

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav imunologie FN v Motole

Markéta Tomisová

Antigliadinové protilátky
Význam v praxi

Bakalářská práce

Praha 2013

Autor práce: Markéta Tomisová

Vedoucí práce: RNDr. Jan Laštovička, CSc.

Oponent práce: MUDr. Jiří Drábek

Datum obhajoby: 2013

Prohlášení

1. Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci s názvem „Antigliadinové protilátky – význam v praxi“ zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Zároveň prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.
2. Souhlasím s tím, aby práce byla zpřístupněna pro studijní a výzkumné účely.

V Praze 23. 4. 2013

Markéta Tomisová

Bibliografická citace

TOMISOVÁ, Markéta. *Antigliadinové protilátky – význam v praxi*. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, 2013, s. 49, Vedoucí bakalářské práce RNDr. Jan Laštovička, CSc.

Anotace

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat současně dostupné metody ve stanovení anti-gliadinových protilátek a vyhodnotit jejich význam pro klinickou praxi.

Anti-gliadinové protilátky se vytvářejí následkem autoimunitní reakce na potravu obsahující gluten. Toto autoimunitní onemocnění se nazývá celiakie sprue (glutenová enteropatie). Celiakie má mnoho forem a vyskytuje se jak u dětí, tak u dospělé populace.

V této práci jsem se zaměřila na porovnání stávajících metod stanovujících protilátky proti tkáňové transglutamináze, gliadinu a endomysiu s novou screeningovou ELISA soupravou na detekci celiakie AESKULISA Celi Check, která používá antigen, který je tvořen komplexem deamidovaných gliadinových peptidů a transglutaminázy. Srovnání bylo provedeno na 160 sérech pacientů indikovaných k vyšetření na celiakii.

Klíčová slova

Celiakie, protilátky proti deamidovanému gliadinu, tkáňová transglutamináza, ELISA, AESKULISA Celi check

Abstract

The aim of this bachelore thesis was to compare currently available methods in investigation of antigliadin antibodies and to evaluate their relevance to clinical practice.

Antigliadin antibodies are generated due to an autoimmunne response to food containing gluten. This autoimmunne disease called Celiac disease (gluten enteropathy). Celiac disease takes many forms and occurs in both, children and adults.

In this bachelore thesis I focus on a comparison of existing methods for assessment of antibodies against tissue transglutaminase, gliadin and endomysium , with new screening ELISA kit for the detection of celiac disease Aeskulisa Celi Check that uses antigen, prepared from a komplex of deamidated gliadin peptides and transglutaminase. The comparison was carried out on 160 sera of patients indicated for screening of celiac disease.

Keywords

Celiac disease, antibodies against deamidated gliadin peptides, anti-tissue-transglutaminase, ELISA, AESKULISA Chellicheck,

Počet znaků (včetně mezer): 54 689

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování školiteli RNDr. Janu Laštovičkovi, CSc. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a za trpělivost, kterou mi při zpracovávání této práce poskytl. Dále děkuji laborantce Renatě Netopilíkové za všestrannou pomoc, a všem pracovníkům Ústavu imunologie FN v Motole za podporu.

Obsah

ÚVOD	9
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1. Celiakie	10
1.1.1. Etiologie	10
1.1.2. Epidemiologie.....	11
1.1.3. Patofyziologie.....	12
1.1.4. Příznaky	13
1.1.5. Formy	14
1.1.6. Diagnostika.....	16
1.1.7. Choroby sdružené s celiakií	19
1.1.8. Léčba.....	20
1.2. Antigliadinové protilátky.....	21
1.2.1. Protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG).....	21
1.2.2. Protilátky proti gliadinu (AGA)	21
1.2.3. Protilátky proti endomysiu (EMA).....	21
1.2.4. Protilátky proti retikulinu (ARA)	22
1.3. Imunoenzymatické stanovení protilátek.....	23
1.3.1. EIA gliadin IgA, IgG protilátek.....	23
1.3.2. EIA anti-tTransglutaminázy IgA protilátek	24
1.3.3. Aeskulisa Chelicheck.....	24
1.3.3.1 Princip metody	24
1.4. Jiné metody stanovení	26
1.4.2. Western Blot	26
1.4.3. Rychlé protilátkové testy (Rapid testy)	26
1.4.4. Biocard celiac test	26
1.4.5. Dot Blot	27
2. CÍL	28

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1. Materiál a metodika.....	29
3.1.1. Přístroje.....	29
3.1.2. Ostatní materiál	29
3.1.3. Reagencie	29
3.1.4. Pacientská séra	31
3.1.5. Příprava reagensů.....	31
3.1.5.1. EIA gliadin DA IgA/IgG.....	31
3.1.5.2. AESKULISA Celicheck.....	32
3.1.5.3. EIA anti-tTG IgA.....	32
3.1.6. EIA Gliadin DA IgA/IgG pracovní postup.....	32
3.1.7. EIA anti-tTG IgA pracovní postup.....	32
3.1.8. AESKULISA Celicheck pracovní postup.....	33
4.VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
4.1. Analýza výsledků vyšetřených protilátek u celiakie	34
4.2. Diskuze	39
ZÁVĚR	41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
Příloha.....	46

ÚVOD

Antigliadinové protilátky jsou protilátky spojovány s onemocněním zvaným glutenová enteropatie (celiakie sprue). Tyto protilátky jsou produkovány B-lymfocyty ve střevní sliznici nemocných s celiakii sprue, a vytváří si je jako reakce na přítomnost glutenu v trávicím traktu.

Celiakie je závažné autoimunitní zánětlivé onemocnění tenkého střeva u geneticky vnímavých jedinců. Hlavním spouštěcím faktorem je bílkovina lepek (gluten), vyskytující se v obilovinách. Celosvětové odhady výskytu (prevalence) celiakie se pohybují okolo 1 %. Podle posledních odhadů je v ČR správně diagnostikován každý desátý ze 40 000 – 50 000 postižených. Je to způsobeno atypickými a nespecifickými příznaky, díky čemuž je procento nediodagnostikovaných takto vysoké. Příčinami jsou zejména absence plošného screeningového vyšetření a nedostatečné povědomí o této nemoci. Pro zabránění rozvoje nemoci je totiž důležitá včasná diagnóza a následně dodržování bezlepkové diety u pacienta. Stanovení specifických protilátek v séru a biopsie sliznice tenkého střeva jsou dva pilíře diagnostiky tohoto onemocnění. Ve své práci se budu zabývat zejména anti-gliadinovými protilátkami. Jedním z cílů této práce je srovnání metodiky stanovení daných protilátek, a také analyzovat výsledky protilátek u pacientů vyšetřovaných na tyto protilátky ve Fakultní nemocnici v Motole v Praze. V následujícím textu přiblížím důležité klinické a patofyziologické souvislosti celiakie, dále různé typy protilátek, provedu jejich vzájemné srovnání a popíšu jejich současné možnosti stanovení, včetně novějších jednoduchých screeningových metod. V poslední části budu analyzovat výsledky vyšetřených protilátek u souboru pacientů. Podkladem pro psaní této práce mi bylo z velké části použití odborných, anglicky psaných, článků z vědeckých časopisů, dostupných v internetových databázích PubMed, Web of Science a Science Direct.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Celiakie

Celiakie je zánětlivé autoimunitní onemocnění, postihující zejména proximální část sliznice tenkého střeva [5]. Poprvé bylo toto onemocnění popsáno před 120 lety, na základě klinické studie dětských pacientů trpících klasickými příznaky (průjem, letargie, opožděný vývoj) [19].

Pro celiakii je typická tvorba protilátek proti buňkám tenkého střeva, při které následně dochází k atrofii střeva. Tento zánětlivý proces probíhá v závislosti na příjmu potravy obsahující lepek (při průniku jeho rezistentních okta- až dekaeptidů). Narušením trávicí i absorpční schopnosti střeva vzniká malabsimilace, tedy porucha využití živin z potravin obsahující lepek. U dětské celiakie se projevy této nemoci mírní až mizí v období puberty, u dospělých se onemocnění projevuje ve věku 30-40 let. Prevalence je různá, díky časté asymptomatickosti, je však v poměru se skutečným počtem nemocných nízká. Ženy bývají postiženy 2x častěji než muži [5].

1.1.1. Etiologie

Podstata celiakie je zřejmě imunopatologická reakce na bílkoviny obsažené v obilovinách. Obecně tyto bílkoviny označujeme jako prolaminy mající více zástupců – gliadiny u pšenice, sekaliny v žitě, hordeiny v ječmeni. Spouštěčem této reakce jsou peptidy s 8-10 aminokyselinami, které enzymy lidského střeva nedokážou rozložit. Důsledkem imunitní reakce je poškození sliznice střeva, velký význam v tomto mechanismu poškození má tkáňová transglutamináza enterocytů [12].

