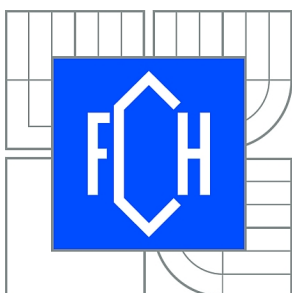




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZPŮSOBY STANOVENÍ A LÉČENÍ CELIAKIE

METHODS OF ASSESMENT AND TREATMENT OF COELIAC DISEASE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARTIN VALKUS

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0557/2010** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Martin Valkus**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Způsoby stanovení a léčení celiakie

Zadání diplomové práce:

1. Provedení literární rešerše na zadané téma
2. Výběr a testování metod pro detekci celiakie
3. Zpracování výsledků a navržení vhodného postupu detekce celiakie

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Martin Valkus
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá způsoby stanovení a léčbou celiakie. Teoretická část zahrnuje základní seznámení s celiakií, její historií, prevalencí, etiopatogenezí a imunopatogenezí. Rozebírá možnosti diagnostiky. Dále se věnuje možnostem léčby, tedy bezlepkové dietě. Zmiňuje legislativu České republiky a Evropské unie. Srovnává finanční nákladnost bezlepkové diety a běžné stravy.

V experimentální části byly srovnány metody PCR, ELISA a nepřímou imunofluorescenci pro stanovení genetické predispozice a protilátek při celiakii (hlavně byl kladen důraz na srovnání protilátek proti gliadinu a deamidovanému gliadinu ve třídách IgA a IgG).

ABSTRACT

This diploma thesis deals with methods of determining and treatment of coeliac disease. In the theoretical part of the work sums up informations about coeliac disease - history, prevalence, etiopathogenesis, immunopathogenesis, possibilities of diagnosis, discusses about gluten-free diet, mentions legislation of the Czech Republic and the European Union and compares expensiveness of gluten-free diet and normal diet.

The experimental part of this thesis compares PCR, ELISA and indirect immunofluorescence methods for assesment of determination of genetic predisposition and antibodies in coeliac disease (greatest emphasis was placed on the comparison of antibodies against gliadin and deamidated gliadin antibodies in IgA and IgG).

KLÍČOVÁ SLOVA

Celiakie, prevalence, imunopatogeneze, ELISA, PCR, diagnostika, protilátky

KEYWORDS

Coeliac disease, prevalence, immunopathogenesis, ELISA, PCR, diagnostics, antibodies

VALKUS, M. Způsoby stanovení a léčení celiakie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 79 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité zdroje literární jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Děkuji Mgr. Daně Vránové, Ph.D., za přátelský přístup a pomoc během realizace mé diplomové práce.

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Celiakie.....	9
2.1.1 Historie celiakie.....	9
2.1.2 Prevalence celiakie.....	10
2.1.3 Vliv pohlaví, heredita a mortalita na rozvoj celiakie.....	11
2.1.4 Cílený screening celiakie.....	11
2.1.4.1 Metodický pokyn Ministerstva zdravotnictví České republiky.....	11
2.1.5 Klinické formy a projevy celiakie.....	12
2.2 Etiopatogeneze celiakie.....	13
2.2.1 Přítomnost gliadinu ve stravě.....	13
2.2.2 Senzitivní organismus.....	14
2.2.3 Alergie na lepek.....	14
2.3 Imunopatogeneze celiakie.....	15
2.3.1 T lymfocytární odpověď.....	17
2.4 Diagnostika celiakie.....	18
2.4.1 Biopsie.....	18
2.4.2 Genetické vyšetření celiakie.....	19
2.4.3 Imunologické vyšetření celiakie.....	20
2.4.3.1 Protilátky proti tkáňové transglutamináze.....	21
2.4.3.2 Protilátky proti gliadinu a deamidovanému gliadinu.....	22
2.4.3.3 Protilátky proti endomysiu.....	22
2.4.3.4 Protilátky proti retikulínu.....	23
2.4.3.5 Protilátky proti aktinu ve třídě IgA.....	23
2.4.3.6 Aktivita paraoxonázy 1.....	23

2.5 Metodika pro diagnostiku celiakie	25
2.5.1 ELISA.....	25
2.5.2 Metoda nepřímé imunofluorescence	27
2.5.3 Chemiluminiscenční imunochemická reakce v pevné fázi	28
2.5.4 SSP - PCR	29
2.6 Možnosti léčby celiakie.....	30
2.6.1 Bezlepková dieta	30
2.6.2 Obiloviny.....	31
2.6.3 Odstranění toxických sekvencí.....	31
2.6.4 Legislativa (množství lepku a označování potravin).....	32
2.6.5 Označení bezlepkových potravin	32
2.6.6 Nákladnost bezlepkové diety.....	33
3 Experimentální část	35
3.1 Soupravy.....	35
3.2 Přístroje a pomůcky.....	35
3.3 Výběr vzorků.....	36
3.4 Separace a skladování vzorků	36
4 Výsledky a diskuze.....	37
4.1. Genetické vyšetření	38
4.1.1 Postup izolace.....	38
4.1.2 Příprava PCR.....	38
4.1.3 Vyhodnocení výsledků:.....	39
4.2 Stanovení specifických protilátek pro celiakii	42
4.2.1 Vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG	42
4.2.2 Vyšetření protilátek proti endomysiu ve třídách IgA a IgG	43
4.2.3 Vyšetření protilátek proti gliadinu ve třídě IgA a IgG	44
4.2.3.1 Test komerční soupravy 1	44

4.2.3.2 Test komerční soupravy 2	45
4.2.3.3 Test komerční soupravy 3	46
4.2.4 Vyšetření protilátek proti deamidovanému gliadinu ve třídách IgA a IgG	48
4.2.4.1 Test komerční soupravy 4	48
4.2.4.2. Test komerční soupravy 5	49
4.2.4.3 Test komerční soupravy 6	50
4.3 Hodnocení.....	52
5 Závěr.....	57
6 Přílohy	59
Příloha 1	59
Příloha 2	61
Příloha 3	64
Příloha 4	68
Příloha 5	70
7 Seznam Použitých zdrojů	72
8 Seznam použitých zkratk a symbolů	79

1 ÚVOD

Celiakie je chronické autoimunitní onemocnění tenkého střeva, které je zapříčiněno nesnášenlivostí lepku. Vznik onemocnění je podmíněn genetickou predispozicí a přítomností lepku ve stravě.

Celiakie se může projevit v jakémkoliv věku. Projevuje se nechutenstvím, průjmem, ztrátou hmotnosti nebo naopak nadváhou, únavou a u dětí také poruchou růstu. Důsledkem je malabsorpční syndrom, tedy špatné vstřebávání živin, vitaminů a minerálů, pacienti proto můžou trpět i anémií, horším zrakem či častějšími zlomeninami.

Při podezření na celiakii je pacientovi provedeno genetické vyšetření predispozice, imunologické stanovení specifických protilátek a biopsie sliznice tenkého střeva. Pro následné stanovení diagnózy je důležitá jejich správná interpretace.

V současné době neexistuje žádná léčba, jediný způsob, jak zabránit klinickým příznakům, je bezlepková dieta. Její podstatou je konzumace potravin přirozeně lepek neobsahujících (zelenina, ovoce, luštěniny) a potravin se sníženým obsahem lepku (nesmí obsahovat více než 100 mg lepku na kilogram potraviny ve stavu, v němž je prodávána konečnému spotřebiteli). Jako bezlepkové se mohou označit ty potraviny, které obsahují méně než 20 mg lepku na kilogram potraviny. Je vhodné doplňovat živiny pomocí suplementů.

Na rozdíl od jiných diet je bezlepková dieta jediným možným způsobem léčby. Nedodržování diety vede ke zhoršení zdravotního stavu a zvýšení nákladů na zdravotní péči a následnou rekonvalescenci.

Rozdíl cenové náročnosti bezlepkové diety a běžné stravy byl vypočítán odborníky ve shodě se Sdružením pacientů ve výši 80 Kč za den. Za měsíc jsou tedy náklady o 2 400 Kč vyšší na jednoho člena rodiny.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Celiakie

Celiakie je závažné chronické onemocnění trávicí soustavy (tenkého střeva) dětí i dospělých. Je spojena s mnoha dalšími onemocněními, např. autoimunitní imunopatologické nemoci a malignity. Důsledkem tohoto onemocnění je malabsorpční syndrom. [1]

Celiakie je patogeneticky velmi zajímavé onemocnění. Spojuje v sobě mechanismy potravinové intolerance a autoimunitního onemocnění. Pro spuštění zánětlivého onemocnění je nutná přítomnost lepku ve stravě, což je skupina bílkovin obsažená v obilných zrnech. [2]

2.1.1 Historie celiakie

Před 10 000 lety došlo v dějinách lidstva k výrazné změně způsobu života, kterou nazýváme neolitická revoluce. V průběhu tohoto procesu se lidé naučili, že je pro ně místo dosavadního způsobu obživy, tedy lovu a sběru, výhodnější usadit se v úrodné oblasti a věnovat se zemědělství. Tento způsob života přesto přinášel jisté nevýhody. Chov domácích zvířat zapříčinil rozšíření infekčních onemocnění a pěstování kulturních plodin jako je pšenice a ječmen zase vedl u určitého procenta populace k zažívacím obtížím. [1]

První, kdo si povšimnul souvislosti v konzumaci těchto obilnin se zažívacími problémy, byl antický lékař Aretaeus z Cappadoici, díky čemuž se o této nemoci můžeme dočíst ve spisech pocházejících z 2. poloviny 2. století. n.l. Jeho spisy přeložil a k tisku upravil až v roce 1856 skotský lékař Francis Adams ze Sydenhamské společnosti. [3]

V průběhu dalších století nenacházíme žádné lékařské záznamy o celiakii. Po Arateovi je jako první poskytl anglický lékař Samuel Gee. Jeho spis z roku 1888 nabádá pacienty s tímto onemocněním k přísné dietě, hlavně k vyhýbání se moučným jídlům. [1]

Nejlépe na dietní léčbu reagovaly děti. To byl zřejmě důvod, proč se o celiakii nejvíce zajímali pediatři, kteří vykazovali i značný náskok v léčbě tohoto onemocnění. Jedním z těchto dětských lékařů byl i Christian A. Herter, jenž napsal knihu o dětech s celiakií. Díky tomu se o celiakii mluvilo jako o Gee – Herterově chorobě. Jeho názor, že jsou tuky lépe snášeny než uhlohydráty, podpořil i proslulý pediatr Sir Frederic Still. Ten roku 1918 poprvé poukázal na škodlivost chleba pro celiaky, přesněji řečeno na jeden druh škrobu vyskytující se v něm. První dietetické opatření sepsal John Howland v roce 1921, ve kterém byla povolena konzumace uhlohydrátu až v poslední fázi diety, a to ve velmi malém množství. [1, 4]

Dále byly doporučovány nemocným lidem různé typy diet (např. banánová dieta). Až po 2. světové válce se nizozemskému pediatrovi W. K. Dickovi podařilo učinit zásadní objev

v léčbě celiakie. U pacientů vyřadil z jídelníčku pšeničnou, žitnou a ovesnou mouku a nahradil je pšeničným škrobem, kukuřičnou nebo rýžovou moukou. To vedlo k razantnímu zlepšení zdravotního stavu nemocných dětí. Touto prací se inspirovala prof. Charlotte Andersonová, která extrahovala škrob a některé další části z pšeničné mouky, čímž zjistila, že výsledná hmota je tím, co pacientům škodí. Od roku 1950 je stěžejním bodem léčby celiakie bezlepková dieta. [3,4]

2.1.2 Prevalence celiakie

Celiakie patří mezi velmi časté autoimunitní onemocnění. Odhaduje se, že ve většině rozvinutých zemích je prevalence cca 1% obyvatelstva. V Evropě stejně jako v USA se počet celiaků odhaduje na tři miliony. V České republice se odhaduje počet celiaků na čtyřicet až padesát tisíc obyvatel (1:200 až 1:250). Předpokládá se, že je dispenzarizováno a diagnostikováno přibližně 15% z celkového počtu nemocných. [13]

Až v posledních letech začínáme poznávat možnosti prevalence celiakie. Cílem je definice metod a prostředků, kterými můžeme riziko představované genetickou dispozicí omezit. Již během těhotenství a v časném dětství je potřeba tato opatření realizovat. Těhotenství u žen s diagnostikovanou celiakií a dodržující bezlepkovou dietu by mělo být vždy plánované v klinické remisi onemocnění. Během těhotenství se mohou objevit určité symptomy aktivity, nejčastěji anémie. Proto se v každém trimestru doporučuje provádět kontrola a podle charakteru zjištěného symptomu nastavit odpovídající substituční terapii. V případě nediodagnostikované celiakie je častější opožděný vývoj plodu, předčasný porod, porod císařským řezem a nízká porodní váha dítěte. V případě podezření na opožděný vývoj plodu by měl být u matky neprodleně provedeno vyšetření na celiakii. Dodržování bezlepkové diety příznivě ovlivňuje průběh těhotenství u většiny matek s celiakií, které prodělaly opakované potraty. [14]

Zejména v prvním roce života mají na funkci a vývoj střevní slizniční bariéry (vč. její propustnosti pro antigenní substance a charakter následné imunitní odpovědi), vývoj střevního mikrobiomu a dozrávání slizničního imunitního systému rozhodující vliv kojení a příjem lepku během kojení. Příjem většího množství lepku do dvou let života zvyšuje výskyt celiakie. Evropská společnost pro pediatrickou gastroenterologii, hepatologii a výživu – ESPGHAN doporučuje podat opakovaně malou dávku lepku mezi 4. až 7. měsícem. Díky tomuto postupu dochází ke snížení rizika celiakie, alergie na lepek a diabetu 1. typu. Zvýšené riziko celiakie představují v tomto období života virové enteritidy (zejména rotavirové), proto se u geneticky disponovaných dětí doporučuje sledovat titr rotavirových protilátek a při jejich

zvýšení následně vyšetřit protilátky proti tkáňové transglutamináze. Dalším rizikovým faktorem je vakcinace. [17]

2.1.3 Vliv pohlaví, heredita a mortalita na rozvoj celiakie

Poměr postižení celiakie u žen a mužů je v poměru 2:1. Celiakie se dědí autosomně dominantně s neúplnou penetrancí. U příbuzných 1. stupně (rodiče, sourozenci a děti) činí výskyt celiakie 8 – 18 % a u jednovaječných dvojčat dosahuje až 70 %.

Mortalita u včasné diagnostiky a následném dodržování bezlepkové diety je menší než 1%. Než byla zavedena léčba bezlepkovou dietou, činila mortalita 10 – 30 %. [17]

2.1.4 Cílený screening celiakie

V současné době jsou časté případy nedostatečně včasné a naopak příliš pozdě diagnostikované celiakie, které vedou k závažným sociálním a zdravotním rizikům – ať už z pohledu pacienta (rozvoj i jiných autoimunitních onemocnění a horší kvalita života) nebo z pohledu státu (vysoké výdaje sociálního a zdravotního pojištění). [10]

Ministerstvo zdravotnictví České republiky vydalo 28. 2. 2011 „Metodický pokyn – Cílený screening celiakie“. Tento pokyn významně přispěl ke stanovení správné diagnózy pacientů s celiakií ambulantními specialisty a praktickými lékaři. Vydání tohoto dokumentu vedlo ke zvýšení povědomí o celiakii a v praxi se více myslí i na tuto diagnózu.

Naše ministerstvo zdravotnictví je v Evropě prvním vrcholovým orgánem ve zdravotnictví, který vydal toto doporučení a udělalo tak první krok k tomu, aby se řešila nejen zdravotní, ale i sociální problematika pacientů s celiakií. [10, 17]

2.1.4.1 Metodický pokyn Ministerstva zdravotnictví České republiky

Cílem tohoto metodického pokynu je časná diagnostika celiakie u velké populace doposud nediodagnostikovaných celiaků a zavedení terapie (bezlepkové diety), odhalení atypických forem celiakie, omezení a kontrola přidružených autoimunitních chorob, monitorování skutečné prevalence celiakie v České republice a zlepšení kvality života celiaků.

Jsou definované rizikové choroby a skupiny, kterých se screening týká:

- příbuzní 1. stupně (rodiče, sourozenci, děti), při jejich pozitivitě příbuzní 2. stupně (prarodiče, strýcové, tety), zejména při výskytu podezřelého symptomu nebo jiné autoimunitní nemoci:
- dermatitis herpetiformis (Duhring), mikrocytární anémie nereagující na léčbu preparáty železa, předčasná osteoporóza, terapeuticky rezistentní průjmová forma syndromu dráždivého střeva, polyneuropatie a myopatie nejasné etiologie, ataxie nejasné etiologie, deprese a

poruchy chování, amenorhea, pozdní menarche, infertilita a poruchy reprodukce, Donův a Turnerův syndrom.

Podezřelé symptomy:

- opožděný psychosomatický vývoj, nevysvětlený úbytek tělesné hmotnosti, nízká koncentrace celkového železa v séru, výrazně izolované zvýšení sérových aminotransferáz (ALT, AST), izolovaný deficit IgA, recidivující aftózní stomatitida a hypoplazie zubní skloviny.

Přidružené autoimunitní choroby:

- diabetes mellitus 1. typu, autoimunitní tyreoiditida a jiné autoimunitní endokrinopatie, autoimunitní hepatitida, systémový lupus erythematoses, primární sklerózující cholangitida, primární biliární cirhóza, Sjögrenův syndrom, choroby pojiva a IgA nefropatie.

V prvním stupni diagnostiky se doporučuje stanovení sérových autoprotilátek k tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a stanovení celkového IgA. Asi u 1 – 3 % celiaků se vyskytuje deficit IgA protilátek. V takovémto případě se doplní vyšetření o stanovení autoprotilátek k tkáňové transglutamináze ve třídě IgG.

V případě positivity autoprotilátek nebo v případě vysoce rizikových symptomů se provádí perorální biopsie aborálního duodema (pod Vaterovou papilou, D2 a nižší oddíly duodena).

V posledním bodě se věnuje péči o nově diagnostikované celiaky. Pacienti se mají odeslat k zahájení léčby a dlouhodobé dispenzarizaci na gastroenterologické pracoviště pro děti a dorost nebo pro dospělé. [22]

2.1.5 Klinické formy a projevy celiakie

V případě celiakie existují čtyři klinické formy – aktivní, tichá, latentní a potenciální. V současné době je předpoklad, že asymptomatických forem celiakie je 7x více oproti symptomatickým formám. [7]

- Aktivní celiakie – je vyjádřena klinickými a histologickými projevy. Jsou prokázány atrofické slizniční změny.
- Tichá celiakie – klinické projevy nejsou zřejmé, imunologické a histologické testy jsou ovšem pozitivní.
- Latentní celiakie – většinou není bez intestinálních symptomů, ovšem chybí důkaz enteropatie. Tato forma celiakie musí splňovat další kritéria: často jsou přítomny klinické projevy, sliznice tenkého střeva je při běžné stravě s lepkem normální, v minulosti byly u pacienta zachyceny histologické změny odpovídající diagnóze celiakie a pozitivní imunologické vyšetření.

- Potenciální celiakie – pacient nevykazuje klinické příznaky, histologický nález na jejunu je normální, má negativní specifické protilátky při celiakii.

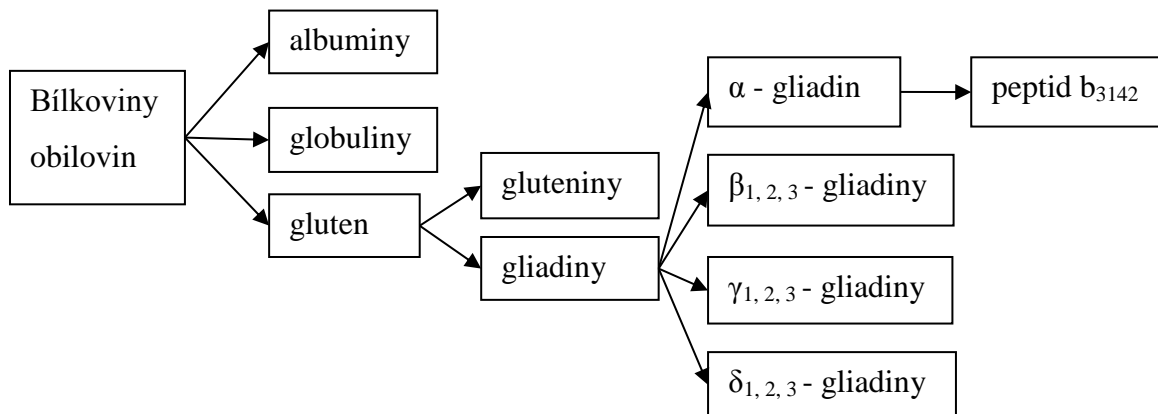
2.2 Etiopatogeneze celiakie

Toto chronické onemocnění trávicí soustavy je podmíněno vystavení organismu toxické frakci glutenu, tedy gliadinu. Aby mohlo dojít k tomuto onemocnění, musí být splněny dvě podmínky [4]:

1. Přítomnost gliadinu ve stravě
2. Senzitivní organismus

2.2.1 Přítomnost gliadinu ve stravě

Lepek, neboli gluten, je směs bílkovinných molekul, které tvoří zásobní proteiny obilných zrn. Gluten se skládá ze dvou bílkovinných frakcí. Složky, které nejsou v alkoholu rozpustné, se nazývají gluteniny a nesehrávají v imunopatogenezi celiakie významnější úlohu. Proteiny rozpustné v alkoholu jsou označovány jako gliadiny (Tab. č. 1).



