

MASARYKOVA UNIVERZITA

Lékařská fakulta

Bakalářská práce

2013

Petra ŠTEFELOVÁ

Masarykova univerzita

Lékařská fakulta

CELIAKIE – AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÉ GLIADINEM

Bakalářská práce

v oboru zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Ivo Lochman, CSc.

Autor:

Petra Štefelová

Ostrava, duben 2013

Jméno a příjmení autora: Petra Štefelová

Název bakalářské práce: Celiakie – autoimunitní onemocnění vyvolané gliadinem

Pracoviště: Oddělení imunologie a alergologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě.

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ivo Lochman, CSc.

Rok obhajoby bakalářské práce: 2013

Souhrn:

Tato práce se zabývá problematikou laboratorní diagnostiky celiakie, geneticky podmíněného autoimunitního onemocnění. Udává se, že tímto onemocněním je postiženo 0,5 až 1% populace, přičemž mnozí postižení si toho nejsou často ani vědomi. Cílem práce je popis současných možností laboratorního screeningu tohoto onemocnění, možností využití dalších doplňkových vyšetření a analýza laboratorního screeningu celiakie prováděného na oddělení imunologie a alergologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě.

Klíčová slova:

Celiakie, tkáňová transglutamináza, endomysální protilátky, gliadin, deamidované peptidy gliadinu

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Ivo Lochmana, CSc. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Ostravě dne.....

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu RNDr. Ivovi Lochmanovi, CSc. za jeho cenné náměty, připomínky a zodpovědné vedení této bakalářské práce.

OBSAH

1	Úvod	6
1.1	Popis bakalářské práce	6
1.2	Cíl práce	6
2	Definice celiakie a základní pojmy	7
2.1	Definice celiakie.....	7
2.2	Základní pojmy	7
2.3	Alergie na lepek versus celiakie.....	12
3	Historie, diagnostika a terapie celiakie.....	14
3.1	Historie.....	14
3.2	Lepek a obiloviny.....	15
3.2.1	Lepek	15
3.2.2	Obiloviny	16
3.3	Patogeneze.....	16
3.4	Klinický obraz.....	17
3.4.1	Klinický obraz v dětství.....	17
3.4.2	Klinický obraz převládající v dospělosti	18
3.4.3	Celiakie a její formy	19
3.4.4	Celiakie a její komplikace.....	20
3.5	Genetická podmíněnost celiakie	20
3.5.1	Indikace ke genetickému vyšetření dispozic k celiakii.....	22
3.5.2	Další důležité rizikové faktory pro celiakii.....	22
3.6	Prevalence celiakie.....	24
3.7	Diagnostika celiakie	24
3.7.1	Historie diagnostických kritérií celiakie	24
3.7.2	Screening celiakie	26

3.7.3	Cílové skupiny pro diagnostický screening celiakie.....	27
3.7.4	Vývoj diagnostických metod celiakie.....	29
3.8	Terapie celiakie	34
3.8.1	Efekt kojení a prvního setkání s lepkem.....	36
4	Materiál a metody.....	38
5	Výsledky a diskuse	40
6	Závěr.....	45
7	Literatura	46

1 Úvod

1.1 Popis bakalářské práce

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou chronického (celoživotního) autoimunitního onemocnění – celiakií. Práce je rozdělena do šesti kapitol. Po první úvodní kapitole, v níž je uveden popis a cíl bakalářské práce, následuje kapitola 2, ve které jsou uvedeny základní pojmy usnadňující orientaci v dané problematice. Ve třetí kapitole je podán stručný historický přehled, úloha lepku a obilovin v souvislosti s celiakií, patogeneze, klinický obraz, genetické souvislosti, výskyt celiakie v ČR, její diagnostika a terapie. Čtvrtou kapitolou začíná praktická část práce, popis průběhu diagnostiky celiakie na oddělení imunologie a alergologie ZÚ Ostrava a na ní navazuje pátá kapitola podávající přehled použitých dat, jejich zpracování doplněná diskuzí. Závěrečná šestá kapitola vyhodnocuje, zda bylo dosaženo plánovaného cíle práce.

1.2 Cíl práce

Ověřit výtěžnost laboratorních metod používaných v diagnostice a monitorování průběhu celiakie na oddělení imunologie a alergologie Zdravotního Ústavu se sídlem v Ostravě na datech získaných z laboratorního informačního systému tohoto pracoviště.

2 Definice celiakie a základní pojmy

2.1 Definice celiakie

Celiakie (glutenová enteropatie, celiakální sprue nebo také Geeova-Herterova-Heubnerova choroba) je obvykle definována jako geneticky podmíněné celoživotní autoimunitní chronické onemocnění zahajované na sliznici tenkého střeva (enteropatie), způsobené přecitlivělostí na lepek (resp. jeho peptidické štěpy s typickou sekvencí aminokyselin). Kromě genetické predispozice je k rozvoji celiakie nutná konzumace potravy obsahující prolaminu, které jsou přítomny v pšenici, žitu, ječmeni, ovsu (v pšenici jsou to gliadiny) a nelze rovněž opomenout vliv vnějšího prostředí (viry, stres). Sliznice tenkého střeva může být postižena následnou imunitní reakcí provázenou zvýšeným množstvím intraepiteliálních lymfocytů a hyperplazií Lieberkühnových krypt, která může vyústit až v totální atrofii klků. Důsledkem poškození sliznice tenkého střeva je malabsorpce různého rozsahu, která se promítá do klinického obrazu (Nevoral, Kotalová, 2002).

Ač spouštěna ve střevě, mívá celiakie zvláště u dospělých osob často mimogastrointestinální projevy, a proto bývá považována také za systémové autoimunitní onemocnění (Lochman, 2007; Lochman, 2011)

2.2 Základní pojmy

Transglutaminázy (TG) – jsou ubikvitární enzymy s mnoha funkcemi. Rozlišujeme několik druhů TG, každý je lokalizován v různých částech organismu a souvisí s různými tkáněmi (viz tabulka č. 1).

Mají deamidační a translokázovou aktivitu jako je GTP-ázová aktivita. Hlavní TG v tenkém střevě je TG2 nazývaná také tkáňová transglutamináza (tTG). (Lochman I. et al., 2007)

Tabulka č. 1: Přehled transglutamináz

<i>název</i>	<i>gen</i>	<i>uplatnění</i>
faktor XIII	F13 A1,F13 B	koagulace
transglutamináza keratinocytů	TG1	kůže
tkáňová transglutamináza	TG2	všudypřítomná
transglutamináza kůže	TG3	kůže
transglutamináza prostaty	TG4	prostata
TGM X	TG5	Kůže
TGM Y	TG6	Neznámo
TGM Z	TG7	Plíce

Převzato z (<http://en.wikipedia.org/wiki/Transglutaminase>)

Tkáňová transglutamináza (tTG) – byla popsána jako vlastní antigenní cíl endomysia pro buňky imunitního systému a jimi tvořené protilátky u pacientů postižených celiakií (Dieterich et al., 1997). Tkáňová transglutamináza je transferázou, jejíž systémový název je protein-glutamin:amin- γ -glutamyltransferasa. Je to Ca^{2+} dependentní enzym katalyzující deaminaci glutaminu na glutamát a vede rovněž ke vzniku intramolekulární vazby glutaminu s dalšími primárními aminy, např. lysinem, a k agregaci glutaminových peptidů. (Kocna, 2013 online)

Vazby vytvořené tTG vykazují vysokou rezistenci k proteolytické degradaci. tTG má důležitou roli v buněčné diferenciaci, podílí se aktivně v procesu koagulace, při buněčné apoptóze, ve stabilizaci extracelulární matrix, zároveň je však také autoantigenem u pacientů s celiakií a má přímý vztah v patogenezi tohoto onemocnění. (Kohout, 2008)

Vztah k celiakii spočívá v jeho účasti na deamidaci peptidů gliadinu, kdy ovlivňuje vazbu těchto peptidů na rizikové HLA komplexy u predisponovaných osob. Protilátky proti tTG u celiatiků stimulují tTG transaminační/deamidační aktivitu i více než dvojnásobně, ale snižují na polovinu její GTPázovou aktivitu. Protilátky anti-tTG nacházíme i u jiných onemocnění – zánětlivých, nádorových a neurologických (AdLa-tTG, 2013 online; Lochman, 2011).

Gliadin – je jedna ze základních stavebních složek lepku. Prolamin přítomný v pšenici obsahuje sekvence, vyvolávající vznik protilátek zodpovědných za celiakii. Gliadiny se rozdělují na alfa/beta, gama, omega-2 a omega-5. U celiatiků se uplatňují v patogenezi choroby především sekvenční epitopy alfa/beta gliadinu a u alergiků konformační epitopy omega gliadinu.

Toto uspořádání do jisté míry ovlivňuje termolabilitu i stabilitu k proteolytickému trávení. (Lochman, 2011)

Aminokyselinové složení prolaminů pšenice je typické vysokým obsahem glutaminu (36-45%) a prolinu (14-30%). Naopak mají nízký obsah tryptofanu, kyseliny asparágové, glutamové a bazických aminokyselin. Nízký obsah polárních aminokyselin souvisí s malou rozpustností gliadinu ve vodě. (Hulín a kol., 2008)

Deamidované peptidy gliadinu (DGP) – jsou to negativně nabitě peptidy vznikající účinkem tkáňové transglutaminázy, která specificky deamiduje místa gliadinové molekuly, kde se vyskytuje aminokyselina glutamin její přeměnou na glutamát. DGP se přednostně u geneticky predisponovaných jedinců váží na HLA receptory II. třídy a také receptory T-lymfocytů, a tím navozují autoimunitní reakci s patologickým rozsahem. Mj. se také podílejí na aktivaci B-lymfocytů a na tvorbě protilátek. (AdLa-DGP, 2013 online)

Endomysium – představuje jednu z vazivových vrstev ve svalovině a je přítomno na povrchu svalových vláken spolu s perimysiem a epimysiem. Strukturou je endomysium tenká, jemná vrstva pojivové tkáně, která obklopuje jednotlivá svalová vlákna uvnitř těla. Skládá se z retikulárních vláken, které jsou tvořeny z kolagenu. (wikipedie, endomysium, 2013 online)

Retikulin – bílkovina izolovaná z vláken retikulárních tkání. Protilátky proti retikulinu (anti-ARA) se vyskytují také často u pacientů s celiakií a dříve se také využívaly v diagnostice tohoto onemocnění. Jejich pozitivitu však nacházíme i u jiných gastrointestinálních poruch, revmatických onemocnění a 5% normálních osob a pro nízkou specifčnost se od jejich vyšetřování v souvislosti s celiakií upouští. Prokazují se metodou nepřímé imunofluorescence na vhodných substrátech. (ifcor, 2013 online)