Gluten je komplex heterogenní směsi proteinů. Skládající se z gliadinů (α -gliadiny, γ - gliadiny, ω -gliadiny) a gluteninů (nízkomolekulární a

vysokomolekulární) [25]. Gliadin je velmi bohatý na glutamin, následná deamidace gliadinového glutaminu vede k aktivaci T-lymfocytů, (navázání na povrchové glykoproteiny HLA-DQ2 a HLA-DQ8 pozitivních imunokompetentních buněk), což spouští právě tuto imunopatologickou reakci [17, 25]. U 95 % pacientů se vyskytuje exprese HLA-DQ2 heterodimeru (DQA1*05 DQB1*02), a ve zbylých procentech se vyskytuje exprese HLA-DQ8 (DQA1*03 DQB1*0302). HLA geny jsou zodpovědné ze 40 % za genetický příspěvek ke vzniku celiakie. Výskyt HLA-DQ2 a HLA-DQ8 alel je významným avšak nesuficientním faktorem vzniku celiakie. Naopak absence těchto alel je signifikantní pro vysokou pravděpodobnost negativních hodnot antigliadinových protilátek a tudíž vyloučení celiakie. [29]

Předpokládá se vliv humorální i buněčné imunity, jelikož sliznice střeva je infiltrována plazmatickými buňkami a T-lymfocyty, díky tvorbě řady protilátek (antigliadinové, antiretikulární, antiendomysální, proti transglutamináze). Významnou roli hraje i genetika, tento proces vzniká zejména u geneticky predisponovaných jedinců. Předpokládá se i možný vliv adenovirové infekce, která mohla vést k senzibilizaci imunitního systému a vzniku imunopatologie [2].

1.1.2. Epidemiologie

Dříve se uváděla prevalence kolem 0,1 – 0,5 % (1:200-1:1000) v západních krajinách (Evropa, USA), k dnešnímu dni podle poslední studie se uvádí až 1,5 %. U rizikových skupin je prevalence ještě vyšší (Diabetes mellitus I. typu 3-6 %, příbuzní pacientů s celiakií až 20 %) [2].

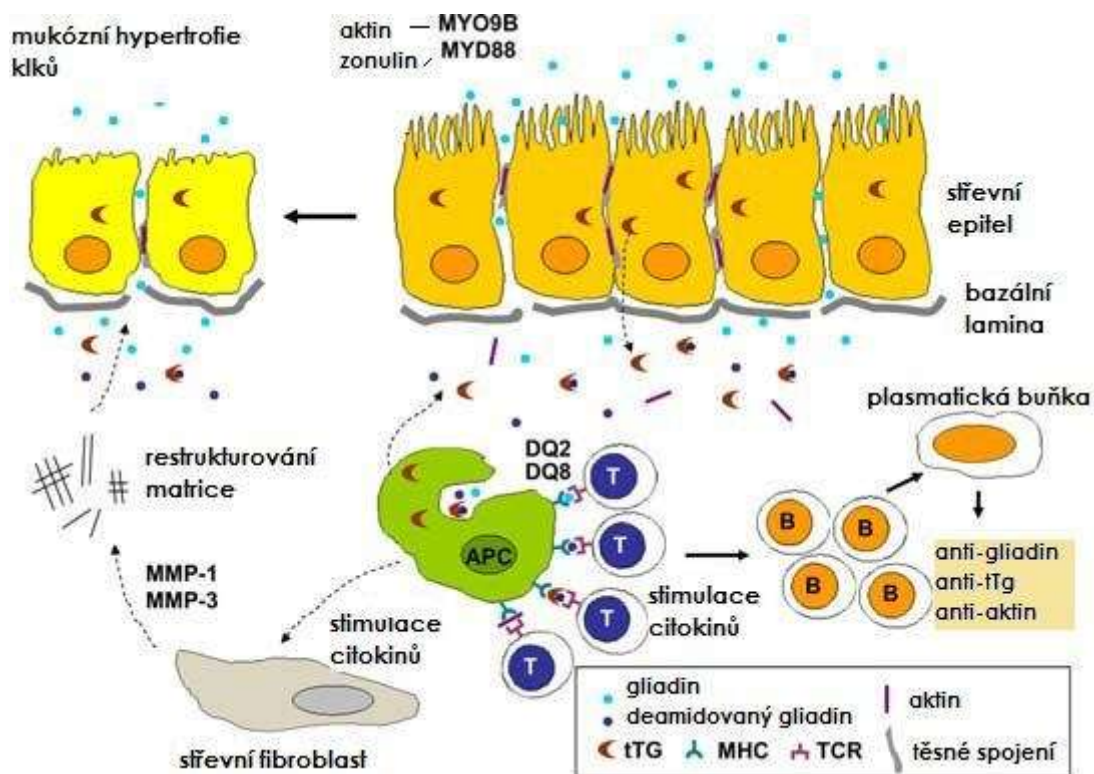
Avšak jen 10 % pacientů má klasické příznaky celiakie, kdežto zbylých 90 % buď žádné příznaky nemá, nebo jsou netypické. Z tohoto důvodu je nutné tyto pacienty vyhledávat populačním nebo cíleným screeningem [2].

1.1.3. Patofyziologie

Sliznice tenkého střeva je postižena chronickým zánětem, což má několik viditelných důsledků na různých úrovních. Makroskopicky se vyhlazuje sliznice tenkého střeva, mizí plicae circulares. Při zvětšení je patrná atrofie klků. Mikroskopicky nacházíme úbytek klků i enterocytálních mikroklků, prohloubené hypertrofické Lieberkühnovy krypty a v lamina propria mucosae zánětlivý infiltrát tvořený zejména plazmatickými buňkami [3].

Ve střevním lumen jsou obsaženy gliadinové fragmenty. Uvolněním zonulinu z receptoru dojde k prostoupení gliadinu do subepiteliální vrstvy. Dojde k deaminaci tkáňovou transglutaminasou a gliadinové peptidy se navážou na HLA receptory, nebo gliadin přímo útočí na povrch antigen prezentující buňky. Receptor těchto buněk, začne uvolňovat cytokiny. Následně T-lymfocyty reagující na antigeny spustí imunitní reakci, což vede k mukózní hypertrofii klků [9,30].

Jak k tomuto procesu dochází, vidíme na Obr. 1.



Obr.1 – Patofyziologie celiakie (upraveno - [9])

1.1.4. Příznaky

Narušení funkce tenkého střeva se projevuje nedostatečným vstřebáváním tuků, bílkovin a také některých vitamínů a minerálních látek, železa apod. Mohou se tedy vyskytovat průjmy, typický je i váhový úbytek, slabost a anemie [10].

Projevem mimostřevním je např. porucha vývoje a stavby kostí, makrocytární anémie, zhoršení zraku z nedostatku vitamínu A, neuropatie z nedostatku vitamínů B komplexu, či přítomnost banálních infekcí (močové, horních cest dýchacích). Další (atypické projevy) únavový syndrom, deprese, neplodnost, spontánní potraty, aftózní stomatitida, zvětšení břišních uzlin [2].

U neléčených pacientů se také klasicky objevuje nedostatek laktázy a laktózová intolerance (nesnášenlivost zejm. mléčného a řepného cukru) [2].

Příznaky celiakie mohou mít různou intenzitu, někdy jsou, zejména u dospělých pacientů, jen nevýrazné, nebo atypické (bezpříznakové), což může být značný problém pro určení správné diagnózy [2].

Klasické příznaky pozorujeme u pacientů dětského věku. Patří sem zejména celkové neprospívání, zpomalení růstu, zastavení váhového přírůstku, vzednutí břicha a jeho bolesti. Objevuje se stolice s vyšším podílem tuků, případně průjmy. Postupně se vyvíjí bílkovinná podvýživa a poměrně často je přítomna také chudokrevnost [10].

1.1.5. Formy

V závislosti na přítomnosti, nebo naopak absenci příznaků lze rozlišit několik forem celiakie. Jednotlivé formy se liší manifestací, diagnostikou a mírou obtíží u nemocné osoby [6].

Prvním je tzv. **forma klasická**, projevující se výše zmíněnými příznaky. Histologický nález na tenkém střevě je pozitivní, imunohistochemické vyšetření rovněž pozitivní, v séru diagnostikovány specifické protilátky [6].

Následuje **forma atypická**, jejíž příznaky jsou nevýrazné, a přímo nesvědčí o postižení střevní oblasti. Vyšetření histologické, imunohistochemické i sérologické je ovšem pozitivní.

Z dalších, hůře rozlišitelných forem celiakie můžeme jmenovat ještě formy *silentní* (nejsou přítomny žádné klinické příznaky, nálezy však pozitivní) a *latentní* (pozitivní sérologické vyšetření protilátek, histologie s imunohistochemií negativní), případně formu *potenciální* (příznaky i nálezy negativní), která je vlastně jen jakýmsi zvýšeným rizikem vzniku celiakie [6].