Tab. č. 1 – Složení bílkovin pšeničných zrn [4]

Molekulová hmotnost gliadinů se pohybuje mezi 18 000 – 75 000. Na základě této molekulové hmotnosti se dělí na α , β , γ a δ gliadiny. Štěpením, které se provádí proteolytickými enzymy, se izolovaly a identifikovaly jednotlivé frakce prolaminu (prolaminy obsahují velké množství prolinu a glutaminu – u pšenice se nazývají gliadiny, viz Tab. č. 2). Mezi těmito frakcemi převažuje α - gliadin o molekulové hmotnosti 18 000. Z tohoto α - gliadinu byl dalším štěpením vyizolován peptid b_{3142} , který je sám schopen vyvolat celiakii a je označován jako tzv. „toxický gliadin“. Pro α - gliadin je typická přítomnost sekvencí aminokyselin bohatých na glutamin a prolin (viz. Tab. č. 2). [2, 4]

obilnina	prolaminy	obsah AK	toxicita
pšenice	α -gliadin	36 % glutaminu 17-23 % prolinu	+++
ječmen	hordeiny	36 % glutaminu 17-23 % prolinu	++
žito	sekaliny	36 % glutaminu 17-23 % prolinu	++
oves	aveniny	↑ glutamin ↓ prolin	+
kukuřice	zeiny	↓ glutamin ↑ alanin, leucin	-
proso		↓ glutamin ↑ alanin, leucin	-
rýže		↓ glutamin ↑ alanin, leucin	-

Tab. č. 2 – Obsah glutaminu a prolinu v prolaminech různých obilovin [2]

2.2.2 Senzitivní organismus

Velkou roli při vzniku celiakie hraje dědičnost. Pacienti s diagnostikovanou celiakií mají přítomné specifické alely HLA-DQ2 a HLA-DQ8 komplexu lokalizované na chromozomu 6p21. K propuknutí onemocnění stačí přítomnost i jen jedné varianty. [2]

Lepek, který je přijímán s potravou, je trávicími enzymy štěpen na jednotlivé bílkovinné řetězce. Lidský organismus nedokáže ve svém střevě tyto bílkovinné řetězce zcela rozložit. Tyto jen částečně rozložené gliadinové fragmenty a peptidy jsou zachyceny buňkami epitelu tenkého střeva, kde se dostávají do kontaktu s dalším enzymem – tkáňovou transglutaminázou. [2, 4, 34]

2.2.3 Alergie na lepek

Hned na začátku je nutné si uvědomit rozdíl mezi celiakií a alergií na lepek. V případě alergie se jedná o imunologickou reakci na bílkoviny obilovin. V imunopatogenezi alergie přísluší hlavní úloha IgE imunoglobulinům reagujících s opakovanými sekvencemi prolinu a glutaminu v peptidech, které vznikly štěpením lepku. Vzniklá vazba zapříčiní uvolnění chemických mediátorů (histaminu z žírných buněk a bazofilů). První alergické projevy po setkání s antigenem se mohou objevit po pár minutách až hodinách a liší se podle expozice lepkem a základního imunologického mechanismu. [34]

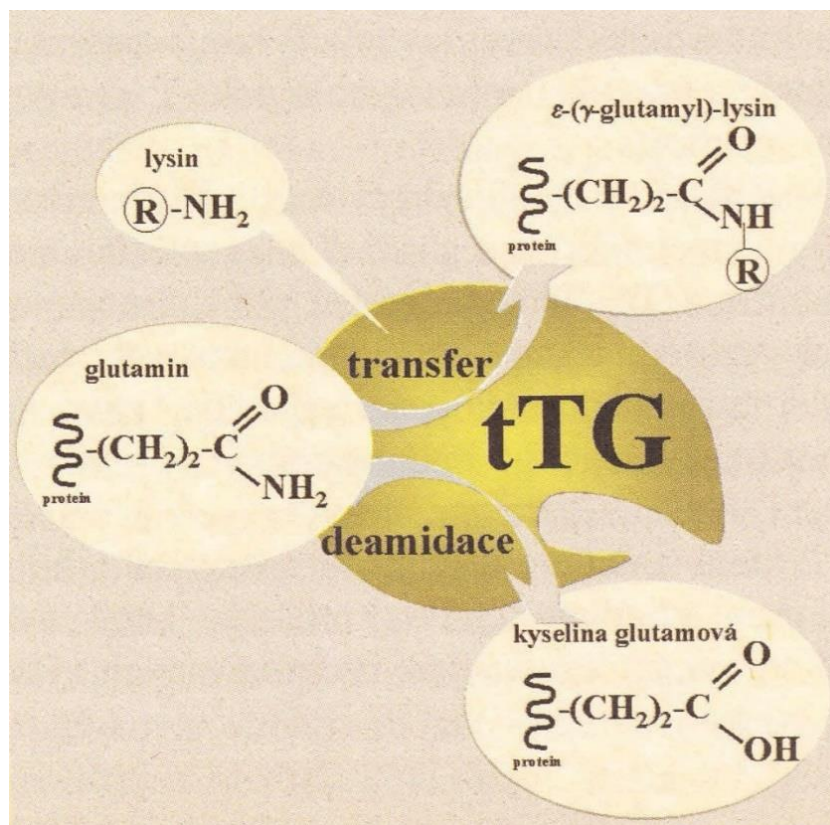
Nejvýznamnější formou potravinové alergie je anafylaxe vyvolaná fyzickou aktivitou (wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis). Alergenem jsou v tomto případě 4 heptapeptidy s glutaminem v poloze 1, 5, 6 a 7 a prolinem v poloze 4. Aminokyseliny v těchto polohách jsou kritické pro vazbu na IgE. Jinými frakcemi gliadinu nebo jinými bílkovinami pšenice se může projevit alergie jinými formami, jako např. kopřivka, atopická dermatitida a anafylaktická

reakce. Existují také alergie profesní, které jsou způsobeny vdechováním mouky a obilných prachů. Výskyt se zvyšuje s dobou zaměstnání a tedy s dobou expozice. Alergeny u této formy alergie jsou inhibitory α -amyláz, aglutinin, peroxidáza nebo nespecifické transportní proteiny lipidů. [34]

2.3 Imunopatogeneze celiakie

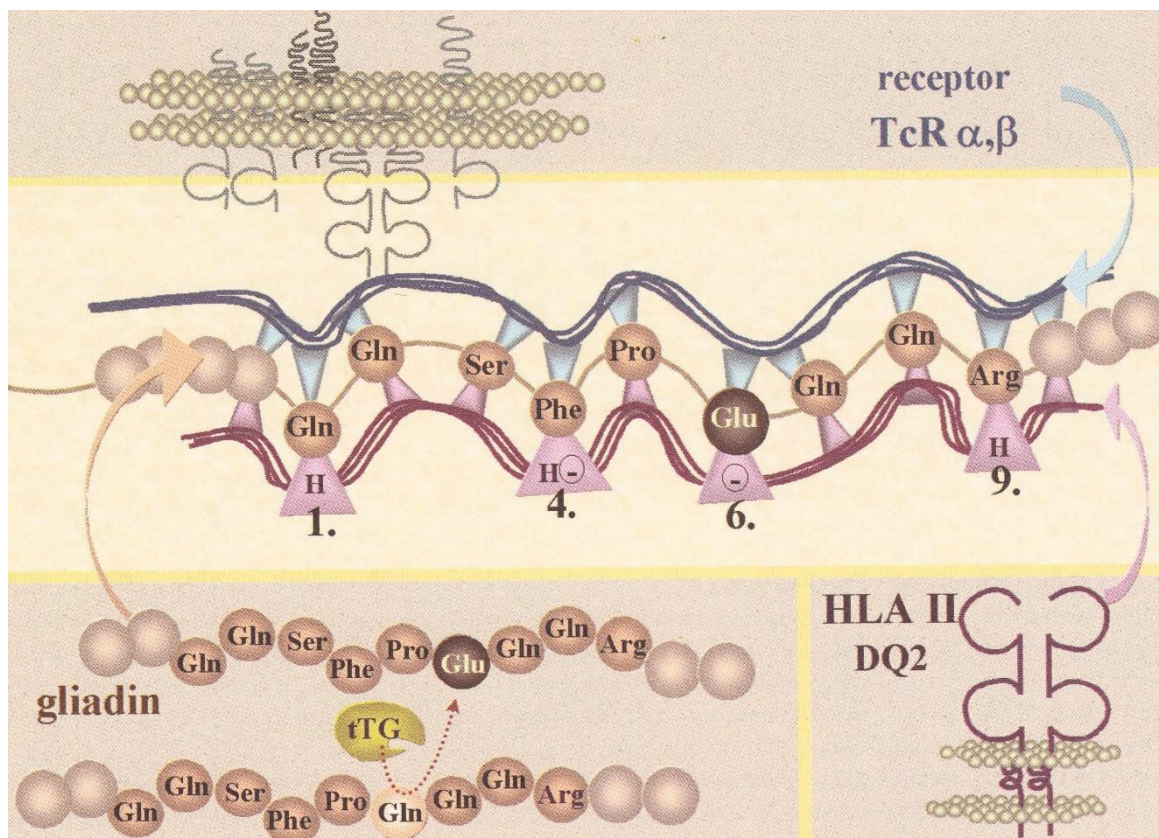
V imunopatogenezi celiakie má mimořádný význam genetická predispozice. Celiakie je asociována s HLA-DQ2 (cis kódovaná DQA1*05:01 / DQB1*02:01 a trans DQA1*0505 DQB1*03:01 / DQA1*02:01 a DQB1*02:02) a u menšího počtu nemocných je asociována s HLA-DQ8 (kódovaná DQA1*03:01 / DQB1*03:02). Za predispozici k celiakii jsou zodpovědné výše jmenované alely, které jsou součástí MHC (hlavní histokompatibilní komplex) na 6. chromozomu a kódují povrchové glykoproteiny HLA druhé třídy. HLA-DQ je buněčný povrchový receptor antigen prezentujících buněk (APC – viz Obr. 3) a je složen z alfa a beta řetězců, které na 6. chromozomu kódují 2 lokusy ležící poblíž sebe (HLA-DQA1 a HLA-DQB1 popsány v Příloze 2). V HLA-DQ2 se vyskytují proteinové izoformy cis a trans (cis - na totožném chromozomu a může být zděděno i od jednoho rodiče a trans - na nestejných chromozomech a je výsledkem kombinace predispozičních alel obou rodičů, kteří sami mají pouze mírnou predispozici). Většina jedinců s genetickou predispozicí v HLA-DQ2 je cis a pouze asi 3 % jsou trans. Genetickou vazbu u celiakie můžeme pozorovat zvýšeným výskytem u přímých příbuzných. [2, 27, 81,82]

Polymorfní část HLA-DQ2 a HLA-DQ8, odpovědná za vazbu antigenních peptidů, vykazuje schopnost vázat aminokyseliny s celkově negativním nábojem (kyselina glutamová a asparagin). Nativní gliadiny mají velmi nízkou koncentraci aminokyselinových zbytků s negativním nábojem. Jsou ovšem bohaté na obsah glutaminu (viz. Tab. č. 2), který může být deamidací snadno přeměněn na kyselinu glutamovou. Modifikace deamidací nativních gliadinů na imunologicky reaktivní peptidy je zprostředkována aktivitou enzymu tkáňová translutamináza. Mechanismus reakcí je naznačen na Obr. 1. [2]



Obr. 1 – Mechanismus reakcí katalyzovaných tkáňovou transglutaminázou [2]

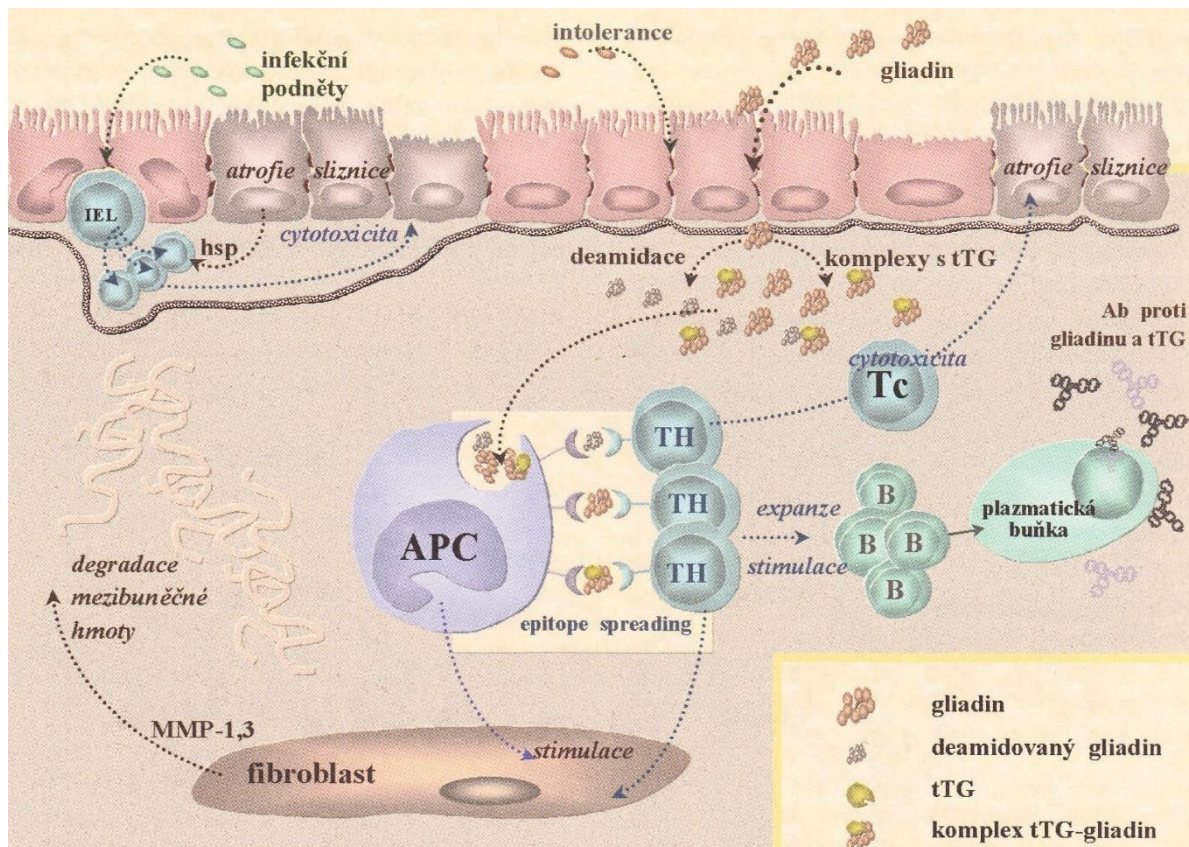
Pro tkáňovou transglutaminázu je nativní gliadin (s obsahem 36 % glutaminu) vysoce afinitním substrátem. Produktem je deamidovaný gliadin, který je pro molekuly HLA-DQ2 a HLA-DQ8 více afinitní a má schopnost indukovat T lymfocytární odpověď. Antigenní peptidy, které obsahují kyselinu glutamovou, se účinně váží na HLA-DQ reakcí s negativně nabitými aminokyselinami na pozicích 4, 6 a 7 vazebného místa této HLA molekuly (viz Obr. 2). [2]



Obr. 2 – Struktura vazebního místa na molekule HLA-DQ2 a vazba imunogenního peptidu [2]

2.3.1 T lymfocytární odpověď

U nemocných s celiakií je epitelová vrstva střevní sliznice zvýšeně propustná. Možnou příčinou může být insult infekční nebo způsobený intolerancí jiných potravin, která může být zapříčiněna nedostatečnou dobou kojení a předčasné zatížení nedozrálého slizničního imunitního systému tuhou stravou. Když nativní gliadin pronikne do tkáně, je deaminován a nebo může vytvářet T komplexy s tkáňovou transglutaminázou. U geneticky disponovaných osob jsou antigenní fragmenty gliadinu velmi účinně prezentovány T lymfocytárnímu systému a rozvíjí se imunopatologická T lymfocytární reaktivita. V antigen-prezentující buňce dojde ke zpracování a následně dojde ke stimulaci T lymfocytů. Tyto T lymfocyty mají dostatečné podněty k aktivaci B lymfocytů a mají za následek tvorbu protilátek proti gliadinu a tkáňové transglutamináze. Dále vznikají tzv. pomocné signály vedoucí k aktivaci cytotoxických T lymfocytů, které cytotoxicky poškozují epitelovou vrstvu. Následně jsou také stimulovány fibroblasty a dochází k tvorbě matrixových metaloproteináz. Tyto metaloproteinázy degradují mezibuněčnou hmotu a jsou ovlivněny její imunobiologické vlastnosti. Schéma vzniku protilátek viz Obr. 3. [2]



Obr. 3 – Imunopatogeneze celiakie [2]

2.4 Diagnostika celiakie

Kritéria určená k diagnostice celiakie byla stanovena společností pro dětskou gastroenterologii a výživu (ESPGHAN – Evropská společnost pro pediatrickou gastroenterologii, hepatologii a výživu a NASPGHAN – Severoamerická společnost pro pediatrickou gastroenterologii, hepatologii a výživu). Kritéria diagnostiky celiakie u dospělých kopírují kritéria pro dětskou gastroenterologii a výživu. [7]

V případě podezření na celiakii nebo v rámci screeningu je u pacienta provedena biopsie sliznice tenkého střeva, genetické vyšetření a imunologické stanovení specifických protilátek v séru.

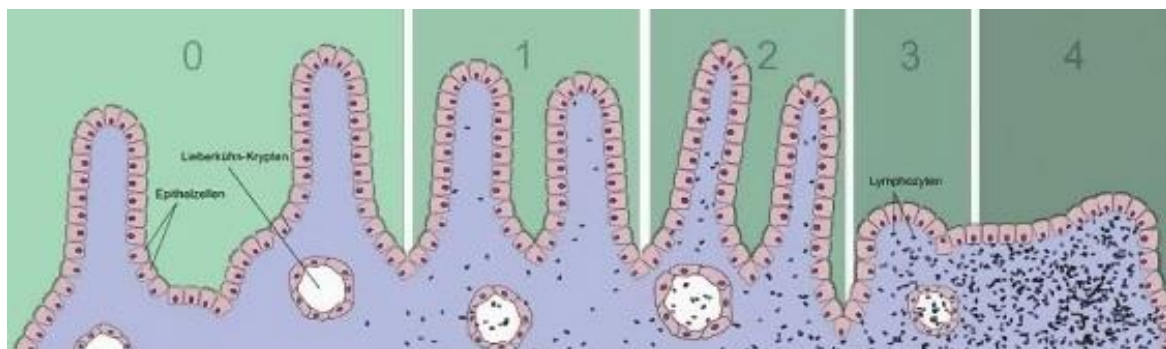
2.4.1 Biopsie

Dřívější kritéria (podle ESPGHAN) pro provedení biopsie při celiakii vyžadovala provedení třech odběrů vzorku tenkého střeva v čase - první odběr byl odebrán při potížích, následně po dodržování bezlepkové diety a zlepšení stavu střevní sliznice byl proveden druhý odběr a následně po opětovném zavedení lepku do potravy a tedy následném zhoršení zdravotního stavu se provedl odběr třetí. Provedení tří biopsií je finančně dosti nákladné a velmi náročné

pro pacienty. Po objevení specifických protilátek (především proti tkáňové transglutamináze a endomysiu) se provádění biopsií přehodnotilo a v současné době je pacient zatížen pouze jednou biopsií vzorku sliznice tenkého střeva. [7]

Při biopsii z prvního úseku tenkého střeva (duodenum, dvanácterník) je velmi důležité získat čtyři až šest vzorků z různých i vzdálených míst duodena z důvodu nerovnoměrného poškození střevní sliznice. Následuje odběr jednoho nebo dvou vzorků z oblasti tenkého střeva přiléhající k žaludku (bulbus duodeni), protože se v některých případech jedná o jediné místo, kde se nalézají zánětlivé procesy a zkrácené klky.

Vzorky se vyhodnocují podle Marchovy klasifikace popisující přechod od normálního složení sliznice až po absolutní vymizení klků. March 0 – normální sliznice, March 1 – zmnožení zánětlivých buněk ve střevní sliznici (zvýšení počtu intraepiteliálních lymfocytů), March 2 – pokračující zánětlivý proces. Dochází k nadměrnému prohlubování krypt (hyperplasie krypt), March 3 – v důsledku silného zánětu dochází ke zkracování klků (atrofie). Poškození klků March 3 se dále dělí na March 3a – mírnou atrofii, March 3b – těžká atrofie a March 3c – úplná atrofie. Posledním je March 4 – totální atrofie, hypoplazie sliznice. [1, 9, 20]



Obr. 4 – Znárodnění změn na sliznici tenkého střeva podle Marshe [27]

2.4.2 Genetické vyšetření celiakie

Jak bylo popsáno v kapitole 2.3, podílejí se na vzniku celiakie genetické faktory. Celiakie je velmi silně asociována s HLA-DQ2 (cis kódovaná DQA1*05:01 / DQB1*02:01 a trans DQA1*0505 DQB1*03:01 / DQA1*02:01 a DQB1*02:02), která je nalezena až u 95% pacientů a u menšího počtu pacientů (přibližně u 5%) je asociována s HLA-DQ8 (kódovaná DQA1*03:01 / DQB1*03:02).

V celkové světové populaci je však HLA-DQ2 přítomen z 20 – 30 %, ale pouze u přibližně jednoho procenta se rozvine celiakie. Z tohoto důvodu vyplývá, že použití metod HLA typizace je nevhodný screeningový test k vyhledávání pacientů s celiakií. Běžně se používá pouze u pacientů s diagnosticky nejasnými příznaky.

Pacient s celiakií má v 99% pozitivní genetické vyšetření na HLA-DQ2 a HLA-DQ8, což značí, že existují ještě další non-HLA geny, které jsou nutné k rozvoji celiakie.

Naopak u pacientů, kteří mají pozitivní genetické vyšetření, se nemusí po celou dobu života celiakie rozvinout. Mají k ní pouze genetické predispozice. [1, 17, 21]

2.4.3 Imunologické vyšetření celiakie

Celiakie patří mezi autoimunitní enteropatie a primárně postihuje sliznici tenkého střeva. V sérech nemocných s celiakií, kteří nejsou léčeni (nedodržují bezlepkovou dietu), se mohou nalézat protilátky proti gliadinu, deamidovanému gliadinu, tkáňové transglutamináze, endomysiu a retikulínu ve třídách IgA a IgG. [25]

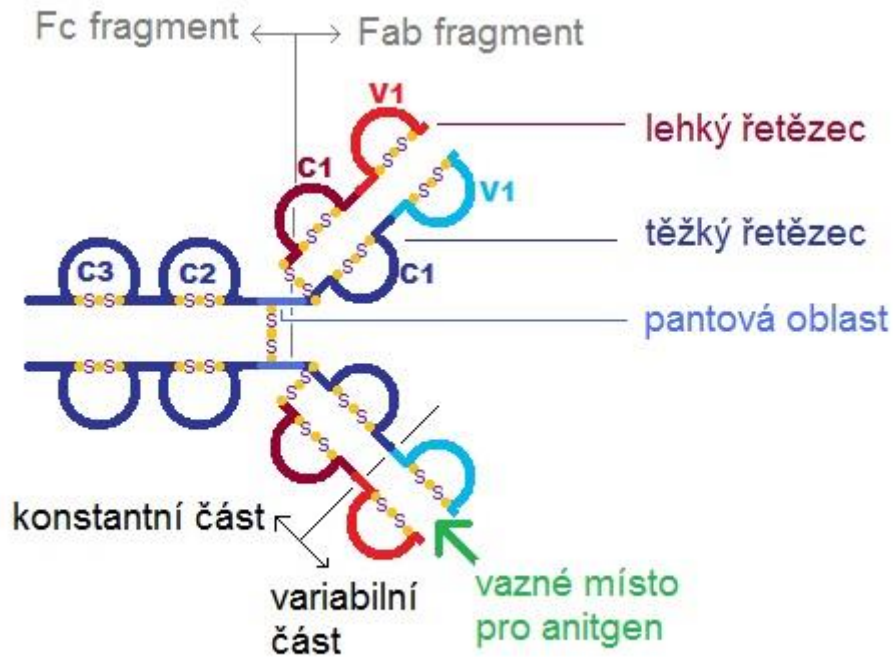
Roku 1971 Seah poprvé popsal sérové protilátky proti gliadinu. Koncem 20. století byly prokázány existence dalších imunopatologií související s celiakií. Chorzeliski poprvé popsal protilátky proti retikulínu, Ladinsler protilátky proti endomysiu a v roce 1997 Dieterich zjistil, že primárním autoantigenem protilátek proti endomysiu je tkáňová transglutamináza. [25]

Imunologické diagnostické metody přispěly významným dílem k diagnostice celiakie. Ovšem k samotnému stanovení diagnózy celiakie pozitivní imunologická vyšetření protilátek nestačí.

K potvrzení celiakie musí být vždy provedena biopsie. [25, 26]

Při prvotním vyšetření na celiakii by nemocný neměl dodržovat bezlepkovou dietu. Při dodržování bezlepkové diety dochází k poklesu protilátek a regeneraci sliznice tenkého střeva. Může tedy dojít ke vzniku falešně negativních výsledků a určení špatné diagnózy.

Mezi koncentrací protilátek a příjmem glutenu existuje závislost, díky které můžeme monitorovat léčbu pacienta a adherenci k bezlepkové dietě. [25, 26]



Obr. 5 – Monomer imunoglobulinu [61]

2.4.3.1 Protilátky proti tkáňové transglutamináze

Hlavní enzym hrající roli v patogenezi tohoto onemocnění je tkáňová transglutamináza nacházející se v lamina propria intestinální sliznice. Jako jiné transglutaminázy spojuje řetězce proteinů mezi aminoskupinou lysinu a karboxamidovou skupinou glutaminu, čímž vytváří vazby vysoce odolné vůči proteolýze. Za fyziologických podmínek enzym deamiduje nativní gliadin a vzniká modifikovaný gliadin (tzv. deamidovaný gliadin).

U predisponovaných jedinců tkáňová transglutamináza odpovídá za zvýšenou afinitu gliadinových peptidů k molekulám HLA na antigen-prezentujících buňkách. Semikvantitativní nebo kvantitativní detekci provádíme enzymovou imunoanalýzou ELISA. Specifita a senzitivita protilátek proti tkáňové transglutamináze je velmi vysoká (senzitivita je kolem 97 % a specifita 91 %).

