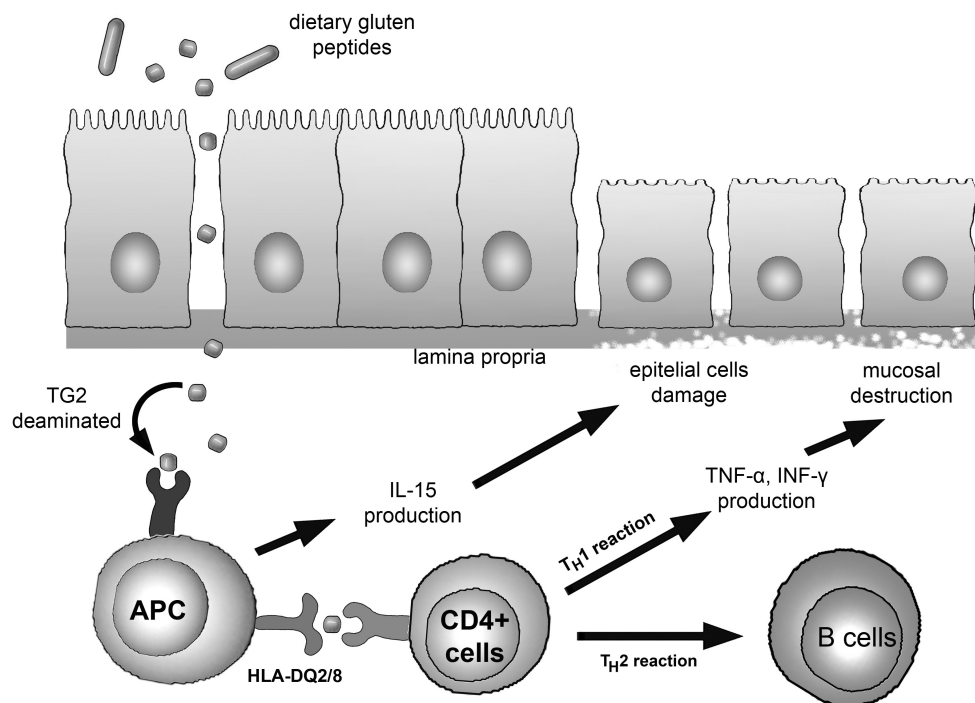
Kombinace řetězců alfa a beta určuje funkční kapacitu molekuly HLA a její vazbu ke gliadinovým peptidům. Po kontaktu s gliadinem může dojít k rozvoji zánětlivého procesu ve sliznici tenkého střeva u geneticky predisponovaného jedince. U takového jedince vykazuje molekula HLA-DQ vysokou afinitu k peptidům, které vznikají při štěpení lepku.

První projevy celiakie nezávisí však pouze na úzké genetické vazbě s HLA-DQ, ale také na době a množství požitého glutenu. Pokud je lepek vystaven jedinec s nezralým imunitním systémem, rozvíjí se onemocnění poměrně rychle (21, 10).

Celiakie se vyskytuje u jedinců s antigeny HLA II. třídy typu DQ2 nebo DQ8. Celiakie bývá často sdružena s dalšími autoimunitními onemocněními, jako například diabetes mellitus I. typu, autoimunitní tyreoiditida, autoimunitní hepatitida, primární bilární cirhóza. U pacientů s celiakií se také častěji setkáváme s deficitem selektivního IgA, Sjögrenovým syndromem, Downovým syndromem, Turnerovým syndromem nebo Williamsovým syndromem. Větší pravděpodobnost výskytu celiakie je také u příbuzných pacientů (16, 25).

Jak již bylo zmíněno, u většiny pacientů s celiakií můžeme nalézt dva typy HLA antigenů II. třídy. Konkrétně se jedná o HLA-DQ2 pozitivní u 90-95% a HLA-DQ8 pozitivní u 5% celiaků. Tyto HLA antigeny má 20-30% zdravé populace, celiakií však onemocní pouhé 1% (25).

Obrázek 1 : Schéma imunitní reakce po požití lepku u vnímavého jedince



Zdroj : převzato z Intech open science (35)

## 5 Klinické projevy celiakie

V dnešní době je popsáno mnoho klinických manifestací celiakie a ukazuje se, že jsou podstatně rozmanitější než se předpokládalo zhruba před dvaceti lety.

Dříve byla celiakie rozeznávána pouze u pacientů s tzv. „klasickou“ formou, tedy se zažívacími potížemi. Dnes však víme, že se celiakie může projevovat také neklasickou (mimostřevní) formou, kdy jsou postiženy orgány bohaté na tkáňovou transglutaminázu. Neklasická forma se projevuje například metabolickými poruchami kostí, kožními problémy, neurologicky, psychicky, nebo může být naopak asymptomatická (25).

Příznaky onemocnění mohou být tedy různé, což je důvod, proč je nemoc u mnoha pacientů diagnostikována velmi pozdě.

Za nejzávažnější formu nemoci lze považovat celiakální krizi. Jedná se o dramatický průběh intolerance lepku s prudkými průjmy, ztrátou vody a minerálů, které mohou vést až k šokovému stavu (7).

### 5.1 Klasická forma

Klasická forma byla dříve typická pro malé děti, které měly gastrointestinální potíže. Nemoc se u dětí projevovala do dvou let od narození. Vlivem delšího kojení a pozdějšího nasazení lepku do stravy byl však zaznamenán časový posun v začátku onemocnění.

U klasické formy celiakie rozlišujeme časný a pozdní začátek. Časný začátek znamená, že se onemocnění projeví do dvou let od narození, dítě neprospívá, mívá průjmy a nafouklé břicho. Pozdní začátek nemoci vzniká v rozmezí od školního věku do dospělosti, v tomto období se onemocnění projevuje spíše zvracením než průjmem.

Klasická forma celiakie se potvrdí pozitivní sérologií a biopsií tenkého střeva. Po následném zavedení bezlepkové diety by měl pacient zaznamenat zlepšení (25).

## 5.2 Atypická forma

Častěji než klasické se vyskytují příznaky atypické. Pacient s atypickými, nebo také neklasickými příznaky má slabé, někdy téměř žádné gastrointestinální potíže. Trpí především problémy extraintestinálními. Jedná se především o kostní, kožní, hemolytické, neurologické, reprodukční a psychické problémy.

Mezi atypické příznaky patří například osteoporóza s větší pravděpodobností zlomenin dlouhých kostí či obratlů, malformace zubů, nevysvětlitelná anémie, únava, neurologické problémy jako mozečková ataxie, ztráta paměti, podrážděnost, deprese, epilepsie, dále opožděný růst a sexuální zrání, opožděná puberta, menstruační poruchy, neplodnost, opakované potraty, deprese nebo také dráždivý tračník.

Po zavedení bezlepkové diety opět nastává zlepšení (25).

### 5.2.1 Kožní forma

Kožní forma celiakie nebo také Duhringova herpetiformní dermatitida se projevuje výskytem puchýřů zejména v okolí velkých kloubů (kolena, lokty, ramena, zápěstí).

Toto onemocnění bylo původně považováno pouze za kožní. Teprve v roce 1970 bylo zjištěno, že téměř 75% pacientů s Duhringovou herpetiformní dermatitidou krom kožních projevů také změny na sliznici tenkého střeva, charakteristické pro celiakii (11, 25).

Sliznice střeva může být postižena pouze mozaikovitě, takže biopsie nemusí být průkazná (11).

Při správném dodržování bezlepkové diety však bylo, u pacientů s Duhringovou herpetiformní dermatitidou, zaznamenáno zlepšení.

### **5.3 Tichá forma**

Tichá, silentní, nebo také subklinická forma bývá často diagnostikována náhodně. Pacient netrpí žádnými gastrointestinálními problémy a zdá se být zcela zdrav.

Onemocnění potvrdí sérologie (pozitivitou protilátek proti endomysiu a tkáňové transglutamináze) a následná biopsie tenkého střeva, kde je vidět atrofie klků.

V imunohistochemickém vyšetření je možné vidět zvýšený počet gama a delta intraepiteálních lymfocytů. Po zahájení léčby bezlepkovou dietou pacienti zaznamenávají fyzické i psychické zlepšení (25).

### **5.4 Asymptomatická forma**

Výskyt této formy je 7 krát vyšší než formy symptomatické. Příbuzní 1. stupně tvoří zhruba 10% případů, proto je zde vhodně využití screeningu v rizikových skupinách. Sérologie protilátek je pozitivní.

U asymptomatické celiakie bývají nevýrazné symptomy, proto je možné tyto pacienty zařadit do skupiny se subklinickou celiakií (25).

### **5.5 Latentní forma**

Latentní forma také nemá žádné klinické příznaky. Pacienti trpící touto formou celiakie mají normální histologický obraz střevní sliznice, tedy bez atrofí, ale mají pozitivní protilátky proti endomysiu a tkáňové transglutamináze.

V imunohistochemickém vyšetření je možné vidět zvýšený počet gama a delta intraepiteálních lymfocytů.

Tato forma se objevuje u pacientů, kterým v minulosti byla diagnostikována celiakie, nebo u pacientů u kterých s velkou pravděpodobností dojde během života k patologickým změnám v tenkém střevě. U těchto pacientů je nutný screening (25).

## **5.6 Potencionální forma**

Potenciální forma nemá žádné klinické příznaky, má negativní histologický nález, ale pozitivní protilátky proti endomysiu a tkáňové transglutamináze.

V imunohistochemickém vyšetření můžeme nalézt zvýšený počet intraepiteálních gama a delta T lymfocytů (25).

## **5.7 Refrakterní forma**

Refrakterní forma postihuje především dospělé pacienty. U těchto pacientů přetrvávají nebo se vracejí malabsorpční symptomy po dobu šesti měsíců až jednoho roku navzdory dodržování bezlepkové diety.