Zvláštní formou přecitlivělosti na gliadin je *Dühringova herpetiformní dermatitida*. Jedná se o kožní formu glutenové enteropatie, která se projevuje výsevem svědivých ložisek v oblasti loktů, hýždí a kštiny. Postižení sliznice tenkého střeva má ostrůvkovitý charakter, nikoli celistvé, jak je tomu např. u klasické formy celiakie. Kožní biopsie a průkaz protilátek proti tkáňové transglutamináze a antiendomysialních protilátek je rozhodující v diagnostice této formy celiakie. Po nasazení bezlepkové diety, dochází ke zmírnění kožních příznaků [5].

Refrakterní sprue je forma celiakie, při níž pacient dočasně reaguje na bezlepkovou dietu, po čase však dochází k relapsu [17].

Pacienti s touto formou celiakie mají potenciálně větší riziko progresu k lymfomům. Trpí také těžkou malnutricí (zejména u pacientů s ulcerativní jejunitidou), což může v mnoha případech vést až k úmrtí. Včasná diagnóza je v tomto případě velmi důležitá [17].

Tato forma celiakie je vzácný stav definovaný perzistentními malabsorpčními symptomy a atrofií klků navzdory striktnímu dodržování bezlepkové diety (déle než 12 měsíců) a zároveň negativní sérologii pro anti-tTG nebo EMA [17].

Prevalence refrakterní sprue je v rozmezí 0,6 – 8 %, odvíjející se dle studie (West, 2009; Roshan et al. 2011; Mooney et al. 2012). Tyto hodnoty prevalence byly odvozeny na základě studií s relativně malým počtem

pacientů. Skutečná prevalence tedy může činit až 10 % u pacientů podezřelých na Refrakterní celiakii (Dewar et al. 2012).

U pacientů s enteropatií asociovanou T-buňkami lymfomu (EATL) je prognóza na záchranu méně než 30 %. Úmrtnost je přímý důsledek komplikací malnutrice nebo progresu EATL [17,18].

Ke klinickým a patologickým rysům *kolagenní sprue* patří následující: za prvé, přítomnost přetrvávajícího průjmu s panmalabsorpcí způsobující několik nedostatků živin a postupné hubnutí. Pacienti nereagují na bezlepkovou dietu. Za druhé, detekce slizničních lézí s jedinečnou morfologickou značkou (ukládání kolagenu v lamina propria mucosae) v proximální části tenkého střeva.

Tato forma špatně reaguje na kortikoidy [20].

1.1.6. Diagnostika

Asymptomatické pacienty je nutné vyhledávat pomocí cíleného screeningu (příbuzní pacientů s celiakií, pacienti s autoimunním onemocněním, ...). Tento screening spočívá v odběru protilátek proti tkáňové transglutamináze v řadě IgA a celkového IgA [2].

U pacientů s typickými symptomy je častým nálezem dilatace kliček jejunu a hyposplenismus, což můžeme prokázat pomocí ultrazvuku břicha. Pro potvrzení či vyvrácení celiakie je zásadní, zejména sérologické vyšetření krve a biopsie tenkého střeva. Vyšetřením krve se zjišťuje přítomnost specifických protilátek (nejprůkaznější jsou proti endomysiu a transglutamináze). Sérologické stanovení protilátek je cenné vyšetření. IgA antigliadinové protilátky nemají potřebnou senzitivu, lepší je stanovení IgA antiretikulinových

protilátek, které dosahuje senzitivity až 90%. Nejlepší volbou je však stanovení IgA protilátek proti transglutamináze a IgA antiendomysialních protilátek, které mají senzitivitu i specifitu přes 95%. Titr antigliadinových a antiendomysialních protilátek se snižuje při úplném dodržování bezlepkové diety [8].

Rozhodující vliv pro diagnózu celiakie má následná enterobiopsie, tj. odběr vzorku z části tenkého střeva. Ten se, zejména u dětských pacientů získává pomocí Coombsovy nebo Carreyovy kapsle, zavedené do první kličky lačnicku (jejunum), kde dochází k odběru. V některých případech není nutné získávat vzorek enteroskopicky, ale postačí odběr za využití gastroskopu z oblasti dvanáctníku (duodenum) pod Vaterovou papilou [16].

Stanovení diagnózy celiakie bez provedení potvrzujícího vyšetření pomocí biopsie patří i v současnosti k častým chybám. V případě, že by přítomné obtíže byly způsobeny jiným onemocněním, může být nasazená léčba neúčinná nebo dokonce kontraproduktivní [16].

Určení diagnózy celiakie je v mnoha případech dlouhodobou záležitostí. Vzhledem k často nevýrazně se projevujícím příznakům a nutnosti vyloučit jako původce obtíží jiné probíhající onemocnění, může jít i o značný časový úsek. Celiakie může řadu let probíhat skrytě a výrazněji se projevit až v závislosti na spouštěcím faktoru, například při stresové zátěži, po chirurgickém zákroku, v těhotenství, vlivem infekce apod [16].

Určení diagnózy spočívá v rukou gastroenterologa. Základní informace při podezření na celiakii, resp. nesnášenlivost lepku, přináší případný výskyt nemoci v rodině pacienta. V tomto ohledu je zvlášť významný tzv. screening. Ten spočívá v pravidelném sledování potenciálních celiaků, tj. těch, v jejichž

příbuzenstvu se tato nemoc vyskytla. Dále sledujeme pacienty, u kterých se vyskytla jedna z přidružených chorob [8].

V r. 1990 byla přijata ESPGHAN kritéria diagnostiky celiakie. Spočívající na histologickém průkazu enteropatie, úpravě klinického stavu po zavedení bezlepkové diety. Tyto kritéria mají napomoci potvrdit či vyloučit celiakii.

Jedno z kritérií, je i hodnocení sliznice střeva podle Marsh-Oberhubera (Tab. 1)

Typ klasifikace	Morfologie
Marsh	
0 (preinfiltrativní)	nejsou změny na sliznici, beze změny poměru klků a krypt
1 (infiltrativní)	zvýšený počet IEL
2 (hyperplastický)	záně rozšíření klků a hlubší krypty
3 (destruktivní)	těžký zánět, atforické klky, hyperplastické krypty
Oberhuber	
0	normální sliznice
1	zvýšený počet IEL, normální nález na sliznici
2	normální klky, prohloubené krypty, zvýšení IEL
3	destruktivní typ s různým stupněm atrofie klků, vždy jsou prohloubené krypty a známky zánětu
3a	parciální atrofie klků (klky zkrácené, rozšířené, klk/krypta 1:1)
3b	subtotální atrofie klků (atrofické, ale rozpoznatelné klky)
3c	totální atrofie klků, sliznice vypadá jako tlusté střevo
4	atroficko-hypoplastické, plochá sliznice s normální hloubkou krypt, nízký počet IEL
Corazza	
A (non-atrofický)	normální architektura typ 0, 1 a 2
B1 (atrofický)	poměr klky/krypty < 3:1 typ 3a, 3b
B2 (atrofický)	klky nejsou detekovatelné typ 3c, 4

Tab. 1 – Klasifikace celiakie podle histologie (upraveno-
<http://img.mf.cz/720/126/2-209b.jpg>)

Byl zaveden orientační skórovací systém pro ověření diagnózy celiakie. Bodují se symptomy, stanovené protilátky, HLA typizace a histologie. Pro diagnózu musí být dosaženo 4 bodů viz. tab. 2 [16].

Symptomy		Body
	malabsorpční syndrom	2
	klinická suspekce nebo DM1 nebo rodič/sourozenec celiakie	1
	bez symptomů	0
Protilátky	EMA pozitivní nebo TG2 > 10 x	2
	TG 2 < 10 x nebo izolované DGP +	1
	sérologie nebyla provedena	0
	protilátky negativní	-1
HLA	HLA-DQ2 nebo DQ8 heterodiméry +	1
	HLA neprovedeno nebo pouze pozitivita HLA-DQB1	0
	HLADQ2/DQ8 negativní	-1
Histologie	Marsh 3b/3c	2
	Marsh 2/3a	1
	Marsh 0/1 nebo biopsie neprovedena	0

Tab. 2 – Orientační skórovací systém (upraveno – [16])

1.1.7. Choroby sdružené s celiakií a komplikace

Sdružené choroby: U pacientů s celiakií se častěji vyskytuje Duhringova herpetiformní dermatitida, DM I. typu, selektivní deficit IgA (v takovém případě je ovšem sérologické vyšetření IgA protilátek negativní), autoimunitní tyreoiditida, IgA nefropatie, sklerozující cholangitida, primární biliární cirhóza a Downův syndrom [2].