V současné době se používá již třetí generace těchto testů používajících rekombinantní tkáňovou transglutaminázu. První generace těchto ELISA testů používala jako antigen tkáňovou transglutaminázu z morčecích jater, což z důvodu kontaminace antigenního substrátu jinými antigenními proteiny vedlo k mnohým falešně pozitivním výsledkům. V druhé generaci byla využita tkáňová transglutamináza z lidských erytrocytů.

Podle pokynu Ministerstva zdravotnictví České republiky k cílenému screeningu celiakie se doporučuje vyšetřit protilátky proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a stanovit celkové

IgA k vyloučení IgA deficitu protilátek. V případě výskytu IgA deficitu se doporučuje vyšetřit protilátky proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgG. [19, 25, 28]

2.4.3.2 Protilátky proti gliadinu a deamidovanému gliadinu

Gliadin je frakce glutenu, která je rozpustná v alkoholu a za některých okolností vyvolává imunitní odpověď střevního slizničního imunitního systému. Pacienti s celiakií nedodržující bezlepkovou dietu mají pozitivní protilátky ve třídách IgA i IgG. Standardně se vyšetřují paralelně, protože protilátky proti gliadinu ve třídě IgG jsou senzitivnější a ve třídě IgA jsou specifitější pro diagnózu celiakie. Protilátky proti gliadinu mohou být pozitivní i u jiných střevních onemocnění, alergií nebo imunopatologií. Ve srovnání s protilátkami proti tkáňové transglutamináze mají výrazně nižší hodnoty senzitivity a specifity.

V dnešní době jsou testy na stanovení protilátek proti gliadinu nahrazovány za testy na stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu. Testy na stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu mají ve třídě IgA o 9 % vyšší senzitivitu a o 3 % vyšší specifitu a ve třídě IgG o 9 % vyšší senzitivitu a o 22 % vyšší specifitu (hodnoty se liší podle použitých souprav). [24, 25, 28]

Protilátky proti gliadinu a deamidovanému gliadinu se stanovují enzymovou imunoanalýzou ELISA. Základní rozdíl mezi oběma variantami je v použití antigenu navázaného na povrch jamek mikrotitračních destiček. V testech na stanovení protilátek proti gliadinu je použit antigen získaný extrakcí nativního gliadinu a v testech na stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu jsou použity syntetické deamidované gliadinové peptidy.

Při léčbě bezlepkovou dietou zpravidla protilátky klesají (mohou klesnout až pod hladinu detekce) a při dlouhodobějším a správném dodržování diety mohou testy vykázat negativní výsledek. [25, 28]

2.4.3.3 Protilátky proti endomysiu

Protilátky proti endomysiu jsou namířeny proti bílkovinné složce pojivové tkáně nacházející se mezi myofibrilárními stěnami zažívacího ústrojí. Tyto protilátky ve třídách IgA a IgG jsou detekovány nepřímou imunofluorescencí. Testy se hodnotí buď kvalitativně (pozitivní / negativní), nebo semikvantitativně (stanovuje se nejvyšší titer, při kterém je viditelná pozitivní reakce).

Specifita a senzitivita je u stanovení protilátek proti endomysiu velmi vysoká. Test je vhodný ke konfirmaci pozitivních výsledků testů na stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze. [24, 25, 28]

2.4.3.4 Protilátky proti retikulinu

Protilátky proti retikulinu cílí na strukturální komponenty kolagenu především typu III. Na základě rozdílné reaktivity se retikulin rozděluje na 5 typů (R1, R2, Rs, R3 a R4). Pouze retikulin typu R1 je asociován s celiakií. Stanovení protilátek proti retikulinu bylo populární především v 80. letech 20. století. V dnešní době následkem nízké senzitivity vyšetření ustupuje do pozadí. [25, 29, 30]

Protilátky proti retikulinu se vyskytují nejen u pacientů s celiakií, ale i u pacientů s Dühringovou herpetiformní dermatitidou, Crohnovou nemocí, revmatoidní artritidou nebo u závislých na heroinu. [29, 30]

Výskyt protilátek proti retikulinu je charakteristický u nemocných s celiakií nedodržujících bezlepkovou dietu ve třídě IgA u 90 – 95 % a ve třídě IgG u 70 %. Dále je možné je detekovat u 20 % nemocných s Crohnovou nemocí. [29, 30]

2.4.3.5 Protilátky proti aktinu ve třídě IgA

Cytoskeletární struktura enterocytu je tvořena mikrofilamenty, což jsou vlákna polymerovaného aktinu (strukturní bílkovina). Aktin je uspořádán do sítě, která je při celiakii narušena kvůli protilátkám tvořených právě proti aktinu. Koncentrace protilátek je v úměrná k poškození střevní sliznice.

Využívají se dva způsoby detekce – pomocí nepřímé imunofluorescence i pomocí enzymové imunoanalýzy (ELISA). V případě nepřímé imunofluorescence se jako substrát pro protilátky používá linie Hep-2 buněk a v případě ELISA testu se jako antigen pro vazbu s protilátkou používá aktin izolovaný z králíčího svalu. [31]

2.4.3.6 Aktivita paraoxonázy 1

Paraoxonáza 1 je glykoprotein tvořený 354 aminokyselinami, který je syntetizovaný v játrech. V organismu má důležitou antioxidační a protizánětlivou roli. Je to kalcium-dependentní esteráza vyskytující se v krvi lidí jako složka subfrakce lipoproteinů o vysoké hustotě, obsahující apolipoprotein A-I. Jejím fyziologickým substrátem jsou oxidované fosfolipidy. Je schopna hydrolyticky štěpit organofosfáty např. paraoxon, insekticidy parathion a chlorpyrifos a nervové jedy jako soman a sarin. Dále vykazuje laktonázovou aktivitu, je tedy schopna hydrolyticky štěpit dihydrokumarin a jiné laktony např. diuretikum spironolakton a inhibitory HMG-CoA reduktázy, statiny a některé z fluorochinolonů.

Aktivita paraoxonázy 1 je redukována různými patogenetickými mechanismy provázející onemocnění jako ischemická choroba srdeční, diabetes mellitus, celiakie a jiná, kde tvorba reaktivních forem kyslíku hraje jednu z klíčových rolí vzniku.

Paraoxonázová aktivita při celiakii souvisí s markery závažnosti onemocnění a negativně koreluje s hladinou lipid hydroperoxidu a s citlivostí séra na peroxidaci lipidů vyvolanou in vitro kovovými ionty. Paraoxonáza 1 je schopna štěpit organofosfáty jako je paraoxon, dále vykazuje aktivity laktonázovou a arylesterázovou. Pro hodnocení její aktivity byly použity tři různé substráty – paraoxon pro paraoxonázovou aktivitu, dihydrocymarin pro laktonázovou a fenylacetát pro arylesterázovou.

Celiakie je spojena s oxidativním poškozením a se značným poklesem paraoxonáza 1 aktivity. Ačkoliv pokles paraoxonázy 1 a zvýšení koncentrace produktů lipidové peroxidace není specifický pro celiakii, jedná se o marker, který svou aktivitou poukazuje na zánětlivé a cytotoxické děje v organismu.

Stanovení aktivity paraoxonázy 1 lze použít při diagnostice celiakie jako pomocný test k doplnění primárních testů. [32, 33]

2.5 Metodika pro diagnostiku celiakie

Pro imunologické stanovení protilátek při celiakii se používají metody:

- ELISA
- Nepřímá imunofluorescence
- Chemiluminiscenční imunochemická reakce v pevné fázi

Pro genetické stanovení predispozice k celiakii se používá metoda:

- SSP – PCR

2.5.1 ELISA

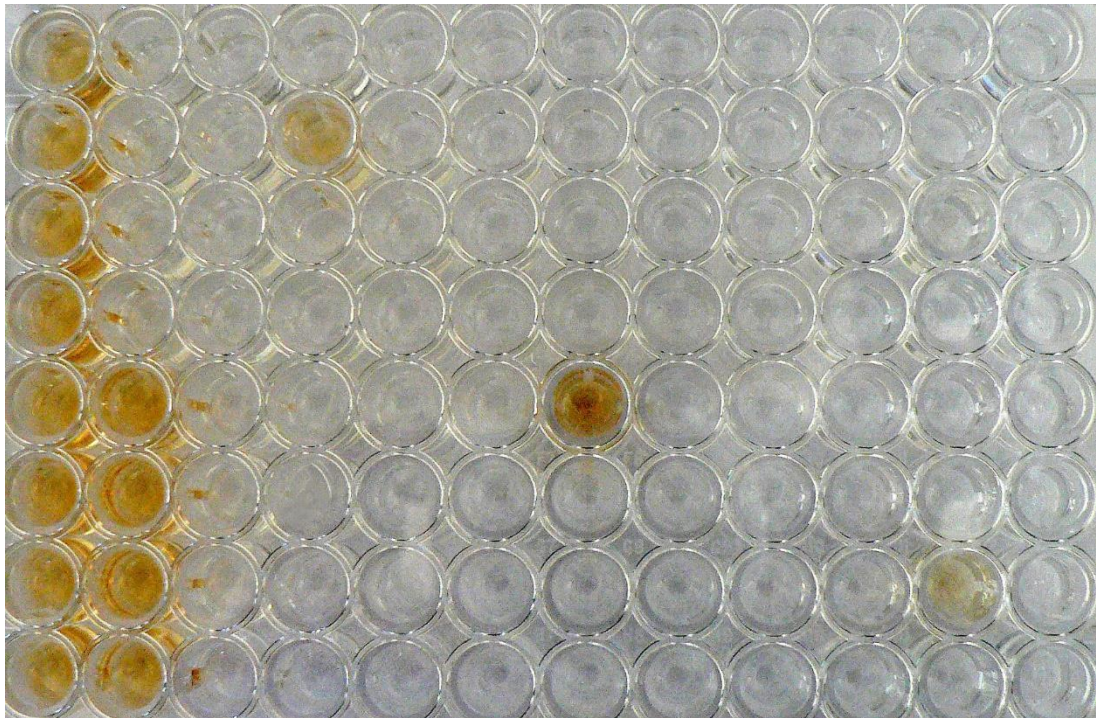
ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) je v diagnostice celiakie nejčastěji používaná metoda. Patří mezi heterogenní enzymové immunoanalýzy s různým uspořádáním. Nejčastěji se používá nekompetitivní uspořádání pro stanovení protilátek:

Pevná fáze – antigen – protilátka – značená protilátka (viz. Obr. 7). Antigen je imobilizován na povrchu jamek mikrotitrační destičky. [24]

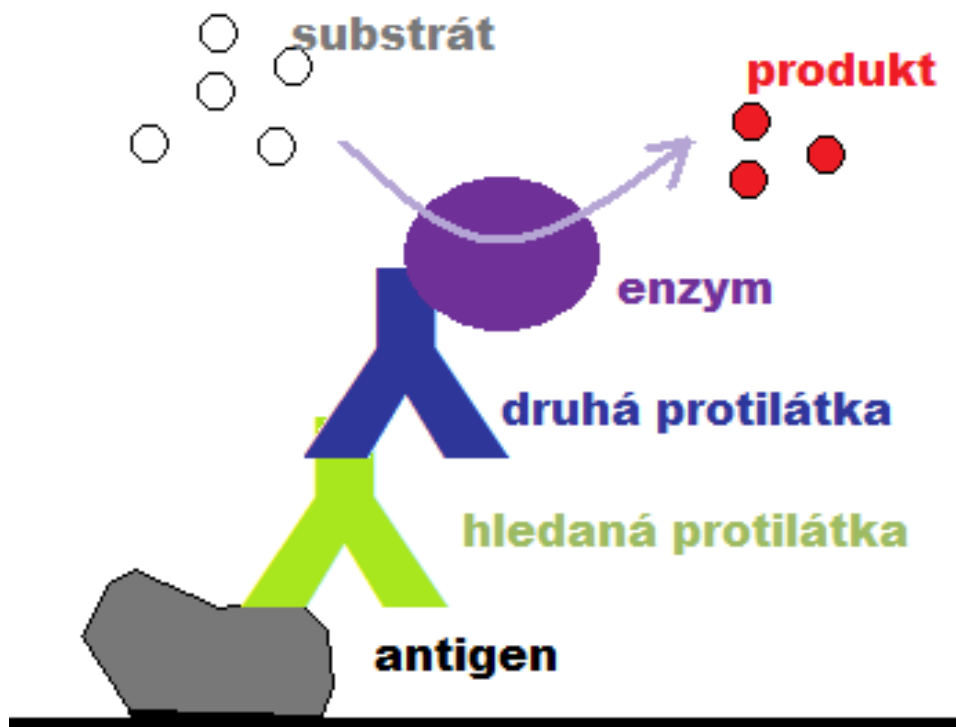
Do jamek se pipetuje naředěné sérum pacientů. Během inkubace v této první fázi dochází k navázání specifických protilátek ze séra na imobilizovaný antigen. Po inkubaci se provede promytí jamek, při kterém dojde k odstranění zbytku naředěného séra.

Po promytí se přidá do jamek mikrotitrační destičky konjugát, který obsahuje křenovou peroxidázu s protilátkou proti lidskému imunoglobulinu IgA resp. IgG.

Po následné inkubaci se opět provede promytí jamek, a tím se odstraní přebytečný konjugát. Následně se přidá substrát (3,3',5,5'- tetramethylbenzidin). Po kratší inkubaci se provede zastavení reakce přidávkem zastavovacího roztoku (roztok kyseliny sírové). Dojde k barevné reakci (viz. Obr. 6). Absorbance testovaných vzorků porovnáváme s absorbancí standardů, které jsou vždy součástí setu. Absorbance je úměrná množství navázaných protilátek (množství protilátek přítomných v lidském séru). [43 - 56]



Obr. 6 – Ukázka pozitivní reakce po přidavku zastavovacího roztoku (žluté zbarvení svědčí o přítomnosti specifických protilátek v lidském séru) [60]



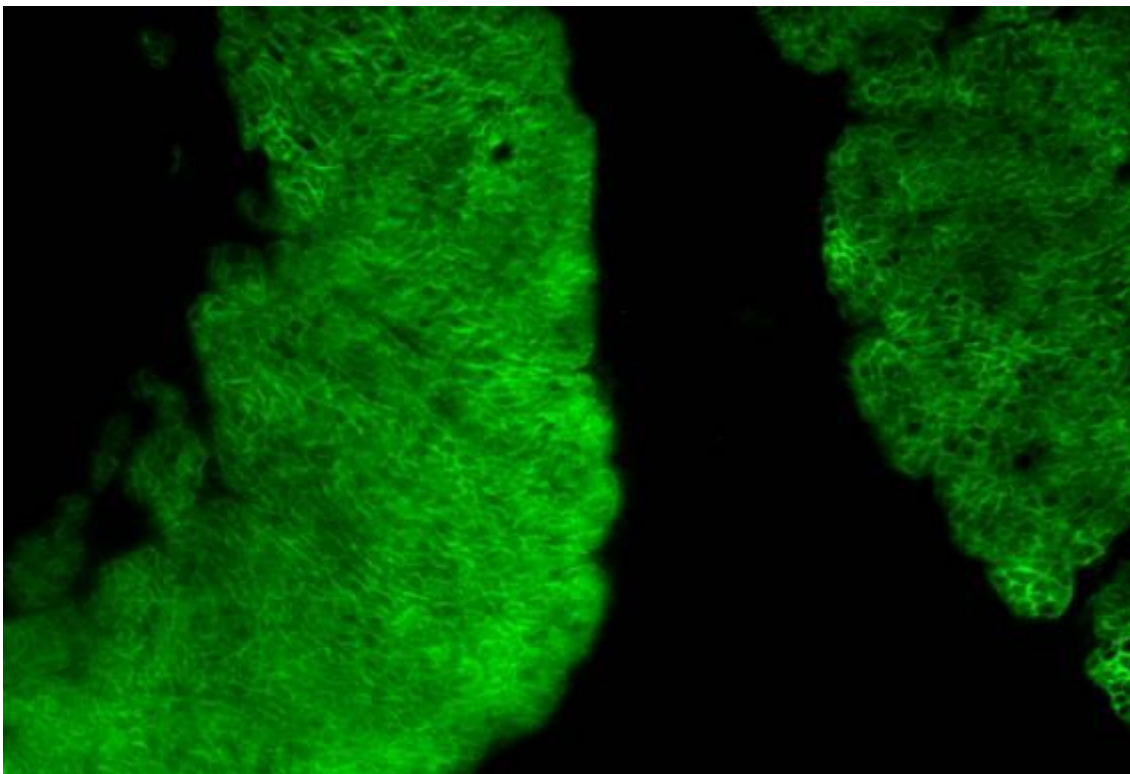
Obr. 7 – Schéma metody ELISA [62]

2.5.2 Metoda nepřímé imunofluorescence

Jedná se o metodu, která je založena na vizualizaci reakce antigen – protilátka a patří mezi ověřené metody při stanovení autoprotilátek.

Jedná se o dvoustupňovou reakci. V prvním kroku se přidá vyšetřovaný vzorek séra do buněčné suspenze. Dojde k navázání specifické protilátky k buněčné struktuře. V druhém kroku dojde k detekci použitím druhé protilátky (substrát z opičího jícnu) s vhodným fluorochromem (fluoresceinizothiokyanát).

Jedná se o kvalitativní metodu. Zkušený laboratorní pracovník odečítá fluorescenčním mikroskopem, zda preparát svítí. Slovní hodnocení přítomnosti protilátek je negativní nebo pozitivní. [24]



Obr. 8 – Mikroskopie nepřímé imunofluorescence endomyosia [63]

2.5.3 Chemiluminiscenční imunochemická reakce v pevné fázi

Protilátky proti gliadinu ve třídě IgE jsou stanovovány na analyzátoru Immulite 2000 XPI. Jako pevná fáze funguje polystyrenová kulička obalená biotinem, která je umístěna v reakční zkumavce. Analyzátor do této zkumavky přidá alergen (v našem případě gliadin) s navázaným streptavidinem a poté stanovovaný vzorek séra. V případě přítomnosti specifických IgE protilátek se naváží na kuličku. Po inkubaci analyzátor přidá konjugát a po další inkubaci dojde k promytí reakční zkumavky, kdy je odstraněn zbytek nenavázaného konjugátu.

V posledním kroku je přidán substrát dioxetan adamantyl fosfát. Jedná se molekulu obsahující energeticky bohatou vazbu mezi dvěma kyslíky a fosfátovou skupinou navázanou na pyrimidinové jádro. Alkalická fosfatáza obsažená v konjugátu odštěpuje fosfátovou skupinu a molekula se rozpadne. Uvolní se tak energie rozpadem vazby mezi kyslíky a vznikne luminiscence, která je měřena fotonásobičem. Intenzita světla, tedy počet fotonů, je úměrný množství specifických IgE ve vzorku pacienta. [59]



Obr. 9 – Immulite 2000 XPI [64]

2.5.4 SSP - PCR

Jedná se o izolaci lidské DNA z krve s následnou typizací HLA lokusů asociovaných s genetickou predispozicí k celiakii pomocí SSP - PCR (sequence specific primer - polymerase chain reaction).

Díky metodám PCR bylo dosaženo v diagnostice HLA značného pokroku. Sekvenování HLA alel umožnilo jasnou typizaci s vysokým rozlišením na úrovni DNA s mnoha výhodami oproti klasickým serologickým metodám.

Klinickým materiálem je plná krev (potřeba leukocytů), z níž se izoluje DNA daného pacienta. Izolace lidské DNA se provádí pomocí izolační soupravy NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel).

Pro soupravu HISTO TYPE Celiac Disease je poté tato purifikovaná DNA výchozím materiálem. Souprava využívá princip SSP-PCR. Metoda je založena na poznatku, že prodlužování primerů je závislé na přesné shodě 3'-konců obou primerů s templátovou DNA. Pouze přesné nasednutí obou primerů na cílovou sekvenci vede k získání produktu, který je poté identifikován na agarózové elektroforéze.

2.6 Možnosti léčby celiakie

V současné době je hlavním a jediným dostupným způsobem léčby dodržování bezlepkové diety. U pacientů s aktivní a tichou formou celiakie je potřeba se zaměřit na léčbu rozvratu vnitřního prostředí. Velmi těžké stavy pak vyžadují péči na jednotce intenzivní péče – intenzivní metabolická péče, rehydratace organismu a parenterální výživa. Vzhledem k poškození sliznice tenkého střeva je nezbytné doplnění vitaminů a minerálů (hlavně vápníku a železa, kyseliny listové). [4]

2.6.1 Bezlepková dieta

Klinické příznaky celiakie způsobuje lepek a jeho toxické peptidy obsažené v obilovinách. U konkrétních druhů se jedná o gliadiny u pšenice, hordeiny u žita, secaliny u ječmene, aveniny u ovsa, zeiny u kukuřice a oryzeiny u rýže. Mírou nebezpečnosti je různá míra rezistence toxických sekvencí jednotlivých prolaminů na působení proteáz trávicího traktu. [2]

Podstatou bezlepkové diety je vyloučení výrobků z pšenice, ječmene, žita, mezidruhových kříženců i výrobků, ve kterých je pšeničný škrob kontaminován lepkem k udržení vhodné textury. Hlavní součástí této diety je tedy kukuřičná mouka, rýže, brambory, sója a další potraviny přirozeně neobsahující lepek jako je ovoce, zelenina a luštěniny. [2]

Protože toto onemocnění často provází malabsorpční příznaky, je třeba dbát i na správný příjem minerálů, hlavně vápníku a železa, a vitaminů. Dospělí celiáci nezřídka trpí poruchou tvorby a vývoje kostí, časté jsou i zlomeniny v důsledku nedostatku vitamínu D, a nedostatek vitamínu A může způsobovat i horší zrak. Kvůli špatnému vstřebávání železa a kyseliny listové jsou pacienti také častěji anemičtí. [2, 19]

U celiakie dochází k poškození střevních buněk, a to především buněk kartáčového lemu, které obsahují enzymy sacharázu a laktázu štěpící složené cukry sacharózu a laktózu. Z tohoto důvodu může být laktázy nedostatek, který se projeví nesnášenlivostí laktózy. Potom je třeba vyloučit ze stravy i mléko a výrobky z něj. [2, 19]

Dieta je potřeba upravit podle aktuální fáze onemocnění. Celiakální krize - je charakterizována těžkou podvýživou a dehydratací. Nejdříve je nutné upravit rozvrat vnitřního prostředí a poté se soustředit na výživu. Ta se podává nejprve parenterálně. Floridní celiakie - v této fázi se začíná pozvolna zatěžovat trávicí trakt podáváním speciálních výživných prostředků obsahujících jednotlivé živiny. Poté se do jídelníčku zařazují dobře snášené bezlepkové potraviny. Sacharózu je vhodné nahradit glukózou. Klidová fáze - je nutné dodržovat přísnou bezlepkovou dietu, aby nedošlo k relapsu onemocnění. [2, 19]

2.6.2 Obiloviny

Obiloviny patří do čeledi Poaceae (lipnicovité), které můžeme rozdělit do dvou skupin podle morfologických a fyziologických vlastností. Do první skupiny patří rýže, kukuřice, proso, čirok a pohanka. Do druhé pšenice, žito, ječmen, oves a mezidruhová kříženci. Obiloviny této druhé skupiny obsahují toxické prolaminy, které způsobují celiakii u predisponovaných jedinců.