Rozlišujeme dva typy refrakterní formy. U typu jedna se vyskytují normální intraepitelové lymfocyty. U druhého typu refrakterní formy celiakie jsou přítomny abnormální (klonální) intraepiteální lymfocyty (31).

## 6 Prevalence onemocnění

Prevalence (udává počet nemocných jedinců k celkovému počtu jedinců ve sledované populaci) závisí na množství glutenu ve stravě (9, 14).

V Evropě se celiakie v současné době vyskytuje v poměru 1:100-300, zhruba před dvaceti lety se prevalence pohybovala v poměru 1:1000-3000. V rodinách s genetickou zátěží se výskyt onemocnění zvyšuje, u sourozenců 2,7-8%, u rodičů 0-8,8%, u potomků 0-17% a u dvojčat až 75% (10, 15, 25, 32).

Prevalence v České republice se odhaduje na 1:200-250, což znamená, že touto chorobou trpí okolo 40-50 tisíc lidí. Ovšem odborně sledováno a diagnostikováno je pouhých 10-15% z celkového počtu postižených (7, 9, 22, 25).

Globální prevalence onemocnění vyvolaných potravinami se pohybuje okolo 1% (3). Poměrně vysoká je v zemích Středního východu, východní Afriky, Severní Ameriky, Jižní Ameriky, jižní Asie a velice často v Indii (9, 14).

Onemocnění postihuje častěji ženské pohlaví, v poměru 2:1, ale bezpříznakovou formou celiakie trpí převážně muži (17).

### 6.1 Rizikové skupiny pro výskyt celiakie

Větší pravděpodobnost výskytu celiakie mají příbuzní prvního stupně pacientů trpících celiakální sprue, jejich riziko je zhruba 70%. Pacienti mající diabetes mellitus I. typu mají 5-10% riziko výskytu.

Lidé, kteří mají selektivní deficit IgA mají 10-20% riziko propuknutí celiakie. Jedná se o nejčastěji se vyskytující primární humorální imunodeficit, v Evropě se vyskytuje v poměru 1:500-700.

Do rizikové skupiny patří také lidé s Downovým syndromem, pacienti s autoimunní hepatitidou nebo s primární biliární cirhózou (25).



## 6.2 Cílený screening celiakie

Na význam celiakie a její včasné diagnostiky ukazuje i zavedení cíleného screeningu. V České republice byl screening zaveden Věstníkem Ministerstva zdravotnictví České republiky v roce 2011 (22).

Důvodem zavedení cíleného screeningu byla nedostatečná nebo pozdní diagnostika nemoci. Vzhledem ke změně manifestace onemocnění se dnes jen málokdy setkáváme s klasickým obrazem neprospívání dítěte. Mnohem častěji se dnes celiakie projevuje atypickými, tedy mimostřevními příznaky a to především u dospělých (13, 22).

Dle Věstníku Ministerstva zdravotnictví České republiky „je cílem screeningu časná diagnostika celiakie s následnou léčbou, tedy zavedení bezlepkové diety, odhalení atypických forem celiakie, zjištění skutečné prevalence celiakie v České republice, prevence komplikací celiakie, omezení a lepší kontrola přidružených autoimunitních chorob, jakož i zlepšení kvality života“ (22).

Cílený screening se provádí u skupin, u kterých předpokládáme vyšší riziko výskytu onemocnění. Jedná se především o rizikové skupiny, uvedené v předchozí kapitole (13, 22).

Metodika programu cíleného screeningu celiakie je dle Věstníku Ministerstva zdravotnictví zaměřena na :

1. „Vytipování možného nositele onemocnění a odeslání probanda k sérologickému vyšetření autoprotilátek k tkáňové transglutamináze (anti-tTG) a celkového IgA.
2. Při selektivním deficitu IgA (u 1-3% celiaků) se žádá laboratoř o automatické doplnění vyšetření stanovením autoprotilátek k tkáňové transglutamináze ve třídě IgG.
3. Pozitivitu autoprotilátek potvrdí perorální biopsie aborálního duodena.
4. Histopatologické vyšetření vzorku sliznice tenkého střeva.
5. Zdravotní péče o nově diagnostikované celiaky v rámci screeningu.“ (22)

## 7 Laboratorní diagnostika celiakie

Diagnostika celiakie je založena na klinickém obrazu, anamnéze, reakci na bezlepkovou dietu a na případném histologickém vyšetření.

Laboratorní diagnostika se zabývá zejména stanovením přítomnosti specifických autoprotilátek vyskytujících se v séru nebo plazmě pacienta. Vyšetření se provádí sérologickými testy ELISA (v případě vyšetření protilátek proti tTG ve třídě IgG, vyšetření protilátek proti gliadinu ve třídách IgA a IgG) nebo imunofluorescencí (v případě stanovení autoprotilátek proti endomysiu ve třídách IgA a IgG).

Pro správnou funkci slizničního imunitního systému má klíčovou roli sekreční IgA, proto se vyšetřují protilátky ve třídě IgA. Ovšem je nutné předpokládat jeho možný deficit, nebo jeho přirozenou nízkou hladinu u malých dětí, proto vyšetřujeme také protilátky ve třídě IgG.

Pozitivita sérologických testů musí být následně potvrzena biopsií.

### 7.1 Protilátky proti tkáňové transglutamináze

Tkáňová transglutamináza je běžně se vyskytující enzym, který má v různých tkáních a orgánech ochrannou a remodelační funkci v opravných procesech. Rozlišujeme celkem osm různých typů tTG, podle toho, v jaké tkáni se enzym vyskytuje. V souvislosti s celiakií je nejvýznamnější typ 2 tTG, který se vyskytuje ve střevě a typ 3 tTG, vyskytující se na povrchu kůže.

U pacientů trpících celiakií se vyskytují protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG). Jsou produkovány B lymfocyty ve střevní sliznici a vyskytují se v krvi, slinách a žluči. Vyskytují se také u řady zánětlivých onemocnění jako jsou např. neurologická nebo nádorová.

Vyšetření anti-tTG se provádí ve třídě IgA pomocí metody ELISA. Pokud jsou protilátky ve třídě IgA pozitivní, následuje biopsie střeva. V případě pacientů se

selektivním deficitem IgA a u malých dětí bude test na protilátky ve třídě IgA negativní, i když má pacient všechny symptomy odpovídající celiakii. V tomto případě se provádí stanovení protilátek ve třídě IgG.

Hodnoty těchto protilátek se využívají ke kontrole správného dodržování bezlepkové diety, pokud je dieta dodržována pečlivě, hodnoty výrazně klesají (1, 7, 25).

Hladiny protilátek proti tTG se také používají jako vhodný marker pro sledování průběhu onemocnění.

## **7.2 Protilátky proti endomysiu**

Endomysium je jemná pojivová tkáň obklopující jednotlivá hladká svalová vlákna hladkých svalů. Obsahuje kolagen a retikulin společně s tkáňovou transglutaminázou, která je hlavním cílovým antigenem. K prokázání celiakie slouží jako spolehlivý marker protilátky proti endomysiu třídy IgA.

Protilátky jsou stanovovány v krvi nebo séru metodou nepřímé imunofluorescence. Vyšetření je považováno za standard pro detekci protilátek specifických pro celiakii (1, 25).

## **7.3 Protilátky proti gliadinu/deaminovaný gliadin**

Gliadin je spouštěcí faktor celiakie. Pro screening se používají protilátky třídy IgA a IgG. Stanovení těchto protilátek má význam především u malých dětí a starších pacientů, kteří mají malou dystrofii střevních klků.

Stanovení protilátek proti nativnímu gliadinu je vhodné pro odhalení nemoci v časném stadiu.

V současné době se toto vyšetření často nahrazuje stanovením protilátek proti deaminovanému gliadinu. Jedná se o vyšetření výrazně specifitější a provádí se u

pacientů, kteří mají specifické protilátky pro celiakii negativní, ale u kterých je vysoká míra podezření na celiakii (1, 25).

## 8 Léčba

Doposud jedinou účinnou léčbou celiakie je dodržování bezlepkové diety. Pokud pacient tuto dietu pečlivě dodržuje, dojde ve střevě k vymizení krypt a obnovení klků (7).

Za účinnou se také považuje tzv. primární prevence celiakie. Tato prevence spočívá v tom, že se půlročnímu dítěti přidává do pokrmu malé množství obsahující lepek. Takovým příkladem může být přidání dvou lžiček pšeničné mouky, nebo dva piškoty do přesnídávky.

Bylo také zjištěno, že 95% pacientů s celiakií toleruje oves, tudíž je možné zavést bezlepkovou dietu bez vyloučení ovsa. Oves však nesmí být nijak kontaminován jinými obilovinami (25).

## **Cíle práce**

1. Vypracovat rešerši na téma „celiakie“.
2. Seznámit se s metodami, které se používají v diagnostice celiakie (imunofluorescence a ELISA).
3. Stanovit výskyt autoantilátok podílejících se na patogenezi celiakie a jejich dynamiku v průběhu onemocnění.

## **Metodika**

### **9 Vyšetřované vzorky**

Materiály potřebné k sepsání této bakalářské práce byly získány v Nemocnici České Budějovice v imunologické laboratoři. Vzorky byly odebrány pacientům během června 2015. U všech vzorků jsem provedla nepřímý imunofluorescenční test pro stanovení protilátek proti endomysiu a ELISA test pro stanovení protilátek proti deaminovanému gliadinu a tTG. Protilátky proti deaminovanému gliadinu a tTG ve třídě IgA a IgG. Protilátky proti endomysiu ve třídě IgA.

Stanovení protilátek jsem provedla celkem u osmnácti patientských vzorků.