Tenké střevo – hlavní funkcí tenkého střeva je trávení potravy a vstřebávání živin. Tenké střevo je asi 2 m dlouhá trubice, začínající vyústěním ze žaludku jako dvanácterník, pokračuje jako jejunum a do tlustého střeva vyúsťuje jako ileum. Sliznice spolu s vrstvou podslizničního vaziva je složena v příčné kruhovitě řasy a povrch samotné sliznice je rozčleněn ve veliký počet střevních klků. Záhyby mezi klky se prohlubují v Lieberkühnovy krypty. Resorpční epitel je tvořen vrstvou vysokých cylindrických buněk, jejichž povrch je rozčleněn v obrovský počet tenoučkových, dlouhých mikroklků. Přítomnost klků a mikroklků umožňuje mnohonásobné zvětšení povrchu sliznice, nezbytného pro resorpci živin. Mezi enterocyty

resorpčního epitelu jsou roztroušeny buňky pohárkové vylučující hlen, dna Lieberkühnových krypt jsou vystlána jednak Panethovými buňkami produkujícími enzymy peptidázy, lysozomální enzymy a buňkami endokrinními. (Vacek, 1996)

B-lymfocyty – jsou buňky imunitního systému zodpovědné především za specifickou, protilátkami zprostředkovanou imunitní odpověď. Imunitní reakce zprostředkovaná B-lymfocyty je založena na rozpoznání antigenu membránovým antigenně specifickým receptorem B-lymfocytů (anglicky BCR, B-cell receptor). Příslušný B-lymfocyt, na jehož receptorech došlo k vazbě antigenu, je stimulován (pomocí kostimulačních signálů T_H2 buněk) k pomnožení a přeměně na efektorové neboli plazmatické B-lymfocyty. Ty produkují velké množství protilátek stejné specifity jako receptor mateřského B-lymfocytu (jde vlastně o tentýž protein v rozpustné formě), vážou se tedy na stejný antigen a napomáhají tak jeho opsonizaci a umožňují dalším buňkám imunitního systému (např. makrofágům nebo neutrofilům), aby ho snáze našly a pokud možno zneškodnily. (wikipedia, B-lymfocyt, 2013 online)

Imunoglobulin A (IgA) – je jedna z pěti hlavních tříd protilátek (imunoglobulinů) vyskytujících se u člověka. Je ve velké míře uvolňován na povrchu sliznic a významně se podílí na ochraně proti mikroorganismům. Je hlavním imunoglobulinem v slzách, slinách, v mateřském mléce, nachází se v nosním, bronchiálním, střevním, prostatickém, vaginálním sekretu. Tato bílkovina (glykoprotein) je produkována plazmatickými buňkami diferencovanými z B lymfocytů v lymfoidních tkáních. Hlavní funkce IgA je neutralizace antigenů na slizničním povrchu (proces imunitní exkluze). Ve spolupráci s obrannými mechanismy sliznic (hlen, řasinky, peristaltika) jsou komplexy IgA s bakteriálními jedy, mikroorganismy a dalšími potenciálními škodlivými antigeny transportovány ven z organismu. Sekreční IgA je odolný proti působení některých enzymů, takže zabraňuje množení mikroorganismů v tělních sekretech a pomáhá tak chránit organismus proti pronikání cizorodých molekul. Rozlišujeme dva izotopy IgA - IgA1, IgA2. V zažívacím traktu převládá IgA2 a v dýchacím traktu IgA1. Při deficitu IgA mohou jeho funkci vykonávat do určité míry imunoglobulin IgM, v dolních cestách dýchacích pak IgG. Jedinci postižení deficitem produkce IgA nemusí mít klinické příznaky, jsou ale náchylnější k respiračním infekcím, alergiím, autoimunitním a nádorovým chorobám. (wikipedia, Imunoglobulin A, 2013 online)

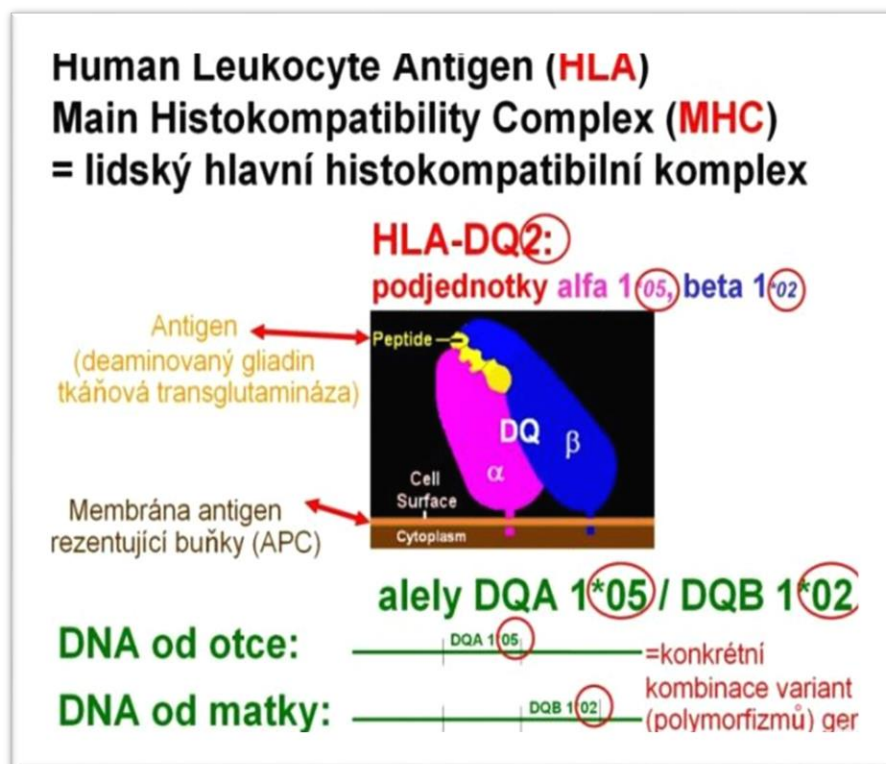
HLA systém – (Human Leukocyte Antigens), hlavní histokompatibilní systém člověka, je obecně označován jako MHC – Major Histokompatibility Complex nebo systém tkáňové slu-

čitelnosti. Má zásadní význam v transplantační medicíně a je rozhodujícím prvkem, který určuje individuální imunologickou reaktivitu. Systém se nachází na krátkém raménku 6. chromosomu a kóduje více než 200 genů, které kódují HLA antigeny (resp. molekuly). Tyto molekuly jsou transmembránové glykoproteiny – heterodimery, jejichž struktura umožňuje vazbu antigenu (peptidu) a kontakt s receptory T- lymfocytů (HLA I, II). Podle své funkce a umístění se geny rozdělují do 3 oblastí: HLA-I, HLA-II, HLA-III. (Penka a kol., 2012)

Geny HLA I. třídy: nejdůležitější jsou umístěny v lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-C. Hlavní produkty těchto genů – antigeny HLA I. třídy jsou exprimovány na všech jaderných buňkách organismu. Jejich důležitou funkcí je prezentace endogenního antigenu CD8 – cytotoxickým T- lymfocytům.

Geny HLA II. třídy: důležité jsou lokusy jsou HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Jejich geny kódují alfa a beta řetězce HLA antigenů II. třídy. Tyto antigeny se nachází především na antigen prezentujících buňkách (B-lymfocyty, monocyty, makrofágy, dendritické a Langerhansovy buňky), ale také na aktivovaných T-lymfocytech a podílejí se na regulaci imunitní odpovědi tím, že prezentují na povrchu APC exogenní peptidy CD4 – pomocným T- lymfocytům (viz obrázek č. 1). (Penka a kol., 2012)

Obrázek č. 1: Schéma molekuly HLA



Převzato z (http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/e-genetika)

Typickou vlastností HLA antigenů je polymorfnost, což znamená, že v místě určitého genu se u jedinců dané populace vyskytují různé varianty, které se označují jako alely. HLA antigeny mají abnormálně velké množství alel, čímž tvoří nejpolymorfnější systém v lidském těle. Biologickým významem a smyslem této obrovské polymorfnosti je zajištění chemické individuality každého jedince, ale i přežití člověka jako biologického druhu v měnících se podmínkách životního prostředí. Určitá skladba HLA antigenů souvisí se zvýšenou náchylností svých nositelů vůči některým chorobám, zatímco naopak jiná kombinace jim poskytuje zvláštní odolnost. Tato úloha HLA antigenů vyplývá z jejich klíčové funkce při rozpoznávání jak cizích, tak vlastních antigenů. Jejich skladba rozhoduje o tom, zda konkrétní jedinec bude na daný antigen odpovídat dostatečnou nebo nedostatečnou imunitní reakcí, zda tato odpověď bude dosti rychlá, aby zabránila vzniku určitého onemocnění, nebo naopak pomalá, vyústující do chronického chorobného stavu, a hlavně zda odpověď bude prospěšná (obrana organismu) nebo škodlivá, poškozující (např. u alergických nebo autoimunitních chorob). Mnohé HLA antigeny se v současnosti pojí se zvýšeným rizikem vzniku některých nemocí. (Penka a kol., 2012)

2.3 Alergie na lepek versus celiakie

Často je celiakie nazývána alergií na lepek, jsou to však rozdílné reakce organismu na lepek.