Výjimkou z druhé skupiny lipnicovitých je odrůda pšenice durum, jejíž dekaeptid může u léčených celiaků způsobit přesmyk imunitní odpovědi Th1 na odpověď Th2 (u slizničních T buněk). Odpověď Th1 posiluje prozánětlivou reakci a to hlavně stimulací makrofágů. Základní funkce Th2 je spolupráce s B-lymfocyty, které se již setkaly s antigenem a interakce k Th2 vede k pomnožení daného klonu B-lymfocytů a jejich přeměnu na formu tvořící protilátky. Jde tedy o přeměnu zánětlivé reakce na supresorovou, protizánětlivou. Proto byly pro terapii navrženy molekuly, které jsou schopné takto měnit typy Th odpovědí. [2, 19]

Oves obsahuje prolamin avenin, který je mnohem méně nebezpečný. Ovšem odpověď na otázku, zda podávat celiakům výrobky z ova, je nejednoznačná. V každém případě je ale nutné jejich čištění. Kanadská společnost pro celiakii stanovila jako bezpečnou dávku 70 g ova pro dospělého a 25 g ova pro děti. V České republice není doporučen, kdežto ve Skandinávii je běžně povolen. Americká společnost pro celiakii nechává rozhodnutí na pacientech, ale není stanoven jako vhodný pro nově diagnostikované jedince. [2, 19]

2.6.3 Odstranění toxických sekvencí

Odstranění klinických příznaků celiakie dnes neznamená jen konzumaci bezpečných potravin. Stěžejní je nekonzumovat toxické sekvence v prolaminech. Ty je možné odstranit genetickou modifikací rostlin nebo speciální přípravou těsta, kdy se při kvašení přidávají bakterie mléčného kvašení pro rozklad toxické sekvence aminokyselin v peptidech proteolytickou reakcí nebo fungální proteázy, které vykazují vysokou stabilitu v kyselém prostředí. Nejprve se používaly k odstranění stopového množství lepku v bezpečných potravinách, později však byla prokázána i jejich schopnost odstranit lepek i z pšeničných jídel. [19, 35]

2.6.4 Legislativa (množství lepku a označování potravin)

Současná česká legislativa týkající se požadavků na množství a označování lepku vychází z nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 41/2009 ze dne 20. ledna 2009 o složení a označování potravin vhodných pro osoby s nesnášenlivostí lepku. Toto nařízení se v české legislativě projevilo ve vyhlášce č. 35/2012 Sb., kterou se mění vyhláška č. 54/2004 Sb., o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití, ve znění pozdějších předpisů. Tato vyhláška ze dne 23. ledna 2012 má platnost od 31. ledna 2012 a účinnost od 1. února 2012. [36, 37]

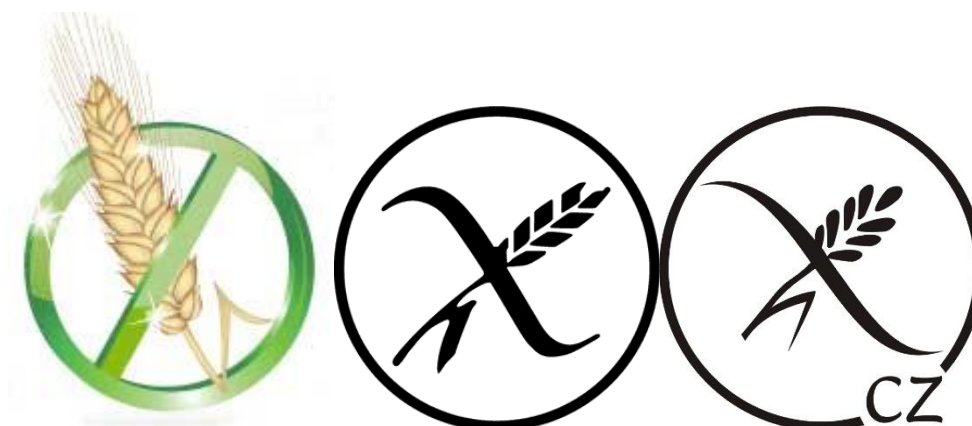
Legislativa uvedena v Příloze č. 1

2.6.5 Označení bezlepkových potravin

Celiaci mohou snášet různé množství lepku. Jedním z cílů legislativy je umožnit celiakům výrobky s různým obsahem lepku tak, aby našli potraviny, které budou odpovídat potřebám a míře citlivosti. Vymezují se dvě základní kategorie:

- Bez lepku - lze uvést pouze tehdy, pokud obsah lepku v potravine ve stavu, v němž je prodávána konečnému spotřebiteli, činí nejvýše 20 mg lepku na kilogram potraviny.
- Velmi nízký obsah lepku – lze uvést pouze tehdy, pokud jedna nebo více složek vyrobených z pšenice, žita, ječmene, ovsa nebo jejich kříženců, které byly speciálně zpracovány tak, aby v nich byl snížen obsah lepku, nebo tyto složky obsahují, nesmí obsahovat více než 100 mg lepku na kilogram potraviny ve stavu, v němž je prodávána konečnému spotřebiteli.

V současné době se používá i alternativní způsob označení bezlepkových potravin (viz Obr. 10), ale vždy musí být i jeden z výše uvedených údajů. [37, 38]



Obr. 10 – Možné způsoby označení bezlepkových potravin [39, 40, 41]

2.6.6 Nákladnost bezlepkové diety

Ministerstvo práce a sociálních věcí České republiky si nechalo analyzovat problematiku nákladnosti dietního stravování oproti stravování běžnému. Tento projekt byl řešen a zpracován společností Forsapi, s.r.o. pod vedením odborníků Fakultní Thomayerovy nemocnice doc. MUDr. Pavla Kohouta, PhD. a Tamary Starnovské. [42]

Z hlediska organizace se jedná o velmi náročnou dietu. Pacienti jsou velmi omezeni, co se týče možnosti stravování, protože bez rizika nemohou navštěvovat veřejná stravování a závodní jídelny. Výběr vhodných potravin je také velmi omezený a některé z nich se nedají koupit v běžných obchodech a jejich cena je výrazně vyšší oproti běžným potravinám. [42]

Finanční nároky na bezlepkovou dietu se liší i podle schopnosti pacienta si sám vařit ze surovin nebo používat potraviny průmyslově vyrobené a polotovary. Pacienti s celiakií mívají další onemocnění či velmi často se vyskytující komplikace vyžadující kombinaci diet (např. kombinace s bezlaktózovou dietou), v těchto případech je finančně náročnější. Na počátku nemoci je nezbytné organismu doplnit živiny, o které přišel v neléčené fázi nemoci. Pacient musí užívat nutriční suplementy (hlavně minerální látky, vitaminy a stopové prvky), které nejsou ve většině případu hrazeny ze zdravotního pojištění. [42]

V úvahu musí být vzato i to, že na rozdíl od jiných diet je bezlepková dieta jediným možným způsobem léčby. Nedodržování diety vede ke zhoršení zdravotního stavu a zvýšení nákladu na zdravotní péči a následnou rekonvalescenci. [42]

Rozdíl cenové náročnosti bezlepkové diety a běžné stravy byl vypočítán odborníky ve shodě se Sdružením pacientů ve výši 80 Kč za den. Za měsíc jsou tedy náklady o 2 400 Kč vyšší na jednoho člena rodiny. [42]

Jak bylo napsáno výše, tak pacienti s celiakií často musí dodržovat více diet najednou (kombinace diet). Velmi často musí vzhledem k narušené sliznici tenkého střeva dodržovat bezlaktózovou dietu. Vyloučení mléčných výrobků a mléka ze stravy zvyšuje finanční náročnost o 10 Kč za den, což odpovídá vyšším měsíčním nákladům o 300 Kč na jednoho člena rodiny. [42]

Vzhledem k narušené střevní sliznici a tedy špatnému vstřebávání minerálů a vitaminů se velmi zvyšuje riziko osteoporózy. Bezlepkovou dietu je proto nutné připravovat s ohledem na tento faktor. Celiakie zužuje možnost výběru potravin vhodných při osteoporóze a musí se užívat vhodné potravní a nutriční suplementy. Finanční náročnost je denně vyšší o 15 Kč, což měsíčně odpovídá 450 Kč na jednoho člena rodiny.

Kombinací všech tří diet, které jsou velmi časté, vyháží celková cenová náročnost na potraviny měsíčně o 3 150 Kč vyšší oproti běžné stravě na jednoho člena rodiny. [42]

Označení diety	Je dieta dražší nežli racionální strava?	Použití doplňků	Kombinace diet	Měsíční rozdíl proti racionální stravě Kč/měsíc/pacient
S omezením tuků	ne	někdy	diabetická	0
S omezením zbytků	ne	funkční potraviny někdy	diabetická	0
Pooperační šetřící	ne	většinou / vždy	-	0
Šetřící	ne	-	-	0
Diabetická	ne	-	ano	0
Redukční	ne	-	-	0
Při hyperlipoproteinemii	ne	-	ano	0
S omezením bílkovin	ano	často	ano	0
Bezlepková	ano	na počátku	osteoporóza, laktózová intolerance	2400
Při fenylketonurii	ano	-	-	podle věku
Při osteoporóze	ano	-	-	450
Laktózová intolerance	ano - těžká	-	-	300

Tab. č. 3 – Shrnutí finanční náročnosti diet a aplikace doplňků [42]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Soupravy

ELISA Anti-transglutamináza – IgA protilátky (Anti-tTG IgA) – BioSystems
ELISA Anti-transglutamináza – IgG protilátky (Anti-tTG IgA) – BioSystems
ELISA EIA Gliadin IgA – TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o.
ELISA EIA Gliadin IgG – TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o.
ELISA EIA Gliadin DA IgA – TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o.
ELISA EIA Gliadin DA IgG – TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o.
ELISA GliaDea IgA – Generic Assays GmbH
ELISA GliaDea IgG – Generic Assays GmbH
ELISA-anti-GLIADÍN-II-A, Biogema, výrobné družstvo
ELISA-anti-GLIADÍN-II-G, Biogema, výrobné družstvo
ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-A, Biogema, výrobné družstvo
ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-G, Biogema, výrobné družstvo
ELISA Anti-Gliadin IgA, BL Diagnostika GmbH
ELISA Anti-Gliadin IgG, BL Diagnostika GmbH
Izolační souprava NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel)
PCR – HISTO TYPE Celiac Disease, BAG Health Care GmbH
Nepřímá imunofluorescence – IgA a IgG protilátek proti ENDOMYSIU, BioSystems
Protilátky proti Gliadinu IgE – chemiluminiscenční imunochemická reakce, Immulite 2000

3.2 Přístroje a pomůcky

Immulite 2000 (BioVendor – Laboratorní medicína a.s.)
Micro plate reader (Dynex ČR)
Laminární box SAFE 2010 (Thermo Fisher Scientific)
Laminární box AURA MINI (BioAir)
Centrifuga Eppendorf 5417R (Eppendorf)
Thermo-Shaker TS-100 (Biosan)
Vortex-GENIE-2 (Scientific Industries)
NanoPhotometer (Implen)
Termocycler MJ Research PTC-200
Ultra Cam Digital imaging
Ultraviolet Crosslinker

Zdroj pro elektroforézu a elektroforetická vana

Pipeta nastavitelná Finnpiquette F1 1-10 μl , 2-20 μl , 5-50 μl , 10-100 μl , 20-200 μl , 100-1000 μl (Thermo Scientific Inc.)

Imunofluorescenční mikroskop (Olympus)

Automatická promývačka (DYNEX)

Termostat

Kádinky, odměrné válce (100 μl , 200 μl)

Deionizovaná a destilovaná voda

Jednorázové rukavice

Sterilní gáza

Vortex

3.3 Výběr vzorků

Pro účely této diplomové práce byly vybrány vzorky pozitivní (byla diagnostikována celiakie), negativní (byla celiakie vyloučena) a neznámé.

- 10 vzorků s diagnostikovanou celiakií
- 10 vzorků s vyloučenou celiakií
- 20 vzorků neznámých

Všichni pacienti, jejichž vzorky byly použity pro stanovení protilátek a HLA typizaci celiakie, podepsali informovaný souhlas s účastí v této diplomové práci a vyplnili krátký dotazník týkající se celiakie a bezlepkové diety. Z dotazníku vyplynulo, že:

- 2 pacienti s diagnostikovanou celiakií nedodržují bezlepkovou dietu a mívají zažívací obtíže. Zbylých 8 pacientů bezlepkovou dietu dodržuje.
- Z neznámých vzorků si všichni stěžují na zažívací potíže a jiné zdravotní problémy, které mohou souviset s celiakií. 5 z nich dodržuje bezlepkovou dietu, i když neměli diagnostikovanou celiakii.

3.4 Separace a skladování vzorků

Sérum bylo od krevní sraženiny odděleno centrifugací. Vzorky jsou stabilní 1 týden při uchování při 2 - 8°C a v případě, že je potřeba vzorky skladovat delší dobu, musí se uchovávat při teplotě -20 až -70°C.

Před použitím byly vzorky rozmrazeny a vytemperovány na pokojovou teplotu (20 až 25 °C).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Včasná diagnostika celiakie je velmi důležitá. V případě podezření na celiakii nebo v rámci screeningu je u pacienta provedeno genetické vyšetření a imunologické stanovení specifických protilátek v séru. V případě positivity je následně provedena biopsie.

Cílem experimentální části bylo:

- Provést genetické vyšetření u čtyřiceti vzorků.
- Stanovit specifické protilátky ze séra.
- Porovnat vyšetření na stanovení protilátek proti gliadinu a proti deamidovanému gliadinu.
- Porovnat závislost výskytu protilátek proti tkáňové transglutamináze a proti deamidovanému gliadinu.
- Vybrat vhodný test pro diagnostiku celiakie (buď stanovovat protilátky proti gliadinu anebo protilátky proti deamidovanému gliadinu).
- Otestovat a vybrat vhodnou komerční soupravu pro stanovení.

4.1. Genetické vyšetření

- Použitá metoda: SSP - PCR (popis v kap. 2.5.4)

4.1.1 Postup izolace

Izolace lidské DNA z plné krve byla provedena pomocí izolační soupravy NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel). Postup:

1. Před izolací vytemperovat suchý blok a eluční BE Buffer na 70°C.
2. Napipetovat 25 µl Proteinase K na dno 1,5 ml zkumavky, přidat 200 µl vzorku a 200 µl Buffer B3. Vortexovat.
3. Inkubovat 15 min. při 70 °C a občas zamíchat, případně na Thermo-Shakeru nastavit 800 rpm. Poté krátce centrifugovat.
4. Přidat 210 µl absolutního etanolu. Vortexovat a krátce centrifugovat.
5. Pipetovat vzorek na kolonku a centrifugovat 1 min. při 11000 rpm.
6. Přenést kolonku do čisté 2 ml zkumavky. Přidat 500 µl Buffer BW.
7. Centrifugovat 1 min. při 11000 rpm.
8. Kolonku umístit do nové sběrné zkumavky a přidat 600 µl Buffer B5.
9. Centrifugovat 1 min. při 11000 rpm.
10. Vylít zkumavku a centrifugovat 1 min. při 11000 rpm (čas se může prodloužit až na 3 min. k dostatečnému odstranění zbytků etanolu).
11. Přenést kolonku do čisté 1,5 ml zkumavky. Přidat 50 µl Buffer BE (předehřátého na 70°C) a inkubovat 1 min. při pokojové teplotě. Centrifugovat 1 min. při 11000 rpm.

4.1.2 Příprava PCR

1. Připravit si potřebné reagenty a nachystat a popsat PCR destičku. Namíchat PCR směs.
2. Složení PCR směsi: 222 µl destilované vody + 28 µl 10x PCR pufru + 2,2 µl Taq polymerázy.
3. Vortexovat směs a odebrat 10 µl směsi do pozice 24, která slouží jako negativní kontrola a v případě kontaminace lidskou DNA zde budou detekovatelné specifické fragmenty.
4. Do směsi přidat 28 µl lidské DNA konkrétního vzorku, vortexovat a krátce centrifugovat.
5. Do zbývajících 23 pozic postupně přidat vždy 10 µl PCR směsi obsahující DNA. Začít pozicí 1 (je označena šipkou) a pokračovat do předposlední pozice 23.
6. Důkladně zavřít destičku pomocí čepiček a setřepat případné kapky na stěnách. Modrý sediment (lyofilizované primery a dNTP) musí být v kontaktu s PCR mixem, proto případné vzduchové bubliny musí být odstraněny.

7. Destičku vložit do termocycleru a zapnout na příslušný amplifikační program (CEL-BAG):

Programme-Step	Temp.	Time	No. of Cycles
First Denaturation	96°C	5 Min	1 Cycle
Denaturation	96°C	20 Sec	5 Cycles
Annealing+Extension	68°C	1 Min	
Denaturation	96°C	20 Sec	10 Cycles
Annealing	64°C	50 Sec	
Extension	72°C	45 Sec	
Denaturation	96°C	20 Sec	15 Cycles
Annealing	61°C	50 Sec	
Extension	72°C	45 Sec	
Final Extension	72°C	5 Min	1 Cycle

Tab. č. 4 – Nastavení amplifikačního programu [66]

8. Po dokončení amplifikace je možno skladovat PCR produkty při 2-8 °C do doby elektroforetické separace.
9. Připravit gel na elektroforetickou separaci (5,1 g agarózy 170 ml 0,5x TBE pufr s upraveným pH 8).
10. Provést elektroforetickou separaci.
11. Vyhotovit fotku příslušného gelu.

4.1.3 Vyhodnocení výsledků:

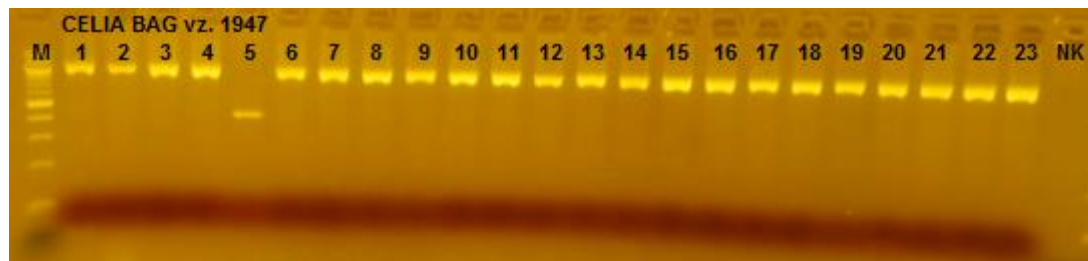
- Testování kvality soupravy

Součástí každého vyšetření byla negativní kontrola detekující možné kontaminace a interní standard sledující kvalitu izolace DNA a detekující také případné inhibice, čímž se ověřuje validita každého testu. Každý test v sobě vždy zahrnuje vlastní zkoumaný vzorek + negativní kontrolu a interní standardy (viz Obr. 11 – 14, které byly pořízeny na pracovišti molekulární diagnostiky laboratoří IFCOR-99, s.r.o.). Externí hodnocení kvality bylo opakovaně úspěšné. Byl proveden odečet a určena predispozice.

Elektroforézou byly separovány specifické PCR fragmenty a fragment interního standardu. Interní standard byl detekován ve všech drahách jako fragment o velikosti 1070 bp, kromě dráhy 5, která má velikost 429 bp. Při nepřítomnosti specifického PCR fragmentu může být daná dráha hodnocena jako negativní. Možnosti a způsob vyhodnocení uvedeny v Příloze 2.

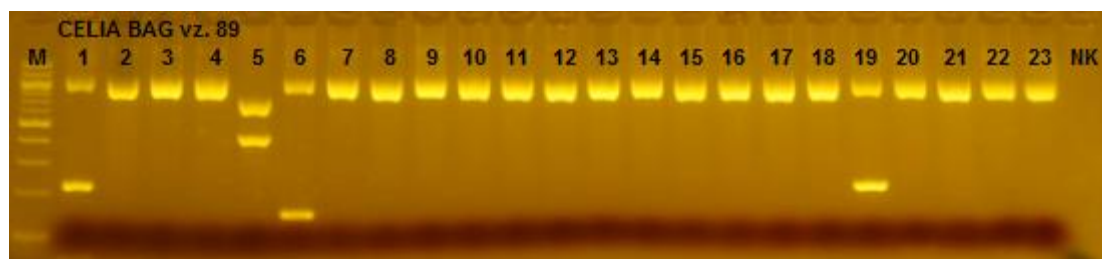
Vyhodnocení testovaných vzorků uvedeno v Příloze 4.

Všechny parametry kvality byly v pořádku a metoda je vhodná pro genetické stanovení celiakie.



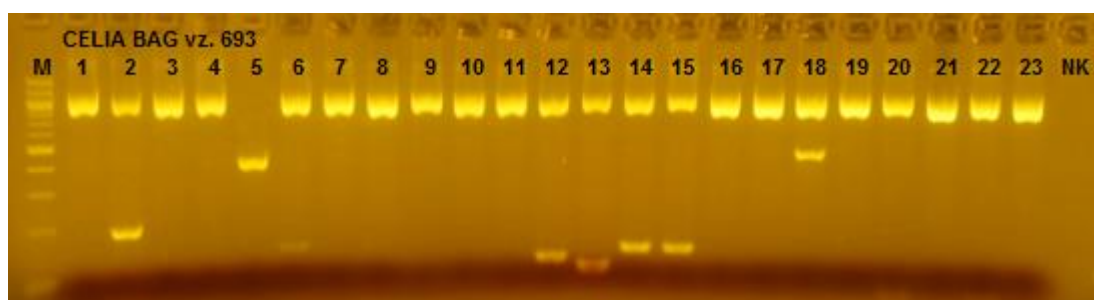
Hodnocení: bez predispozice

Obr. 11 – Fotografie gelu - nebyly nalezeny alely *DQA1* a *DGB1* lokusů asociované s celiakií, pozice 5 – interní standard o velikosti 429 bp, pozice 1 - 4 a 6 - 23 interní standard o velikosti 1070 bp, NK – negativní kontrola a M – 100 bp velikostní marker.



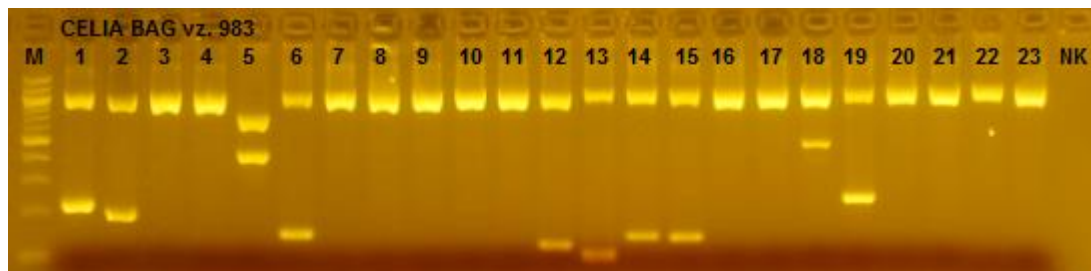
Hodnocení: 1,5,6,19 -> s predispozicí (DQ2)

Obr. 12 – Fotografie gelu – nalezeny alely *DQA1* a *DQB1* lokusů asociované s celiakií (*DQA1**05:01 a *DQB1**02:01), pozice 5 – interní standard o velikosti 429 bp, pozice 1 - 4 a 6 - 23 interní standard o velikosti 1070 bp, NK – negativní kontrola a M – 100 bp velikostní marker.



Hodnocení: 2,12,13,14,15,18 -> s predispozicí (DQ8)

Obr. 13 – Fotografie gelu – nalezeny alely *DQA1* a *DQB1* lokusů asociované s celiakií (*DQA1**03:01 a *DQB1**03:01), pozice 5 – interní standard o velikosti 429 bp, pozice 1 - 4 a 6 - 23 interní standard o velikosti 1070 bp, NK – negativní kontrola a M – 100 bp velikostní marker.