#### **9.1 Nepřímý imunofluorescenční test**

Nepřímý imunofluorescenční test se v imunologii využívá ke stanovení přítomnosti autoprottilátek v séru nebo plazmě, v tomto případě namířených proti endomysiu. Protilátky stanovujeme ve třídě IgA a IgG. Výsledkem fluorescence je semikvantitativní výsledek, kdy se hodnotí přítomnost a intenzita fluorescence.

Pro detekci autoprottilátek je zapotřebí substrát, tedy histologická nebo cytologická struktura. Protilátky proti endomysiu je možné určovat v mnoha typech tkání primátů (střevo, žaludek, ezofag nebo játra). V tomto případě se jedná o mikrotonové řezy opičího střeva.

Nepřímý imunofluorescenční test je tzv. dvoustupňová reakce. V první fázi se inkubují tkáňové řezy fixované na sklíčku s naředěnými patientskými vzorky. Pokud jsou ve vyšetřovaném vzorku přítomny autoprottilátky, dojde k jejich navázání na antigeny. Nenavázané (nespecifické) protilátky jsou po inkubaci odmyty.

Ve druhé fázi se přidá druhá protilátka (obvykle zvířecí). Tato protilátka je namířena proti Fc-části lidského imunoglobulinu a je konjugovaná s vhodným fluorochromem. Navázání zvířecí protilátky umožní zbarvení již navázaných protilátek a jejich zviditelnění pro fluorescenční mikroskop. Pod fluorescenčním mikroskopem hodnotíme, zda preparát svítí či nesvítí. Jedná se o subjektivní hodnocení, které lze částečně objektivizovat použitím fluorescenčního kalibračního sklíčka a pozitivní a negativní kontroly (1, 5).

Pro účely mé bakalářské práce jsem použila již předem připravený set od firmy EUROIMMUN. Testovací souprava umožňuje vyšetření lidských IgA a IgG protilátek proti endomysiu v séru.

### **9.1.1 Pracovní pomůcky**

- sklíčka (deset sklíček, každé obsahuje deset biočipů, s fixovanými zmraženými řezy opičího střeva) + krycí sklíčka
- konjugát (fluoresceinem značená sekundární protilátka, anti-lidské IgA, kozí)
- pozitivní kontrola (lidské sérum s autoprotilátkami proti endomysiu IgA)
- negativní kontrolní sérum (lidské sérum, negativní na autoprotilátky)
- sůl pro PBS (pH 7,2)
- Tween 20
- Evans blue
- ustalovací médium (glycerol s PBS) (5)



### 9.1.2 Pracovní postup

V první řadě jsem si připravila roztok PBS-Tween. Jedno balení soli pro PBS jsem rozpustila v 1 litru destilované vody a následně přidala 2 ml Tween 20. Roztok jsem míchala skleněnou tyčinkou, dokud nebyla směs homogenní. Poté co byl roztok homogenní, přestoupila jsem k ředění patientských vzorků.

K dispozici jsem měla osmnáct patientských sér a tak jsem si připravila stejný počet čistých zkumavek, do kterých jsem naředila séra na výchozí koncentraci 1:10 (11,1  $\mu$ l patientského vzorku, 100  $\mu$ l PBS-Tween roztoku).

Poté jsem přistoupila k provedení samotného testu. Do každého reakčního políčka na sklíčku jsem napipetovala 30  $\mu$ l naředěného patientského vzorku.

Po napipetování všech vzorků na reakční políčka jsem nechala vzorky třicet minut inkubovat ve vlhké komůrce při pokojové teplotě (+18°C až +25°C), bez přístupu světla, aby nedošlo k vyschnutí vzorků na sklíčku (pokud patientské sérum obsahovalo protilátky proti endomysiu, navázaly se na antigeny během inkubační doby).

Po uplynutí inkubační doby jsem jednotlivá sklíčka promyla pomocí PBS-Tween pufrem (nenavázané protilátky se tak odstranily). Sklíčka jsem pět minut nechala v kyvetě s PBS-Tween pufrem tak, aby se biočipy na jednotlivých sklíčkách nedotýkaly.

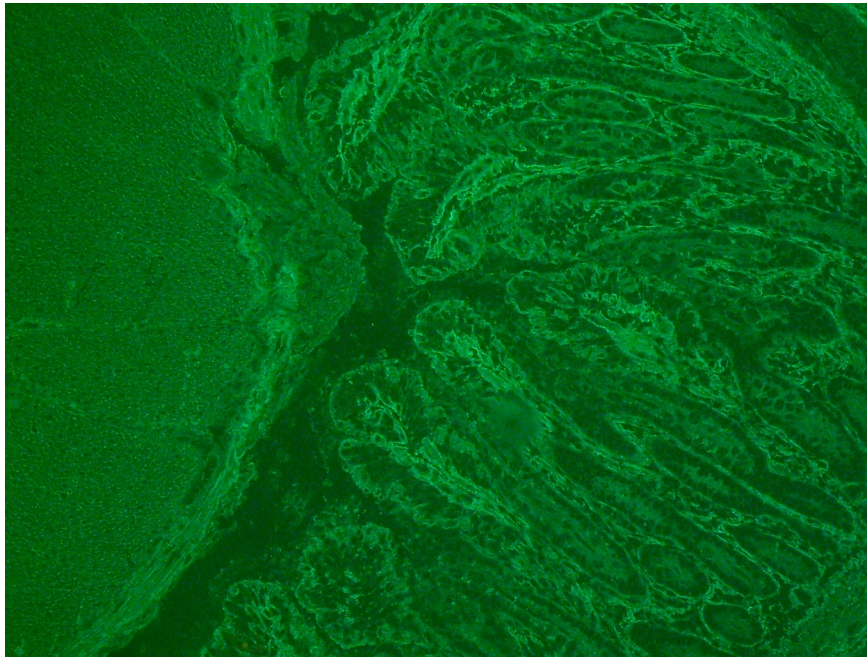
Po vyjmutí z kyvety jsem do každého reagenčního políčka napipetovala 25  $\mu$ l anti-lidského séra, značeného fluoresceinizoithiokyanátem (FITC). FITC ve světle o vlnové délce 490 nm emituje charakteristické zelené světlo o vlnové délce 517 nm (zdrojem světla u fluorescenčního mikroskopu je rtuťová výbojka). Opět jsem nechala inkubovat třicet minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě, bez přístupu světla.

Následně jsem sklíčka propláchla PBS-Tween pufrem a na pět minut vložila do kyvety s PBS-Tween pufrem. Aby došlo ke kontrastnímu obarvení, přidala jsem do kyvety pár kapek Evans Blue.

Jednotlivá sklíčka jsem po vyjmutí z kyvety opatrně osušila buničinou a do každého reakčního políčka na sklíčku napipetovala 10  $\mu$ l glycerolu s PBS (zajišťuje lepší optické prostředí). Sklíčka s biočipy jsem překryla krycími sklíčky a následně vyhodnocovala pod fluorescenčním mikroskopem.

### 9.1.3 Vyhodnocení pod mikroskopem

Vyhodnocení jsem prováděla pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BHS. Pokud jde o opičí střevo, ve fluorescenčním mikroskopu fluoreskuje pojivová tkáň klků a střevních krypt. Ve svalové vrstvě se objevuje plástvovitá fluorescence a zabarven je i endotel podslizničních cév (viz. obr. 2) (5).



Obrázek 2 : silně pozitivní (hodnoceno +++) Ab proti endomysiu pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BHS, použité zvětšení : 200x - vlastní foto

## 9.2 ELISA test

Princip testu spočívá v navázání specifické protilátky na antigen. Antigen je navázán na pevné fázi v reagenčních jamkách. V prvním kroku se v jamkách inkubují naředěné pacientské vzorky. Jsou-li ve vzorku specifické protilátky, naváží na fixovaný

antigen a nenávané složky se odmyjí. Následně se přidá druhá protilátka (anti-lidská) s navázaným enzymem, tzv. konjugát. Konjugát se naváže na komplex protilátky a antigenu. Po opětovné inkubaci se reakce vizualizuje přidáním substrátu. Přidaný substrát je štěpen enzymem, který je navázaný na druhou protilátku. Vzniká tak barevná reakce, kterou měříme fotometricky (1, 5).

„Výhodou tohoto testu je dostatečná citlivost a specifčnost. Současné systémy umožňují automatizaci ELISA testů“ (1). Test jsem prováděla ručně, ale standardně se vyšetření provádí pomocí analyzátoru Quanta Lyser 160.

### **9.2.1 ELISA test, vyšetření protilátek proti deaminovanému gliadinu**

Pro účely mé bakalářské práce jsem použila již předem připravený set od firmy EUROIMMUN. Testovací souprava umožňuje vyšetření lidských IgA a IgG protilátek proti gliadinu v séru. Výsledek je semikvantitativní, hodnocený metodou „cut-off“.

#### **9.2.1.1 Pracovní pomůcky**

- mikrotitrační jamky potažené antigeny (dvanáct mikrotitračních proužků po osmi odlomitelných jamkách v rámečku)
- kalibrační sérum 1 (200 RU/ml, IgA lidské)
- kalibrační sérum 2 (25 RU/ml, IgA lidské)
- kalibrační sérum 3 (2 RU/ml, IgA lidské)
- pozitivní kontrola (IgA lidské)
- negativní kontrola (IgA lidské)
- enzymový konjugát (anti-lidské IgA označené peroxidázou, králík)
- vzorkový pufr

- promývací pufr (10 x koncentrovaný)
- chromogen/substrátový roztok (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- stop roztok (0,5 M kyselina sírová) (6)

### 9.2.1.2 Pracovní postup

V první řadě jsem si připravila promývací pufr, který je mimo jiné důležitý pro přípravu patientských vzorků. Jelikož se promývací pufr dodává v setu 10x koncentrovaný, je třeba ho naředit destilovanou vodou a to v poměru 1:9 (50 ml promývacího pufru, 450 ml destilované vody).