Komplikace: Celiakie je prekancerózou, což je zřejmě způsobeno chronickým vyčerpáním imunitního systému. U pacientů s celiakií častěji vznikají lymfomy (zejména T-lymfomy), adenokarcinom tenkého střeva a dlaždicobuněčný karcinom jícnu [2].

1.1.8. Léčba

Základem léčby je úplná a trvalá bezlepková dieta. [27] Mnoho nemocných má současně deficit laktázy, který je sekundární. Lze tedy podávat kortikoidy. U Dühringovy herpetiformní dermatitidy má úspěch i podání DDS sulfonů (Dapson) [19].

Nové medikamenty pro celiakii jako luminalní endopeptidázy, antagonisti zonulinu a peptidové vakcíny se ještě pro běžnou léčbu nepoužívají, ale mohou poskytnout benefit pro pacienty s refrakterní sprue.

Další pochopení stimulace IL-15 spouštěče, a následné blokace přirozené imunitní aktivace (čili zabránění poškození střevního epitelu), je cestou k alespoň částečně úspěšné léčbě celiakie [17,18].

Kromě toho je nutné při projevech karence zajistit substituci látek jako je železo, kyselina listová, vitamin B12, kalcium a vitamin D [19,27].

1.2. Antigliadinové protilátky

1.2.1. Protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG)

Tkáňová transglutamináza je enzym, který se nachází v lamina propria intestinální sliznice. Zodpovídá za zvýšenou afinitu peptidů gliadinu k molekulám HLA na antigen-prezentujících buňkách. První generace anti-tTG ELISA testů využívala jako antigen tkáňovou transglutaminázu z morčecích jater. Druhá generace využívala tkáňovou transglutaminázu z lidských erytrocytů a nejnovější testy třetí generace používají rekombinantní tkáňovou transglutaminázu. Nález vyšší než 100 U/ml je dostatečný pro diagnózu celiakie [10, 28].

1.2.2. Protilátky proti gliadinu (AGA)

Gliadin je v alkoholu rozpustná frakce glutenu, která je za určitých okolností schopna vyvolat abnormální imunitní odpověď střevního slizničního imunitního systému. Rozlišujeme izotyp IgA a IgG. AGA se diagnostikují v obou izotypech a to proto, že AGA IgG je senzitivnější a AGA IgA specifitější pro diagnózu celiakie. Stanovujeme především u dětí mladších 2 let, a osob s IgA deficiencí. Jelikož ve srovnání s anti-tTG je méně senzitivní i specifická [10].

1.2.3. Protilátky proti endomysiu (EMA)

Jsou namířeny proti proteinové složce pojivové tkáně, mezi myofibrilami stěny zažívacího ústrojí. Detekujeme nepřímou imunofluorescencí v izotypech IgA i IgG. Test je vhodný ke confirmaci pozitivních výsledků anti-tTG [10].

1.2.4. Protilátky proti retikulinu (ARA)

Vyskytují se v 5 typech a jsou namířeny proti strukturálním komponentám kolagenu. Vzhledem k nízké senzitivě testu, jejich využití klesá [10].

1.3. Imunoenzymatické stanovení protilátek

ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), někdy také označovaná jako EIA (Enzyme Immunoassay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek. Metoda ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Za prvé je to schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch plastů (např. polystyrenu) a v druhé řadě pak schopnost vázat enzymy na Fc fragment imunoglobulinových molekul [1].

Pro průkaz specifických protilátek i antigenů existuje široké spektrum různých modifikací ELISA testu:

- Přímá ELISA - pro detekci antigenu.
- Nepřímá ELISA - pro detekci specifických protilátek.
- Přímá sendvičová ELISA - pro detekci antigenu.
- Nepřímá sendvičová ELISA - pro detekci specifických protilátek.

U celiakie stanovujeme zejména anti-gliadinové IgA a IgG protilátky, Protilátky proti transglutamináze ve třídě IgA, a protilátky proti endomysiu (EMA).

1.3.1. EIA Gliadin IgA, IgG protilátky

Za základní marker celiakie jsou považovány specifické protilátky IgA a IgG proti deaminovanému gliadinu v séru či plazmě. Stanovení těchto protilátek je prováděná metodou EIA, typ sandwich, tj. pevná fáze – antigen – protilátka – značená protilátka. Stěny jamek mikrotitrační destičky jsou potaženy deaminovaným gliadinem. Značenou protilátkou je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgA/IgG, konjugovaná křenovou peroxidázou. Stanovení

peroxidázové aktivity se provádí pomocí substrátu s tetrametylbenzidinem (TMB). Inkubaci provádíme ve tmě a při teplotě 37 °C. Pozitivita se projevuje modrým zbarvením, které se zastavovacím roztokem (obsahuje kys. sírovou) změní na žluté, jehož intenzita se měří na fotometru při vlnové délce 450 nm [11, 26].

1.3.2. EIA Anti-tTransglutamináza IgA protilátky

Na mikrotitrační destičce je vázána tTG. Navázání protilátek přítomných ve vzorcích a kalibrátorech, vytvoření sendvičového komplexu a následná enzymová barevná reakce, probíhá obdobně jako u EIA Gliadinu. Inkubace provádíme ve tmě a při laboratorní teplotě. Optická hustota se změří při 450 nm [4, 26].

1.3.3. AESKULISA CeliCheck

AESKULISA CeliCheck New Generation používá k detekci Celiac Neo-Epitope antigen, který je tvořen komplexem deamidovaných gliadinových peptidů a transglutaminázy. Tento neo-epitop má vynikající citlivost 97,5% a specifitu 98,8%, o 10% vyšší než deaminované gliadinové peptidy a dokáže tak zachytit i skryté formy celiakie. Protilátky proti neo-epitopu se objevují až o 6 měsíců dříve než protilátky proti d-gliadinu, tTg a EMA, takže CeliCheck poskytuje velmi časnou diagnostiku celiakie. Výrobce deklaruje diagnostickou citlivost na celiakii 100%. Souprava, kterou jsem testovala je screeningová pro obě třídy (IgA i IgG) protilátek najednou.

Tato metoda je nástrojem pro diferenciální diagnostiku a monitoring celiakie [19].

1.3.3.1. Princip metody

Vzorky séra se naředí v poměru 1:101 a jsou inkubovány na mikrotitračních destičkách v jamkách pokrytých specifickým antigenem. Jsou-li ve vzorku séra

pacienta přítomny protilátky, naváží se na antigen. Nenavázaná frakce se vymyje, přidává se protilátka proti lidskému imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou, vzorek se inkubuje a dochází k reakci s komplexem antigen-protilátka, vzniklém v mikrodestičce. V dalším kroku se nenavázaný konjugát vymyje a přidáváme roztoku substrátu TMB (tetramethylbenzidin), který způsobí kolorimetrickou enzymatickou reakci, která je zastavena přidáním zředěné kyseliny. Na základě naměřených absorbancí, zjišťujeme koncentraci konjugátu vázaného na komplex a ta, odpovídá množství původní koncentrace příslušných protilátek v séru [Manuál AESKULISA Celi Check].

1.4. Jiné metody stanovení

1.4.2. Western Blot

Pomocí této metody detekujeme protilátky proti tTG nebo čistý gliadin, který se zahřívá s ředícím roztokem, při 100 °C na 5 minut, elektroforéza probíhá za redukčních podmínek (1M 2-merkaptoethanolu v pufru pro elektroforézu) v kontinuálním 12% nebo 15% akrylamidu, podle standardní metodiky. Do každé jamky se vloží 5,5 ug proteinu. Po elektroforéze proteinů jsou výsledky (fragmenty) vizualizovány barvením 0,1% brilantní modří R-250. Po elektroforéze se proteiny transferují na nitrocelulóзовé membrány, kde dochází ke vzlínání (difúzí či stejnosměrným proudem). Po následném promytí, a díky reakci substrátu s peroxidázou vzniknou barevné proužky, které se vyhodnocují pomocí digitálního systému zobrazování. Denzita pruhů odpovídá přímo úměrně navázaným protilátkám ze séra pacienta [31].

1.4.3. Rychlé protilátkové testy (Rapid testy)

Těmito testy se detekují protilátky tTG třídy IgA z plné krve. Tento test tedy nelze použít u pacientů s deficicientem IgA protilátek. Metoda slouží k rychlému screeningu a vyhledávání pacientů s celiakií [32].

Princip testu využívá endogenní tTG, které se uvolňuje z červených krvinek, a reakcí s protilátkami proti tTG vznikají komplexy, které jsou následně vizualizovány a vyhodnoceny imunochromatografickým testem, využívající kapilárního difúzního systému. Tento test nelze použít u pacientů s deficicientem IgA protilátek [32].