Hodnocení: 1,2,5,6,12,13,14,15,18,19 -> s predispozicí (DQ2,DQ8)

*Obr. 14 – Fotografie gelu – nalezeny alely DQA1 a DQB1 lokusů asociované s celiakií (DQA1*05:01, DQB1*02:01, DQA1*03:01 a DQB1*03:01), pozice 5 – interní standard o velikosti 429 bp, pozice 1 - 4 a 6 - 23 interní standard o velikosti 1070 bp, NK – negativní kontrola a M – 100 bp velikostní marker.*

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 6 vzorků s predispozicí DQ2
- 2 vzorky s predispozicí DQ8
- 2 vzorky s oběma predispozicemi DQ2 i DQ8

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním nálezem

Z 20 neznámých vzorků:

- 5 vzorků s predispozicí DQ2
- 1 vzorek s predispozicí DQ8
- 14 vzorků s negativním nálezem

4.2 Stanovení specifických protilátek pro celiakii

Po vyšetření genetické predispozice k celiakii následovalo stanovení specifických protilátek:

- Protilátky proti tkáňové transglutamináze ve třídách IgA a IgG
- Protilátky proti endomysiu ve třídě IgA a IgG
- Protilátky proti gliadinu ve třídách IgA, IgE a IgG
- Protilátky proti deamidovanému gliadinu ve třídě IgA a IgG

Vyhodnocení testovaných vzorků uvedeno v Příloze 4 a 5.

4.2.1 Vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG

- Použitá metoda: ELISA (popis v kap. 2.5.1) - semikvantitativní stanovení.
- Postup odečtu: Byla měřena intenzita zabarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Jako referenční filtr byl použit filtr s vlnovou délkou 630 nm.
- Interpretace testu: Výpočtem byl stanoven index positivity (absorbance vzorku / průměrná absorbance CUT-OFF). Index positivity menší než 0,8 je považován za negativní výsledek, mezi 0,8 – 1,2 je výsledek považován za hraniční a větší než 1,2 za pozitivní výsledek.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Absorbance nulového standardu (blanc) má být menší než 0,4.
- Absorbance negativní kontroly má být nižší než 0,8.
- Absorbance pozitivní kontroly má být vyšší než 1,2.

Protilátky IgA		Protilátky IgG	
Kontroly	OD	Kontroly	OD
BL	0,105	BL	0,135
NK	0,206	NK	0,178
CO	0,524	CO	0,496
CO	0,537	CO	0,485
PK	1,894	PK	1,792

Tab. č. 5 - Parametry kontroly kvality komerční soupravy protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG vyhověly ve všech parametrech (modře zbarveny hodnocené hodnoty)

Externí hodnocení kvality bylo opakovaně úspěšné. Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 20 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.2.2 Vyšetření protilátek proti endomysiu ve třídách IgA a IgG

- Použitá metoda: Metoda nepřímé imunofluorescence (popis kap. 2.5.2) - kvalitativní stanovení.
- U fluorescenčních metod se kalibrace neprovádí.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Negativní kontrola – negativní fluorescence.
- Pozitivní kontrola – pozitivní fluorescence.

Externí hodnocení kvality bylo opakovaně úspěšné.

Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 20 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.2.3 Vyšetření protilátek proti gliadinu ve třídě IgA a IgG

Pro stanovení protilátek byly vybrány soupravy tří firem:

- Komerční souprava 1: Biogema, výrobné družstvo
- Komerční souprava 2: BL Diagnostika GmbH
- Komerční souprava 3: TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o.

U kvantitativních metod jsou kalibrační křivky, spojnice trendu a její rovnice, ze které byla vypočítána koncentrace protilátek, uvedeny v Příloze 3. Vyhodnocení testovaných vzorků uvedeno v příloze 5.

4.2.3.1 Test komerční soupravy 1

- Použitá metoda: ELISA (popis v kap. 2.5.1) - kvantitativní stanovení.
- Postup odečtu: Byla měřena intenzita zabarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Jako referenční filtr byl použit filtr s vlnovou délkou 630 nm.
- Interpretace testu: Vytvoří se kalibrační křivka a stanoví se koncentrace protilátek jednotlivých vzorků (U/ml). Koncentrace protilátek menší než 11 U/ml je považován za negativní výsledek, mezi 11 U/ml a 14 U/ml je výsledek považován za hraniční a větší než 14 U/ml za pozitivní výsledek.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Absorbance nulového standardu má být menší než 0,2.
- Absorbance nejvyššího standardu má být vyšší než 0,8.
- Koncentrace protilátek v negativní kontrole pro obě třídy má být menší než 9 U/ml.
- Koncentrace protilátek v pozitivní kontrole má být ve třídě IgA 29 ± 6 U/ml a ve třídě IgG 32 ± 6 U/ml.

Parametry kalibrační křivky				Kontrola soupravy		
Standard	c (U/ml)	OD (IgA)	OD (IgG)	Kontrola	c (U/ml)	OD
K1	0	0,181	0,028	Ve třídě IgA		
K2	5	0,571	0,574	NK	2,99	0,368
K3	10	0,804	0,935	PK	34,87	1,405
K4	20	1,329	1,399	Ve třídě IgG		
K5	40	1,677	1,672	NK	4,68	0,219
K6	160	1,763	1,751	PK	36,98	1,378

Tab. č. 6 – Parametry kontroly kvality komerční soupravy vyhověly ve všech parametrech (modře zbarveny hodnocené hodnoty)

Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 16 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.2.3.2 Test komerční soupravy 2

- Použitá metoda: ELISA (popis v kap. 2.5.1) - kvantitativní stanovení.
- Postup odečtu: byla měřena intenzita zabarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Jako referenční filtr byl použit filtr s vlnovou délkou 630 nm.
- Interpretace testu: Vytvoří se kalibrační křivka a stanoví se koncentrace protilátek jednotlivých vzorků (U/ml). Koncentrace protilátek menší než 12 U/ml je považován za negativní výsledek a větší než 12 U/ml za pozitivní výsledek.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Absorbance nulového standardu má být menší než 0,2.
- Absorbance nejvyššího standardu má být vyšší než 0,8.
- Koncentrace protilátek v negativní kontrole pro obě třídy má být menší než 12 U/ml.
- Koncentrace protilátek v pozitivní kontrole pro obě třídy má být 20 – 40 U/ml.

Parametry kalibrační křivky				Kontrola soupravy		
Standard	c (U/ml)	OD (IgA)	OD (IgG)	Kontrola	c (U/ml)	OD
K1	0	0,021	0,020	Ve třídě IgA		
K2	6,3	0,307	0,357	NK	4,98	0,119
K3	12,5	0,574	0,747	PK	33,67	1,245
K4	25	1,085	1,251	Ve třídě IgG		
K5	50	1,607	1,656	NK	4,69	0,219
K6	100	1,245	1,785	PK	36,98	1,378

Tab. č. 7 – Parametry kontroly kvality komerční soupravy vyhověly ve všech parametrech (modře zbarveny hodnocené hodnoty)

Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 3 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 17 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.2.3.3 Test komerční soupravy 3

- Použitá metoda: ELISA (popis v kap. 2.5.1) - semikvantitativní stanovení.
- Postup odečtu: Byla měřena intenzita zabarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Jako referenční filtr byl použit filtr s vlnovou délkou 630 nm.
- Interpretace testu: Výpočtem se stanoví index positivity (absorbance vzorku / průměrná absorbance CUT-OFF). Index positivity menší než 0,9 je považován za negativní výsledek, mezi 0,9 – 1,1 je výsledek považován za hraniční a větší než 1,1 za pozitivní výsledek.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Absorbance nulového standardu (blanku) má být menší než 0,150.
- Průměrná absorbance CUT-OFF v rozsahu 0,200 – 0,600 a větší než absorbance negativní kontroly.
- Absorbance negativní kontroly pro obě třídy má být menší než 0,200.
- Absorbance pozitivní kontroly pro obě třídy má být větší než 1,5 násobek průměrné absorbance CUT-OFF.

Ve třídě IgA		Ve třídě IgG	
Kontroly	OD	Kontroly	OD
BL	0,006	BL	0,017
NK	0,073	NK	0,095
CO	0,532	CO	0,495
CO	0,536	CO	0,502
PK	2,007	PK	1,842

Tab. č. 8 - Parametry kontroly kvality komerční soupravy vyhověly ve všech parametrech (modře zbarveny hodnocené hodnoty)

Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 3 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 17 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.2.4 Vyšetření protilátek proti deamidovanému gliadinu ve třídách IgA a IgG

Pro stanovení protilátek byly vybrány sety tří firem:

- Komerční souprava 4: Biogema, výrobné družstvo
- Komerční souprava 5: Generic Assays GmbH
- Komerční souprava 6: TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o.

U kvantitativních metod jsou kalibrační křivky, spojnice trendu a její rovnice, ze které byla vypočítána koncentrace protilátek, uvedeny v Příloze 3. Vyhodnocení testovaných vzorků uvedeno v příloze 5.

4.2.4.1 Test komerční soupravy 4

- Použitá metoda: ELISA (popis v kap. 2.5.1) - kvantitativní stanovení.
- Postup odečtu: Byla měřena intenzita zabarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Jako referenční filtr byl použit filtr s vlnovou délkou 630 nm.
- Interpretace testu: Vytvoří se kalibrační křivka a stanoví se koncentrace protilátek jednotlivých vzorků (U/ml). Koncentrace protilátek menší než 13 U/ml je považován za negativní výsledek, mezi 13 U/ml a 15 U/ml je výsledek považován za hraniční a větší než 15 U/ml za pozitivní výsledek.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Absorbance nulového standardu má být menší než 0,1.
- Absorbance nejvyššího standardu má být vyšší než 0,8.
- Koncentrace protilátek v negativní kontrole pro obě třídy má být menší nebo rovna 9 U/ml.
- Koncentrace protilátek v pozitivní kontrole má být ve třídě IgA 29 ± 6 U/ml a ve třídě IgG 32 ± 6 U/ml.

Parametry kalibrační křivky				Kontrola soupravy		
Standard	c (U/ml)	OD (IgA)	OD (IgG)	Kontrola	c (U/ml)	OD
K1	0	0,020	0,018	Ve třídě IgA		
K2	5	0,067	0,133	NK	6,35	0,078
K3	10	0,091	0,216	PK	32,97	0,254
K4	20	0,173	0,388	Ve třídě IgG		
K5	40	1,335	0,524	NK	1,37	0,052
K6	160	1,084	1,391	PK	36,50	0,508

Tab. č. 9 – Parametry kontroly kvality komerční soupravy vyhověly ve všech parametrech (modře zbarveny hodnocené hodnoty)

Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 20 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.2.4.2. Test komerční soupravy 5

- Použitá metoda: ELISA (popis v kap. 2.5.1) - kvantitativní stanovení.
- Postup odečtu: Byla měřena intenzita zabarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Jako referenční filtr byl použit filtr s vlnovou délkou 630 nm.
- Interpretace testu: Vytvoří se kalibrační křivka a stanoví se koncentrace protilátek jednotlivých vzorků (U/ml). Koncentrace protilátek menší než 10 U/ml je považován za negativní výsledek, mezi 10 U/ml a 15 U/ml je výsledek považován za hraniční a větší než 15 U/ml za pozitivní výsledek.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Absorbance standardu 1 má být menší nebo rovna 0,5.

- Absorbance standardu 4 má být vyšší než 1,2.
- Koncentrace protilátek v negativní kontrole pro obě třídy má být menší než 10 U/ml.
- Koncentrace protilátek v pozitivní kontrole vyšší než 15 U/ml.

Parametry kalibrační křivky				Kontrola soupravy		
Standard	c (U/ml)	OD (IgA)	OD (IgG)	Kontrola	c (U/ml)	OD
K1	1	0,015	0,012	Ve třídě IgA		
K2	10	0,537	0,455	NK	4,19	0,432
K3	30	1,291	1,112	PK	59,86	1,389
K4	100	1,710	1,644	Ve třídě IgG		
K5	300	1,792	1,777	NK	4,34	0,387
				PK	23,84	0,989

Tab. č. 10 – Parametry kontroly kvality komerční soupravy vyhověly ve všech parametrech (modře zbarveny hodnocené hodnoty)

Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 20 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.2.4.3 Test komerční soupravy 6

- Použitá metoda: ELISA (popis v kap. 2.5.1) - semikvantitativní stanovení.
- Postup odečtu: Byla měřena intenzita zabarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Jako referenční filtr byl použit filtr s vlnovou délkou 630 nm.
- Interpretace testu: Výpočtem se stanoví index positivity (absorbance vzorku / průměrná absorbance CUT-OFF). Index positivity menší než 0,9 je považován za negativní

výsledek, mezi 0,9 – 1,1 je výsledek považován za hraniční a větší než 1,1 za pozitivní výsledek.

Hodnocení kvality použité komerční soupravy – hodnotící parametry:

- Absorbance nulového standardu (blanku) má být menší než 0,150.
- Průměrná absorbance CUT-OFF v rozsahu 0,200 – 0,600 a větší než absorbance negativní kontroly.
- Absorbance negativní kontroly pro obě třídy má být menší než 0,200.
- Absorbance pozitivní kontroly pro obě třídy je větší než 1,5 násobek průměrné absorbance CUT-OFF.

Ve třídě IgA		Ve třídě IgG	
Kontroly	OD	Kontroly	OD
BL	0,010	BL	0,014
NK	0,087	NK	0,075
CO	0,365	CO	0,440
CO	0,369	CO	0,448
PK	1,467	PK	1,571

Tab. č. 11 - Parametry kontroly kvality komerční soupravy vyhověly ve všech parametrech (modře zbarveny hodnocené hodnoty)

Všechny parametry kvality byly v pořádku a souprava je vhodná pro stanovení.

Vyhodnocení vzorků:

Z 10 pozitivních vzorků:

- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgG
- 4 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek ve třídě IgA
- 2 vzorky s pozitivním výsledkem protilátek v obou třídách IgA a IgG

Z 10 negativních vzorků:

- 10 vzorků s negativním výsledkem protilátek

Z 20 neznámých vzorků:

- 20 vzorků s negativním výsledkem protilátek

4.3 Hodnocení

Porovnání vyšetření na stanovení protilátek proti gliadinu a proti deamidovanému gliadinu

- Všechny testované komerční soupravy vyhověly kontrolám kvality a je možné je použít k diagnostice celiakie.
- Ve výsledcích testů komerčních souprav na stanovení specifických protilátek proti gliadinu a deamidovanému gliadinu ve třídách IgA a IgG je patrná vyšší senzitivita a specifita komerčních souprav na stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu v obou třídách imunoglobulinů. Komerční soupravy na stanovení protilátek proti gliadinu vykazují vyšší nespecifickou pozitivitu protilátek v obou třídách imunoglobulinů – výrazněji ve třídě IgG. (viz. Tab. č. 12 a Graf č. 1 a 2).

Celkový počet vzorků	Protilátky proti gliadinu				Protilátky proti deamidovanému gliadinu			
	IgA		IgG		IgA		IgG	
	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní
40	32	8	30	10	34	6	34	6

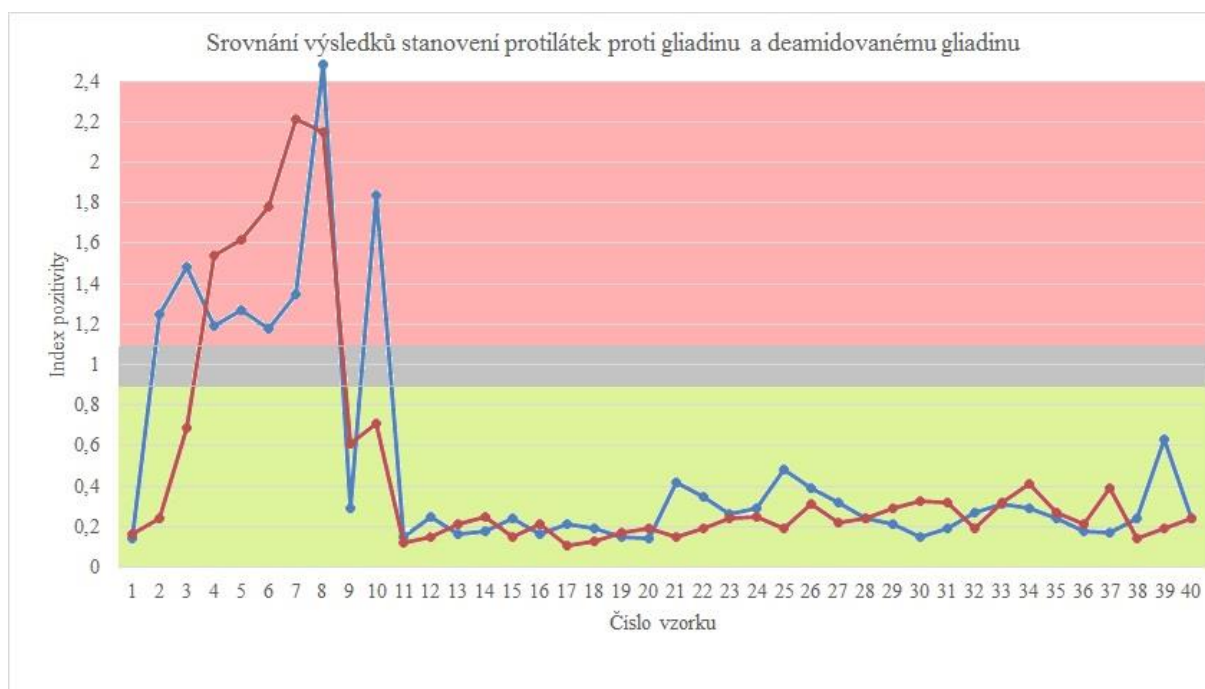
Tab. č. 12 – Srovnání podle počtu pozitivních a negativních výsledků v jednotlivých testech

(výsledky vychází z Přílohy 5) a grafické srovnání v Příloze 6

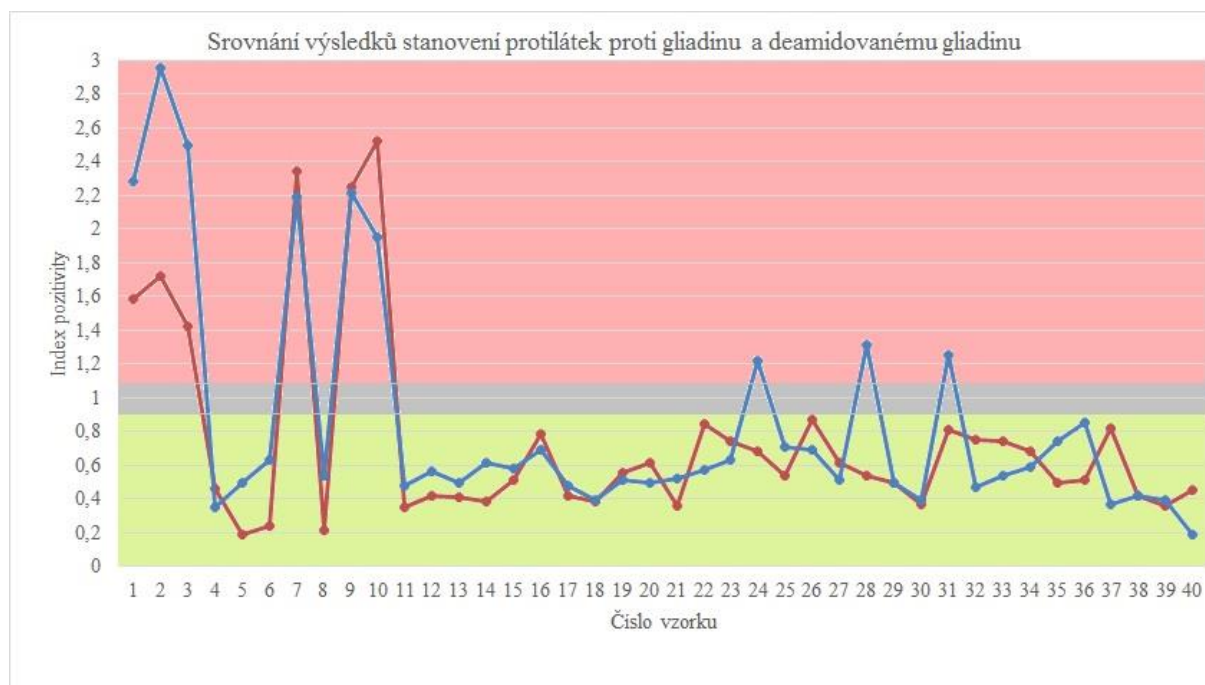
Při léčbě bezlepkovou dietou zpravidla protilátky klesají (mohou klesnout až pod hladinu detekce) a při dlouhodobějším a správném dodržování diety mohou testy vykazat negativní výsledek.

- Z výsledků uvedených v Příloze 5 je vidět, že všechny testované vzorky s diagnostikovanou celiakií vykazují pozitivní protilátky proti gliadinu a proti deamidovanému gliadinu ve třídě IgA nebo ve třídě IgG. Vyjma vzorků vědomě porušujících bezlepkovou dietu, mají pozitivní protilátky v obou podtřídách, tedy IgA i IgG. Lze tedy s jistotou tvrdit, že u všech 10 vzorků s diagnostikovanou celiakií byl ve stravě obsažen lepek.

Grafické srovnání výsledků:



Graf č. 1 – Srovnání výsledků stanovení protilátek proti gliadinu a deamidovanému gliadinu ve třídě IgA (modrá řada – komerční souprava 3 a červená řada – komerční souprava 6). V zeleném poli se nalézají negativní výsledky, v šedém poli výsledky hraniční a ve světle červeném poli pozitivní výsledky.



Graf č. 2 – Srovnání výsledků stanovení protilátek proti gliadinu a deamidovanému gliadinu ve třídě IgG (modrá řada – komerční souprava 3 a červená řada – komerční souprava 6). V zeleném poli se nalézají negativní výsledky, v šedém poli výsledky hraniční a ve světle červeném poli pozitivní výsledky.

Porovnat závislost výskytu protilátek proti tkáňové transglutamináze a deamidovanému gliadinu.

Po srovnání výsledků stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze a deamidovanému gliadinu **byla zjištěna shoda** ve všech stanovovaných vzorcích (viz. Tab. č. 13 a Graf č. 3 a 4).

Celkový počet vzorků	Protilátky proti tkáňové transglutamináze				Protilátky proti deamidovanému gliadinu			
	IgA		IgG		IgA		IgG	
	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní
40	34	6	34	6	34	6	34	6

Tab. č. 13 – Srovnání podle počtu pozitivních a negativních výsledků v jednotlivých testech (výsledky vychází z Přílohy 4 a Přílohy 5) a grafické srovnání v Příloze 6

Tento výsledek potvrzuje tvrzení, že modifikace nativních gliadinů deamidací na imunologicky reaktivní deamidovaný gliadin, která je zprostředkována aktivitou enzymu tkáňová transglutamináza, **je platná**.

Podmínkou tvrzení je přítomnost gliadinu ve stravě a senzitivní organismus.