Pacientské vzorky se ředí vzorkovým pufrům v poměru 1:201 (1 ml vzorkového pufru, 5 µl patientského séra).

Jelikož jsem opět pracovala s osmnácti patientskými vzorky, připravila jsem si do rámečku příslušný počet mikrotitračních proužků.

Do jednotlivých reagenčních jamek jsem v souladu s pipetovacím protokolem od firmy Euroimmun (viz. tab. 1) napipetovala 100 µl kalibračního séra 1, kalibračního séra 2, kalibračního séra 3, pozitivní kontroly, negativní kontroly a 100 µl jednotlivých vzorků pacientů. Reagenční jamky jsem nechala inkubovat třicet minut při pokojové teplotě (+18°C až +25°C), bez přístupu světla. Pokud jsou patientské vzorky pozitivní, protilátky se během inkubace naváží na antigeny.

Po uplynutí inkubační doby jsem vyprázdnila všechny jamky a promyla je 300 µl naředěného promývacího pufru (všechny nenavázané protilátky se tak odstranily). Promytí po 300 µl jsem u každého mikrotitračního proužku provedla třikrát, přičemž promývací pufr jsem v jamkách nechala vždy alespoň třicet vteřin a následně pufr z jamek odstranila.

Následně jsem do každé reagenční jamky napipetovala 100 µl enzymového konjugátu (peroxidázou značené anti-lidské IgA, králičí). Mikrotitrační jamky jsem opět nechala inkubovat třicet minut při pokojové teplotě, bez přístupu světla. Po uplynutí

inkubační doby jsem mikrotitrační jamky vyprázdnila a promyla třikrát 300 µl, stejně jako v předchozím kroku.

Do každé jamky jsem napipetovala 100 µl chromogen/substrátového roztoku a nechala inkubovat při pokojové teplotě, bez přístupu světla. Po patnácti minutách inkubace jsem do každé jamky napipetovala 100 µl stop roztoku, který ukončil enzymatickou reakci.

Výsledné zabarvení v mikrotitračních destičkách jsem změřila fotometricky při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 620 nm (viz. tab. 2, tab. 3).

Test je hodnocen metodou „cut-off“. Pozitivní výsledky se hodnotí + až +++ dle násobku „cut-off“ hodnoty. Za „cut-off“ je považováno kalibrační sérum 2 s hodnotou 25 RU/ml. Výsledky se vyhodnocují semikvantitativně, výpočtem poměru extinkční hodnoty patientského vzorku a extinkční hodnoty kalibračního séra 2. Pokud je poměr extinkcí <1,0, vzorek je hodnocený jako negativní. Pokud je výsledný poměr extinkcí ≥1,0, vzorek je hodnocen jako pozitivní (6).

Tabulka 1 : Schéma pipetovacího protokolu při stanovení protilátek proti deaminovanému gliadinu, dle firmy Euroimmun

	1	2	3
A	kalibrační sérum 1	pacient 4	pacient 12
B	kalibrační sérum 2 („cut-off“)	pacient 5	pacient 13
C	kalibrační sérum 3	pacient 6	pacient 14
D	pozitivní kontrola	pacient 7	pacient 15
E	negativní kontrola	pacient 8	pacient 16
F	pacient 1	pacient 9	pacient 17
G	pacient 2	pacient 10	pacient 18
H	pacient 3	pacient 11	

Zdroj : převzato z EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG. (6)

Tabulka 2 : Naměřené hodnoty optických denzit při stanovení protilátek proti deaminovanému gliadinu ve třídě IgA, semikvantitativní hodnocení, měřeno při 450/620 nm

	1	2	3
A	1,443	0,273	0,201
B	0,316 („cut-off“)	0,195	0,232
C	0,095	0,196	1,288 (+++)
D	0,823	1,154 (+++)	0,203
E	0,091	0,541 (+)	0,179
F	0,561 (+)	0,215	0,377 (+)
G	0,196	1,223 (+++)	0,175
H	0,307	0,379 (+)	

Tabulka 3 : Naměřené hodnoty optických denzit při stanovení protilátek proti deaminovanému gliadinu ve třídě IgG, semikvantitativní hodnocení, měřeno při 450/620 nm

	1	2	3
A	1,073	0,042	0,091
B	0,144 („cut-off“)	0,031	0,057
C	0,043	0,101	0,547 (+++)
D	0,373	1,503 (+++)	0,088
E	0,028	0,048	0,049
F	0,108	0,037	0,111
G	0,067	0,257 (+)	0,085
H	0,045	0,067	

### 9.2.2 ELISA test, vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze

Pro účely mé bakalářské práce jsem opět použila již předem připravený set, tentokrát od firmy Orgentec. Testovací souprava umožňuje vyšetření lidských IgA a

IgG protilátek proti tTG v naředěných vzorcích lidského séra. Výsledky jsou kvantitativní.

#### **9.2.2.1 Pracovní pomůcky**

- mikrotitrační jamky potažené antigeny (dvanáct mikrotitračních proužků po osmi odlomitelných jamkách v rámečku)
- kalibrátor A (0 U/ml)
- kalibrátor B (5 U/ml)
- kalibrátor C (10 U/ml)
- kalibrátor D (25 U/ml)
- kalibrátor E (75 U/ml)
- kalibrátor F (200 U/ml)
- pozitivní kontrola
- negativní kontrola
- vzorkový pufr (5 x koncentrovaný)
- enzymový konjugát (obsahuje anti-lidské protilátky)
- TMB substrátový roztok
- ukončovací roztok
- promývací pufr (50 x koncentrovaný) (27)

#### **9.2.2.2 Pracovní postup**

V první řadě jsem si naředila promývací pufr a vzorkový pufr. Padesátkrát koncentrovaný promývací pufr (20 ml) jsem v odměrném válci naředila destilovanou

vodou na celkový objem 1000 ml. Pětkrát koncentrovaný vzorkový pufr (20 ml) jsem v odměrném válci naředila také destilovanou vodou a to na celkový objem 100 ml.

K dispozici jsem měla opět osmnáct patientských vzorků, které jsem do nových zkumavek jednotlivě naředila vzorkovým pufrem v poměru 1:100 (10  $\mu$ l patientského vzorku, 990  $\mu$ l vzorkového pufru).

Do testovacího rámečku jsem si připravila příslušný počet mikrotitračních proužků, odpovídajících počtu patientských vzorků, kalibrátorů a kontrol.

Do každé reagenční jamky mitrotiračního proužku jsem, dle pipetovacího schématu od firmy Orgentec (viz. tab. 4) napipetovala 100  $\mu$ l kalibračních vzorků, kontrolních vzorků a patientských naředěných vzorků. Vzorky jsem inkubovala třicet minut při pokojové teplotě (20°C-28°C), bez přístupu světla (pokud byl vzorek pozitivní, protilátky se navázaly na antigeny).

Po uplynutí inkubační doby jsem odstranila obsah jamek a promyla je třikrát 300  $\mu$ l promývacího roztoku (odstranila jsem tak nenavázané částice). Po posledním promytí jsem do každé jamky přidala 100  $\mu$ l enzymového konjugátu. Patnáct minut jsem inkubovala při pokojové teplotě, bez přístupu světla. Následně jsem odstranila obsah jamek a promyla je třikrát promývacím roztokem, stejně jako v předchozím kroku.

Do každé jamky jsem napipetovala po 100  $\mu$ l TMB substrátu a patnáct minut inkubovala (pokojová teplota, bez přístupu světla) (viz. obr. 3). Po uplynutí inkubační doby jsem do každé jamky napipetovala 100  $\mu$ l stop roztoku (viz. obr. 4), který ukončil enzymatickou reakci a pět minut inkubovala.

Po ukončení poslední inkubace jsem vyhodnotila vzorky pomocí readeru (čtečka mikrotitračních destiček) (viz. tab. 5, tab. 6).

Výsledky se odečítají z kalibrační křivky, jsou kvantitativní (U/ml). Pokud je hodnota <10 U/ml, výsledek je negativní. Pokud je hodnota  $\geq$  10 U/ml, výsledek je pozitivní (27).



Tabulka 4 : Schéma pipetovacího protokolu dle firmy Orgentec

	1	2	3	4
A	kalibrátor A	pacient 1	pacient 9	pacient 17
B	kalibrátor B	pacient 2	pacient 10	pacient 18
C	kalibrátor C	pacient 3	pacient 11	
D	kalibrátor D	pacient 4	pacient 12	
E	kalibrátor E	pacient 5	pacient 13	
F	kalibrátor F	pacient 6	pacient 14	
G	pozitivní kontrola	pacient 7	pacient 15	
H	negativní kontrola	pacient 8	pacient 16	

Zdroj : převzato z ORGENTEC (27)

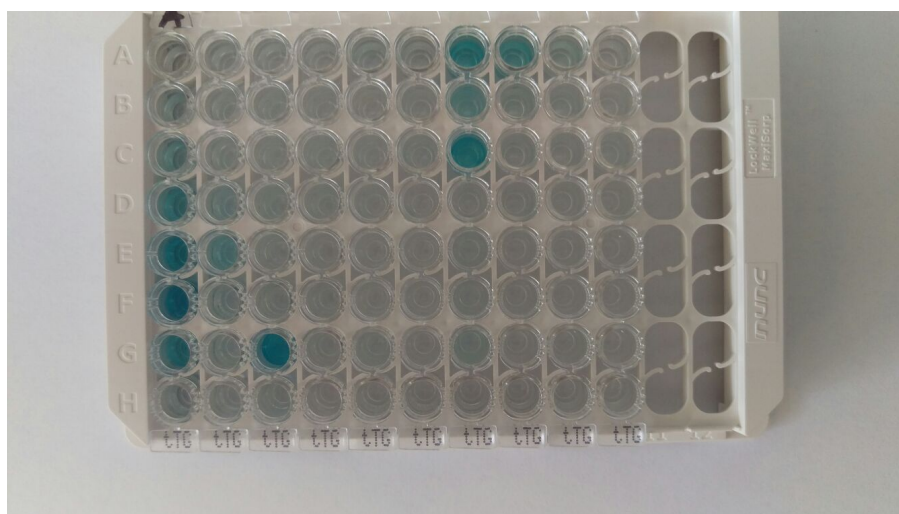
Tabulka 5 : Naměřené hodnoty optických denzit při stanovení protilátek proti tTG ve třídě IgA, odečítající se z kalibrační křivky, kvantitativní hodnocení, měřeno při 450/620 nm