Pro alergii na lepek je typická reakce I. typu, které se účastní specifické imunoglobuliny IgE. V prvním kroku se musí organismus vnímavého jedince setkat s alergenem – lepkem, resp. jeho alergenními epitopy, a dochází k aktivaci specifických klonů B-lymfocytů, mezi nimi i paměťových B-lymfocytů. Ve druhém kroku, kdy se organismus po prvotní senzibilizaci znovu setká s alergenem, dojde již ke znatelné reakci mediované vyprodukovanými alergen-specifickými IgE. Specifické IgE, které jsou navázané na žírné buňky, tyto buňky aktivují a dojde k vyplavení obsahu granulí těchto buněk, což se projeví typickou alergickou reakcí – vyrážka na kůži, průjem, nadýmání, zvracení, křeče. Reakce nastává během několika minut až hodin. K diagnostice se využívá kožních testů, sérologické vyšetření specifických IgE protilátek nebo buněčných testů, jako jsou basotesty, testy na uvolňování histaminu po stimulaci basofilů periferní krve alergeny nebo RAST testy (radioalergosorbentní testy). U těchto pacientů není až tak striktní nutnost dodržování bezlepkové diety a nedochází k poškození střevní sliznice. (pharmanews, 2013 online; Lochmanová, 2008; Lochman a Lochmanová, 2010)

Na rozdíl od alergie na lepek je celiakie autoimunitní onemocnění, viz podkapitola 2.1, u něhož s odstupem 3 až 6 měsíců dochází k reakci organismu proti vlastním strukturám. Bezlepková dieta je u pacientů postižených celiakií celoživotní, její porušení může mít fatální následky. V diagnostice celiakie se uplatňují sérologické metody, doplněné biopsií, popř. i genetickým vyšetřením. (pharmanews, 2013 online)

3 Historie, diagnostika a terapie celiakie

3.1 Historie

Název *celiakie* pochází z latinského slova *coeliacus*, odvozeného z řeckého *κοιλιακός* (*koiliakós*) "břišní" (wikipedia, celiakie, 2013 online). Přívlastek sprue (celiakální sprue) byl vytvořen v 18. století a je odvozený od holandského slova „sprue“, což znamená aftózní choroba, protože hodně těchto pacientů má aftózní ulcerace v dutině ústní. (Jurgoš a kol., 2006)

Historicky první zmínky o nemocných s podobnými příznaky lze najít již v egyptském či antickém písemnictví. Araetus z Kappadokie ve 2. století našeho letopočtu popsal abdominální příznaky typické pro celiakii. (Gee, 1888)

V roce 1888 Samuel Jones Gee, anglický lékař a pediatr, publikoval první úplný novodobý popis celiakální sprue a předpokládal dietní faktor jakožto důvod onemocnění. (wikipedia, Gee, 2013 online)

V roce 1924 popsal Haas vymizení příznaků onemocnění při podávání přísně banánové diety. (Nevoral, Kotalová, 2002)

V roce 1932 Thaysen popsal onemocnění identické s celiakií u dospělých. (Nevoral, Kotalová, 2002)

V roce 1945 popsal holandský pediatr K. W. Dicke souvislost příznaků nemoci s konzumací obilnin. Jednalo se o zlepšení stavu dětských pacientů s celiakií v průběhu 2. světové války po konzumaci stravy připravené zpracováním mouky z cibulek tulipánů. (Maňásková, 2013a online)

V roce 1950 Dicke ve spolupráci s Kamerem prokázali závislost mezi konzumací bílkovin pšenice a malabsorpcí tuků. (Nevoral, Kotalová, 2002)

V roce 1954 Paulley poprvé popsal slizniční změny na základě vyšetření materiálu získaného z chirurgických resekcí. (Nevoral, Kotalová, 2002)

V roce 1957 sestavil Crosby a Shinerová s Royerem zavedli enterobioptickou kapsli pomocí níž mohly být popsány změny na sliznici tenkého střeva (Maňásková, 2013a online).

V 70. letech byly rozvinuty sérologické metody (viz podkapitola 3.7.4), které se začaly používat jako screeningová vyšetření, vedly k rozpoznání různých klinických forem onemocnění, zjištění prevalence celiakie v populaci a také je to období, kdy se začalo o celiakii mluvit jako o onemocnění autoimunitní povahy. (Nevoral, Kotalová, 2002)

V roce 1986 Howell a kolektiv zjistili, že je celiakie spojena se specifickými DQ haplotypy HLA II. třídy. (Jurgoš a kol., 2006)

Vzhledem k tomu, že se změny na sliznici typické pro celiakii objevovaly i u pacientů bez klasických příznaků v dospělém věku, byly Marshem v roce 1992 poprvé popsány různé stupně postižení sliznice tenkého střeva a začaly být rozeznávány i oligo- i asymptomatická forma celiakie. Klasifikace změn na sliznici provázející pacienty s celiakií byla později (1999) upravena Oberhuberem a naposledy (2005) G. R. Corazzou. (Kohout, 2012)

Celiakie tak na konci 20. století přestala být uváděna jako onemocněním typické pro dětský věk a její diagnostika se tak posunula do praxe lékařů pro dospělé populaci. (Kohout, 2012)

3.2 Lepek a obiloviny

3.2.1 Lepek

Zrno obilovin obsahuje bílkoviny – albumin, globuliny, gluteniny a prolaminy. Gluteniny a prolaminy tvoří lepek (gluten), který je obsažen v endospermu zrna obilnin, kde je spojen se škrobem. Vzhledem k tomu, že je škrob na rozdíl od lepku rozpustný ve vodě, dají se tyto dvě základní součásti obilnin od sebe oddělit. Podle způsobu přípravy pak mají připravený škrob a gluten rozdílnou čistotu. (Kohout, 2008)

Každá obilovina má svoje typické prolaminy – u pšenice se nazývají gliadiny, žito obsahuje hordeiny, ječmen secaliny, oves aveniny, kukuřice zeiny a rýže oryzeiny. (Kohout, 2008)

Pro prolaminy ve všech obilninách je charakteristická zkřížená reaktivita, což je způsobeno jejich společným genetickým původem. (Jurgoš a kol., 2006)

Prolaminy obsahují vysoké množství aminokyselin prolinu a glutaminu a jsou rozpustné jen v silných roztocích alkoholu (70% etanol). Některé z těchto prolaminů, především gliadin, ale taktéž hornin a secalin obsahují sekvence, které vyvolávají vznik protilátek zodpovědných za vznik celiakie. (Kohout, 2008)

3.2.2 Obiloviny

Obiloviny jsou semena jednoletých ušlechtilých travin – čeleď lunicovité (poaceae), podčeleď lipnicokvětých nebo lipnicových (pooideae). Jsou pěstovány pro zrno, které se buď konzumuje vcelku nebo se různým způsobem upravuje. Do této čeledi patří několik rodů, rozdělují se do dvou skupin podle morfologických a fyziologických vlastností. (Kohout, 2008)

Do první skupiny patří pšenice (*Triticum*), žito (*Secale*), ječmen (*Hordeum*), oves (*Avena*) a mezidruhová kříženci (*Triticale* a *Tritordeum*).

Do druhé skupiny patří kukuřice (*Zea*), rýže (*Oryza*), proso (*Panicum*), čirok (*Sorghum*) a pohanka (*Fagopyrum*).

Obilniny z první skupiny obsahují pro vnímavé jedince toxické prolaminy (gliadin, hordein, secalin, případně avenin), jejichž požití může vést k projevům celiakie u geneticky predisponovaných jedinců. (Kohout, 2008).

3.3 Patogeneze

V patogenezi celiakie, podobně jako u jiných autoimunitních chorob, existuje genetická predispozice ke vzniku autoimunitní reakce provázené většinou tvorbou protilátek a spouštěč, který tuto reakci vyvolává. U pacientů s celiakií je spouštěčem lepek, resp. některé části gliadinové molekuly, která je jeho součástí a je složena z peptidů sestávajících se z 8 až 10 aminokyselin. Při průniku těchto peptidů sliznicí tenkého střeva dochází k jejich deamidaci působením tkáňové transglutaminázy na tzv. deamidované gliadinové peptidy (DGP), a poté se v lymfatické tkáni gastrointestinálního traktu (GALT) vážou na povrchové glykoproteiny HLA-DQ2 a HLA-DQ8 pozitivních imunokompetentních buněk (APC-antigen prezentujících buněk). Tímto je spouštěna ve sliznici tenkého střeva buněčná a humorální imunitní odpověď, v jejímž důsledku dochází ke vzniku autoproti látek proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG) a protilátek proti deamidovaným gliadinovým peptidům (anti-DGP). (Kohout, 2012)

Produkci protilátek zajišťují pro tTG a DGP vyselektované B-lymfocyty, které se aktivují v plasmatické buňky, hromadí se v prostorech pod atrofovanou sliznicí a produkují protilátky, které se dostávají do krevního oběhu a ostatních tělních tekutin, kde mohou být detekovány a stanovovány. Pokud přísun lepku v potravě končí nasazením bezlepkové diety, po-

stupně vymírají i klony B-lymfocytů, které produkují protilátky proti tTG a DGP. (Lochman I. et.al., 2007)

Tvorba protilátek a jejich interakce se svými antigeny je prvním krokem zánětlivé reakce a se současným zvýšením aktivity metaloproteáz dochází k poškození sliznice tenkého střeva, kterou tvoří vrstva enterocytů. Poškození nabývá různého rozsahu u různých osob, a to od minimálního postižení sliznice, které zasahuje pouze v rámci úrovně kartáčového lemu enterocytů, až k totální atrofii klků, hypertrofii Lieberkühnových krypt a infiltrací submukózy lymfocyty. (Kohout, 2012)

Za normálních okolností brání kompetentní mezibuněčná těsná spojení průchodu makromolekul (včetně glutenových peptidů) přes střevní bariéru. Glutenem indukovaná nadprodukce zonulinu, střevního peptidu regulujícího těsná mezibuněčná spojení, je alespoň v některých případech odpovědná za patologické zvýšení střevní propustnosti a přestup glutenu do lamina propria, což jsou procesy charakteristické pro časnou fázi celiakie. (Musil, 2013 online)

Zásadní je, že celiakie se neprojevuje a nelze ji prokázat stanovením protilátek anti-tTG a anti-DGP u člověka, který již preventivně, např. z důvodu výskytu celiakie v rodině nebo při pozitivních genetických testech na predispozici k rozvoji celiakie, dodržuje dietu. Chybí zde spouštěč imunopatologického procesu – lepek, nelze tak potvrdit či vyloučit, zda se jedná o opravdového celiaka. (Testline, 2013 online)

V patogenezi celiakie nejsou zanedbatelné ani vnější vlivy, patří zde stres, infekce bakteriální, virová, nemoc, operace, těhotenství, kojení. (Pharmanews, 2013 online)

3.4 Klinický obraz

Celiakie se může projevovat kompletními gastrointestinálními symptomy, ale i extra-intestinálními příznaky. Výjimkou nejsou ani formy oligosymptomatické a asymptomatické. Klinická manifestace se značně odlišuje podle rozsahu a intenzity střevního poškození. (Jurgoš s kol., 2006)

3.4.1 Klinický obraz v dětství

Klasické projevy v dětství nelze přehlédnout – průjem, steatoreu, zvracení, křečové bolesti břicha, které se vyskytují v různém odstupu po ukončení kojení při zavedení lepku do

potravy, nejčastěji v prvním a druhém roce života. Dítě přestává prospívat, může být podrážděné, apatické, s nafouklým bříškem, svalovou slabostí a hypotonií. Kromě průjmu je možná i zácpa. Gastrointestinální symptomy nemusí být tak výrazné, i tak je nutné brát v úvahu u všech dětí, které přestanou prospívat, možnost glutenové enteropatie. (Jurgoš a kol., 2006)