1.4.4. Biocard celiac test

Test využívá principu imunochromatografie. Test vyžaduje 1 kapku (10 ml) krve, získané z píchnutí do prstu. Kapka krve se shromažďuje v kapiláře, která

je vložena do zkušební zkumavky s reagenčním roztokem. Výsledky jsou k dispozici po 15 min od vložení zkumavky do roztoku. Na testovacím proužku jsou dvě oddělená indikační pole. Test se považuje za pozitivní, pokud obě indikační pole jsou totožná. Testovací pole (obsahuje myší protilátku proti lidskému IgA) nám zobrazuje přítomnost anti-tTG IgA protilátek v krvi. Kontrolní pole (obsahuje IgG protilátku proti myší protilátce na testovacím poli) zobrazuje normální hladiny celkového IgA [33,34].

Tento test je vhodný pro domácí použití a vyrábí jej Ani Biotech Oy, Finsko.

1.4.5. Dot blot

Patří k multiplexovým testům, které jsou schopny detekovat více parametrů, resp. protilátek v jednom vzorku během jednoho stanovení.

Princip vychází z western blottingu, jako antigeny se využívají ty vysoce čištěné a rekombinantní. Vzniklé stripy lze hodnotit vizuálně či vyhodnotit počítačovou technologií. Densita pruhů odpovídá přímo úměrně koncentraci protilátky ve vzorku. Výsledky jsou srovnatelné s výsledky enzymové imunanalýzy [35].

2. CÍL

1. Porovnat výsledky získané pomocí jednotlivých ELISA testů (Transglutamináza, Gliadin) a EMA s výsledky získanými s novou soupravou AESKULISA Celi Check, používající jako antigen neo-epitop, a zjistit, zda se výsledky shodují nebo případně v čem se odlišují a jaký je přínos tohoto nového antigenu v diagnostice celiakie.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál a Metodika

3.1.1. Přístroje

DSX[®] ELISA PROCESSOR (Dynex, Germany)

Promývací zařízení (BIOTEC Instrument)

Termostat na 37°C

Fotometr pro mikrotitrační destičky (SLT Labinstruments A-5082)

Vortex mixer

3.1.2. Ostatní materiál

Automatické pipety

Jedno a vícekanálové pipety (5 – 1000 µl)

Špičky pro jednorázové použití

Ependorfky

3.1.3. Reagencie

Souprava reagentů pro EIA Gliadin DA IgA, IgG (Test-Line s.r.o., ČR)

- Potažená destička s navázaným antigenem
- Kalibrátor 1 - 5 AU/ml (lidské sérum bez protilátek proti deamidovanému gliadinu)
- Kalibrátor 2 - 25 AU/ml (lidské sérum obsahující protilátky proti deamidovanému gliadinu v hraniční koncentraci)
- Kalibrátor 3 - 100 AU/ml (lidské sérum obsahující protilátky proti deamidovanému gliadinu)
- Kalibrátor 4 – 200 AU/ml
- Konjugát (zvířecí imunoglobulin proti lidským IgA/IgG značený peroxidázou)
- Ředící roztok vzorků (pufr se stabilizátory bílkovin)

- TMB – Complete 3 (jednosložkový chromogenní substrátový roztok s TMB a H₂O₂)
- Promývací roztok (koncentrovaný pufr)
- Zastavovací roztok (kyselina sírová 1 mol/l)

Souprava reagensii pro EIA anti – tTG (BioSystems s. a., Spain)

- Koncentrovaný mycí roztok (TRIS 2 mol/l, neionizovaný detergent 22 g/l, azid sodný 15 mmol/l)
- Ředící roztok (TRIS 0,1 mol/l, NaCl 110 mmol/l, urea 2 mol/l, bovinní albumin 5 g/l, neionizovaný detergent 5 g/l, azid sodný 15 mmol/l)
- Pozitivní kontrola (sérum s anti-tTG protilátkami, azid sodný 15 mmol/l)
- Negativní kontrola (lidské sérum bez anti-tTG protilátek, azid sodný 15 mmol/l)
- Konjugát (křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny IgA)
- Substrát (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB))
- Zastavovací roztok (kyselina sírová 0,5 mol/l)
- Mikrodestička (6 jamek potažených vápníkem a gliadinem aktivovaným rekombinantním tTG)

Souprava reagensii pro AESKULISA Celi Check REF 3510 (Aesku.diagnostics, Germany)

- Promývací roztok (TRIS, NaCl, Tween 20, Azid Sodný)
- Ředící roztok (TRIS, NaCl, NaCl, BSA, Azid sodný)
- Negativní kontrola (lidské sérum, azid sodný)
- Pozitivní kontrola (lidské sérum, azid sodný)
- Cut-off kalibrátor (lidské sérum, azid sodný)

- Kalibrátory 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml (lidské sérum, azid sodný)
- Konjugát (křenová peroxidáza proti lidskému imunoglobulinu)
- TMB substrát (stabilizovaný TMB/ H₂O₂)
- Zastavovací roztok (1M kyselina chlorovodíková)
- Mikrodestička

3.1.4. Pacientská séra

Bylo vybráno 164 zmražených sér z rutinní imunologické laboratoře Ústavu imunologie FN v Motole v Praze. Séra byla již předtím otestována v rámci klinické diagnostiky na základě doporučení lékaře.

Stáří sér bylo v době měření maximálně tři měsíce od data poslední analýzy, séra byla skladována zmražená na teplotu -20°C.

Testovací skupina obsahovala 97 ženských a 66 mužských sér.

3.1.5. Příprava reagensů

3.1.5.1. EIA gliadin DA IgA

Koncentrovaný promývací roztok ředíme 1 + 19. Např. 75 ml koncentrovaného promývacího roztoku + 1425 ml destilované vody. V lahvičce s promývacím roztokem se mohou vytvořit krystaly solí. Tyto krystaly je potřeba před použitím rozpustit zahřátím na vodní lázni. Roztok po naředění je stabilní týden při +2 až +8°C.

Konjugát a TMB Complete 3 se dále neředí.

Ředění vzorků: důkladně promícháme vzorky, ředíme je 1+100, tj. 10µl vzorku + 1 ml Ředícího roztoku vzorků.

3.1.5.2. *AESKULISA Celicheck*

Připravíme promývací roztok v poměru 1:50 s destilovanou vodou. Séra ředíme v poměru 1:101 s ředícím roztokem vzorků. Připravené roztoky a vzorky, séra vložíme do přístroje DSX, a zvolíme připravený program.

3.1.5.3. *EIA anti- tTG IgA*

Příprava reagensií viz. EIA gliadin DA IgA/IgG.

3.1.6. EIA Gliadin DA IgA /IgG pracovní postup

Všechny reagensie i vzorky necháme vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promícháme. Do jednotlivých jamek mikrodestičky pipetujeme 100 µl vzorků, kontroly a ředící roztok vzorků podle schématu viz. Manuál. Destičky přikryjeme víčkem a inkubujeme 30 minut při 37°C.

Odsajeme obsah jamek a 4x promyjeme promývacím roztokem. Následně dávkujeme do všech jamek 100 µl konjugátu. Destičku přikryjeme víčkem a inkubujeme 30 minut při 37°C.

Odsajeme obsah jamek a 4x promyjeme promývacím roztokem. Následně dávkujeme do všech jamek 100 µl jednosložkového TMB-Complete. Destičku přikryjeme víčkem, inkubujeme 15 minut při 37°C.

Zastavíme reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku. Do 30 minut po zastavení reakce změříme intenzitu zbarvení na fotometru při vlnové délce 450 nm.

3.1.7. EIA anti-tTG IgA pracovní postup

Všechny reagensie i vzorky necháme vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promícháme. Do jednotlivých jamek mikrodestičky pipetujeme 100 µl vzorků, kontroly a ředící roztok vzorků podle schématu viz. Manuál. Destičky přikryjeme víčkem a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě.

Odsajeme obsah jamek a 3x promyjeme promývacím roztokem. Následně dávkujeme do všech jamek 100 µl konjugátu. Destičku přikryjeme víčkem a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě.

Odsajeme obsah jamek a 4x promyjeme promývacím roztokem. Následně dávkujeme do všech jamek 100 µl substrátu. Destičku přikryjeme víčkem, inkubujeme 15 minut při pokojové teplotě.

Zastavíme reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku. Do 30 minut po zastavení reakce změříme intenzitu zbarvení na fotometru při vlnové délce 450 nm.

3.1.8. AESKULISA CeliCheck pracovní postup

Připravená séra, roztoky vložíme do přístroje. V počítači nastavíme příslušný program. Spustíme analýzu a necháme přístroj pracovat.

Samotná procedura přístroje

Automat provádí veškeré kroky testu automaticky. Testovaná séra jsou naředěna 1:100 a automat napipetuje 100 µl z každého séra do jamek destičky. Automat potom napipetuje 100 µl kalibrátoru a negativní a pozitivní kontroly do jamek destičky.