	1	2	3	4
A	0,000	0,013	0,009	0,034
B	0,133	0,009	0,572 (pozitivní)	0,017
C	0,221	0,031	0,002	
D	0,468	0,028	0,069	
E	0,933	0,014	0,007	
F	1,412	0,035	0,238 (pozitivní)	
G	0,691	0,036	0,006	
H	0,062	0,112	0,025	

Tabulka 6 : Naměřené hodnoty optických denzit při stanovení protilátek proti tTG ve třídě IgG, odečítající se z kalibrační křivky, kvantitativní hodnocení, měřeno při 450/620 nm

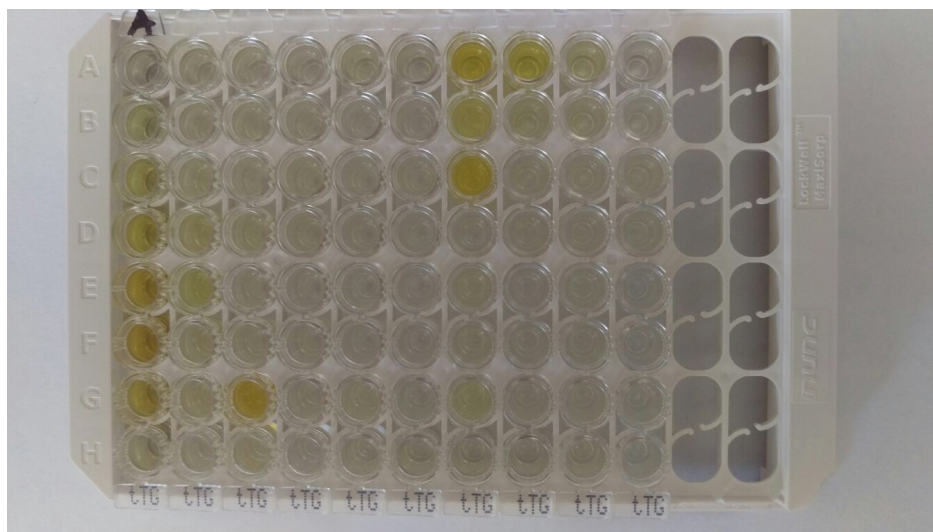
	1	2	3	4
A	0,000	0,048	0,073	0,106
B	0,137	0,052	0,836 (pozitivní)	0,061
C	0,268	0,097	0,055	
D	0,514	0,060	0,114	
E	0,979	0,063	0,055	
F	1,591	0,119	0,222 (pozitivní)	
G	0,696	0,091	0,077	
H	0,064	0,066	0,053	

Obrázek 3 : Vizualizace pozitivní reakce po přidání substrátu



Zdroj : vlastní foto

Obrázek 4 : Změna intenzity zabarvení vzorku po přidání stop roztoku



Zdroj : vlastní foto

## Výsledky

### 1) Výsledky vlastního stanovení přítomnosti protilátek

Protilátky jsem stanovovala celkem u osmnácti anonymních patientských vzorků, získaných v imunologické laboratoři nemocnice České Budějovice. U všech vzorků jsem provedla nepřímý imunofluorescenční test pro stanovení protilátek proti endomysiu a ELISA test pro stanovení protilátek proti deaminovanému gliadinu a tTG.

Výsledky jsou diskutovány, na základě dalších údajů získaných z databáze imunologické laboratoře a na základě poznatků získaných z dostupné literatury, v kapitole „diskuze“.

Tabulka 7 : Výsledky stanovení autoprottilátek proti endomysiu u vyšetřovaných vzorků, nepřímá imunofluorescence

Číslo vzorku	Rok narození	IgA Ab
1	1957	negativní
2	1958	negativní
3	1959	negativní
4	1968	negativní
5	1970	negativní
6	1976	negativní
7	1976	negativní
8	1981	negativní
9	1984	negativní
10	1984	pozitivní +++
11	1992	negativní
12	1998	negativní
13	1998	negativní
14	1999	pozitivní ++

<b>15</b>	2002	negativní
<b>16</b>	2002	negativní
<b>17</b>	2005	negativní
<b>18</b>	2007	negativní

Tabulka 8 : Výsledky stanovení protilátek proti deaminovanému gliadinu u vyšetřovaných vzorků, ELISA

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Rok narození</b>	<b>IgA Ab</b>	<b>IgG Ab</b>
<b>1</b>	1957	pozitivní +	negativní
<b>2</b>	1958	negativní	negativní
<b>3</b>	1959	negativní	negativní
<b>4</b>	1968	negativní	negativní
<b>5</b>	1970	negativní	negativní
<b>6</b>	1976	negativní	negativní
<b>7</b>	1976	pozitivní +++	pozitivní +++
<b>8</b>	1981	pozitivní +	negativní
<b>9</b>	1984	negativní	negativní
<b>10</b>	1984	pozitivní +++	pozitivní +
<b>11</b>	1992	pozitivní +	negativní
<b>12</b>	1998	negativní	negativní
<b>13</b>	1998	negativní	negativní
<b>14</b>	1999	pozitivní +++	pozitivní +++
<b>15</b>	2002	negativní	negativní
<b>16</b>	2002	negativní	negativní
<b>17</b>	2005	pozitivní +	negativní
<b>18</b>	2007	negativní	negativní

Tabulka 9 : Výsledky stanovení autoprotilátek proti tTG u vyšetřovaných vzorků, ELISA

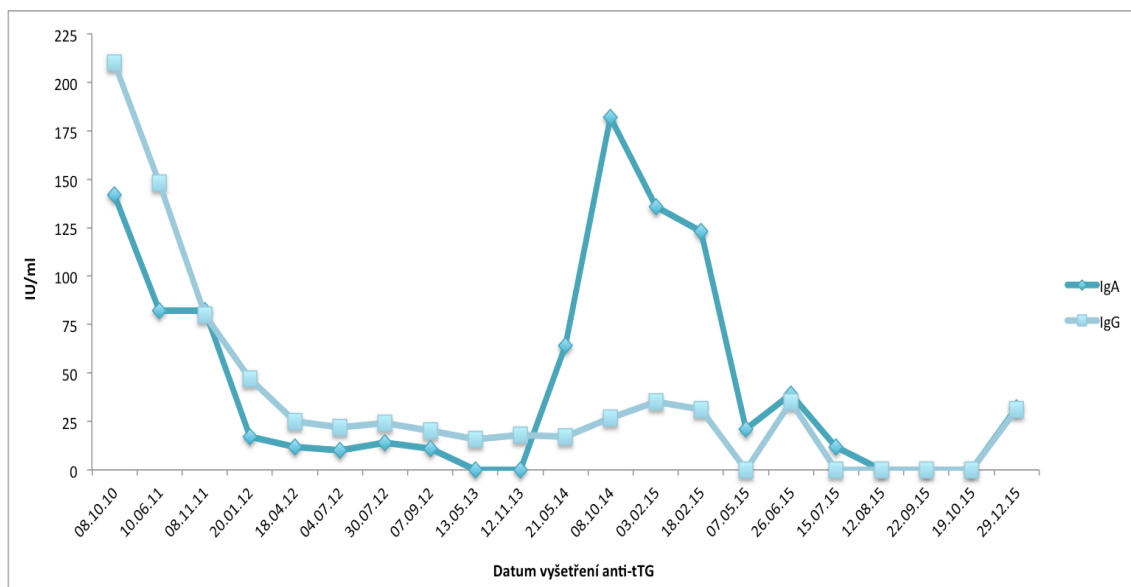
Číslo vzorku	Rok narození	IgA Ab	IgG Ab
1	1957	negativní	negativní
2	1958	negativní	negativní
3	1959	negativní	negativní
4	1968	negativní	negativní
5	1970	negativní	negativní
6	1976	negativní	negativní
7	1976	negativní	negativní
8	1981	negativní	negativní
9	1984	negativní	negativní
10	1984	pozitivní (8 U/ml)	pozitivní (13 U/ml)
11	1992	negativní	negativní
12	1998	negativní	negativní
13	1998	negativní	negativní
14	1999	pozitivní (34 U/ml)	pozitivní (56 U/ml)
15	2002	negativní	negativní
16	2002	negativní	negativní
17	2005	negativní	negativní
18	2007	negativní	negativní

## 2) Stanovení dynamiky výskytu protilátek

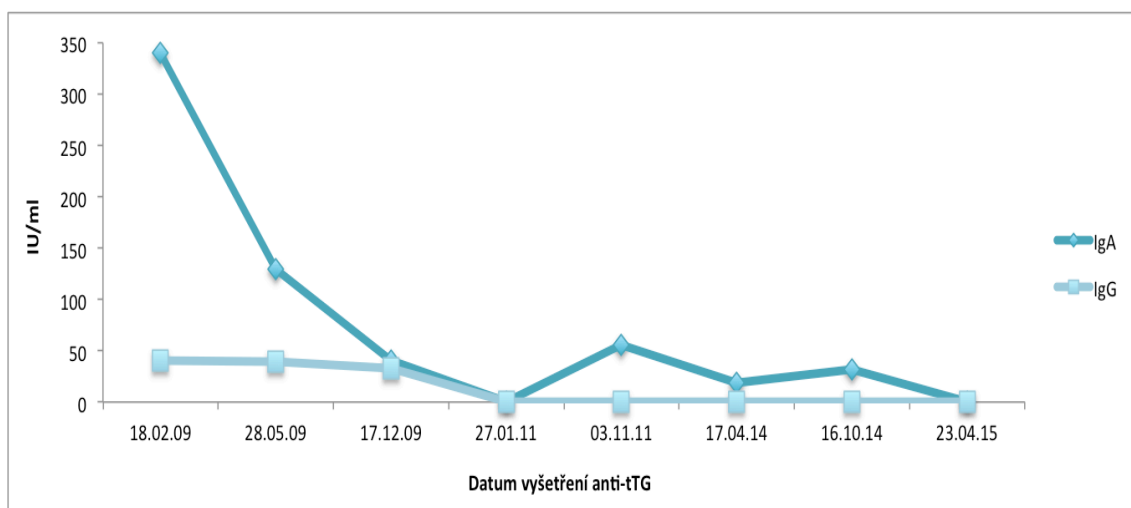
Pro stanovení dynamiky protilátek jsem použila údaje z databáze imunologické laboratoře. Údaje se týkaly anonymních pacientů.