3.4.2 Klinický obraz převládající v dospělosti

- *Gastrointestinální projevy* – průjem, steatoza, flatulence, úbytek hmotnosti.
- *Extraintestinální projevy* – mohou postihovat jakýkoliv orgán, většinou vyplývají z malabsorpce nebo z imunologické reakce, někdy je příčina nejasná, viz dále.
- *Hematologická manifestace* – anémie různého rozsahu, z nedostatku železa, folátu, vitamínu B12, koagulopatie z nedostatku vitamínu K, hyposplenismus s trombocytózou, defektní erytrocyty.
- *Kosterně-svalová manifestace* – jako důsledek poruchy vstřebávání vápníku, vitamínu D, dochází k patologickým zlomeninám, osteopenii, svalovým křečím-tetanie, děti jsou malého vzrůstu s defekty zubní skloviny, deficit draslíku – může doprovázet svalová slabost, bolesti kloubů, artritidy.
- *Neurologická-psychiatrická manifestace* – postihuje centrální i periferní nervový systém, ataxie způsobené imunologickým poškozením cerebella, zadních provazů míšních, periferních nervů, svalová slabost, parastézy, snížená citlivost – polyneuropatie. Změny nálady, iritabilita, deprese.
- *Endokrinní symptomatologie* – opožděná puberta, poruchy fertility (muži i ženy), amenorea, potraty, narození dětí s nízkou porodní hmotností, u mužů abnormální spermiogram. Abnormální hypotalamicko-pituitární regulace gonádových funkcí, hyperparathyreoidismus (defekt vstřebávání vápníku s jeho následnou mobilizací z kostí).
- *Kožně-slizniční manifestace* – rekurentní aftózní stomatitida, dermatitis hepertiformis Dühring, vaskulitidy, folikulární keratóza, petechie, dermatitidy, pigmentace.
- *Další manifestace* – časté jaterní dysfunkce s různou intenzitou projevů, od pouhého zvýšení jaterních transamináz, chronické hepatitidy až po autoimunitní hepatitidy. (Jurgoš a kol., 2006)

3.4.3 Celiakie a její formy

Dle přítomnosti klinických, sérologických a histologických změn rozeznáváme obvykle několik forem celiakie:

- *Klasická forma* – projevuje se typickými střevními příznaky jak u dětí tak dospělých, sérologické testy v rámci screeningu celiakie (anti-tTG, anti-DGP) jsou pozitivní a biopsie tenkého střeva je také pozitivní
- *Atypická* – příznaky jsou netypické, které si pacient ani lékař nemusí spojit s touto nemocí, nebo mohou převládat příznaky přidružených chorob (anemie, osteopenie, alopecie, neplodnost). Při screeningu jsou u těchto pacientů pozitivní protilátky a současně pozitivní střevní biopsie.
- *Asymptomatická (silentní, tichá)* – pacienti s touto bezpříznakovou formou celiakie, často unikají pozornosti, jsou ohroženi postupnými komplikacemi. K odhalení těchto pacientů napomáhá screening rizikových skupin, v němž jsou pozitivní protilátky i střevní biopsie.
- *Latentní (skrytá)* – u pacientů jsou pozitivní sérologické testy, jsou klinických bez příznaků a střevní biopsie je hodnocena jako normální, s možným nálezem zvýšeného počtu gamma/delta lymfocytů v podslizničním vazivu.
- *Potenciální* – tuto formu celiakie můžeme definovat jako zvýšené riziko této nemoci. U pacientů je negativní screening protilátek, nemají klinické příznaky a obraz střevní biopsie je zcela normální až na zvýšený počet gamma/delta lymfocytů v submukóze.
- *Duhringova herpetiformní dermatitida* – projevuje se puchýřkatým ložiskovým postižením kůže, které může i nemusí být provázeno průjmy. Průkaz této formy spočívá v nálezů depozit specifických protilátek v poškozené kůži při odběru kožní tkáně. Při vyšetření biopsie tenkého střeva je typičtější ložiskové postižení. (Kohout, Pavlíčková, 2006)

Rozdíl v typických klinických projevech u dětí a dospělých, je způsoben tím, že transglutaminázy jsou ubikvitární enzymy s vysokou homologií molekul. Protilátky anti-tTG produkované B-lymfocyty, které jsou aktivovány ve střevě, mohou být zapojeny do patologických procesů i v jiných tkáních a orgánech, kde reagují s molekulami TG typickými pro tyto tkáně. U dospělých pacientů s celiakií nejsou protilátky proti gliadinu tak senzitivní a specifické jako protilátky anti-tTG. Naopak u dětí s celiakií jsou častěji pozorovány pozitivní anti-gliadinové a negativní anti-tTG protilátky. (Lochman I. et al., 2007)

3.4.4 Celiakie a její komplikace

Na rozdíl od běžné populace mohou u celiatiků častěji nastat níže uvedené komplikace, vyplývající z chronické imunologické reaktivity na gluten, nutričního deficitu a z opakovaného poškození sliznice tenkého střeva. (Jurgoš a kol., 2006)

- Celiakie je *významná prekanceróza*, příčinou je pravděpodobně oslabení imunitního systému dlouhodobou antigenní stimulací glutenem. Nejčastější malignitou je lymfom T-buněk, adenokarcinom tenkého střeva a karcinom dlaždicového epitelu jícnu.
- *Ulcerózní jejunoileitida* (chronická negranulomatózní ulcerózní enterokolitida).
- *Kolagenová sprue* – histologicky prokazujeme depozita kolagenu v proprii sliznice tenkého střeva.
- *Refrakterní sprue* – (tzv. neklasifikovatelná či nezvládnutelná celiakie), jedná se o symptomatickou těžkou vilózní atrofii tenkého střeva, která se podobá celiakii, ale nereaguje na striktní bezlepkovou dietu trvající alespoň 6 měsíců. (Jurgoš a kol., 2006)

3.5 Genetická podmíněnost celiakie

I když je v patogenezi a genetické podmíněnosti celiakie stále dosti otázek, hlavní genetická predispozice je už známá – jedná se o asociaci k určitým genům pro HLA antigeny II. třídy, které se mapují do oblasti HLA-DR, HLA-DQ. Tyto geny kódují HLA glykoproteiny, jejichž molekulu tvoří alfa a beta řetězce, kombinací těchto řetězců vznikají různé varianty glykoproteinů (různé haplotypy). (Lochman, 2011)

V tabulce č. 2 je uveden přehled nejčastěji detekovaných rizikových HLA alel ve spojitosti s celiakii, s procentuálním zhodnocením četnosti jejich výskytu u pacientů postižených tímto onemocněním. Není rozdíl, je-li heterodimer DQ2 (A1*0501, B1*0201) lokalizován na jednom chromosomu v cis-pozici nebo na dvou homologních chromosomech v trans-pozici. (Celiac Disease, 2013)

Značení v tabulce: při zápisu konkrétní alely postupujeme na základě použité analýzy. Je-li za názvem genetického lokusu hvězdička, první dvojčíslí za ní odpovídá rozlišení na úrovni sérologických metod (low resolution), druhé dvojčíslí určuje specifickou alelu s danou

aminokyselinovou sekvencí za využití metod DNA analýzy (high resolution). (Litzman a kol., 2009)

Tabulka č. 2 : Rizikové HLA alely pro celiakii

molekula HLA II	riziková alela	%
DQ2 (trans)	DQA1*0505	95
	DQB1*0202	
DQ2(cis)	DQA1*0501	95
	DQB1*0201	
DQ8	DQA1*0301	5
	DQB1*0302	

Převzato z (Celiac Disease, 2013)

V tabulce č. 3 jsou uvedeny HLA-DR molekuly, nejčastěji asociované s rizikovými HLA-DQ2, HLA-DQ8 molekulami u pacientů s celiakií. (Celiac Disease, 2013)

Tabulka č. 3

molekula HLA II	riziková alela
DR3	DRB1*0301
DR5	DRB1*11, *12
DR7	DRB1*0701
DR4	DRB1*04

Převzato z (Celiac Disease, 2013)

Riziko vzniku celiakie odpovídá kombinaci určitých HLA haplotypů, přičemž rizikové alely HLA-DQ2 a HLA-DQ8 jsou rozšířeny po celém světě. Prevalence rizikových haplotypů HLA-DQ2 v běžné populaci koreluje s prevalencí celiakie. Přítomnost rizikových haplotypů DQ2 a DQ8 je pro vznik celiakie nezbytná, ale ne dostačující (Lochman, 2011). Riziková alela DQA1*0501/DQB1*0201 (HLA-DQ2) se vyskytuje v populaci ve 20-30%, ale jen u 1% jejích nosičů dochází k rozvoji celiakie. Z tohoto poznatku lze vyvodit, že existují další NON-HLA geny nebo faktory nutné k rozvoji celiakie a screeningový test rizikových HLA antigenů je nevhodný pro vyhledávání potenciálních pacientů. (Muntav, 2009 online)

Dědičnost celiakie je autozomálně dominantní s nekompletní penetrací (nemusí se projevit). Výskyt celiakie mezi příbuznými 1. stupně (dítě, rodič, sourozenec) se udává v 10 až 18 %, mezi jednovaječnými dvojčaty cca 70 až 75 %. (Celiakie a já, 2013 online)

Rizikové HLA alely predisponují pacienty k celiakii tím, že preferenčně prezentují peptidy z glutenu pomocným CD4 T-buňkám lamina propria tenkého střeva. Tyto T-buňky se po rozpoznání glutenových peptidů aktivují a produkují řadu cytokinů, z nichž převažuje interferon gamma. Tím se vyvolává kaskáda zánětlivých reakcí ve střevní stěně, což vede k drobným lézím tenkého střeva. Gluten z potravy obsahuje velké množství epitopů rozpoznávaných T-buňkami a tyto epitopy obsahují velké množství aminokyselin prolinu a glutaminu. Právě vysoký podíl prolinu způsobuje, že tyto peptidy jsou rezistentní na štěpení žaludečními, pankreatickými i intestinálními proteázami. Potrava bohatá na gluten pak zvyšuje množství těchto imunoreaktivních epitopů v tenkém střevě. Současně jsou některé glutaminy z glutenových peptidů katalyticky deamidovány tTG a tato deamidace posiluje jejich imunogenost tím, že se lépe vážou na vazebná místa uvedených HLA proteinů. (testceliakie, 2013 online)