Následuje inkubace 30 minut při pokojové teplotě. Pak dojde k promytí 3x 300 µl promývacího roztoku.

Automat přidá 100 µl konjugátu do každé jamky. Následuje opět inkubace 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci přístroj promyje vzorky 3x 300 µl promývacím roztokem.

Automat přidá 100 µl TMB substrátu do každé jamky. Proběhne další inkubace 30 minut při pokojové teplotě bez přístupu světla.

Po inkubaci automat přidá 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky. Inkubace 5 minut, pak dochází k přečtení absorbance při vlnové délce 450 nm.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Stanovení hladin protilátek u pacientů s celiakií

Prováděla jsem analýzu protilátek u vybraných sér pacientů s indikovaným vyšetřením na protilátky proti gliadinu IgA i IgG, protilátky proti transglutamináze, a anti-endomysiální protilátky. U některých pacientů nebyly z ekonomických důvodů provedeny všechny uvedené testy, ale pouze některé z nich (viz tabulka 4). Všechna séra byla ale otestována na screeningovém testu AESKULISA Celicheck. Naměřené hodnoty a referenční meze jsou uvedeny v následujících tabulkách.

V příloze (Tab. 4) jsou výsledky analýzy sér pacientů, která byla vyšetřena na endomysiální protilátky, protilátky proti DA gliadinu a proti transglutamináze a proti celiac neo-epitopu, syntetickému antigenu, který používá souprava Celi Check. V tabulce 3 jsou uvedeny hranice positivity jednotlivých testů

Tab. 3 – hranice positivity

	negativní	pozitivní
	U/ml	
Transglutamináza IgA	< 8	> 12
DA gliadin IgA, IgG	<22,5	>27,5
Celi Check	<16	>24

Z tabulky 4 (viz. Příloha) byla následně vypočítána specifita, citlivost a přesnost metod.

Podle nastavených hranic positivity uvedených u všech testů (Tab. 3) byla posouzena negativita či pozitivita vzorků. Na základě tohoto posouzení byly

vytvořeny kontingenční tabulky. V tabulkách se porovnávaly výsledky pozitivitu či negativitu testů s výsledky AESKULISA Celi Check, které byly považovány za referenční.

Vysvětlivky ke zkratkám:

TP	True positive – správně pozitivní
TN	True negative – správně negativní
FP	False positive – falešně pozitivní
FN	False negative – falešně negativní

Výsledné koncentrace všech naměřených analytů byly podrobeny korespondenční analýze. Korespondenční analýza byla provedena v programu Microsoft Excel. Tato analýza je aplikovaná metoda pro kategorizovanou (nenumernou) data.

Tab. 5 – Výsledky falešných a skutečných negativit/pozitivit

	EMA (slabě pozitivní považovány za pozitivní)	EMA (slabě pozitivní považovány za negativní)	tTG	gliadin	tTG+Gliadin+EMA (EMA slabě pozitivní považována za negativní)
FN	11	28	27	6	1
FP	21	2	7	23	44
TN	35	54	63	25	31
TP	65	48	53	21	83

Z tabulky č. 5 vyplývá, že u výsledků TP se můžeme domnívat, že celiakie u těchto pacientů byla diagnostikována správně. U výsledků TN naopak podezření na celiakii není potvrzeno.

U kvalitativního stanovení protilátek proti endomysiu je v případech slabé pozitivitu uváděna hodnota *slabě pozitivní*. Tato hodnota by měla být

považována za pozitivní, ale je v tabulce interpretována oběma způsoby, buď jako pozitivní nebo jako negativní, aby bylo možno ilustrovat rozdíly ve výsledné statistice.

Specifitu, citlivost a přesnost metod byla vypočítána podle následujících vzorců:

$$\text{citlivost} = \frac{TP}{TP+FN}$$

$$\text{specifita} = \frac{TN}{TN+FP}$$

$$\text{přesnost} = \frac{TP+TN}{TP+FP+FN+TN}$$

Tab. 6 – Citlivost specifita a přesnost

	EMA (slabě pozitivní považovány za pozitivní)	EMA (slabě pozitivní považovány za negativní)	tTG	gliadin	tTG+Gliadin+EMA (EMA slabě pozitivní považována za pozitivní)
citlivost	85,53	63,16	66,25	77,78	98,81
specifita	62,50	96,43	90,00	52,08	41,33
přesnost	65,27	48,41	53,42	21,33	83,19

Přesnost měření (Measurement accuracy) je definována jako „Těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny“. Nejedná se tedy o veličinu a není dána číselnou hodnotou veličiny. Přesnost kombinuje preciznost a pravdivost, tj. vlivy náhodných a systematických faktorů [36].

Citlivost měření (Measurement sensitivity) je definována jako „Podíl změny indikace měřicího systému a odpovídající změny hodnoty veličiny, která je

měřena.“ Citlivost metody se může měnit např. s koncentrací analytu v případě, že kalibrační závislost metody není lineární. [36].

Specifita měření (analytical specificity) udává rozsah měření, do kterého může být jednotlivý analyt (skupina analytů) stanoven v komplexní směsi, aniž by došlo k interferenci s ostatními složkami ve směsi [36]. Specifická metoda je ta, která je oproštěna od vlivu interferencí. Specifičnost je schopnost dané metody stanovovat pouze tu měřenou veličinu, která má být stanovena [36].

Podle vypočtených hodnot těchto metrologických parametrů můžeme soudit, že nejspecifičtější stanovuje protilátky metoda EMA (ale pouze pokud hodnoty vycházejících slabě pozitivně považujeme za negativní). Jelikož ale slabě pozitivní hodnoty bychom měli považovat spíše za pozitivní, docházíme k výrazně nižší specifitě (62,5). Endomysium totiž detekuje více protilátek najednou, takže specifita je pak nižší zatímco se zvyšuje přesnost a citlivost. U EMA slabě pozitivních vzorků je důležité správně určit jejich pozitivitu, to je ale možné pouze v kombinaci s jinou vyšetřovací metodou, což zvyšuje náklady na diagnózu. I v tomto ohledu se Celi Ceck jeví jako výhodnější test. Testování samotných endomysiálních protilátek je sice průkaznější než je tomu u testování samotných tTG protilátek [37], ale pracnost a náročnost odečítání fluorescenčních preparátů u EMA z ní činí metodu stále méně používanou a ustupující moderním imunochemickým technikám s možností plné automatizace.

Používaný kit AESKULISA Celi Check udává ve svých materiálech citlivost 100 % na diagnostiku celiakie a specifitu 86,1 % vůči tTG protilátkám.

U anti-tTG IgA EIA kitu (BioSystems) výrobce udává hodnoty citlivosti 95% a specifity 99,4 %.

Výsledky studií (Villalta, et al., 2010) ukazují, že diagnostická sensitivity gliadinu v třídě IgG je srovnatelná se sensitivitou tTG [24]. Z našich výsledků toto nevyplývá, ale to může být hlavně způsobeno rozdíly v kvalitě u jednotlivých výrobců souprav a také velikostí srovnávaného souboru.

Pakliže srovnáme vlastní výsledky u tTG a DGP se studií (Vermeersch, et. al, 2011), vidíme rovněž rozdíly mezi vypočtenou sensitivitou i specifitou. U studie Vermeersch byla ovšem použita ELISA firmy Inova. Dospěli k hodnotám sensitivity u tTG 84,1% (66,25 %) , u DGP 85 % (77,78 %). Hodnoty specifity u tTG 95,9 % (90,00 %), u DGP 99,3 % (52,08). V závorkách jsou uvedeny naše výsledky pro vizuální srovnání. K rozdílu v sensitivitě a specifitě může docházet z různých důvodů, zejména již zmíněná kvalita souprav tento parametr výrazně ovlivní.

4.2. Diskuze

V této práci nebylo možno potvrdit tvrzení výrobce, že citlivost soupravy Aeskulisa CeliCheck je 100%, protože jsme neměli k dispozici výsledky biopsií pacientů, ale to také nebylo cílem práce. Předpokládanou citlivost potvrdil sám výrobce vlastní studií. Tento údaj o citlivosti nám však posloužil jako základ pro srovnání ostatních tří diagnostických metod stanovení protilátek.

Ve vztahu k výsledkům s neo-antigenem soupravy Celi Ceck je možno udělat následující závěry:

Poměrně vysoké procento falešně negativních vzorků (27) u transglutaminázy je možno interpretovat tím, že protilátky proti neo-epitopu se objevují až o 6 měsíců dříve než protilátky proti d-gliadinu, tTG a EMA.