V grafech je zaznamenána dynamika protilátek anti-tTG v průběhu onemocnění po zavedení bezlepkové diety. Výsledky jsou diskutovány v kapitole „diskuze“.

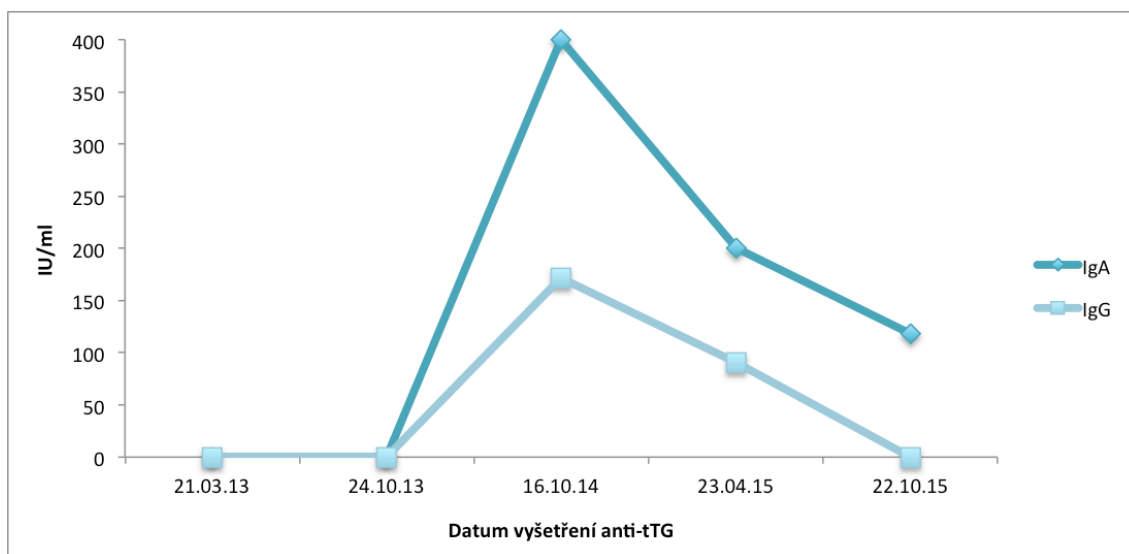
Graf 1 : Stanovení dynamiky protilátek anti-tTG v průběhu onemocnění u anonymního pacienta číslo 19



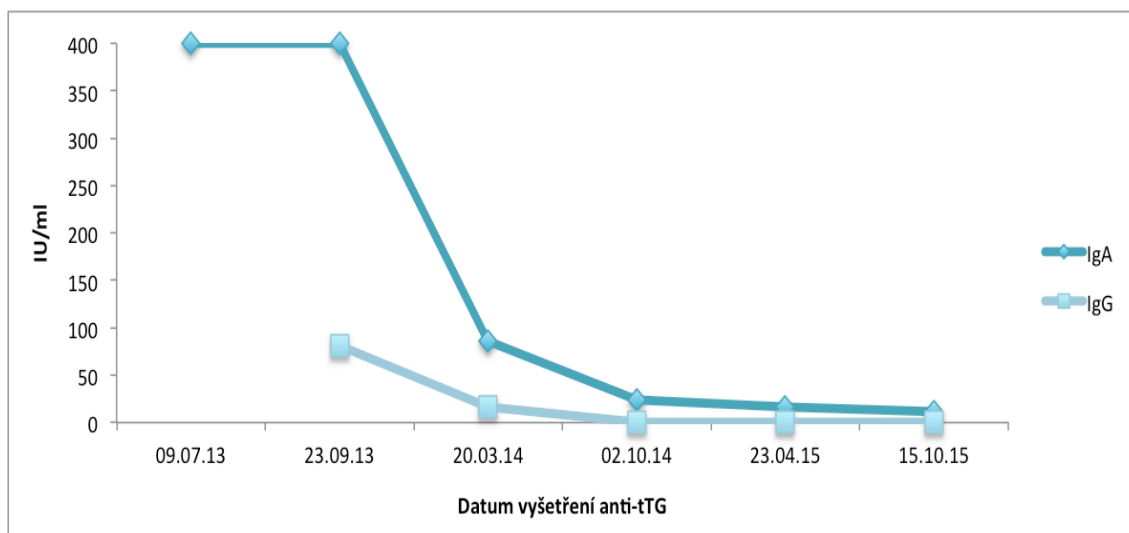
Graf 2 : Stanovení dynamiky protilátek anti-tTG v průběhu onemocnění u pacienta se vzorkem číslo 7



Graf 3 : Stanovení dynamiky protilátek anti-tTG v průběhu onemocnění u pacienta se vzorkem číslo 10



Graf 4 : Stanovení dynamiky protilátek anti-tTG v průběhu onemocnění u pacienta se vzorkem číslo 14





## **Diskuze**

### **1) Diskuze o naměřených výsledcích**

Protilátky jsem stanovovala v imunologické laboratoři nemocnice České Budějovice. Pomocí metod imunofluorescence a ELISA jsem stanovovala protilátky celkem u osmnácti patientských vzorků.

U dvou vzorků (10, 14) jsem na základě pozitivitu protilátek proti endomysiu, deaminovanému gliadinu a tTG potvrdila diagnostiku celiakie. U zbylých šestnácti vzorků jsem celiakii neprokázala.

#### **Vzorky pozitivní na Ab proti deaminovanému gliadinu, endomysiu a tTG**

U vzorků číslo 10 a 14 byly protilátky proti endomysiu, deaminovanému gliadinu i tTG pozitivní, tudíž u obou vzorků byla prokázána celiakie.

Pacientka se vzorkem číslo 10 byla na vyšetření poprvé v roce 2013. Ten samý rok jí, na základě pozitivitu protilátek, byla diagnostikována celiakie a následně byla zavedena bezlepková dieta. Hladiny IgA byly v normě.

Pacientka se vzorkem číslo 14 byla na vyšetření poprvé v roce 2013, kdy byla pozorována na patologický stav. Celiakie jí byla, na základě pozitivitu protilátek, diagnostikována v roce 2014. Následně byla zavedena bezlepková dieta. Hladiny IgA byly v normě.

#### **Vzorky negativní na Ab proti deaminovanému gliadinu, endomysiu a tTG**

U vzorků číslo 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 15, 16, 18 bylo stanovení protilátek proti endomysiu, deaminovanému gliadinu a tTG negativní.

Pacientka se vzorkem číslo 2 byla na vyšetření poprvé v roce 2010 z důvodu břišní bolesti. Vyšetření na protilátky proti endomysiu, deaminovanému gliadinu a tTG jsou stále negativní. Hladiny IgA nebyly vyšetřovány. Pacientce byla diagnostikována chronická hepatitida.

Pacient se vzorkem číslo 3 byl na vyšetření poprvé, stanovované protilátky byly negativní. Hladiny imunoglobulinů nebyly měřeny. U tohoto vzorku byly navíc stanovovány autoprotilátky proti cytoplazmě neutrofilů. Perinukleární protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (pANCA) byly pozitivní, což značí možnou diagnózu ulcerózní kolitidy. Byla prokázána také intolerance kravského mléka.

Pacientka se vzorkem číslo 4 byla na vyšetření poprvé. Stanovované protilátky byly negativní. Hladiny imunoglobulinů byly v normě, diagnostikována byla systémová autoimunita.

Pacienti se vzorky číslo 5, 6, 9 byli na vyšetření poprvé. Protilátky proti endomysiu, deaminovanému gliadinu a tTG byly negativní. Hladiny IgA byly v normě. Diagnostikována byla funkční dyspepsie.

U pacienta se vzorkem číslo 12 byl diagnostikován Gilbertův syndrom. Gilbertův syndrom neboli nekonjugovaná hyperbilirubinémie je benigní stav, typický chronickým mírným zvýšením nekonjugovaného bilirubinu při hladovění, psychické nebo fyzické zátěži, či po požití alkoholu. Část pacientů má nespecifické symptomy, trpí trávicími potížemi, slabostí, únavou či bolestí břicha (26). Domnívám se, že na základě těchto nespecifických symptomů, které se vyskytují v souvislosti s celiakií, bylo u vzorku číslo 12 doporučeno vyšetření na celiakii. Pozitivita protilátek proti endomysiu, deminovanému gliadinu ani tTG však nebyla prokázána. Hladiny IgA byly v normě.

Pacient se vzorkem číslo 13 byl na vyšetření poprvé v roce 2000, z důvodu bolesti kloubů. Na protilátky proti endomysium, deaminovanému gliadinu a tTG je stále negativní. Pacientovi byla diagnostikována střevní malabsorpce. Hladiny IgA byly v normě.