3.5.1 Indikace ke genetickému vyšetření dispozic k celiakii

Jen méně než 0,5% pacientů s celiakií nemá HLA-DQ2 ani HLA-DQ8 rizikové alely. Genetické vyšetření lze tak využít k zamítnutí diagnózy celiakie s vysokou pravděpodobností, protože nepřítomnost rizikových alel HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 vylučuje celiakii z 99%. Genetické vyšetření rizikových alel nepatří mezi rutinní, screeningová vyšetření při podezření na celiakii. Využívá se především tam, kde bychom mohli získat pomocí běžných sérologických testů falešně negativní informaci, zejména u dětí mladších 2 let, u pacientů s prokázanou mírnou enteropatií, na bezlepkové dietě nebo s IgA a IgG deficitem. Toto vyšetření je zvláště efektivní také u osob s pozitivní rodinnou anamnézou. Vyšetření se využívá pro vyloučení diagnózy celiakie v případě nejasného onemocnění. (Maňásková, 2013b online)

3.5.2 Další důležité rizikové faktory pro celiakii

Popisováno je například zvýšené riziko vzniku celiakie pro pacienty s Downovým nebo Turnerovým syndromem, či pro pacienty s jinými autoimunitními chorobami. Je tedy

jasné, že další geny a jejich produkty, které ovlivňují imunitní reakci jako celek, hrají důležitou roli v komplexní patogenezi celiakie. (Šípek, 2013 online)

Vedle HLA genotypu a selektivního deficitu IgA, je dalším genetickým ukazatelem zvýšeného rizika celiakie variantní myosin IXB (MYO9B) vyskytující se v buňkách střevní sliznice. Účastní se remodelace aktinu epitelových enterocytů, což může vést k poškození střevní bariéry. (Lochman I. et al., 2007)

Studie prováděné na orgánových a tkáňových kulturách, doplněné o genetickou analýzu genů HLA I. třídy vedly k navržení dalších mechanismů. Některé peptidy gliadinu, jako např. p31-43, zpomalují inaktivaci receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) a zahajují tak účinek stopového množství EGF na aktin cytoskeletu. (Lochman I. et al., 2007)

Do oblasti HLA genů I. třídy patří také geny rodiny MIC (MHC class I chain-related-genes). Produkty genů MIC-MICA, MIC-MICB jsou transmembránové glykoproteiny, přítomné na epitelových buňkách, zvláště střevní sliznice a na fibroblastech. Podílejí se na rozvoji slizniční imunitní odpovědi (jsou považovány za markery epitelového stresu) a slouží jako ligandy pro receptory (NKG2D) - přirozených zabíječů (natural killers - NK lymfocyty), gama/delta T-lymfocytů a alfa/beta CD8 T-lymfocytů. MIC glykoproteiny nemají schopnost vázat peptidy jako GP HLA I. NK buňky nejsou vybaveny receptory pro specifické antigeny jako např. alfa/beta T-lymfocyty které mají TCR receptory. Také gama/delta T-lymfocyty jsou aktivovány pouze stykem s antigenem bez účasti HLA molekul. Rozpoznání MIC A/B ligand receptory NKG2D vede k aktivaci cytolytických buněk nebo přes cytokiny zprostředkovaných mechanismů efektorových buněk. Tento mechanismus je účasten kontrole nádorovým procesům, virových, bakteriálních infekcí a při rozvoji autoimunitních procesů, které souvisí i s celiakií a vede k destrukci sliznice epitelových buněk. (Penka, 2012; Lochman I. et al., 2007)

Vědci se na modelových organizmech (myši) zabývali úlohou molekuly IL-15 v procesu rozvoje celiakie. IL-15 patří mezi interleukiny, což jsou signální molekuly, které ovlivňují většinu dějů buněčné i protilátkové imunity. Konkrétně v případě IL-15 studie ukázala, že zvýšené hladiny této molekuly výrazně napomohly rozvoji symptomů celiakie u laboratorních myší. Naopak u myší, kde byla aktivita IL-15 zablokována, došlo k výraznému klinickému zlepšení. Přínosem této studie je zejména možné využití poznatků v terapii. Přípravky, které by ovlivňovaly hladinu IL-15, mohou být potenciálně využitelné jako součást léčby celiakie. Komplexnější pochopení patogeneze celiakie na molekulární úrovni nám navíc může napomoci s novými diagnostickými metodami. (DePaolo et al., 2011).

3.6 Prevalence celiakie

Během posledních 15 let se dramaticky změnil pohled na celiakii, což bylo způsobeno zavedením nových sérologických testů s vysokou specificitou i senzitivitou - protilátky proti endomyziu (anti-EMA) a protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG). Prevalence se dříve pohybovala v rozmezí 1:1000 – 1:3000, v současné době je více než dvanásobná. Podstatný rozdíl je způsoben tím, že výskyt byl dříve hodnocen a srovnáván na podkladě klinických příznaků a starších screeningových dat a dnes za pomoci dat získaných současně dostupnou laboratorní diagnostikou. (Memorandum - Celiakální sprue, 2004)

Nyní je celiakie chápána jako častá autoimunitní choroba postihující 0,5 – 2 % obyvatel ve vyspělých zemích. Kvalifikovaný odhad pacientů s celiakií je v ČR 1:200 – 1:250, tj. 40 000 – 50 000 nemocných, ale předpokládá se, že je diagnostikováno a dispenzarizováno jen 10 – 15 % celiaků. (Frič, 2011)

3.7 Diagnostika celiakie

3.7.1 Historie diagnostických kritérií celiakie

První diagnostická kritéria pro průkaz celiakie přijala Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu – ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) v roce 1969, doporučením systému tří biopsií. První biopsie měla demonstrovat strukturální abnormality sliznice tenkého střeva před zahájením diety neobsahující gluten (GFD – gluten free diet), druhá ukazovala viditelnou úpravu při bezlepkové dietě a třetí potvrzovala histologický relaps po zavedení glutenu opět do potravy. (Jurgoš a kol., 2007)

V roce 1990 byla stanovená nová, revidovaná kritéria s omezeným počtem enterobiopsií nutných ke stanovení diagnózy celiakie. Tomuto kroku předcházela řada událostí, zavedení sérologických markerů celiakie (anti-gliadinové protilátky, anti-endomysialní protilátky) do standardní klinické praxe (70. léta), uskutečnění změny výživového systému kojenců (většina evropských zemí v 80. letech) – prolaktační program, posun podávání lepku až od ukončeného 6. měsíce života. (Nevoral, Kotalová, 2002)

Během dalších let pokročila opět sérologická diagnostika a spolu s novými poznatky přispěla k přesvědčení evropských pediatrických gastroenterologů společnosti ESPGHAN o nutnosti revidovat kritéria z roku 1990. Nová kritéria byla publikována v lednu 2012 v časopise JPGN (Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition). (Grebíková a kol., 2012)

Nejnovějších doporučení ESPGHAN (Grebíková a kol., 2012) říkají, jsou-li přítomny klinické příznaky spolu s pozitivním nálezem anti-tTG IgA protilátek (při vyloučení deficitu celkového IgA) je třeba dítě či adolescenta odeslat k dětskému gastroenterologovi. Pokud je hladina těchto protilátek nižší než desetinásobek normy, je doporučováno ověření diagnózy enterobiopsií. Naopak při průkazu jejich desetinásobného zvýšení nad hodnotu normálu, má být tato pozitivita ověřena vyšetřením anti-EMA protilátek (z nově odebraného vzorku krve) a určením HLA typizace. Průkazem přítomnosti rizikových HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 alel a anti-EMA protilátek, je možno potvrdit diagnózu celiakie bez enterobiopsického vyšetření.

Asymptomatictí pacienti patřící do skupin s vysokým rizikem celiakie (viz dále, podkapitola 3.7.3) jsou indikováni k HLA typizaci. Při zjištění predispozice k onemocnění, jsou dále sérologicky vyšetřeni na průkaz anti-tTG IgA a celkového IgA. Hodnota protilátek, která je indikací k enterobiopsii musí být vyšší než trojnásobek normy. Probandi s nižšími sérologickými hodnotami a negativní i tak vyžadují další dispenzarizaci z důvodu možného budoucího rozvoje onemocnění.

V diagnostice dětí (zejména mladších 2 let), mohou napomoci vyšetřované protilátky anti-DGP ve třídě IgG i IgA, jsou-li anti-tTG a anti-EMA negativní, přestože klinické příznaky odpovídají podezření na celiakii. (Grebíková a kol., 2012)

V případech trvající diagnostické nejistoty, zůstává nezbytností expoziční test lepkem. Testu by mělo předcházet vyšetření na přítomnost rizikových alel HLA-DQ2 a HLA-DQ8 a neměl by být indikován u dětí do 5 let věku a v období puberty. Během zátěže lepkem (15g/den) by měla být sledována dynamika tvorby protilátek. Obvykle je považován za dostatečný interval dvou let, relaps se však může objevit i později. (Frühauf a kol., 2012)

Shrnutí doporučení ESPGHAN (leden, 2012), ve formě skórovacího systému je uvedeno v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Orientační skórovací systém pro ověření diagnózy celiakie (pro diagnózu je požadováno dosažení 4 bodů)

Symptomy		Body
	malabsorpční syndrom	2
	klinická suspekce nebo DM1 nebo rodič/sourozenec celiakie	1
	bez symptomů	0
Protilátky*	EMA pozitivní nebo TG 2 > 10×	2
	TG 2 < 10× nebo izolovaně DGP +	1
	sérologie nebyla provedena	0
	protilátky negativní	-1
HLA	HLA-DQ2 nebo -DQ8 heterodiméry +	1
	HLA neprovedeno nebo pouze pozitivita HLA-DQB1*0202	0
	HLA-DQ2/DQ8 negativní	-1
Histologie	Marsh 3b/3c	2
	Marsh 2/3a	1
	Marsh 0/1 nebo biopsie neprovedena	0

*u IgA deficiencie provést hodnocení ve třídě IgG

Převzato z (Frühauf, 2012)

3.7.2 Screening celiakie

Celoživotní charakter celiakální sprue, vícesystémové postižení a závažnost některých komplikací stejně jako nutnost specifického dietního režimu a nižší kvalita života nemocných vytvářejí naléhavou potřebu vhodného screeningového programu. (Novotný, 2008 online)

Po šestiletém jednání schválilo Ministerstvo zdravotnictví metodický pokyn „Cílený screening celiakie“. Jeho text je publikován ve Věstníku MZ-ČR, část 3, z 28. 2. 2011, str. 51-54. (Frič, 2011)

Celiakie naplňuje všechna kritéria stanovená WHO pro onemocnění, která by měla podléhat screeningu (Novotný, 2008 online):

1. *časná diagnóza onemocnění může být obtížná na základě klinické symptomatologie;*
2. *onemocnění je časté a vyvolává významnou nemocnost;*
3. *screeningový test je vysoce specifický a senzitivní;*
4. *léčba onemocnění je dostupná;*
5. *nerozpoznané onemocnění může vyvolat řadu komplikací, které je obtížné léčit.*

V současné době se za racionální považuje screening zaměřený na cílové skupiny, u nichž lze předpokládat vyšší výskyt jedinců s nerozpoznanou celiakií.