EMA je obecně považována za velmi specifický ukazatel celiakie. U výsledků EMA však vidíme, že výsledek významně ovlivňuje skupina slabě pozitivních fluorescenčních obrazů. Je jisté, že převážná většina z nich koresponduje s přítomností jiných protilátek než proti tTG, které se ve vyšetřovaných sérech mohou vyskytovat. To způsobuje vyšší incidenci falešně pozitivních stanovení, což srovnání s neo-epitopem odhalí. Přiřazení slabě pozitivních výsledků k negativní skupině má však za následek výrazné snížení citlivosti metody.

Co se týče srovnání výsledků neo-epitopu s tTG, její citlivost nám vychází překvapivě horší než u anti-gliadinových protilátek, což obecně neplatí [24]. Anti-tTG protilátky mají vyšší senzitivitu a specifitu než protilátky proti gliadinu. Tento výsledek proto přičítáme spíše nepřesnosti ve spojení s malým počtem srovnávaných výsledků.

Protilátky proti d-gliadinu vychází v našem srovnání nejhůře, což je v souladu s očekáváním, protože použitá souprava firmy Test-Line je velmi levná. Tomu také odpovídá dosti vysoké množství falešně pozitivních výsledků (23)

Podle předpokladu nejlepší diagnostické výsledky dostaneme, když použijeme kombinaci všech tří testů – tTG, gliadinu v obou Ig třídách a EMA. Citlivost těchto kombinovaných metod pak vychází velmi vysoká (98,8). Plošné provádění všech těchto tří testů zároveň je ovšem v praxi víceméně nemožné, protože tím neúměrně vzrůstá cena vyšetření. Právě také z ekonomického hlediska se jeví přínos neo-epitopu jako velmi významný, zvláště když detekujeme IgG i IgA v jedné soupravě jako v našem případě.

ZÁVĚR

Diagnostika celiakie není vždy jednoduchá a jednoznačná. Nástrojem k časnému odhalení nemoci zůstává stanovení specifických protilátek v séru. K nejčastěji stanovovaným protilátkám dnes patří stále protilátky proti deaminovaným gliadinovým peptidům, endomysiu a tkáňové transglutamináze. Biopsie sice zůstává zlatou konfirmační metodou, má ale také svá omezení. Někteří pacienti s latentní nebo dokonce i aktivní formou celiakie mohou mít histopatologii normální.

Odlišnosti mezi jednotlivými protilátkami jsou zejména v senzitivitě, specifitě a metodice stanovení daných protilátek. Proto také jejich diagnostická výpovědní hodnota je odlišná.

Přemostění antigenů tGT s gliadin specifickými peptidy a výroba syntetických neo-epitopů posunula možnosti diagnostiky celiakie výrazně kupředu. Jelikož tyto neo-epitopy jsou strukturálně bližší fyziologickým antigenům, nové ELISA testy používající tyto antigeny vykazují mnohem vyšší citlivost a specifitu.

AESKULISA Celi check a další soupravy založené na neo-epitopech mohou poskytnout rychlou jednoduchou a vysoce citlivou imunoenzymatickou diagnostiku celiakie. Výhoda využití této technologie je také v časně diagnostice, která dokáže prokázat onemocnění až o šest měsíců dříve než to dokáží soupravy založené na standardních antigenech. Tyto moderní ELISA testy se začínají ve světě při diagnostice celiakie stále více prosazovat.

Seznam použité literatury

- [1] BARTŮŇKOVÁ, J. aj. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha : Grada Publishing, 2005. 176 s. ISBN 80-247-0691-1.
- [2] KOHOUT, P. *Celiakie*. Postgraduální medicína, 2012, roč. 14, č. 2, s. 207 - 210. ISSN: 1212-4184
- [3] CICLITIRA, P.J. – JOHNSON, M.W. – DEWAR, D.H. *The pathogenesis of coeliac disease*. Molecular Aspects of Medicine, 2005, roč.26, č.6, s.421-458.
- [4] DIPPER, C.R. aj. *Anti-tissue transglutaminase antibodies in the follow-up of adult coeliac disease*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2009, roč.30, č.3, s.236-244.
- [5] KOHOUT, P.- PAVLÍČKOVÁ, J. *Celiakie a bezlepková dieta*. Praha: Maxdorf, 2006. Vydání 3.
- [6] ČERVENKOVÁ, R. – LUKÁŠ, M. *Celiakie*, Praha: Galén, 2006. Vydání 1.
- [7] HOŘEJŠÍ, V. – BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Praha : Nakladatelství TRITON, 2005. Vydání 3. 279 s. ISBN 80-7254-686-4.
- [8] KOHOUT, P. *Diagnostika a léčba celiakie*. Interní medicína pro praxi, 2006, roč.8, č.7, s.324-326.
- [9] LOCHMAN, I. aj. *Multiplex assays to diagnose celiac disease*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007, roč.1109, s.330-337.
- [10] MALÍČKOVÁ, K. aj. *Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii*. Interní medicína pro praxi, 2005, roč.7, č.10, s.440-443.
- [11] SCHUPPAN, D. – JUNKER, Y. – BARISANI, D. *Celiac disease: From pathogenesis to novel therapies*. Gastroenterology, 2009, roč.137, č.6, s.1912-1933.

- [12] LATTA J., *Celiakie – od screeningu k diagnóze*, Interní medicína pro praxi, 2012, roč. 14, č. 5, s. 221-223. ISSN: 1212-7299
- [13] BANSAL A.K., aj. *Celiac G+ Antibody Assay for the Detection of Autoantibodies in Celiac Disease*, Contemporary Challenges in autoimmunity: Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, s. 36-40
- [14] WAHNSCHAFFE et al. *Intestinal antibodies against gliadin , tissue-transglutaminase, β -lactoglobulin, and ovalbumin in patients with irritable bowel syndrome*, Annals of the New York Academy of Sciences, s. 280-284
- [15] FERGUSSON A., et al. *Heterogenity of Celiac Disease: Clinical, pathological, immunological and Genetic*, Annals of the New York Academy of Sciences, s. 112-120
- [16] FRÜHAUF P., et al. *Nové doporučení ESPGHAN pro diagnostiku celiakie*, Pediatrie pro praxi. 2012, roč. 13, č. 3, s. 211-213. ISSN: 1213-0494
- [17] WOODWARD J., *The management of refractory coeliac disease*, Therapeutic Advances in Chronic Disease, 2013, 4 (2) s. 77-90
- [18] MOONEY P., et al. *Treatment Failure in Coeliac Disease: A Practical Guide to Investigation and Treatment of Non-responsive and Refractory Coeliac Disease*, Jurnal Gastrointestin Liver Dis, 2012, roč. 21, č. 2, 197-203
- [19] AESKU SCIENCE – *Official publication of AESKU Diagnostics*, 2005, s.1-23
- [20] FREEMAN H. J., *Colagenous sprue*, Canadian journal of gastroeneterology, 2011, roč. 25, č. 4, s. 189-192
- [21] MAZZARELLA G. et al., *Reintroduction of gluten following flour transamidation in adult celiac patients: a randomized, controlled clinical study*. Clinical and Developmental Immunology, 2012, s. 1-10
- [22] MEGIORNI F., PIZZUTI A. *HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing*. Journal of Biomedical Science, 2012, roč. 19, č.88, s.1-5

- [23] SUGAI E., et. Al. *New serology assays can detect gluten sensitivity among enteropathy patients seronegative for anti-tissue transglutaminase.* Clinical chemistry, 2010, roč. 56, č.4, s.661-664
- [24] VILLALTA D. et al. *IgG antibodies against deamidated gliadin peptides for diagnosis of celiac disease in patients with IgA deficiency.* Clinical Chemistry, 2010, roč. 56, č.3, s. 464-468
- [25] KONING F., *Celiac disease: quantity matters.* Semin Immunopathol, 2012, roč. 34, s. 541-549
- [26] PARIZADE M., et al. *Performace of serology assai for diagnosing celiac disease in a clinicla setting,* Clinical and valine immunology, 2009, s. 1576 – 1582
- [27] UKKOLA A., et al. *Patients' experiences and perceptions of living with coeliac disease – Implications for optimizing care.* J Gatrointestinal Liver Dis, 2012, roč. 21, č.1, s. 17-22
- [28] MUBARAK A., et al. *Tissue transglutaminase levels above 100 U/ml and celiace disease: a prospective study.* World journal of gastroenterology, 2012, roč. 18, č. 32, s. 4399 – 4403
- [29] PICCINI B., et al. *HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease.* Rev Esp Enferm Dig, 2012, roč. 104, č. 5, s. 248-254
- [30] RAUHAVIRTA T., et al. *Epithelial transport and deamidation of gliadin peptides: a role for coeliac disease patient imunoglobulin A.* Clinical & Experimental Immunology, 2010, roč. 164, s. 127-136
- [31] MUÑOZ F., et al. *Enamel defects associated with coeliac disease: putative role of antibodies against gliadin in pathogenesis.* European Journal of Oral Sciences, 2012, roč. 120, č. 2, s. 104-112
- [32] RAIVIO T., et al. *Comparison of a novel whole blood transglutamise-based ELISA with a whole blood rapid antibody test and established*

conventional serological celiac disease assays. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2008, roč. 47, č. 5, s. 562-567