Pacientovi se vzorkem číslo 15 byl diagnostikován hypopituitarismus. Jak již bylo zmíněno, jedinou účinnou léčbou celiakie je dodržování bezlepkové diety. V některých případech však bývá dodržování bezlepkové diety neúspěšné. Léčbu mohou komplikovat přidružená autoimunitní onemocnění, onemocnění štítné žlázy nebo jako v tomto případě endokrinní poruchy. Dříve hypopituitarismus nebyl popsán jako současně se vyskytující s celiakií, symptomy této nemoci byly původně považovány za příznaky špatně kontrolované celiakie. Collin a spol. popsali tři případy hipopituitarismu u

pacientů s celiakií, u kterých bylo dodržování bezlepkové diety neúspěšné. První pacient měl diabetes mellitus I. typu a trpěl hypoglykemií, druhý pacient měl svalovou atrofii neznámého původu a třetí pacient trpěl poruchou růstu. Žádný z nich neměl zvětšenou hypofýzu, což naznačuje, že hipopituitarismus byl autoimunitního původu. Celkový stav pacientů se zlepšil až po substituční terapii (2). U patientského vzorku číslo 15 nebyly protilátky proti endomysiu, deaminovanému gliadinu ani tTG prokázány. Hladiny IgA byly v normě.

Pacient se vzorkem číslo 16 byl na vyšetření z důvodu břišní bolesti. V roce 2008 byl pozitivní na protilátky proti deaminovanému gliadinu (++). Protilátky proti endomysiu a tTG byly negativní. Hladiny IgA byly v normě. Pacientovi byla diagnostikována alergie.

Pacientka se vzorkem číslo 18 byla na vyšetření poprvé, protilátky proti endomysiu, deaminovanému gliadinu a tTG byly negativní. Hladiny IgA byly v normě. Diagnostikována byla zácpa.

### **Vzorky pozitivní na Ab proti deaminovanému gliadinu, ale negativní na Ab proti endomysiu a tTG**

U patientských vzorků číslo 1, 7, 8, 11 a 17 byly prokázány protilátky proti gliadinu. Nebyla však prokázána celiakie.

U vzorku číslo 1 byly prokázány protilátky proti deaminovanému gliadinu ve třídě IgA slabě pozitivní (+). Hladiny IgA byly v normě. Pacientce byla diagnostikována funkční dyspepsie.

U vzorku číslo 7 byly prokázány silně pozitivní protilátky proti deaminovanému gliadinu ve třídě IgA (+++) i IgG (+++). Hladiny IgA byly v normě. Této pacientce byla v roce 2009 diagnostikována funkční dyspepsie a následně celiakie. Nyní nebyly prokázány protilátky proti endomysiu a tTG. Pokud však pacientka nedodrží bezlepkovou dietu, protilátky proti endomysiu a tTG se mohou projevit s odstupem.

U vzorku číslo 8 byly prokázány pouze slabě pozitivní protilátky proti deaminovanému gliadinu ve třídě IgA (+). Pacientce byla diagnostikována celiakie v

roce 2009, ale protože dodržuje bezlepkovou dietu, nebyly nyní prokázány protilátky proti endomysiu a tTG. Hladiny imunoglobulinů nebyly měřeny.

U vzorku číslo 11 byly prokázány protilátky proti deaminovanému gliadinu ve třídě IgA (+). Pacientka byla vyšetřena z důvodu břišní bolesti. Hladina IgA byla mírně pod normou, protilátky proti endomysiu a tTG byly negativní.

U vzorku číslo 17 byly prokázány protilátky proti deaminovanému gliadinu ve třídě IgA (+). Hladiny imunoglobulinů nebyly měřeny. Pacient byl na vyšetření poprvé z důvodu kožních projevů. Diagnostikována byla alergie na kravské mléko.

## **2) Diskuze o stanovení dynamiky protilátek v průběhu onemocnění**

Na základě stanovení dynamiky protilátek proti tkáňové transglutamináze bych chtěla poukázat na poměrně značný rozdíl mezi hladinami IgA a IgG v průběhu onemocnění. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišným biologickým poločasem rozpadu imunoglobulinů IgA a IgG. Biologický poločas IgA je 6 dní a biologický poločas IgG je 21 dní (36).

Pokud pacient/ka správně dodržuje bezlepkovou dietu, hladina protilátek ve třídě IgA, díky svému krátkému biologickému poločasu, výrazně klesá. Hladina protilátek IgG klesá také, ale kvůli delšímu biologickému poločasu klesá pomaleji. Pokud však není dieta dodržována správně, hladiny IgA stoupají výrazně rychleji oproti IgG, což by mohla vysvětlovat různě rychlá tvorba IgA a IgG v reakci na opakovaný antigenní podnět.

V grafu číslo 1 je znázorněna dynamika protilátek proti tkáňové transglutamináze v průběhu onemocnění u anonymní pacientky (číslo 19) z databáze. Pacientce byla celiakie diagnostikována v roce 2010, začala dodržovat bezlepkovou dietu. Ovšem v období od prosince 2013 do dubna 2014 pravděpodobně bezlepkovou dietu nedodržovala, což lze předpokládat na základě mnohonásobně zvýšené hladiny IgA. Po opětovném dodržování bezlepkové diety hladiny IgA opět klesají. V období od října 2010 do listopadu 2014 jsou hladiny IgG vyšší než IgA, což by na základě screeningu,

dle Věstníku Ministerstva zdravotnictví, nebylo zjištěno, protože se vyšetřují anti-tTG pouze ve třídě IgA. Pokud by pacientka od začátku správně dodržovala bezlepkovou dietu, došlo by k rychlému poklesu IgA (díky rychlému poločasu rozpadu) a celiakie by tak nebyla prokázána. Výsledky by vlastně byly falešně negativní. Pokud by však byly stanoveny také anti-tTG ve třídě IgG, mohla by být celiakie u pacientky (díky poměrně pomalému poločasu rozpadu IgG) prokázána.

Dynamiku protilátek jsem znázornila také u pacientů se vzorky číslo 7, 10 a 14. U všech třech pacientů byla diagnostikována celiakie. Mnou stanovované protilátky prokázaly celiakii pouze u vzorků číslo 10 a 14, což značí, že pacientka se vzorkem číslo 7 dodržuje bezlepkovou dietu.

U pacientky se vzorkem číslo 7 byla celiakie diagnostikována v roce 2009. Dodržuje správně bezlepkovou dietu, což lze předpokládat dle poklesu protilátek IgA a IgG v průběhu onemocnění (viz. graf č. 2). Nyní nebyly prokázány protilátky proti endomysiu a tTG.

U pacientky se vzorkem číslo 10 byla diagnostikována celiakie v roce 2013. Dle dynamiky protilátek (viz. graf č. 3) lze říci, že pacientka zpočátku pečlivě dodržovala bezlepkovou dietu. Ovšem od října 2013 do října 2014 mnohonásobně vzrostla hladina protilátek IgA (méně IgG), což značí nedodržení bezlepkové diety. Následně hladiny obou protilátek klesají, což značí opětovné dodržování bezlepkové diety.

Dynamika protilátek u vzorku číslo 14 (viz. graf č. 4) je podobná jako u vzorku číslo 7. Zpočátku byly hladiny protilátek IgA mnohonásobně vyšší, než jsou nyní. Po zavedení bezlepkové diety protilátky IgA výrazně klesly. Nízké hladiny protilátek značí, že pacientka dodržuje bezlepkovou dietu.

V současné době se poměrně často setkáváme s případy lidí, kteří dodržují bezlepkovou dietu, přestože jim nebyla diagnostikována celiakie. Mohou tímto způsobem řešit své jiné zdravotní problémy. V mnoha případech dodržování bezlepkové diety pomohlo ke zlepšení zdravotního stavu. Problém však nastává v případě, že by tito lidé celiakii skutečně měli. Pokud by byli vyšetřováni dle Věstníku Ministerstva zdravotnictví (celkové IgA a anti-tTG ve třídě IgA), jejich výsledky na protilátky by, na základě poměrně krátkého poločasu rozpadu IgA, byly falešně negativní. Vzhledem k

dynamice poklesu protilátek v průběhu onemocnění, by bylo vhodné zařadit do screeningu vyšetření anti-tTG ve třídě IgA i IgG. Díky delšímu poločasu rozpadu IgG by tak bylo možné celiakii prokázat i přes dodržování bezlepkové diety.

## Závěr

Celiakie patří, kvůli své vysoké prevalenci, k jedním z nejdůležitějších onemocnění trávicího ústrojí. V České republice se prevalence odhaduje na 1:200-250, což znamená, že touto chorobou trpí okolo 40-50 tisíc lidí. Vysoký výskyt onemocnění je dán především změnou manifestace onemocnění. Dnes už se jen málokdy setkáváme s klasickým obrazem neprospívání dítěte, mnohem častější jsou atypické, tedy mimostřevní příznaky, což je důvod, proč bývá celiakie často diagnostikována pozdě. Velmi důležitým opatřením, jak včas diagnostikovat celiakii je cílený screening, zaměřený na skupiny s vyšší pravděpodobností výskytu tohoto onemocnění.

Cílem teoretické části mé bakalářské práce bylo shrnutí aktuálních informací o celiakii. Zmínila jsem příčinu vzniku nemoci - lepek, blíže jsem se zaměřila na genetiku, se kterou vznik celiakie výrazně souvisí a podrobněji jsem popsala vznik a průběh imunitní reakce u vnímavého jedince po požití lepku. Uvedla jsem jednotlivé formy celiakie, které jsou v současné době rozpoznávány, nastínila jsem stanovení protilátek, důležitých pro diagnostiku celiakie a na závěr jsem se krátce zmínila o léčbě celiakie.