3.7.3 Cílové skupiny pro diagnostický screening celiakie

Asymptomatické pacienty vyhledáváme pomocí screeningu (Věstník MZ ČR, metodický pokyn, cílený screening celiakie, článek 1) ve skupině příbuzných pacientů s celiakií (přímých nebo vzdálených), hledá se také mezi pacienty s dalšími autoimunitními chorobami a patří zde i pacienti lékařů jednotlivých specializací s níže uvedenými problémy.

1. Rizikové osoby a nemoci

- příbuzní 1. stupně (rodiče, sourozenci, děti) pacientů s celiakií. Při pozitivitě příbuzného 1. stupně je vhodné uvážit screening i u příbuzného 2. stupně (prarodiče, strýcové, tety), zejména v přítomnosti podezřelého symptomu nebo autoimunitního onemocnění. V rodinách s více postiženými jedinci je vhodné, pokud je první výsledek negativní, opakovat sérologické vyšetření alespoň jednou v intervalu 2–3 let vzhledem k možnosti sérokonverze.
- dermatitis herpetiformis (Duhring)
- anémie nereagující na léčbu preparáty železa (většinou sideropenická)
- předčasná osteoporóza
- terapeuticky rezistentní průjmová forma syndromu dráždivého střeva
- polyneuropatie a myopatie nejasného původu
- ataxie nejasné etiologie
- deprese
- poruchy chování
- amenorea, pozdní menarche
- infertilita a poruchy reprodukce
- Downův a Turnerův syndrom

2. Podezřelé symptomy

- opožděný psychosomatický vývoj
- anémie

- nevysvětlitelný úbytek tělesné hmotnosti
- průjem (3 a více řídkých stolic denně)
- nízké sérové železo
- výrazné izolované zvýšení sérových aminotransferáz (AST, ALT)
- kožní změny (alopecie, vitiligo)
- recidivující aftózní stomatitida
- hypoplazie zubní skloviny
- izolovaný deficit sérového IgA

3. *Přidružené autoimunitní choroby*

Autoimunitní onemocnění se vyskytují u pacientů s celiakií 10–30krát častěji než v ostatní populaci. Dále jsou pak uvedeny pouze častější z nich. Symptomy celiakie mohou být maskovány přidruženou chorobou. Rozpoznání celiakie a zahájení její léčby jsou významné, neboť tento postup může zlepšit terapeutickou kontrolu přidružené nemoci.

Mezi nejčastější autoimunitní onemocnění asociované s celiakií patří:

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

U osob indikovaných ke screeningu se doporučuje dvoustupňové vyšetření.

V **prvním stupni** je provedeno stanovení sérových autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG) v třídě IgA a vyšetření celkového IgA. (uvádí se, že 3 % celiaků má přítomen izolovaný deficit IgA a v těchto případech je třeba vyšetřit autoprotilátky ve třídě IgG).

Pozitivní výsledek anti-tTG ve třídě IgA indikuje pacienty k **druhému stupni** screeningu, tj. perorální biopsii aborálního duodena (pod Vaterovou papilou) na gastroenterologickém pediatrickém pracovišti nebo na oddělení pro dospělé. Při vysoce rizikových symptomech (anemie, úbytek tělesné hmotnosti a průjem, tj. tři a více řídkých stolic denně) se doporučuje odeslat probanda na gastroenterologické pracoviště i při negativní sérologii. (Frič, 2011)

3.7.4 Vývoj diagnostických metod celiakie

V prvním období diagnostiky byla prováděna biopsie tenkého střeva. Pak přišly sérologické metody prokazující nejdříve protilátky proti gliadinu a retikulinu, pak proti endomy-siu a tkáňové transglutamináze, a nejnověji proti deaminovaným peptidům gliadinu. S objevem molekulárních metod bylo jen otázkou času, kdy tyto metody najdou své uplatnění i v diagnostice celiakie.

Biopsie tenkého střeva

Dnes se má používat již jen k doplnění diagnostiky celiakie, při pozitivitě sérologických testů v indikovaných případech.

U dětí provádíme odběr sliznice jejunu pomocí enterobioptické kapsle. Tento druh odběru je preferován, jelikož zde není nutná celková anestezie. U dospělých je preferováno vyšetření endoskopické, které je jednodušší a rychlejší a není při něm u dospělých celková anestezie také vyžadována. Jen v určitých případech vyžaduje toto vyšetření analgosedaci. Výhodou endoskopického vyšetření je možnost odlišení jiných chorob této oblasti. Odběr biopsie se provádí z distálního duodena či proximálního jejunu, vždy pod Vaterovou papilou. Těchto oblastí tenkého střeva spolehlivě dosahuje gastroskopie, na rozdíl od enteroskopie, která je využívána až při podezření na komplikaci celiakie nebo při rozhodnutí pro odběr histologického vzorku z jejunu. (Kohout, 2012)

Při diagnostice celiakie je rozhodující histologický obraz vyšetření sliznice tenkého střeva, který je hodnocen podle Marshe a Oberhubera (viz tabulka č. 5). Také můžeme doplnit histologický obraz o imunohistochemické metody, pomocí kterých zjistíme enzymové deficity tenkého střeva, např. deficit disacharidáz, především laktózy. (Kohout, 2012)

Histochemické metody mají význam také pro porovnání IEL (intraepiteliálních lymfocytů), zjišťuje se poměr CD8 ku CD3 IEL, u nekomplikované celiakie je mezi 50 až 100 %.

Populace IEL s nízkým počtem CD8 lymfocytů je nazývána jako aberantní typ IEL a v 80% jsou tito pacienti ohroženi monoklonální proliferací IEL, kterou je možné ověřit genetickým vyšetřením klonální reorganizace řetězců receptorů T lymfocytů. (Chlumská, 2013 online)

Při sledování pacientů bez komplikací nemusíme opakovat odběr bioptického vzorku, monitorujeme pouze dynamiku tvorby protilátek a opakované endoskopické vyšetření je indikováno pouze v případě podezření na některou z komplikací celiakie (lymfom, refrakterní sprue). (Kohout, 2012)

Histologické vyšetření má především zásadní prognostický význam, umožňuje stanovit závažnost zánětlivých změn a diagnostikovat těžké formy, což poskytuje možnost alespoň do určité míry ovlivnit jejich nepříznivý průběh. (Chlumská, 2013 online)

Tabulka č. 5: Klasifikace celiakie dle histologie

typ klasifikace	Morfologie	IEL/100
Marsh		
0 (preinfiltrativní)	nejsou změny na sliznici, beze změny poměru klků krypt	< 40
1 (infiltrativní)	zvýšený počet IEL	> 40
2 (hyperplastický)	zánět, rozšíření klků a hlubší krypty	> 40
3 (destruktivní)	těžký zánět, atrofické klky, hyperplastické krypty	> 40
Oberhuber		
0	normální sliznice	< 40
1	zvýšený počet IEL, normální nález na sliznici	> 40
2	normální klky, prohloubené krypty, zvýšení IEL	> 40
3	destruktivní typ s různým stupněm atrofie klků, vždy jsou prohloubené krypty a známky zánětu	
3a	parciální atrofie klků (zkrácené, rozšířené, klk/krypta 1:1)	> 40
3b	subtotální atrofie klků (atrofické, ale rozpoznatelné klky)	> 40
3c	totální atrofie klků, sliznice vypadá jako tlusté střevo	> 40
4	atroficko-hypoplastické, plochá sliznice s normální hĺobkou krypt, nízký počet IELs	< 40
Corazza		
A (non-atrofický)	normální architektura typ 0, 1 a 2	> 25
B1 (atrofický)	poměr klky/krypty < 3 : 1 typ 3a, 3b	> 25
B2 (atrofický)	klky nejsou detekovatelné typ 3c, 4	> 25

IEL – intraepiteliální lymfocyty. Převzato z (Kohout, 2012).

Sérologické metody v diagnostice celiakie

Celiakie je provázená přítomností specifických protilátek, prokazatelných v séru celiatiků konzumujících stravu obsahující lepek. Po zahájení bezlepkové diety a jejím řádném dodržování protilátky po určité době ze séra mizí. (Nevoral, Kotalová, 2002)

Význam těchto protilátek je především v relativní jednoduchosti jejich detekce a stanovování, dostupnosti jejich diagnostiky a tím i možnosti jejich využití ve screeningu a monitorování průběhu onemocnění. (Nevoral, Kotalová, 2002)

Protilátky, které stanovujeme u celiatiků lze rozdělit na protilátky proti potravinovému spouštěči onemocnění (gliadin a jeho deamidované peptidy) a protilátky proti tkáňovým strukturám a jejich komponentám (především endomysium a tTG), které jsou autoprotílátkami. Obojí stanovujeme v imunoglobulinových třídách IgA a IgG, avšak větší specifitu k tomuto onemocnění nesou IgA protilátky, a to především tkáňové (viz tabulka č. 6).

Tabulka č. 6: Sérologické markery celiakie – porovnání senzitivity a specifity

Test	senzitivita v %	specifita v %
AGA IgG	57 – 100	42 – 98
AGA IgA	53 – 100	65 – 100
anti-EMA IgA	75 – 98	96 – 100
anti-tTG IgA	98	98
anti-DGP	100	98,5

Převzato z: (Kohout, 2012)

Potravinovými protilátkami jsou anti-gliadinové protilátky (Anti-Gliadin Antibodies – AGA), stanovované od konce 50. let, nyní prokazované ELISA testem, ve třídě IgA i IgG. Titr AGA v séru pacientů s neléčenou celiakií je vysoký, hlavně u kojenců a batolat. V tomto věku je zřejmá pohotovější schopnost tvorby protilátek než u starších dětí a dospělých. Avšak AGA pozitivitu nalézáme i u jiných gastrointestinálních onemocnění, zvláště při zvýšené střevní propustnosti, ale i u zdravých lidí (Nevoral, Kotalová, 2002).