[33] PICHLER J., et al. Feasibility of a Finger prick-based self-testing kit in first and second-degree relatives of children with coeliac disease. World journal of gastroenterology. 2011, roč. 17, č. 14, s. 1840-1843

[34] RAIVIO T., et al. *Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method.* Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2006, roč. 24, č. 1, s. 147-154

[35] <http://www.d-tek.be/pdfs/manual/5.pdf>

[36] <http://www.sekk.cz/terminologie/index.htm>

[37] SWALLOW K., et al. *Quality not quantity for transglutaminase antipody 2: the performance of an endomysial and tissue transglutaminase test in screening coeliac disease remains stable over time.* Clinical & Experimental Immunology. 2013, roč. 171, č. 1, s. 100-106

Příloha – Tabulka č. 4 Naměřené výsledky

pacient č.	EMA	t-Tgt	Gliadin G	Gliadin A	CeliCheck
1	negativní	1,5	9,4	4,0	4,8
2	negativní	2,0	14,2	5,4	7,5
3	negativní	2,0	28,2	5,8	24,0
4	negativní	2,1	27,0	6,6	14,6
5	negativní	2,4	16,5	3,9	6,9
6	negativní	2,4	17,9	8,0	10,7
7	negativní	2,5	50,4	5,9	15,7
8	negativní	2,5	35,5	5,9	26,0
9	negativní	2,5	4,8	13,0	14,0
10	negativní	2,5	62,0	8,2	23,8
11	negativní	2,5	55,6	4,1	9,5
12	negativní	2,5	31,9	4,8	20,9
13	negativní	2,5	8,2	4,4	4,7
14	negativní	2,6	32,3	5,7	7,0
15	negativní	2,6	28,3	4,1	10,0
16	negativní	2,6	103,6	13,4	91,7
17	negativní	2,6	34,5	12,6	17,5
18	negativní	2,6	99,1	4,6	60,0
19	negativní	2,6	27,8	3,6	14,8
20	negativní	2,7	27,9	14,9	21,7
21	negativní	2,7	35,8	4,3	8,9
22	negativní	2,7	10,2	4,3	5,3
23	negativní	2,8	32,2	3,6	33,1
24	negativní	2,8	16,3	7,4	10,1
25	negativní	2,8	3,9	29,8	33,0
26	negativní	2,8	26,6	4,9	9,1
27	negativní	2,9	78,6	18,1	82,8
28	negativní	2,9	70,0	9,3	38,0
29	negativní	3,0	51,1	4,3	10,5
30	negativní	3,0	35,8	4,0	5,5
31	negativní	3,2	18,2	4,9	8,3
32	negativní	3,3	60,7	7,8	28,7
33	negativní	3,3	63,0	12,7	12,6
34	negativní	3,4	28,9	10,2	11,6
35	negativní	3,9	4,2	11,6	14,8
36	negativní	4,3	4,5	11,9	10,2
37	negativní	8,1			7,1
38	negativní	8,2			7,4

39	negativní	8,4			17,3
40	negativní	10,0			4,7
41	negativní	10,3			18,2
42	negativní	40,9			432,0
43	negativní		62,4		32,2
44	negativní		25,6		9,9
45	negativní		36,5		13,6
46	negativní		53,3		12,0
47	negativní		29,8		8,6
48	pozitivní	>100,00			4835,0
49	pozitivní	>100,00			6443,0
50	pozitivní	>100,00			5758,0
51	pozitivní	>100,00			3823,0
52	pozitivní	>100,00			4292,0
53	pozitivní	>100,00			6509,0
54	pozitivní	>100,00			6508,0
55	pozitivní	>100,00			5396,0
56	pozitivní	>100,00			6410,0
57	pozitivní	>100,00			3635,0
58	pozitivní	>100,00	44,0	128,8	5235,0
59	pozitivní	>100,00			6276,0
60	pozitivní	>100,00			4547,0
61	pozitivní	>100,00			3703,0
62	pozitivní	>100,00			4105,0
63	pozitivní	10,9			22,7
64	pozitivní	11,4			27,7
65	pozitivní	11,7			47,6
66	pozitivní	12,1			1380,0
67	pozitivní	13,5			1073,0
68	pozitivní	14,1	26,4	11,3	42,6
69	pozitivní	15,6			39,7
70	pozitivní	16,3			18,1
71	pozitivní	16,4			24,6
72	pozitivní	17,7			59,5
73	pozitivní	17,7			32,5
74	pozitivní	17,7			124,8
75	pozitivní	21,6			50,0
76	pozitivní	25,5	6,2	17,9	29,8
77	pozitivní	25,9			156,0
78	pozitivní	28,1			67,8
79	pozitivní	31,2			64,9
80	pozitivní	37,1			238,0
81	pozitivní	40,4			196,0

82	pozitivní	41,3			588,0
83	pozitivní	41,5			2445,0
84	pozitivní	46,8	31,4	31,9	991,0
85	pozitivní	47,5			245,0
86	pozitivní	49,2	6,3	24,6	65,9
87	pozitivní	55,9			1344,0
88	pozitivní	58,1			237,0
89	pozitivní	59,8			422,0
90	pozitivní	69,6			4438,0
91	pozitivní	75,2			3768,0
92	pozitivní	78,3			5904,0
93	pozitivní	90,2	26,7	34,2	1071,0
94	pozitivní	91,1			4554,0
95	pozitivní	95,0	34,3	39,9	1341,8
96	pozitivní	97,9			4197,0
97	pozitivní	99,4	58,2	91,8	5389,0
98	pozitivní		50,6	122,3	5294,0
99	slabě pozitivní	2,2			9,9
100	slabě pozitivní	4,3			21,1
101	slabě pozitivní	5,9			54,0
102	slabě pozitivní	5,9			17,3
103	slabě pozitivní	6,7			59,0
104	slabě pozitivní	6,7	5,4	4,6	7,5
105	slabě pozitivní	7,2			22,8
106	slabě pozitivní	7,2			89,3
107	slabě pozitivní	7,4			60,0
108	slabě pozitivní	8,0			16,5
109	slabě pozitivní	8,2			9,9
110	slabě pozitivní	8,5			14,9
111	slabě pozitivní	8,7			6,9
112	slabě pozitivní	9,5			19,5
113	slabě pozitivní	9,9			21,8
114	slabě pozitivní	10,0			16,2
115	slabě pozitivní	10,1			19,7
116	slabě pozitivní	10,4			27,7
117	slabě pozitivní	10,6			73,0
118	slabě pozitivní	10,6			37,9
119	slabě pozitivní	10,7			57,5
120	slabě pozitivní	11,2			104,9
121	slabě pozitivní	11,4			69,4
122	slabě pozitivní	11,5			132,0
123	slabě pozitivní	11,7			27,7
124	slabě pozitivní	11,8			9,0

125	slabě pozitivní	11,9			17,3
126	slabě pozitivní	11,9			18,5
127	slabě pozitivní	12,1			51,0
128	slabě pozitivní	12,4			56,4
129	slabě pozitivní	12,7			35,6
130	slabě pozitivní	13,3			14,8
131	slabě pozitivní	14,3			20,6
132	slabě pozitivní	16,7			9,2
133	slabě pozitivní	17,4			36,8
134	slabě pozitivní	20,8	5,2	17,9	25,3
135		2,4	28,4	9,8	6,7
136		2,4	13,5	5,5	8,6
137		2,4	5,6	13,1	11,7
138		2,4	31,4	4,0	8,2
139		2,5	95,1	6,6	31,7
140		2,5	12,9	25,9	24,6
141		2,5	8,1	3,7	5,8
142		2,6	31,0	3,9	8,7
143		2,6	35,5	6,3	29,8
144		2,7	55,9	4,9	21,6
145		2,9	25,5	4,5	9,6
146		2,9	25,4	5,6	14,7
147		2,9	14,3	6,9	6,5
148		3,0	31,9	4,6	11,6
149		3,1	40,2	11,9	114,0
150		3,1	27,5	25,7	27,0
151		3,5	4,6	7,3	8,8
152		3,6	27,9	6,5	8,7
153		3,6	4,7	88,8	111,5
154		5,1	23,5	4,2	9,8
155		10,1			14,1
156		11,3			17,4
157		18,7	14,2	11,3	48,3
158		37,7	9,6	30,2	246,0
159			10,0	4,2	4,7
160			14,8	5,6	7,6
161			61,7	6,4	20,0
162			4,8	4,1	4,2