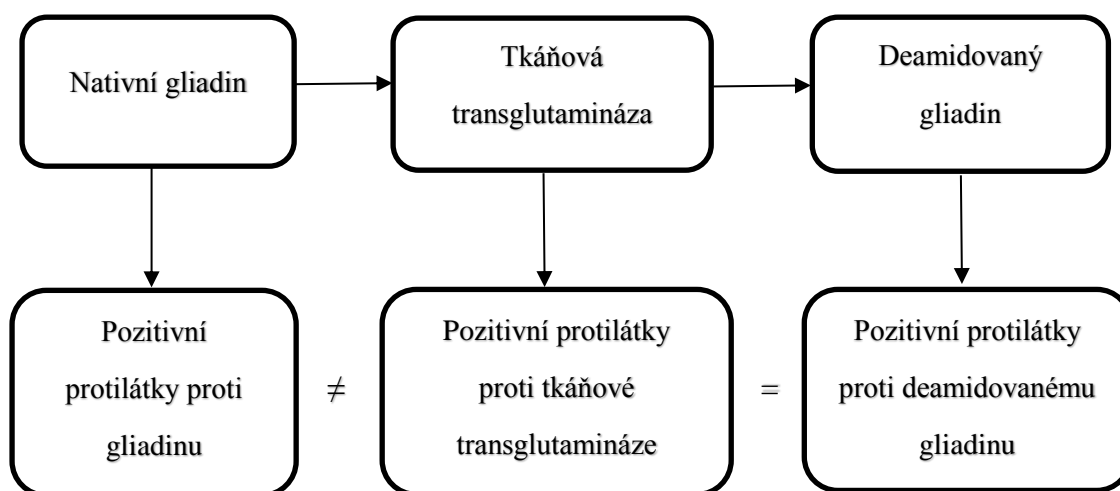
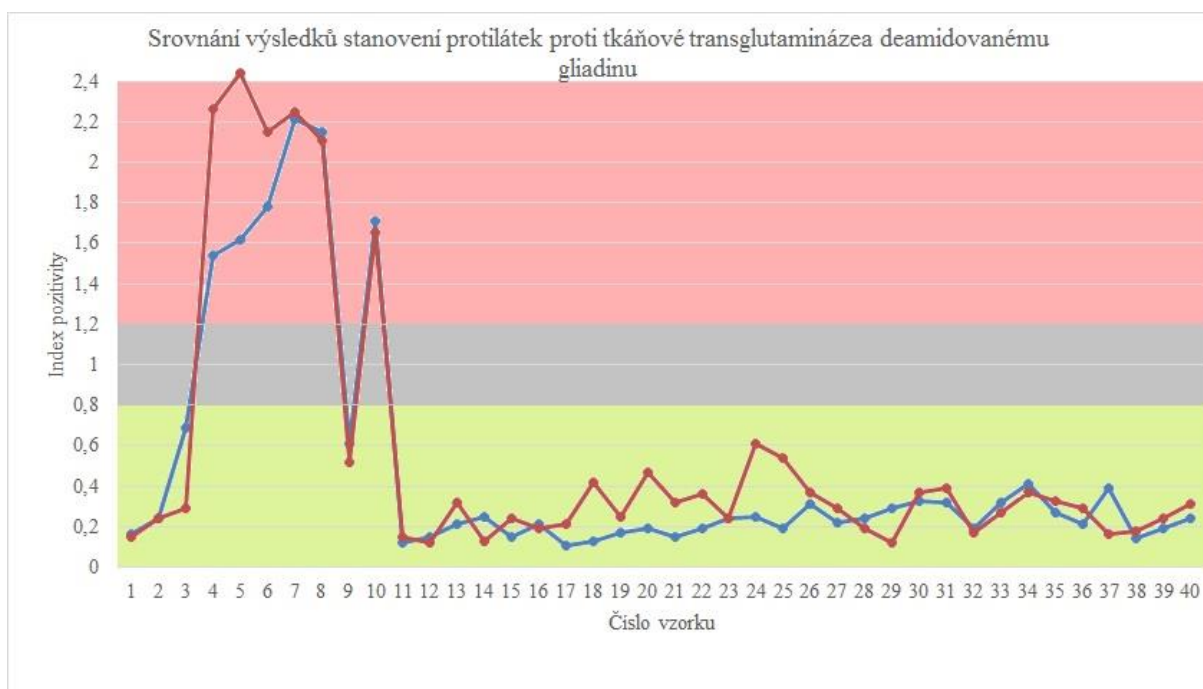
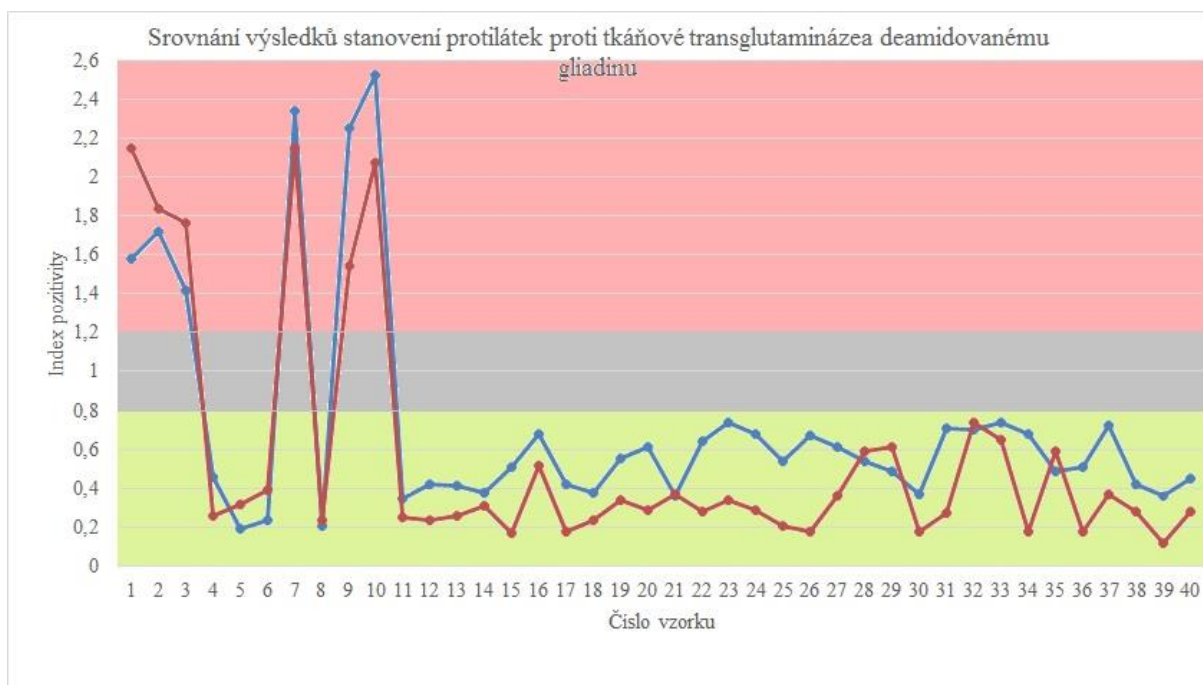


Diagram č. 1 – Tvorba protilátek

Grafické srovnání výsledků:



Graf č. 3 – Srovnání výsledků stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze a deamidovanému gliadinu ve třídě IgA (modrá řada – komerční souprava 6 a červená řada – protilátky proti tkáňové transglutamináze). V zeleném poli se nalézají negativní výsledky, v šedém poli výsledky hraniční a ve světle červeném poli pozitivní výsledky.



Graf č. 4 – Srovnání výsledků stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze a deamidovanému gliadinu ve třídě IgG (modrá řada – Komerční souprava 6 a červená řada – protilátky proti tkáňové transglutamináze). V zeleném poli se nalézají negativní výsledky, v šedém poli výsledky hraniční a ve světle červeném poli pozitivní výsledky.

Při léčbě bezlepkovou dietou zpravidla protilátky klesají (mohou klesnout až pod hladinu detekce) a při dlouhodobějším a správném dodržování diety mohou testy vykazat negativní výsledek.

- Z výsledků uvedených v Příloze 5 je vidět, že všechny testované vzorky s diagnostikovanou celiakií vykazují pozitivní protilátky proti gliadinu a proti deamidovanému gliadinu ve třídě IgA nebo ve třídě IgG. Vyjma vzorků vědomě porušujících bezlepkovou dietu, mají pozitivní protilátky v obou podtřídách, tedy IgA i IgG. Lze tedy s jistotou tvrdit, že u všech 10 vzorků s diagnostikovanou celiakií byl ve stravě obsažen lepek.

Ve třech neznámých vzorcích byla zjištěna přítomnost IgE protilátek proti gliadinu a lze ji klasifikovat jako alergii na gliadin (dle Tab. č. 16).

U šesti neznámých vzorků byla zjištěna genetická predispozice k celiakii. Protilátky proti celiakii byly negativní. Lze je tedy vyhodnotit jako pacienty s potenciální celiakií.

5 ZÁVĚR

V teoretické části byla zhodnocena problematika celiakie, její prevalence, etiopatogeneze, imunopatogeneze, diagnostika a léčba.

- V České republice je odhadován počet celiaků na čtyřicet až padesát tisíc obyvatel (1:200 až 1:250). Předpokládá se, že je dispenzarizováno a diagnostikováno přibližně 15% z celkového počtu nemocných. Byly popsány klinické formy a projevy celiakie.
- Byl popsán rozdíl mezi celiakií a alergií na lepek.
- Byl popsán metodický pokyn Ministerstva zdravotnictví České republiky – Cílený screening celiakie, který přispěl ke stanovení správné diagnózy pacientů s celiakií ambulantními specialisty a praktickými lékaři.
- Byla popsána etiopatogeneze celiakie. Ke vzniku tohoto onemocnění musí být splněny dvě podmínky: Přítomnost gliadinu ve stravě a senzitivní organismus. Celiakie je geneticky podmíněné chronické autoimunitní onemocnění.
- Byly rozebrány možnosti diagnostiky celiakie a doporučení ESPGHAN a NASPGHAN. V případě podezření na celiakii nebo v rámci screeningu je u pacienta provedena biopsie sliznice tenkého střeva, genetické vyšetření a imunologické stanovení specifických protilátek v séru.
- Byly popsány jednotlivé protilátky stanovované při podezření na celiakii a jednotlivé metodiky, které se v této diagnostice využívají.
- Byla popsána v současné době jediná možnost léčby – dodržování bezlepkové diety. Byly rozebrány legislativní požadavky týkající se množství a označení lepku v potravinách.
- Byla vypočítána nákladnost bezlepkové diety oproti běžné stravě na jednu osobu.

V experimentální části bylo vybráno čtyřicet vzorků (10 s diagnostikovanou celiakií, 10 s vyloučenou diagnózou celiakie a 20 neznámých vzorků) a na základě dotazníku s informovaným souhlasem byly dále zpracovány.

- U všech vzorků bylo provedeno genetické vyšetření celiakie a stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze, endomysiu, gliadinu, deamidovanému gliadinu ve třídě IgA a IgG a protilátky proti gliadinu ve třídě IgE.
- U všech testů byly vyhodnoceny kontrolní parametry (validita testů). U kvantitativních metod vytvořeny kalibrační křivky, byly proloženy spojnicí trendu a stanovena její rovnice, ze které se následně vypočítala koncentrace protilátek. U semikvantitativních metod byly vypočítány indexy pozitivivity z podílu hodnoty absorbance vzorku a průměrné hodnoty CUT-OFF.
- Bylo provedeno porovnání vyšetření protilátek proti gliadinu a deamidovaného gliadinu. (srovnávacím prvkem byla již zavedená metoda na stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze). Byla zjištěna vyšší senzitivita a specifita souprav na stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu v obou třídách.
- Byla porovnána závislost výskytu protilátek proti tkáňové transglutamináze a deamidovanému gliadinu - byla zjištěna shoda ve všech stanovovaných vzorcích.

Na základě těchto měření a po následném vyhodnocení výsledků bylo rozhodnuto vedením laboratoře, že Alergologická a imunologická laboratoř IFCOR-99, s.r.o. v Blansku bude provádět **vyšetření protilátek proti deamidovanému gliadinu.**

Na základě porovnání parametrů kvality, vyhodnocení výsledků stanovení, interpretaci a ceny souprav Set 4, Set 5 a Set 6 bylo dále rozhodnuto vedením laboratoře, že **stanovení protilátek proti deamidovanému gliadinu bude v laboratoři prováděno na soupravách Set 6.**

6 PŘÍLOHY

Příloha 1

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 41/2009

Na 31. zasedání Komise pro Codex Alimentarius, které se konalo v termínu 30. června 2008 – 4. července 2008 v Ženevě, byla přijata norma pro potraviny pro zvláštní výživu osob s nesnášenlivostí lepku s cílem umožnit těmto osobám nalézt na trhu rozmanité potraviny odpovídající jejich potřebám a jejich citlivosti na lepek. Tento kodex byl zohledněn při tvorbě tohoto nařízení.

Nařízení se v Článku 3 věnuje složení a označování potravin vhodných pro osoby s nesnášenlivostí lepku:

Potraviny pro osoby s nesnášenlivostí lepku, jež sestávají z jedné nebo více složek vyrobených z pšenice, žita, ječmene, ova nebo jejich kříženců, které byly speciálně zpracovány tak, aby v nich byl snížen obsah lepku, nebo tyto složky obsahují, nesmí obsahovat více než 100 mg/kg lepku v potravině ve stavu, v němž je prodávána konečnému spotřebiteli. Při označování takovýchto výrobků, jejich obchodní úpravě a v související reklamě se uvede výraz „velmi nízký obsah lepku“.

Výraz „bez lepku“ lze uvést pouze tehdy, pokud obsah lepku v potravině ve stavu, v němž je prodávána konečnému spotřebiteli, činí nejvýše 20 mg/kg.

Oves obsažený v potravinách pro osoby s nesnášenlivostí lepku musí být speciálně vyroben, připraven a/nebo zpracován tak, aby bylo zamezeno kontaminaci pšenicí, žitem, ječmenem nebo jejich kříženci, přičemž obsah lepku v ovsu nesmí být vyšší než 20 mg/kg. [36, 38]

Vyhláška č. 35/2012 Sb.

Tato vyhláška zpracovává příslušné předpisy Evropské unie a upravuje v návaznosti na přímo použitelné předpisy Evropské unie druhy potravin pro zvláštní výživu, požadavky na zdravotní nezávadnost potravin určených pro zvláštní výživu, jejich složení, označování a podmínky a způsob jejich použití [37]:

- Směrnice Rady 92/52/EHS ze dne 18. června 1992 o počáteční a pokračovací kojenecké výživě určené pro vývoz do třetích zemí
- Směrnice Komise 96/8/ES ze dne 26. února 1996 o potravinách pro nízkenergetickou výživu ke snižování hmotnosti
- Směrnice Komise 1999/21/ES ze dne 25. března 1999 o dietních potravinách pro zvláštní léčebné účely

- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES ze dne 20. března 2000 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se označování potravin, jejich obchodní úpravy a související reklamy
- Směrnice Komise 2006/125/ES ze dne 5. prosince 2006 o obilných a ostatních příkrmech pro kojence a malé děti
- Směrnice Komise 2006/141/ES ze dne 22. prosince 2006 o počáteční a pokračovací kojenecké výživě a o změně směrnice 1999/21/ES
- Směrnice Komise 2007/29/ES ze dne 30. května 2007, kterou se mění směrnice 96/8/ES, pokud jde o označování, reklamu a obchodní úpravu potravin pro nízkoenergetickou výživu ke snižování hmotnosti
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/39/ES ze dne 6. května 2009 o potravinách určených pro zvláštní výživu
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006 ze dne 20. prosince 2006 o přidávání vitaminů a minerálních látek a některých dalších látek do potravin
- Nařízení Komise (ES) č. 1609/2006 ze dne 27. října 2006, kterým se na období dvou let povoluje uvedení na trh počáteční kojenecké výživy na bázi hydrolyzátů syrovátkových bílkovin získaných z bílkovin kravského mléka
- Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny
- Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny
- Nařízení Komise (ES) č. 41/2009 ze dne 20. ledna 2009 o složení a označování potravin vhodných pro osoby s nesnášenlivostí lepku
- Nařízení Komise (ES) č. 953/2009 ze dne 13. října 2009 o látkách, které mohou být pro zvláštní výživové účely přidávány do potravin pro zvláštní výživu

Příloha 2

Hodnocení pozic rozdělených fragmentů a možné interpretace výsledků a uváděných komentářů v případě přítomnosti / nepřítomnosti specifických PCR fragmentů v drahách (klíčové alely asociované s predispozicí k celiakii jsou vyznačeny tučně):

1. 1, **5**, **6**, **19** -> DRB1*03 – **DQA*05:01** – **DQB*02:01** (DQ2 typ)

Výsledek	DQ2 pozitivní
Komentář	U pacienta byly nalezeny alely DQA1 a DQB1 lokusů asociované s celiakií. Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit stanovením protilátek či dalšími diagnostickými postupy.

2. 3, 4, **6**, **7**, 9, 10, 11, (15), 17, **23** -> DRB1*07 – DQA1*02:01 – **DQB1*02:02**
DRB1*11 – **DQA1* 05:05** – DQB1*03:01 (DQ2 typ)

Výsledek	DQ2 pozitivní
Komentář	U pacienta byly nalezeny alely DQA1 a DQB1 lokusů asociované s celiakií. Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit stanovením protilátek či dalšími diagnostickými postupy.

3. 2, **12**, **13**, **14**, **15**, **18** -> DRB1*04 – **DQA1*03:01** – **DQB1*03:02** (DQ8 typ)

Výsledek	DQ8 pozitivní
Komentář	U pacienta byly nalezeny alely DQA1 a DQB1 lokusů asociované s celiakií. Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit stanovením protilátek či dalšími diagnostickými postupy.

4. 3, 6, 7, 17 -> DRB1*07 – DQA1*02:01 – DQB1*02:02 (DQ2 typ s mírnou predispozicí)

Výsledek	DQ2 pozitivní
Komentář	Přítomnost haplotypu DQA1*0201/DQB1*0202. Nalezený genotyp je asociován s mírným rizikem celiakie. Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit stanovením protilátek či dalšími diagnostickými postupy.

5. 4, 9, 10, 11, (15), 23 -> DQA1*05:05 – DQB1*xx:xx (DQ2 typ ojediněle asociován s predispozicí k celiakii)

Výsledek	DQ2 pozitivní
Komentář	U pacienta byl detekován genotyp (přítomnost alely DQA1*0505), který je v ojedinělých případech asociován s diagnózou celiakie. Upozornění: Tento výsledek nelze interpretovat jako potvrzení celiakie. Diagnózu je potřeba potvrdit stanovením protilátek či dalšími diagnostickými postupy.

6. Přítomnost specifických fragmentů, které neodpovídají výše uvedeným kombinacím, příp. nepřítomnost jakýchkoli specifických PCR fragmentů.

Výsledek	DQ2 negativní a/nebo DQ8 negativní
Komentář	U pacienta nebyly nalezeny alely DQA1 a DQB1 lokusů asociované s celiakií. Výsledek s vysokou pravděpodobností tuto diagnózu vylučuje.

Interpretation with Score™: BAG / SSP Special V4.x

Auswertediagramm / Evaluation diagram

HISTO TYPE Celiac Disease

Lot-No.:

Celiac disease: HLA-DRB1 – DQA1 – DQB1 associations:		Reaction pattern:
1. DRB1*03 - DQA1*0501 - DQB1*0201	(DQ2 type)	1, 5, 6, 19
2. DRB1*07 - DQA1*0201 - DQB1*0202	(DQ2 type)	3, 6, 7, 17
3. DRB1*07 - DQA1*0201 - DQB1*0202	(DQ2 type)	3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, (15), 17, 23
DRB1*11 - DQA1*0505 - DQB1*0301	(DQ8 type)	2, 12, 13, 14, 15, 18
4. DRB1*04 - DQA1*0301 - DQB1*0302	(DQ8 type)	

Special Ser.Type	Length of internal control in bp	1070																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
DR3	DRB1*030101 – *0340 / *1107, 53																									
DR4	DRB1*040101 – *0462, 64-77																									
DR7	DRB1*070101, *070102w, 03 – 09, 10N-15		3																							
DR11	DRB1*110101 – *1121, *1123, *1129, *1131w, 32, 33w, 34, 35w-37, 39-52w, 53-6502w, 66, 68, 69 / *0308			4																						
DQ2	DRB1*020101, *020102, *0204					5	1	6																		
DQ2	DQB1*0202						6																			
DQ2	DQB1*0203						7																			
-	DQB1*0205						7		8																	
DQ7(3) / -	DQB1*030101, 0103, 0104, 19, 21, 22						?	6	?																	
DQ7(3)	DQB1*030102									9	10	11				15										
DQ8(3) / -	DQB1*030201, *030202, *030204, *030503, *030504, 11, 18									9	10	11		12	13	14	15									
DQ8(3)/DQ3	DQB1*030203, *030501, *030502									9	10	11		12	13	14	15									
DQ9(3) / -	DQB1*030302, *0315, *0317									9	10	11		12	13	14	15									
DQ7(3)	DQB1*0304									9	10	11		12	13	14	15	16								
DQ3 / DQ4	DQB1*030303, *0306, *0320 / DQB1*0401-03									9	10	11		12	13	14	15	16								
-	DQB1*0307															14										
-	DQB1*0308															14										
-	DQB1*0309, *0316															12	13									
DQ8(3)	DQB1*0310															12	13									
-	DQB1*0312									9	10					15										
-	DQB1*0313									10	11					14	15									
-	DQB1*0314									10						14	15									
-	DQA1*0201									10						15	16									
-	DQA1*030101																	17								
-	DQA1*050101, *050102																		18							
-	DQA1*0502																				19					
-	DQA1*0503, *0506, *0507																				19	20				
-	DQA1*0504																				19	21*				
-	DQA1*0505, *0508, *0509																				19		22			
-	Kontaminationskontrolle/Contamination Control																									
Länge in bp / length in bp		220	200	140	177/ 800	150	140	150	105	200	185	120	95	145	135	105	580	235	90	200	205	235		24		
					171																					

w = schwache Reaktion / weak reaction / ! Die Größe der internen Kontrolle in Mix 5 ist 429bp / The size of the internal control in mix 5 is 429bp ! / update 07 / 2008

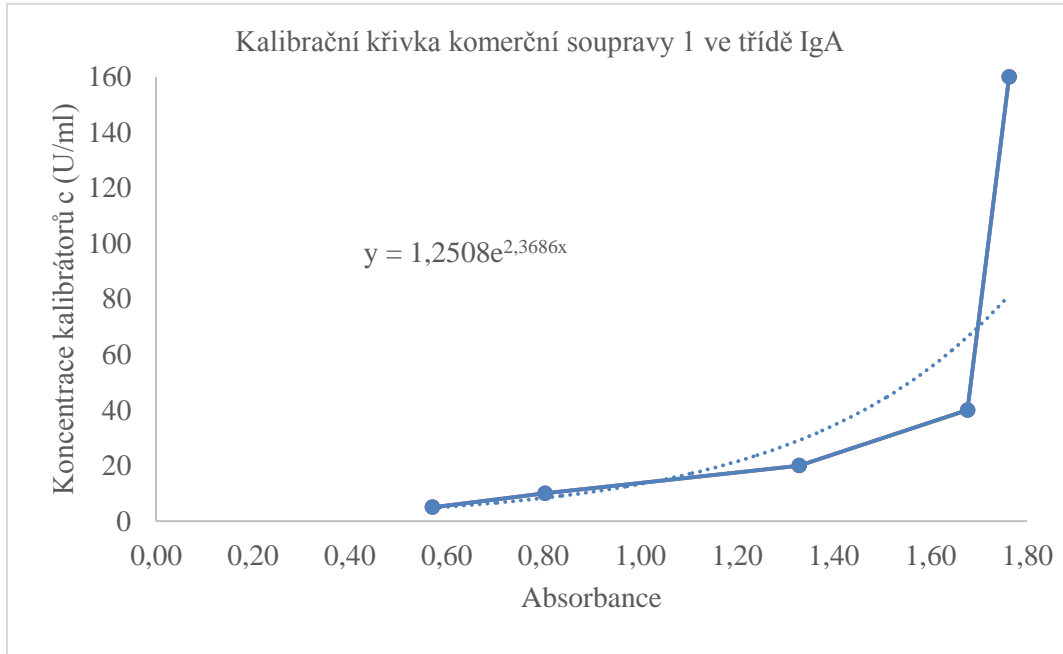
* Die spezifische Bande in Mix 21 kann schwächer sein als die anderen spezifischen Reaktionen. / The specific band in Mix 21 may be weaker than the other specific bands