Po několika letech se obrátila pozornost k modifikované frakci gliadinu – deamidovaným gliadinovým peptidům (DGP). Testy využívající tohoto antigenu vykazují mnohem vyšší

senzitivitu a specifitu než testy využívající nemodifikovaný gliadin (AGA). Tato skutečnost je daná tím, že gliadin není z hlediska fylogenetického vývoje člověka a jeho potravinových zdrojů fyziologický substrát pro tTG. Deamidované gliadinové epitopy vykazují pak 400 násobně vyšší afinitu k určitým rizikovým HLA-DQ2 a HLA-DQ8 molekulám přítomných na antigen-prezentujících buňkách vnímavých jedinců než na epitopy nedeamidovaného gliadinu. (Lochman I. et al., 2007)

Tkáňové protilátky byly nejprve vyšetřované v roce 1971. Jednalo se o anti-retikulinové protilátky (ARA) ve třídě IgA i IgG. Byly určované na řezech krysích ledvin nebo jater, metodou nepřímé imunofluorescence. (Nevoral, Kotalová, 2002)

V roce 1983 Chorzelski popsal v sérech pacientů s dermatitis herpetiformis Duhring a u celiatiků pomocí nepřímé imunofluorescence protilátky ve třídě IgA, které se váží k retikulinové komponentě endomyzia hladké svaloviny opičího jícnu a označil je jako anti-endomyziální protilátky – anti-EMA (Binder et al., 2008).

Další významnou substancí tkáňovou transglutaminázu (tTG = TG2) identifikovala Dieterichová v roce 1997 jako součást endomyssia. Metoda ke stanovování anti-tTG je ELISA. (Dieterich et al., 1997)

Principy základních sérologických testů v diagnostice celiakie

Protilátky anti-DGP, anti-tTG a AGA jsou nejčastěji vyšetřovány metodou ELISA.

ELISA test – ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovit v neznámém vzorku koncentraci analytu. Je speciálním případem enzymových imunoanalýz (EIA) – heterogenní EIA. Jako indikátor imunochemické reakce slouží enzym s vysokým číslem přeměny, který je součástí konjugátu.

Na jamku polystyrenové destičky, která je pokryta antigenem, je aplikován vyšetřovaný vzorek. Po inkubaci následuje promytí a aplikace enzymem značeného konjugátu (zvířecí protilátka proti lidskému imunoglobulinu značená enzymem). Po další inkubaci a promytí se aplikuje roztok obsahující substrát pro enzym konjugátu. Následuje další inkubace a zastavení reakce „stop“ roztokem, který zastaví enzymatickou reakci.

Výsledné zabarvení jednotlivých jamek/kyvetek, v nichž analýza probíhá, je měřena spektrofotometricky při dané vlnové délce. Intenzita výsledného zbarvení konečného produktu je úměrná koncentraci hledané protilátky.

Protilátky anti-EMA a ARA jsou detekovány metodou nepřímé imunofluorescence.

Nepřímá imunofluorescence – Tato metoda byla až donedávna považována jako zlatý standard. Na vhodný antigenní substrát různého původu je nejdříve aplikováno vyšetřované sérum s předpokládanými protilátkami. Pokud jsou tyto protilátky přítomny, dojde k jejich vazbě na antigenní struktury substrátu a vytváří se takto imunokomplex – antigen s protilátkou. Po promytí nenavázaných protilátek a proteinů séra je přidán vhodný konjugát (protilátka proti lidské protilátce značená fluorochromem) a po inkubaci, promytí a uzavření krycím sklíčkem lze výsledek reakce odečíst pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pozitivní reakce se projeví fluorescencí struktur nesoucích antigeny, proti nimž byly v séru přítomny hledané protilátky.

Koncentrace celkového imunoglobulinu IgA při podezření na deficit tvorby IgA je stanovována většinou nefelometricky nebo turbidimetricky, v naší laboratoři pak nefelometricky

Nefelometrie – Princip metody využívá precipitace v tekutém prostředí, k níž dochází při reakci antigenu s protilátkou. Vzniklý zákal vytváří precipitát, který je tvořen imunokomplexy antigenu s protilátkou a intenzita zákalu je při konstantním množství přidané protilátky úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

Nefelometrie měří množství světla rozptýleného na částicích precipitátu při průchodu paprsku. Stanovení koncentrace imunoglobulinů ve vzorku je umožněno odečtením z kalibrační křivky, vytvořené za použití standard o známé koncentraci proteinů. Využívá se při tom obvykle počítačového zpracování získaných dat pomocí firemních programů. (Litzman a kol., 2009)

Genetická vyšetření související s diagnostikou celiakie

K průkazu rizikových predispozičních alel HLA-DQ2, HLA-DQ8 se využívá metoda PCR (polymerase chain reaction) s následnou line-blot detekcí.

Princip postupu vyšetření: PCR využívá enzymatické amplifikace fragmentů HLA-DQA1 a HLA-DQB1 genů izolovaných z primárního vzorku lidské krve (odběr do K₃EDTA) pomocí sekvenčně specifických biotinylovaných primerů a cyklického střídání specifických reakčních teplot. Získaný produkt amplifikace je dále typizován enzymaticky značenou reverzně hybridizační reakcí se sekvenčně specifickými probami imobilizovanými na membráně.

Při vyhodnocení je udáván stupeň rizika pro rozvoj celiakie (viz tabulka č. 7).

Tabulka č. 7

riziko	výsledek	slovní hodnocení
nízké	DQ2-/DQ8-	pouze 0,5% pacientů s celiakií
vysoké	DQ2+/DQ8-	95% pacientů s celiakií je DQ2+
vysoké	DQ2+/DQ8+	95% pacientů s celiakií je DQ2+
vysoké	DQ2-/DQ8+	pouze 5% pacientů s celiakií je DQ2-

3.8 Terapie celiakie

Léčba celiakie je na rozdíl od její diagnostiky jednoduchá – celoživotní dodržování bezlepkové diety. Léčba spočívá v odstranění toxických sekvencí prolaminů z diety pacientů s celiakií. Jejich odstranění je možné dvěma způsoby:

1. dieta, při níž jsou vyloučeny obiloviny, které obsahují gluten a všechny výrobky z ní připravené.
2. odstranění toxické sekvence z obilovin, které ji běžně obsahují. To je možné buď genetickou modifikací těchto plodin, nebo speciální přípravou těsta, kdy jsou při kvašení přidávány buď fugální protézy, nebo probiotika. (Kohout, 2008)

Kritéria pro definici bezlepkového výrobku jsou určena vyhláškou Ministerstva zdravotnictví 157/2008 Sb. o potravinách určených pro zvláštní výživu a způsobu jejich použití. (Kohout a kol., 2010)

Jako bezlepkový výrobek je označován ten,

- který obsahuje méně než 1 mg gliadinu ve 100g *přírozně* bezlepkových potravin, což odpovídá 2 mg lepku ve 100g výrobku,
- anebo obsahuje méně než 5 mg gliadinu ve 100g bezlepkových potravin, což odpovídá 10 mg lepku ve 100g výrobku

Dodržování bezlepkové diety dle tohoto zákona znamená konzumaci bezlepkových výrobků s nepatrným obsahem gliadinu. U pacientů s celiakií je i toto malé množství dostačující pro nastartování autoimunitní reakce vedoucí k relapsu onemocnění. (Kohout a kol., 2010)

Proto dle nařízení Komise evropských společenství 41/2009 se označování potravin ve členských zemích změnilo následně:

- ***bezlepkové potraviny***, takto jsou značeny potraviny, které obsahují maximálně 20 mg lepku/kg bez ohledu na jejich výrobu z přírozně bezlepkových surovin nebo obilnin obsahujících lepek
- ***potraviny s velmi nízkým obsahem lepku***, obsahují maximálně 100mg lepku/kg bez ohledu na jejich výrobu z přírozně bezlepkových surovin nebo z obilnin obsahujících lepek

Z tohoto nařízení plyne pro pacienty s celiakií, že bezlepkové potraviny mohou konzumovat volně, ale u potravin s velmi nízkým obsahem lepku by si měli kontrolovat celkový denní příjem lepku v potravě. (Kohout a kol., 2010)

Otázkou škodlivosti lepku v malém množství a jeho dopady na organismus celiatiků se zabývali autoři z Bari (Catassi a spol., 2007). Ti ve své studii (dvojitě slepá, randomizovaná, trvající 90 dní) podávali 49 pacientům kapsle s gliadinem v různých množstvích, 0, 10, 50 mg. Studie vedla ke zjištění, že denní dávka kolem 10 mg gliadinu je ještě plně bezpečná, i přestože u pacientů byly zaznamenány změny na sliznici tenkého střeva, byly však jen dočasné. Dávka kolem 50 mg gliadinu vedla u všech vyšetřovaných pacientů k relapsu onemocnění, projevujícím se prohloubením krypt, snížením klků a zánětlivou infiltrací tenkého střeva v lamina propria. (Kohout a kol., 2010)

3.8.1 Efekt kojení a prvního setkání s lepkiem

Vzhledem ke snižujícímu se počtu typických projevů celiakie v dětském věku a naopak ke zvyšujícímu se počtu pacientů s celiakií diagnostikovaných v dospělém věku, vyskytly se názory, zda osvěta s pozdějším přidáním potravin s lepkiem do dětské výživy skutečně zmenší celkový počet pacientů s celiakií nebo jí takto symptomaticky odloží do dospělého věku. (Kohout, 2008)

Studován byl i efekt kojení v době prvního setkání s lepkiem. Zjistilo se, že pokud je lepek podán dětem, které jsou v té době ještě kojeny, je výrazně snížen počet pacientů s celiakií. (Akobeng AK et al, 2006)

Jinou prospektivní studií, která proběhla u 1560 dětí v letech 1994 až 2004, bylo zjištěno, že přidáním lepku do dětské výživy v prvních třech měsících života, došlo u této skupiny až k pětinasobnému zvýšení počtu pacientů s celiakií ve srovnání se skupinou, kterou byl lepek poprvé přijímán potravou mezi čtvrtým a šestým měsícem života. U další skupiny dětí, kterým byl lepek poprvé přidán až v sedmém a v dalších měsících života, bylo riziko vzniku celiakie opět zvýšeno. (Noris, et al., 2005)

Mateřské mléko každopádně sehrává významnou preventivní úlohu mimo jiné i při ochraně před vznikem celiakie. Mezi možné ochranné mechanismy patří:

- obsah velkého množství látek, mající imunomodulační vliv na střevní sliznici
- bioaktivní látky chrání střevo před gastrointestinálními záněty
- kojené děti přijímají menší množství lepku na kilogram hmotnosti
- do mateřského mléka se dostává malé množství lepku konzumovaného matkou, což pomáhá navodit orální toleranci u dítěte (Mrosková a kol., 2011)

Nelze však zatím říci, zda kojení představuje trvalou ochranu anebo pouze oddaluje rozvoj symptomů onemocnění, resp. vede k mírnějším formám celiakie. (Mrosková a kol., 2011)

Vyloučené výrobky v bezlepkové dietě

Veškeré výrobky z pšenice, ječmene, žita, včetně jejich mezidruhových kříženců, které jsou z těchto obilovin vyrobeny, obsahují jejich příměsí nebo jsou jimi kontaminovány. Zákaz se týká i starších odrůd, jako jednořadová pšenice, pšenice špaldy, kamutu apod.