V praktické části jsem se zabývala především stanovením protilátek klíčových pro diagnostiku celiakie. Protilátky jsem stanovovala v Nemocnici České Budějovice v imunologické laboratoři celkem u osmnácti patientských vzorků. U všech vzorků jsem provedla nepřímý imunofluorescenční test pro stanovení protilátek proti endomysiu ve třídě IgA a ELISA test pro stanovení protilátek proti deaminovanému gliadinu a tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG. Celiakie byla na základě positivity protilátek prokázána celkem u dvou patientských vzorků. Na základě stanovení dynamiky protilátek proti tkáňové transglutamináze v průběhu onemocnění jsem poukázala na značně rozdílnou dynamiku mezi IgA a IgG při dodržování bezlepkové diety.

## Seznam informačních zdrojů

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

COLLIN, P., M. HAKANEN, J. SALMI, M. MÄKI a K. KAUKINEN. Autoimmune Hypopituitarism in Patients with Coeliac Disease: Symptoms Confusingly Similar. *Scand J Gastroenterol* [online]. 2000, **2001**(5), s. 558-560 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: [http://pathology.jhu.edu/hypophysitis/pdf/483\\_2000\\_Collin.pdf](http://pathology.jhu.edu/hypophysitis/pdf/483_2000_Collin.pdf)

CONRAD, Karsten, Edward K.L. CHAN, Luis E.C. ANDRADE, Günter STEINER, Ger J.M. PRUIJIN a Yehuda (Eds.) SHOENFELD. *From Autoantibody Research to Standardized Diagnostic Assays in the Management of Human Diseases: Report on the 12th Dresden Symposium on Autoantibodies* [online]. September 23–26, 2015. Dresden: PABST, 2015, 2015 [cit. 2015-11-07]. ISBN 978-3-95853-104-8.

CONRAD, Karsten, Werner SCHÖBLER, Falk HIEPE a Marvin J. FRITZLER. *Autoantibodies in Organ Specific Autoimmune Diseases: A Diagnostic Reference* [online]. Volume 8 - 2011. Lengerich: Pabst Science Publishers, 2011, 2011 [cit. 2015-11-11]. ISBN 978-3-89967-734-8. Dostupné z: [http://www.gfid-ev.com/formulare/AAA\\_Vol8.pdf](http://www.gfid-ev.com/formulare/AAA_Vol8.pdf)

EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG. *Střevo (opice) (IgA nebo IgG): Návod na nepřímý imunofluorescenční test*. Lübeck, 2013.

EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG. *Anti-gliadin (GAF-3X) ELISA (IgA): Návod na provedení testu*. Lübeck, 2011.



FRIČ, P., J. NEVORAL, H. TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, M. DVOŘÁK, O. POZLER, P. KOHOUT, P. FRÜHAUF a P. KOCNA. Cílený screening celiakální sprue (CS). *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. **1/2009**, 2 [cit. 2015-11-20]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/KBM-screening-CS.pdf>

FRIČ, Přemysl a Radan KEIL. *Celiakie pro praxi* [online]. 2011, **8(9)**, s. 354-359 [cit. 2016-02-21]. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/09/03.pdf>

FRIČ, Přemysl a Olga MENGEROVÁ. *Celiakie: bezlepková dieta a rady lékaře*. Vyd. 1. Čestlice: Medica Publishing, c2008. Dieta (Medica Publishing). ISBN 978-80-85936-62-9.

HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.

HROMÁDKOVÁ, Jana. Dermatitis herpetiformis Duhring. *Zdraví E15* [online]. 2011 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/dermatitis-herpetiformis-duhring-459792>

KLEINOVÁ, Andrea. *Celiakie bezlepková dieta* [online]. 2012 [cit. 2015-10-11]. Dostupné z: <http://www.pharmanews.cz/vydani201202/clanek3.html>

KOHOUT, P. Cílený screening celiakie - ZDN. *Zdraví E15* [online]. 2010 [cit. 2016-11-08]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/cileny-screening-celiakie-452401>

KOHOUT, Pavel. *Celiakie v ambulantní praxi: Medicína pro praxi* [online]. 2007, (6), s. 250-252 [cit. 2015-08-19]. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/06/02.pdf>

KOHOUT, Pavel. Celiakie - ZDN. *Zdraví E15* [online]. 2012 [cit. 2016-01-12]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/celiakie-463474>

KOHOUT, Pavel. *Diagnostika a léčba celiakie: Interní medicína* [online]. 2006, (7 a 8), s. 324-326 [cit. 2015-08-19]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2006/07/03.pdf>

KOHOUT, Pavel a Jaroslava PAVLÍČKOVÁ. *Celiakie: Dieta bezlepková*. Čestlice: Pavla Momčilová - Medica Publishing, 1994. Dieta (Pavla Momčilová - Medica Publishing). ISBN 80-901-1376-1.

KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, s. 831-838 [cit. 2015-10-14]. ISBN 80-862-2550-X.

LITTLEWOOD, J. *Coeliac disease* [online]. 2009 [cit. 2015-12-10]. Dostupné z: <http://www.cfmedicine.com/history/topics/coeliac%20disease.htm>

LOSOWSKY, M.S. A History of Coeliac Disease. *Digestive Diseases* [online]. 2008, **26**(2), s. 112-120 [cit. 2016-01-12]. DOI: 10.1159/000116768. ISSN 1421-9875. Dostupné z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000116768>

MAŇASKOVÁ, Dana. *Genetika celiakie: Genetická predispozice* [online]. In: . 2010, 2013 [cit. 2015-10-14]. Dostupné z: [http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p\\_sub=celiakie/e-genetika](http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/e-genetika)

MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky* [online]. 2011, s. 51-54 [cit. 2016-02-18]. Dostupné z: [http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c\\_4741\\_2162\\_11.html](http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c_4741_2162_11.html)

MOŽNÁ, Lucie. *Bezlepkářům od A do Z: příručka pro celiaky*. Česko: [nakladatel není známý], 2006. ISBN 80-260-7810-1.

NATCHER, William H. *NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease* [online]. In: . 2004 [cit. 2015-09-04]. Dostupné z: <https://consensus.nih.gov/2004/2004CeliacDisease118Program.pdf>

NEVORAL, J. *Kdy lepek může způsobit nemoci a kdy naopak bezlepková dieta není vhodná: Celiakie a bezlepková dieta* [online]. In: . 2015, s. 1-81 [cit. 2016-11-29]. Dostupné z: [http://www.potravinavyav21.cz/kdy-lepek-muze-zpusobit-nemoci-a-kdy-naopak-bezlepkova-dieta-neni-  
vhodna/?utm\\_source=newsletter&utm\\_medium=email&utm\\_content=lepek2&utm\\_campaign=lepek](http://www.potravinavyav21.cz/kdy-lepek-muze-zpusobit-nemoci-a-kdy-naopak-bezlepkova-dieta-neni-vhodna/?utm_source=newsletter&utm_medium=email&utm_content=lepek2&utm_campaign=lepek)

NEVORAL, Jiří. Onemocnění jater v dětském věku - ZDN. *Zdraví E15* [online]. 2001 [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/onemocneni-jater-v-detskem-veku-140270>

ORGENTEC. *ELISA, IMMUNOBLOTS, IMMUNOFLUORESCENCE: Instruction for Use*. Mainz-Germany, 2012.

PEKÁRKOVÁ, Božena, Boris PEKÁREK a Jarmila KABÁTOVÁ. Racionálna diagnostika a liečba celiakie: 46. metodický list racionálnej farmakoterapie. *Štandardný diagnostický a terapeutický postup* [online]. 2009, **13**(1-2) [cit. 2015-10-04]. Dostupné z: <http://www.herba.sk/stiahni/metodicky-46-celiakia.pdf>

POZO-RUBIO, Tamara, Marta OLIVARES, Esther NOVA, Giada DE PALMA, Jorge R. MUJICO, Maria Desamparados FERRER, Ascensión MARCOS a Yolanda SANZ. Immune Development and Intestinal Microbiota in Celiac Disease. *Clinical and Developmental Immunology* [online]. 2012, **2012**, 1-12 [cit. 2015-09-04]. DOI: 10.1155/2012/654143. ISSN 1740-2522. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/654143/>

PŘÍHODA, Josef, Marie HRUŠKOVÁ a Pavel SKŘIVAN. *Cereální chemie a technologie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0530-7.

RUBIO-TAPIA, A. a J. A MURRAY. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut* [online]. 2010, **59**(4), 547-557 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1136/gut.2009.195131. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2009.195131>

RUJNER, Jolanta a Barbara A CICHANŃSKA. *Bezlepková a bezmléčná dieta*. Vyd. 1. [české]. Brno: Computer Press, 2010. ISBN 978-80-251-3255-5.

SHOENFELD, Yehuda, Ricard CERVERA a M GERSHWIN. *Diagnostic criteria in autoimmune diseases*. Totowa, NJ: Humana Press, c2008. ISBN 16-032-7285-2.

SNYDER, Melissa R. a Joseph A. MURRAY. Celiac Disease: Advances in Diagnosis. *Expert Review of Clinical Immunology* [online]. 2015 [cit. 2015-12-03]. DOI: 10.1586/1744666X.2016.1130625. ISSN 1744-666x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/1744666X.2016.1130625>

TORRES, M.I., T. PALOMEQUE a P. LORITE. Celiac Disease and Other Autoimmune Disorders. Autoimmunity - Pathogenesis, Clinical Aspects and Therapy of Specific Autoimmune Diseases [online]. InTech, 2015 [cit. 2016-04-20]. DOI: 10.5772/60695. ISBN 978-953-51-2134-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/autoimmunity-pathogenesis-clinical-aspects-and-therapy-of-specific-autoimmune-diseases/celiac-disease-and-other-autoimmune-disorders>

Molekuly rozeznávající antigen. JÍLEK, Petr. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. 4. vyd., V Grada 1. Praha: Grada, 2014, s. 43. ISBN 978-80-247-4822-1.