Obr. 15 – Interpretace gelu elektroforézy

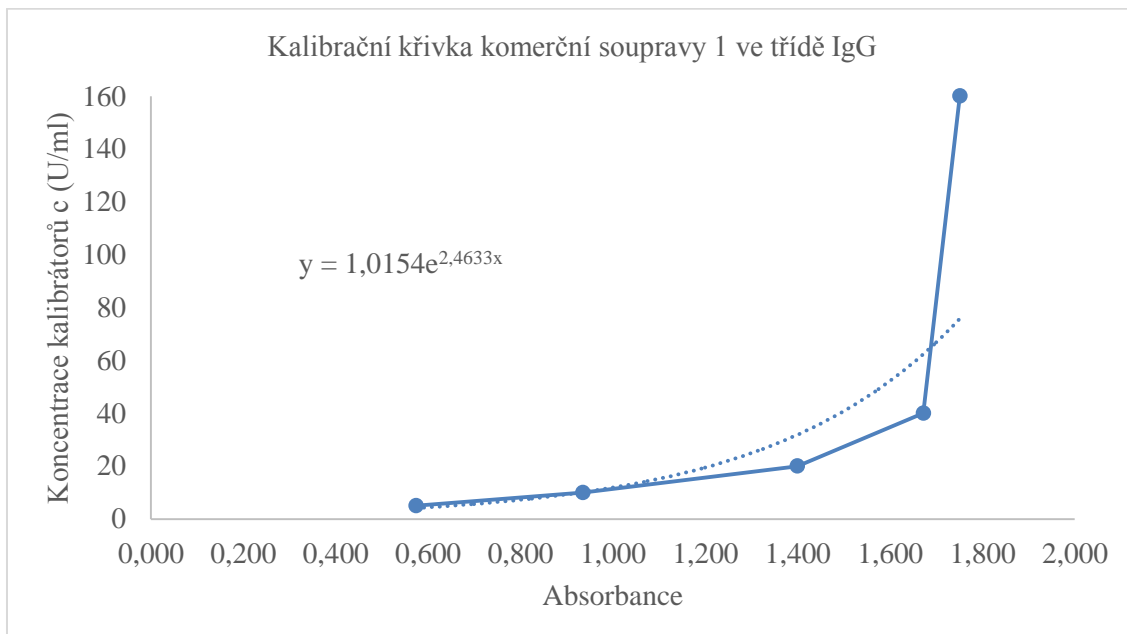
Příloha 3

Kalibrační křivky, spojnice trendu a její rovnice:

- Pro komerční soupravu 1

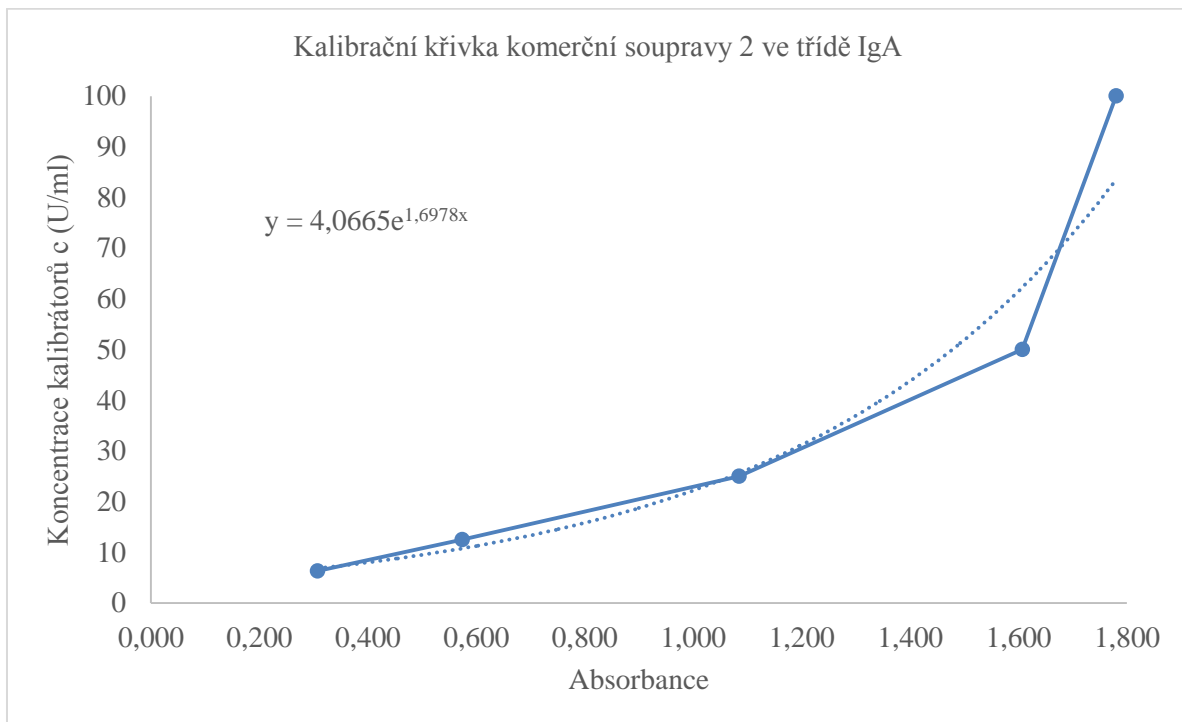


Graf č. 5 – Kalibrační křivka komerční soupravy 1 ve třídě IgA

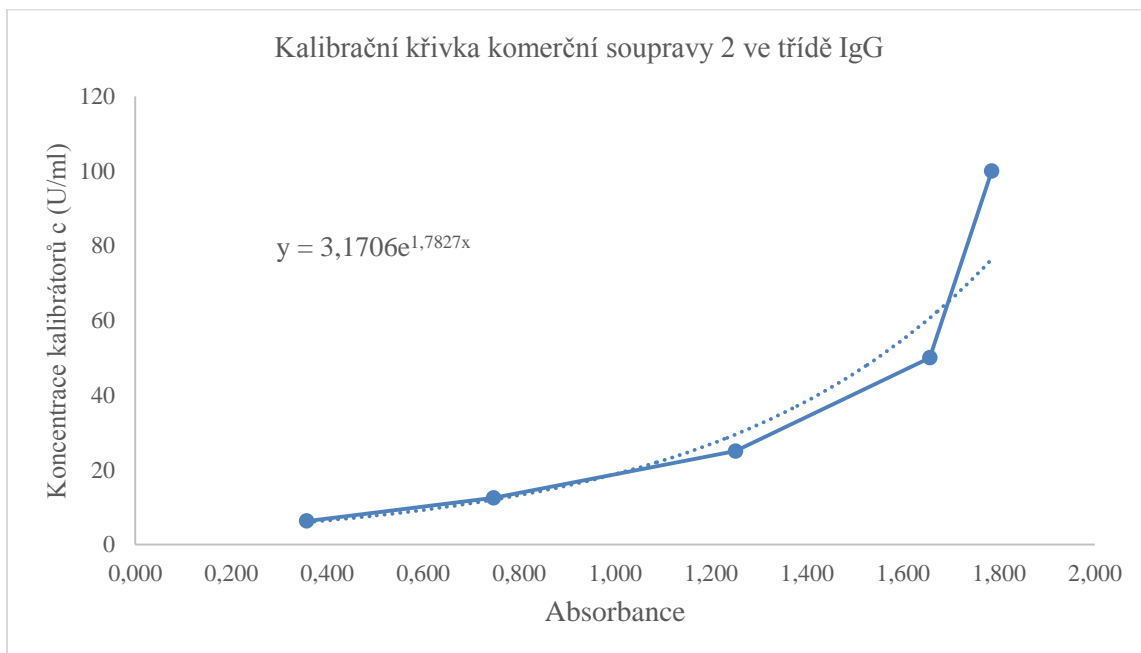


Graf č. 6 – Kalibrační křivka komerční soupravy ve třídě IgG

- Pro komerční soupravu 2

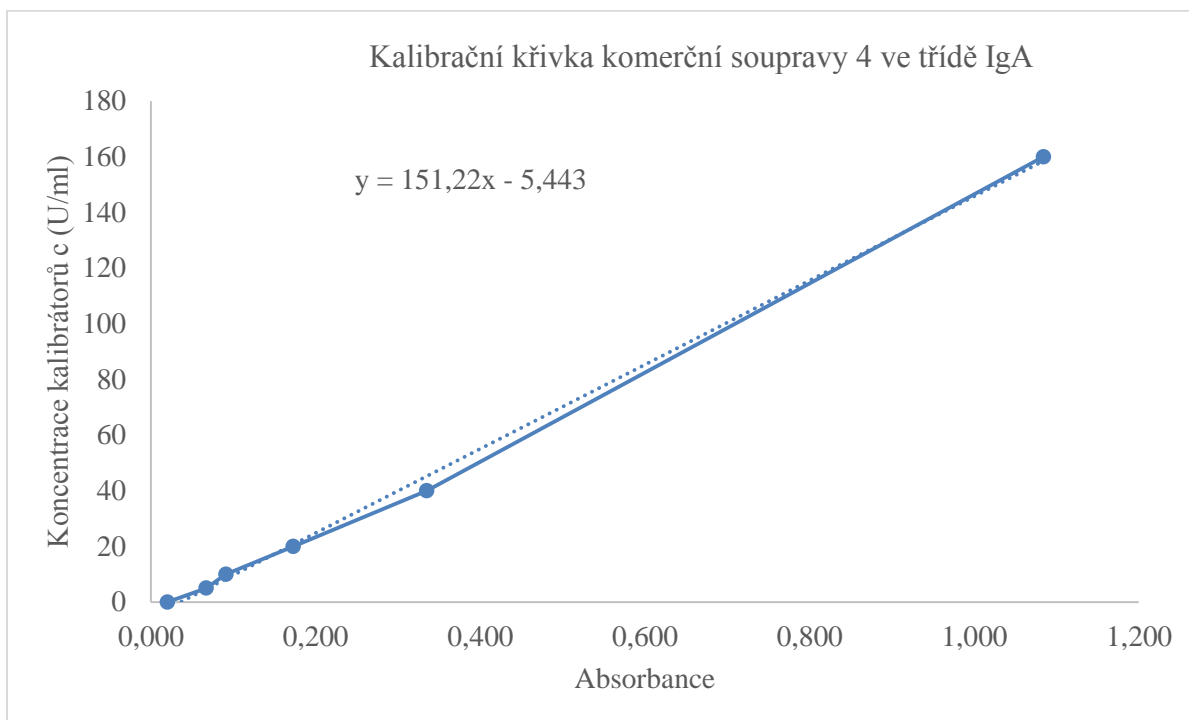


Graf č. 7 – Kalibrační křivka komerční soupravy 2 ve třídě IgA

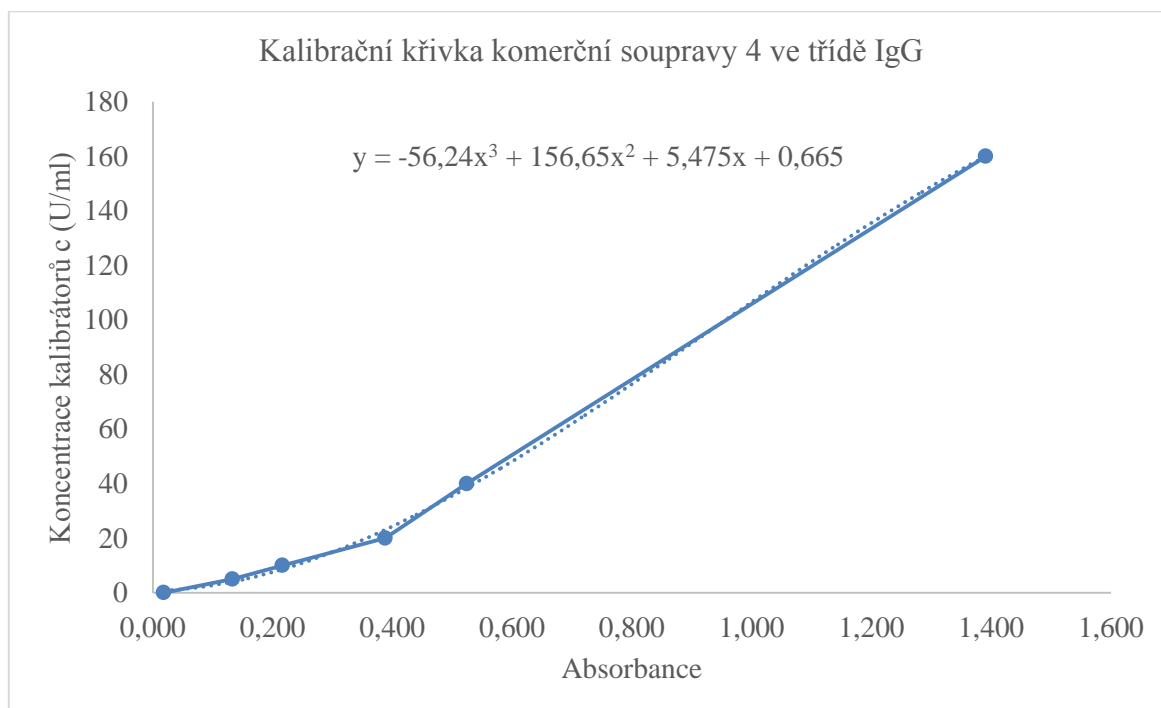


Graf č. 8 – Kalibrační křivka komerční soupravy 2 ve třídě IgG

- Pro komerční soupravu 4

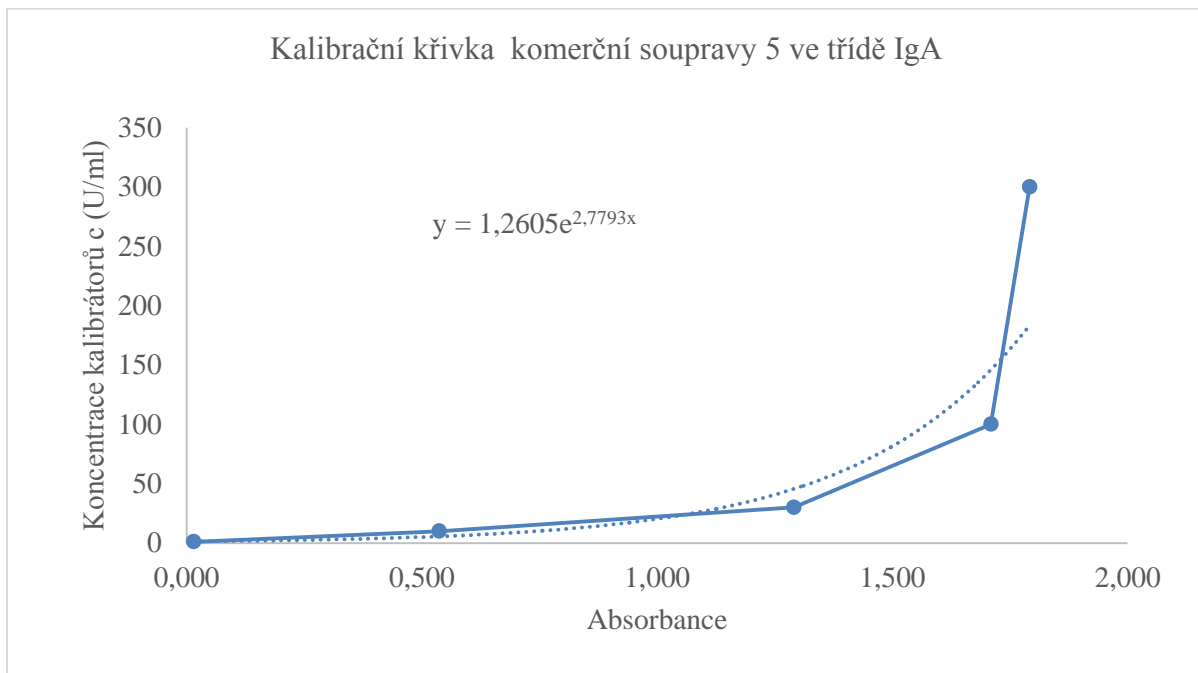


Graf č. 9 – Kalibrační křivka komerční soupravy 4 ve třídě IgA

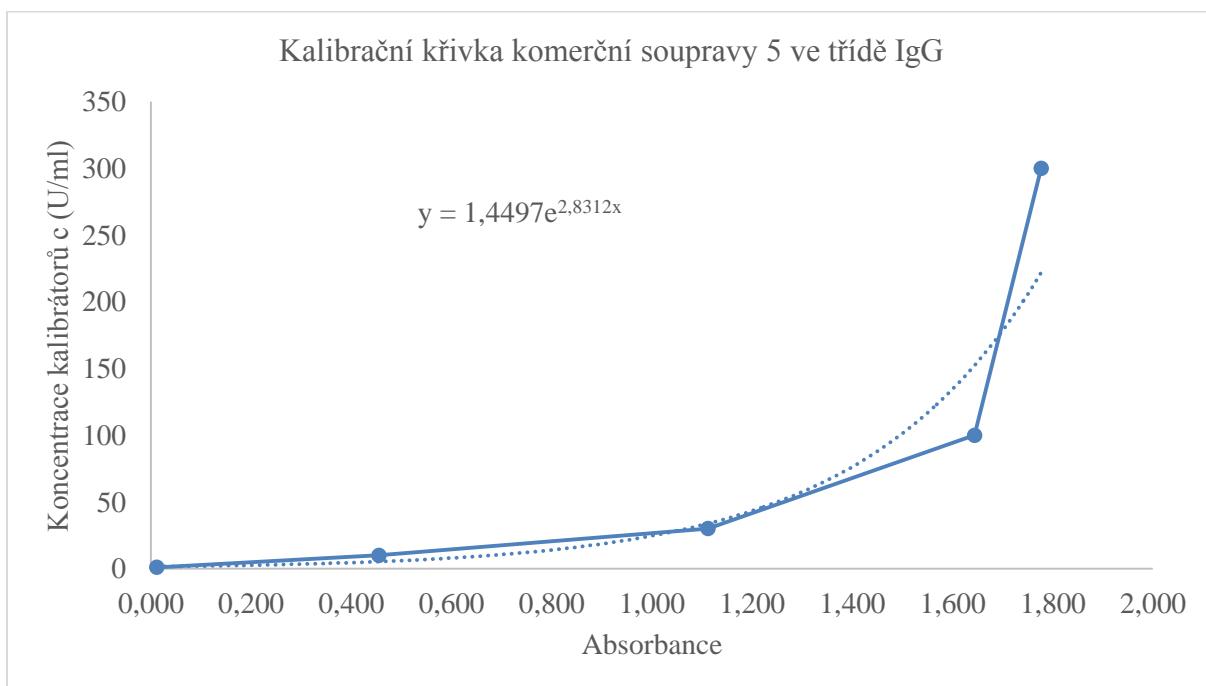


Graf č. 10 – Kalibrační křivka komerční soupravy 4 ve třídě IgG

- Pro komerční soupravu 5



Graf č. 11 – Kalibrační křivka komerční soupravy 5 ve třídě IgA



Graf č. 12 – Kalibrační křivka komerční soupravy 5 ve třídě IgG

Příloha 4

Hodnocení výsledků:

- Genetického vyšetření
- Stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze a endomysiu
- IgE protilátek na gliadin (vyloučení alergie na gliadin)

Identifikace			Genetické vyšetření		Protilátky proti tkáňové transglutamináze		Protilátky proti endomysiu		Alergie na gliadin
			Hodnocení		Index positivity		Hodnocení		Index positivity
Vzorek	Pohlaví	Celiakie:	DQ-2	DQ-8	IgA	IgG	IgA	IgG	IgE
1	Žena	Diagnostikována	+	-	0,15	2,15	-	+	<0,10
2	Žena	Diagnostikována	-	+	0,24	1,84	-	+	<0,10
3	Žena	Diagnostikována	+	-	0,29	1,76	-	+	<0,10
4	Žena	Diagnostikována	+	+	4,46	0,26	+	-	<0,10
5	Muž	Diagnostikována	+	+	2,44	0,32	+	-	<0,10
6	Muž	Diagnostikována	+	-	2,15	0,39	+	-	<0,10
7	Muž	Diagnostikována	-	+	3,25	2,15	+	+	<0,10
8	Žena	Diagnostikována	+	-	2,11	0,24	+	-	<0,10
9	Muž	Diagnostikována	+	-	0,52	1,54	-	+	<0,10
10	Muž	Diagnostikována	+	-	1,65	2,07	+	+	<0,10

Tab. č. 14 – Hodnocení vzorků s diagnostikovanou celiakií (červeně zbarveny pozitivní výsledky, - negativní výsledek a + pozitivní výsledek)

Identifikace			Genetické vyšetření		Protilátky proti tkáňové transglutamináze		Protilátky proti endomysiu		Alergie na gliadin
			Hodnocení		Index positivity		Hodnocení		Index positivity
Vzorek	Pohlaví	Celiakie:	DQ-2	DQ-8	IgA	IgG	IgA	IgG	IgE
11	Muž	Vyloučená	-	-	0,15	0,25	-	-	<0,10
12	Muž	Vyloučená	-	-	0,12	0,24	-	-	<0,10
13	Žena	Vyloučená	-	-	0,32	0,26	-	-	<0,10
14	Žena	Vyloučená	-	-	0,13	0,31	-	-	<0,10
15	Muž	Vyloučená	-	-	0,24	0,17	-	-	<0,10
16	Muž	Vyloučená	-	-	0,19	0,52	-	-	<0,10
17	Žena	Vyloučená	-	-	0,21	0,18	-	-	<0,10
18	Žena	Vyloučená	-	-	0,42	0,24	-	-	<0,10
19	Žena	Vyloučená	-	-	0,25	0,34	-	-	<0,10
20	Žena	Vyloučená	-	-	0,47	0,29	-	-	<0,10

Tab. č. 15 – Hodnocení vzorků s vyloučenou diagnózou celiakie (červeně zbarveny pozitivní výsledky, - negativní výsledek a + pozitivní výsledek)

Identifikace			Genetické vyšetření		Protilátky proti tkáňové transglutamináze		Protilátky proti endomysiu		Alergie na gliadin
			Hodnocení		Index positivity		Hodnocení		Index positivity
Vzorek	Pohlaví	Celiakie:	DQ-2	DQ-8	IgA	IgG	IgA	IgG	IgE
21	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,32	0,37	-	-	<0,10
22	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,36	0,28	-	-	<0,10
23	Muž	Neznámý vzorek	-	-	0,24	0,34	-	-	<0,10
24	Muž	Neznámý vzorek	-	-	0,61	0,29	-	-	<0,10
25	Žena	Neznámý vzorek	+	-	0,54	0,21	-	-	<0,10
26	Muž	Neznámý vzorek	-	+	0,37	0,18	-	-	<0,10
27	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,29	0,36	-	-	<0,10
28	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,19	0,59	-	-	<0,10
29	Žena	Neznámý vzorek	+	-	0,12	0,61	-	-	<0,10
30	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,37	0,18	-	-	<0,10
31	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,39	0,27	-	-	<0,10
32	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,17	0,74	-	-	<0,10
33	Muž	Neznámý vzorek	+	-	0,27	0,65	-	-	<0,10
34	Žena	Neznámý vzorek	+	-	0,37	0,18	-	-	<0,10
35	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,33	0,59	-	-	<0,10
36	Žena	Neznámý vzorek	+	-	0,29	0,18	-	-	<0,10
37	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,16	0,37	-	-	<0,10
38	Žena	Neznámý vzorek	-	-	0,18	0,28	-	-	7,82
39	Muž	Neznámý vzorek	-	-	0,24	0,12	-	-	15,8
40	Muž	Neznámý vzorek	-	-	0,31	0,28	-	-	9,53

Tab. č. 16 – Hodnocení neznámých vzorků (červeně zbarveny pozitivní výsledky , - negativní výsledek a + pozitivní výsledek)

Příloha 5

Hodnocení výsledků vzorků a srovnání setů na stanovení protilátek proti gliadinu a deamidovanému gliadinu:

Identifikace	Protilátky proti gliadinu						Protilátky proti deamidovanému gliadinu					
	Set 1		Set 2		Set 3		Set 4		Set 5		Set 6	
	Koncentrace (U/ml)		Koncentrace (U/ml)		Index positivity		Koncentrace (U/ml)		Koncentrace (U/ml)		Index positivity	
Vzorek	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
1	6,2	75,4	4,8	82,4	0,14	2,28	10,5	82,9	9,8	125,8	0,16	1,58
2	32,5	54,2	28,5	56,3	1,25	2,95	9,8	92,6	8,5	124,6	0,24	1,72
3	24,6	48,2	18,5	63,2	1,48	2,49	11,2	104,3	6,2	99,2	0,69	1,42
4	18,2	6,5	16,2	11,1	1,19	0,35	28,5	11,2	30,6	7,9	1,54	0,46
5	21,5	5,8	15,4	10,5	1,27	0,49	42,6	10,5	105,6	8,3	1,62	0,19
6	19,5	4,9	18,3	9,8	1,18	0,63	105,8	9,5	125,8	7,9	1,78	0,24
7	35,6	35,8	24,2	25,6	1,35	2,19	98,4	132,6	195,2	185,2	2,21	2,34
8	100,2	7,1	86,5	10,2	2,48	0,54	85,6	4,9	95,4	9,8	2,15	0,21
9	4,2	65,8	8,2	72,5	0,29	2,21	4,1	74,2	3,2	96,5	0,61	2,25
10	98,5	24,8	78,5	29,8	2,96	1,95	91,2	124,2	85,4	54,3	0,71	2,52

Tab. č. 17 – Hodnocení vzorků s diagnostikovanou celiakií (červeně zbarveny pozitivní výsledky)

Identifikace	Protilátky proti gliadinu						Protilátky proti deamidovanému gliadinu					
	Set 1		Set 2		Set 3		Set 4		Set 5		Set 6	
	Koncentrace (U/ml)		Koncentrace (U/ml)		Index positivity		Koncentrace (U/ml)		Koncentrace (U/ml)		Index positivity	
Vzorek	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
11	4,9	8,2	8,5	10,2	0,15	0,48	9,5	11,1	8,2	9,2	0,12	0,35
12	4,2	5,6	6,5	9,8	0,25	0,56	8,6	10,2	8,3	9,5	0,15	0,42
13	3,9	4,2	4,9	8,9	0,16	0,49	4,5	8,4	8,5	7,2	0,21	0,41
14	5,6	7,6	10,2	8,6	0,18	0,61	8,6	9,6	9,1	6,5	0,25	0,38
15	7,2	5,4	11,1	9,3	0,24	0,58	4,9	9,2	7,4	5,4	0,15	0,51
16	8,1	3,8	9,5	10,3	0,16	0,69	5,9	8,7	7,6	5,6	0,21	0,78
17	4,5	7,2	8,5	10,6	0,21	0,48	5,8	8,9	5,9	5,9	0,11	0,42
18	3,5	6,5	7,9	9,4	0,19	0,39	10,2	7,2	7,2	7,5	0,13	0,38
19	2,8	7,4	8,6	8,2	0,15	0,51	9,7	10,2	8,1	7,9	0,17	0,55
20	6,1	6,8	5,6	7,2	0,14	0,49	10,1	9,8	9,3	8,2	0,19	0,61

Tab. č. 18 – Hodnocení vzorků s vyloučenou diagnózou celiakie (červeně zbarveny pozitivní výsledky)

Identifikace	Protilátky proti gliadinu						Protilátky proti deamidovanému gliadinu					
	Set 1		Set 2		Set 3		Set 4		Set 5		Set 6	
	Koncentrace (U/ml)		Koncentrace (U/ml)		Index positivity		Koncentrace (U/ml)		Koncentrace (U/ml)		Index positivity	
Vzorek	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
21	8,2	10,2	10,2	11,2	0,42	0,52	7,2	10,8	7,2	8,3	0,15	0,36
22	7,5	9,8	8,5	10,5	0,35	0,57	6,2	11,3	5,6	9,1	0,19	0,84
23	4,5	8,4	4,6	9,8	0,26	0,63	5,6	9,8	7,4	8,4	0,24	0,74
24	4,2	16,4	4,9	13,6	0,29	1,22	4,2	6,9	8,1	9,6	0,25	0,68
25	5,6	6,5	5,2	11,3	0,48	0,71	7,8	7,2	5,2	8,2	0,19	0,54
26	9,7	10,8	6,3	10,5	0,39	0,69	9,6	8,4	6,1	8,1	0,31	0,87
27	10,5	10,2	7,2	8,4	0,32	0,51	5,4	9,5	4,2	7,6	0,22	0,61
28	9,2	16,2	9,5	13,8	0,24	1,31	4,8	10,5	5,6	7,9	0,24	0,54
29	8,5	10,4	8,2	7,8	0,21	0,49	10,2	11,2	4,2	8,5	0,29	0,49
30	7,6	9,5	4,9	8,5	0,15	0,39	11,5	10,8	8,4	7,4	0,33	0,37
31	5,8	15,8	7,2	12,9	0,19	1,25	8,2	10,2	6,3	7,6	0,32	0,81
32	7,4	5,8	7,9	4,2	0,27	0,47	7,4	9,4	6,7	6,4	0,19	0,75
33	9,5	8,7	7,6	6,5	0,31	0,54	5,9	7,4	4,2	5,2	0,32	0,74
34	4,9	8,5	8,1	10,2	0,29	0,59	4,5	9,5	4,9	8,5	0,41	0,68
35	8,4	10,2	8,6	10,6	0,24	0,74	7,2	8,2	5,3	7,4	0,27	0,49
36	9,5	15,2	10,2	12,5	0,18	1,21	8,9	6,5	8,1	9,1	0,21	0,51
37	10,8	7,5	10,6	10,5	0,17	0,37	9,6	10,5	4,1	8,4	0,39	0,82
38	8,9	8,2	11,1	9,8	0,24	0,42	4,2	11,3	8,6	9,6	0,14	0,42
39	9,4	7,5	7,5	5,6	0,63	0,39	10,2	10,2	8,2	9,2	0,19	0,36
40	9,8	4,9	7,4	7,2	0,24	0,19	9,5	8,5	6,2	7,6	0,24	0,45

Tab. č. 19 – Hodnocení neznámých vzorků (červeně zbarveny pozitivní výsledky)

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. BASS, Stephanie: Celiakie – Úspěšná léčba nesnášenlivosti lepku, Jan Vašut s.r.o., 2013, s. 8 – 75, ISBN 978-80-7236-839-6.
2. KREJSEK, Jan, KOPECKÝ, Otakar, Klinická imunologie, NUCLEUS HK, 2004, s. 831 – 838, ISBN 80-86225-50-X.
3. JAMES, S. Steward, West Middlesex University Hospital, sleworth, Middlesex, [cit. 17. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://celiac.cz/default.aspx?article=47>>.
4. KOHOUT, Pavel, Celiakie – Dieta bezlepková, Nakladatelství Pavla Momčilová, 1994, s. 3 – 18, ISBN 80-901137-6-1.
5. RUJNER, Jolanta, Bezlepková a bezmléčná dieta, Vydavatelství a nakladatelství Computer Press, 2005, s. 9 – 23, ISBN 80-251-0775-2.
6. AGGARWAL, Saurabh, BENJAMIN Lebwohl, and PETER H. R. Green: Screening for Celiac Disease in Average-Risk and High-Risk Populations. Therapeutic Advances in Gastroenterology, 2012, 5(1):37-47, PMID: 22282707
7. KOHOUT Pavel: Diagnostika a Léčba celiakie, Interní medicína pro praxi, Interní Medicína pro praxi, 2006, 7 a 8:324-326, [cit. 18. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2006/07/03.pdf>>.
8. HUSBY, S., KOLETZKO, S., KORPONAY-SZABÓ I. R., MEARIN M. L.: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2012, 54:136-160, [cit. 18. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.jpagn.org>>.
9. LATTA, Jiří: Celiakie – od screeningu k diagnóze, Interní klinika IPVZ, KNTB Zlín, Interní Medicína pro praxi, 2012, 14(5):221-223, [cit. 18. 3. 2015]. Dostupný z: <[http:// http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/05/09.pdf](http://http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/05/09.pdf)>.
10. FRIČ, Přemysl, Nevoral, Jiří: Cílený screening celiakie, Interní Medicína pro praxi, 2009, 11(11): 484-487, [cit. 18. 3. 2015]. Dostupný z: <[http:// http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/11/02.pdf](http://http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/11/02.pdf)>.
11. HARRY E. Prince: Evaluation of the Inova Diagnostics Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Measuring Serum Immunoglobulin G (IgG) and IgA to Deamidated Gliadin Peptides, Clinical and Vaccine Immunology, 2006, 13(1):150-151, ISSN: 1556-6811.

12. FRÜHAUF, Pavel, Szitányi, Peter, Vyhnálek, Radim: Nové doporučení ESPGHAN pro diagnostiku celiakie, *Pediatric pro praxi*, 2012, 13(3):211-213, [cit. 19. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2012/03/18.pdf>>.
13. LOHI, S., Mustalahti, K., Kaukinen, K.: Increasing prevalence of coeliac disease over time, *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 2007, 26(9):1217-1225, PMID: 17944736
14. GOLDEMUND, Karel, Celiakie, Přehledový článek, *Praktická medicína, Pediatric pro praxi*, 2001, 3:106-111, [cit. 19. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2001/03/02.pdf>>.
15. CATASSI, Carlo, FABIANI, Elisabetta, IACONO, Giuseppe: A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease, *J Clin Nutr, American Society for Nutrition*, 2007, 85(1):160-6, PMID: 17209192
16. VÉCSEI, A. K. W., GRAF, U. B., VOGELSANG, H.: Follow-up of adult celiac patients: Which noninvasive test reflects mucosal status most reliably?, *Endoscopy*, 2009, 41(2): 123-128, PMID: 19214890
17. FRIČ, Přemysl, Radan, Keil: Celiakie pro praxi, přehledový článek, *Medicína pro praxi*, 2011, 8(9):354-359, [cit. 19. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/09/03.pdf>>.
18. PÍSKOVSKÁ, Marta: Sdělení z praxe – Celiakie – projevy mimo gastrointestinální trakt v dospělosti, *Medicína pro praxi*, 2011, 8(7 a 8):333-336, [cit. 20. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/07/07.pdf>>.
19. KOHOUT, Pavel: Novinky v bezlepkové dietě, Přehledový článek, *Interní medicína pro praxi*, 2008, 10(3):113-116, [cit. 20. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.solen.cz/pdfs/int/2008/03/03.pdf>>.
20. LUKÁŠ, Zdeněk: Histopatologie a diferenciální diagnostika celiakální sprue: 30. sjezd českých patologů, Brno, 23. - 24. 5. 2003. Abstrakta. *Česko-slovenská patologie a Soudní lékařství*, 2003, Roč. 39/48, č. 4, Příl. s. 6. ISSN: 1210-7875
21. MUNTAU, Ania Carolina: *Pediatric*, Grada Publishing, a.s., 2009, strana 379 - 382 ISBN 978-80-247-2525-3
22. Cílený screening celiakie (metodický pokyn), *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky*, 2011, částka 3, strana 51 – 54, [cit. 21. 3. 2015]. Dostupný z: <http://www.celiakie-jihh.cz/fotky2772/novy_design/dokumenty/Cileny_screening>.

23. HOŘEJŠÍ, Václav, BARTUŇKOVÁ, Jiřina: Základy imunologie – 4. vydání, Nakladatelství TRITON, 2009, strana 235 – 239, ISBN 978-80-7387-280-9
24. BARTUŇKOVÁ, Jiřina, PAULÍK, Milan a kolektiv: Vyšetřovací metody v imunologii, 2. přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing, a.s., 2011, strana 33 – 35 a 129-135, ISBN 978-80-247-3533-7
25. MALÍČKOVÁ, K., JANATKOVÁ, I., ŠANDOVÁ, P., FUČÍKOVÁ, T.: Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii, přehledový článek, Interní medicína pro praxi, 2005, 10:440 – 443, [cit. 21. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/10/06.pdf>>.
26. ROSTOM, A., MURRAY, J. A., KAGNOFF, M. F.: American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease, Gastroenterology, 2006, 131(6):1981 – 2002, PMID: 17087937
27. MAŇASKOVÁ, Dana: Diagnostika celiakie, 2010, [cit. 28. 3. 2015]. Dostupný z: <http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/f-dg>.
28. VOLTA, U., Villanacci, V.: Review - Celiac disease: diagnostic criteria in progress, Cellular and Molecular Immunology, 2011, 8:96 – 102, ISSN: 1672-7681
29. JÍLEK, Dalibor, KRÁL, Vlastimil: Laboratorní imunologická diagnostika, Postgraduální medicína, 2009, 2:153 – 158, [cit. 29. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/laboratorni-imunologicka-diagnostika-413551>>.
30. RIZZETTO, Mario, DONIACH, Deborah: Type of „retikulin“ antibodies detected in human sera by immunofluorescence, Journal of clinical Pathology, 1973, 26(11):841 – 851, [cit. 29. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC477901/>>.
31. GRANITO, A., MURATORI, P., CASSANI, F., PAPPAS, G.: anti-actin IgA antibodies in severe coeliac disease, Clinical and Experimental Immunology – The Journal of Translational Immunology, 2004, 137(2):386 – 392, [cit. 29. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1809109/>>.
32. FERRETTI, Bacchetti a spol.: Lipid Peroxidation and Paraoxonase-1 Activity in Celiac Disease, Journal of lipids, 2012, Article ID 587479, [cit. 29. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.hindawi.com/journals/jl/2012/587479/cta/>>.
33. FLEKAČ M., ŠKRHA J., NOVOTNÝ Z.: Faktory ovlivňující aktivitu a koncentraci antioxidantního enzymu paraoxonáza 1, Klinická biochemie a metabolismus,

- 2006, 14(35):33 – 39, [cit. 30. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0601-33.pdf>>.
34. FRIČ, P., ZAVORAL, M., DVOŘÁKOVÁ, T.: Přehledný referát – Choroby způsobené lepkem, *Vnitřní lékařství*, 2013, 59(5):376 – 382, [cit. 30. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.prolekare.cz/vnitri-lekarstvi-clanek/choroby-zpusobene-lepkem-40640>>.
35. RIZZELLO, G. Carlo, ANGELIS, Maria De, CAGNO, Raffaella Di, CAMARCAM, Alessandra: Highly Efficient Gluten Degradation by Lactobacilli and Fungal Proteases during Food Processing: New Perspectives for Celiac Disease, *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73,(14):4499 – 4507, PMID: 17513580
36. Nařízení komise (ES) č. 41/2009 ze dne 20. ledna 2009 o složení a označování potravin vhodných pro osoby s nesnášenlivostí lepku, *Úřední věstník Evropské unie*, 21.1.2009, L 16/3, [cit. 31. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32009R0041>>.
37. Vyhláška č. 35/2012 Sb., kterou se mění vyhláška č. 54/2004 Sb., o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití, ve znění pozdějších předpisů, [cit. 31. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.epravo.cz/top/zakony/sbirka-zakonu/vyhlaska-ze-dne-23-ledna-2012-kterou-se-meni-vyhlaska-c-542004-sb-o-potravinach-urceny-ch-pro-zvlastni-vyzivu-a-o-zpusobu-jejich-pouziti-ve-zneni-pozdejsich-predpisu-18766.html>>.
38. Codex Standard for foods for special Dietary use for persons intolerant to gluten, 2008, Codex Stan 118 – 1979, strana 1 – 3, [cit. 31. 3. 2015]. Dostupný z: <<http://www.codexalimentarius.net>>.
39. Obrázek označení bezpečkových potravin, Sdružení celiaků České republiky, [cit. 4. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://celiac.cz/default.aspx?article=236>>.
40. Obrázek označení bezpečkových potravin, Portál pro alergiky (proalergiky), Celiakie – Bezpečková dieta, [cit. 4. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://www.proalergiky.cz/alergie/clanek/bezpeckova-dieta>>.
41. Obrázek označení bezpečkových potravin, *Hospodářské Noviny – Potraviny bez lepku*, [cit. 4. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://ihned.cz/c1-54445440-potraviny-bez-lepku>>.
42. KOHOUT, Pavel, STARNOSVSKÁ, Tamara: Nákladnost dietního stravování oproti stravování běžnému, Závěrečná zpráva řešení projektu výzkumu, zadavatel: Česká republika – ministerstvo práce a sociálních věcí, nositel projektu: Forsapi, s.r.o., 12. ledna 2006, Kód projektu: GK MPSV-01-134/05

43. Příbalový leták – Anti-transglutamináza – IgA / IgG protilátky (Anti-tTG IgA) ELISA IgA / IgG ELISA Kit, BioSystems, M44754i-15, [cit. 4. 4. 2015].
44. Příbalový leták – EIA Gliadin IgA, TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o., Brno, GIA096, [cit. 4. 4. 2015].
45. Příbalový leták – EIA Gliadin IgG, TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o., Brno, GIG096, [cit. 4. 4. 2015].
46. Příbalový leták – EIA Gliadin DA IgA, TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o., Brno, GDA096, [cit. 4. 4. 2015].
47. Příbalový leták – EIA Gliadin DA IgG, TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o., Brno, GDG096, [cit. 4. 4. 2015].
48. Příbalový leták – GliaDea IgA, Generic Assays GmbH, Berlin, Kat. č. 3710, v01 09-11-16, [cit. 4. 4. 2015].
49. Příbalový leták – GliaDea IgG, Generic Assays GmbH, Berlin, Kat. č. 3810, v01 09-11-16, [cit. 4. 4. 2015].
50. Příbalový leták - ELISA-anti-GLIADÍN-II-A, G, Biogema, výrobné družstvo, Košice, E-235, [cit. 5. 4. 2015].
51. Příbalový leták - ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-A, Biogema, výrobné družstvo, Košice, E-231, [cit. 5. 4. 2015].
52. Příbalový leták - ELISA-anti-GLIADÍN deamidovaný-G, Biogema, výrobné družstvo, Košice, E-232, [cit. 6. 4. 2015].
53. Příbalový leták – Anti-Gliadin IgA, BL Diagnostika GmbH, Diagnostika Mainz, Kat. č.: 5B34LA, [cit. 6. 4. 2015].
54. Příbalový leták – Anti-Gliadin IgG, BL Diagnostika GmbH, Diagnostika Mainz, Kat. č.: 5B34LG, [cit. 6. 4. 2015].
55. OLIVEIRA, Andreia, TRINDADE, Eunice, TAVARES, Marta: Celiac Disease in first degree relatives of celiac children, *Arq Gastroenterol*, 2012, 49(3):204-7, PMID: 23011243
56. MUBARAK, Amani, WOLTERS, Victorien M.: Tissue transglutaminase levels above 100 U/1ml and celiac disease: a prospective study, *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(32):4399-4403, PMID: 22969205
57. Příbalový leták - HISTO TYPE Celiac Disease, BAG Health Care GmbH, Lich, Kat. č.: 70941, [cit. 6. 4. 2015].
58. Příbalový leták – IgA a IgG protilátky proti ENDOMYSIU (nepřímá imunofluorescence), BioSystems, [cit. 6. 4. 2015].

59. Příbalový leták – IgE gliadin, (chemiluminiscenční imunochemická reakce - Immulite 2000), [cit. 6. 4. 2015].
60. Obrázek pozitivní reakce na mikrotitrační destičce metodou ELISA, [cit. 6. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://lib.znate.ru/docs/index-25114.html?page=2>>.
61. Obrázek monomeru imunoglobulinu, autor: Petr Bína, [cit. 6. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Imunoglobulin.png>>.
62. Obrázek schéma ELISA, autor: Petr Bína, [cit. 6. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://www.wikiskripta.eu/images/6/6b/Schema-ELISA-capture.png>>.
63. Obrázek nepřímé imunofluorescence endomysia na opičím oesofagu, Autor: Marcela Jarešová, [cit. 6. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/MJAAQ.htm>>.
64. Obrázek analyzátoru Immulite 2000 XPi pro chemiluminiscenční imunochemická reakce, [cit. 6. 4. 2015]. Dostupný z: <<http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/immulite-2000-xpi-immunoassay-system>>.
65. Standardní operační postup (SOP 33/2) – Stanovení protilátek třídy IgA a IgG proti tkáňové transglutamináze (tTG), IFCOR-99, s.r.o., vypracovala: Mgr. Iveta Zapletalová, dne: 14. října 2013, verze: 03, [cit. 6. 4. 2015].
66. Standardní operační postup (SOP 21/1) – HLA typizace – vyšetření genetické predispozice k celiakii, IFCOR-99, s.r.o., vypracoval: Mgr. Jan Ištváněk, dne: 6. března 2014, verze: 01, [cit. 6. 4. 2015].
67. TAYLAN, Kav, BULENT, Sivri: Is enteroscopy necessary for diagnosis of celiac disease?, World Journal of Gastroenterology, 2012,18(31):4095-4101, PMID: 22919241.
68. CHANG, Matthew S., RUBIN, Moshe, LEWIS, Suzanne K., GREEN, Peter H.: Diagnosing celiac disease by video capsule endoscopy (VCE) when esophogastroduodenoscopy (EGD) and Biopsy is unable to provide a diagnosis: a case series, BMC Gastroenterology, 2012, 12:90, PMID: 22812595.
69. PICCINI, Barbara, VASCOTTO, Marina, SERRACCA, Lucia: HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease, Revista Espanola de enfermedades digestivas, 2012, 104(5):248-254, PMID: 22662777.
70. KURPPA, Kalle, RÄSÄNEN, Tiia, COLLIN, Pekka: Endomysial antibodies predict celiac disease irrespective of titers or clinical presentation, World Journal of Gastroenterology, 2012, 18(20):2511-2516, PMID: 22654448.

71. BYSTRÖM, Ing-Marie, HOLLÉN, Elisabet: Health-Related Quality of life in Children and Adolescents with Celiac Disease: From the Perspectives of Children and Parents, *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, Article ID:986475, PMID: 22548054.
72. DEWAR, David H., DONNELLY, Suzanne: Celiac disease: Management of persistent symptoms in patients on a gluten-free diet, *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(12):1348-1356, PMID: 22493548.
73. BHATTACHARYYA, Rajasri, SHARMA, Neeru, BANERJEE, Dibyajyoti: Design of a peptide for immunodetection of IgA antigliadin antibody for the purpose of screening of celiac disease, *Bioinformation – Discovery at the interface of physical and biological sciences*, 2012, 8(2):87-91, PMID: 22359441.
74. SANEIAN, Hosein, ZANDIEH, Fariborz: Value of Gluten Patch Test in Diagnosis of Celiac Disease, *Iran Journal Pediatr*, 2011, 21(4):491-496, PMID: 23056837.
75. VIPPULA, Anitta, KAUKINEN, Katri, LUOSTARINEN, Liisa: Clinical benefit of gluten-free diet in screen-detected older celiac disease patients, *BMC Gastroenterology*, 2011, 11:136, PMID: 22176657.
76. NORSTRÖM, Fredrik, LINDHOLM, Lars, SANDSTRÖM, Olof: Delay to celiac disease diagnosis and its implications for health-related quality of life, *BMC Gastroenterology*, 2011, 11:118, PMID: 22060243
77. TOMMASINI, Alberto, NOT, Tarcisio, VENTURA, Alessandro: Ages of celiac disease: From changing environment to improved diagnostics, *World Journal of Gastroenterology*, 2011, 17(32):3665-3671, PMID: 21990947
78. MCSORLEY, Henry J., GAZE, Soraya, DAVESON, James: Suppression of inflammatory Immune Responses in Celiac Disease by Experimental Hookworm Infection, *PLoS ONE*, 2011, 6(9):1-7, PMID: 21949691
79. GRECO, L., ROMINO, R.: The first large population based twin study of coeliac disease, *GutJNL*, 2002, 50:624-628, PMID: 11950806
80. MULDER, C. J., CELLIER, C.: Coeliac disease: changing views, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 2005, 19(3):313-321, PMID: 15925838
81. COLLIN, Pekka, WAHAB, Peter J., MURRAY, Joseph A.: Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease, *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 2005, 19(3):341-350, PMID: 15925840

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACP	Antigen prezentující buňka
ALT	Alaninaminotransferáza
AST	Aspartátaminotransferáza
CUT-OFF (CO)	Hraniční hodnota
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HLA	Human Leucocyte Antigen
IgA	Imunoglobulin A
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
K1 – K6	Kalibrátor 1 – Kalibrátor 6 (označení standardů)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
NK	Negativní kontrola
PCR	Polymerase chain reaction
PK	Pozitivní kontrola
SSP	Sequence specific primer
Th odpověď	Zánětová T lymfocytární odpověď