Dále se jedná o potraviny, ve kterých je pšeničný škrob kontaminovaný lepkem, případně do kterých je lepek dodáván pro svou vlastnost udržení textury výrobku. (Kohout a kol., 2010)

Potraviny pro bezlepkovou dietu

Základem bezlepkové diety jsou brambory, kukuřice, rýže, pohanka, jáhly, amarant (laskavec), Quinoa (merlík chilský), sója a další luštěniny, zelenina a ovoce. Maso je též přirozeně bezlepková potravina. V našich obchodech jsou potraviny pro bezlepkovou dietu označeny mezinárodním symbolem přeškrtnutého klasu. (Kohout, Pavlíčková, 2006)

Mléko a mléčné výrobky nejsou pro střevo postižené celiakií škodlivé, problém nastává pouze u atrofí tenkého střeva vyššího stupně, kdy postižené enterocyty neobsahují enzym laktázu, za normálních okolností štěpící laktózu (mléčný cukr) a tudíž pacienti v tomto stavu mléko nesnášejí. (Kohout a kol., 2010)

4 Materiál a metody

Základní laboratorní screening celiakie na oddělení imunologie a alergologie ZÚ Ostrava v sobě zahrnuje v současné době vyšetření protilátek anti-tTg ve třídě IgA a anti-DGP ve třídě IgG metodou ELISA.

Dále vyšetřujeme v souvislosti s diagnostikou celiakie protilátky proti tTG ve třídě IgG metodou ELISA, endomysiu ve třídě IgA a IgG metodou nepřímé imunofluorescence na řezech opičího jícnu, anti-DGP ve třídě IgA metodou ELISA, celkovou koncentraci imunoglobulinu IgA nefelometricky a protilátky proti nativnímu α -gliadinu (AGA) ve třídě IgA i IgG pomocí ELISA (použitá diagnostika viz tabulka č. 8).

Aktivita destrukčního procesu střevní sliznice způsobovaného celiakií může být monitorována vyšetřováním protilátek proti F-aktinu ve třídě IgA metodou ELISA (Binder WL, 2008). Tento test, který také naše laboratoř nabízí, je však využíván kliniky jen minimálně (v roce 2012 jen 3 požadavky, v letech 2008 – 2019 kolem 30 požadavků ročně).

Tabulka č. 8: Soupravy používané k laboratorní diagnostice celiakie na oddělení imunologie a alergologie ZÚ Ostrava

<i>název testu</i>	<i>výrobce</i>	<i>katalogové číslo</i>
anti-tTG IgA	Quanta Lite®h-tTG IgA Elisa	708760
anti-tTG IgG	Quanta Lite®h-tTG IgA Elisa	708755
anti-EMA IgA	Nova Lite®Monkey Oesophagus IFA Kit	704155
anti-EMA IgG	Nova Lite®Monkey Oesophagus IFA Kit	704155*
anti-DGP IgA	Quanta®Gliadin IgA II Elisa	704525
anti-DGP IgG	Quanta®Gliadin IgG II Elisa	704520
AGA IgA	EIA Gliadin IgA TEST-Line	GIA 096
AGA IgG	EIA Gliadin IgG TEST-Line	GIG 096

*stejná souprava, jiný konjugát IgG kat. číslo 504011

V letech 2006 – 2009 byla pro screeningové vyšetření celiakie používaná na oddělení imunologie a alergologie v Ostravě multiplexová ALBIA metoda soupravami *Quanta Plex Celiac profile IgA* firmy Inova, která zahrnovala vyšetření anti-tTG a anti-DGP ve třídě IgA a současně i screeningové vyšetření koncentrace celkového IgA. Výhodou multiplexových analýz je, že analyty jsou měřeny v jedné reakční nádobce v tomtéž čase. Obecně platí, že multi-

plexové analýzy šetří čas, práci, objem použitého vzorku a jsou levnější než stanovování několika analytů v jednom vzorku klasickými jednoanalytovými metodami (Lochman I. et al., 2007). Bohužel, firma INOVA ALBIA linii v roce 2011 zrušila.

Při srovnání výtěžnosti diagnostiky celiakie byla použita data oddělení imunologie a alergologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, za rok 2012.

Pro analýzu naměřených výsledků jednotlivých vyšetření byly tyto výsledky převedeny do pěti kategorií (viz tabulka č. 9). U ELISA metod byly výsledky převáděny na indexy positivity (IP), tj. poměr naměřené hodnoty vzorku k hraniční (cut off) hodnotě. U metod nepřímé imunofluorescence (anti-endomysialní protilátky) bylo hodnocení prováděno podle doporučení SLI ČSAKI (dostupné na www.sli-csaki.cz).

Tabulka č. 9: Kategorie hodnocení výsledků

hodnocení	kvantitativní metody (IP)	IFA
negativní	< 0,9	není pozorována žádná fluorescence očekávaných struktur
hraniční	0,9 – 1,1	nezřetelná, ale patrná fluorescence očekávaných struktur
slabě pozitivní	> 1,1 – 2	zřetelná, ale slabá fluorescence očekávaných struktur
pozitivní	> 2 – 5	zřetelná, jasná fluorescence očekávaných struktur
silně pozitivní	> 5	velmi silná fluorescence, která může způsobit splývání struktur

5 Výsledky a diskuse

Přehled počtu a výsledku vyšetření se vztahem k diagnostice celiakie provedených na oddělení imunologie a alergologie ZÚ Ostrava je uveden v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10 : Přehled vybraných vyšetření provedených na oddělení imunologie a alergologie ZÚ Ostrava v roce 2012

Hodnocení	anti-DGP IgA		anti-DGP IgG		anti-tTG IgA		anti-tTG IgG	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
negativní	860	93,48	3508	95,2	5306	93,56	1029	97,54
hraniční	11	1,20	30	0,81	57	1,01	1	0,09
sl.pozitivní	13	1,41	46	1,25	95	1,68	10	0,95
pozitivní	24	2,61	72	1,95	110	1,94	11	1,04
sil.pozitivní	12	1,30	29	0,79	103	1,82	4	0,38
celkem	920	100,00	3685	100,00	5671	100,00	1055	100,00

Tabulka č. 10: pokračování

Hodnocení	anti-EMA IgA		anti-EMA IgG		AGA IgA		AGA IgG	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
negativní	2111	94,83	797	97,67	479	91,06	408	77,57
hraniční	6	0,27	2	0,25	14	2,66	17	3,23
sl.pozitivní	23	1,03	8	0,98	21	3,99	59	11,22
pozitivní	86	3,86	9	1,1	7	1,33	39	7,41
sil.pozitivní	-	-	-	-	5	0,95	3	0,57
celkem	2226	100	816	100	526	100	526	100

Při porovnávání shody mezi jednotlivými testy byly dále slabě pozitivní, pozitivní a silně pozitivní výsledky sdruženy do jedné kategorie, a to jako výsledky pozitivní. Hraniční výsledky byly z hodnocení vyloučeny. Všechny zde použité tabulky byly vytvořeny v Excelu a při hodnocení použity statistické metody nabízené tímto programovým vybavením.

Jako screeningové vyšetření na celiakii je na oddělení imunologie a alergologie používána kombinace stanovení anti-tTG ve třídě IgA a anti-DGP ve třídě IgG. Oba tyto testy by měly mít pro celiakii stejnou senzitivitu a specificitu (Kohout, 2012). Neshoda výsledků obou těchto testů může ukazovat navíc na pacienty s IgA deficitem, u nichž vyšetření protilátek ve

třídě IgA musí být doplněno a nahrazeno vyšetřením protilátek ve třídě IgG. Výsledky získané na oddělení imunologie a alergologie v roce 2012 jsou uvedeny v tabulce č. 11. Z tabulky je patrné, že oba testy bykazuji velmi dobrou shodu (96,5%), což odpovídá literárním údajům.

Tabulka č. 11: Srovnání stanovení anti-tTG ve třídě IgA a anti-DGP ve třídě IgG na OIA u vyšetření provedených v roce 2012.

shoda: 96,5% vyloučeno:2,0%		anti-DGP IgG			
		negativní	hraniční	pozitivní	celkem
anti-tTG IgA	negativní	3079	16	40*	3135
	hraniční	33	2	5	40
	pozitivní	74	11	94	179
	celkem	3186	29	139	3354

*při prvotním záchytu je zde doporučováno vyšetřit celkové IgA

Ze 40 pacientů, kteří byli v anti-DGP IgG pozitivní a v anti-tTG IgA negativní, jen u pěti (jednalo se hlavně o předškolní děti) byl při analýze jejich výsledků v databázi oddělení imunologie a alergologie prokázán lehčí deficit IgA tvorby protilátek. Zbylí pacienti byli v minulosti anti-tTG IgA nebo anti-endo IgA pozitivní, jsou však již pravděpodobně na dlouhodobé bezlepkové dietě, a tak IgA protilátky v těchto testech již vymizely, zatímco IgG přetrvávají déle.

Stejně i neshoda v pozitivitě 74 pacientů anti-tTG IgA pozitivních a anti-DGP negativních mohla být způsobena tím, že se jednalo o časná stádia celiakie, v nichž tvorba IgG protilátek nastupuje až po přesmyku z tvorby IgA protilátek.

tTG je součástí endomysia. Endomysium však obsahuje ještě další antigeny, proti nimž se mohou tvořit u pacientů s celiakií protilátky. V zásadě by ovšem vyšetření protilátek proti endomysiu a tTG mělo poskytovat srovnatelné výsledky (Kohout, 2012). Jak to vypadá s diagnostikou a testy provedenými na OIA v r. 2012, přináší tabulce č. 12.

Uvedené výsledky potvrzují vysokou korelaci vyšetření anti-tTG a anti-EMA protilátek v IgA třídě (shoda v 97,62% analýz).

Tabulka č. 12: Srovnání vyšetření anti-tTG a anti-EMA protilátek ve třídě IgA

shoda: 97,62% vyloučeno: 1,44%		anti-tTG IgA			
		negativní	hraniční	pozitivní	celkem
anti-EMA IgA	negativní	1646	19	40	1705
	hraniční	-	3	2	5
	pozitivní	2	2	83	87
	celkem	1648	24	125	1797

Protilátky proti gliadinu, jejichž pozitivitu nalézáme i u jiných gastrointestinálních onemocnění souvisejících se zvýšenou střevní propustností (především potravinových intolerancí), ale i u zdravých lidí (Nevoral, Kotalová, 2002) nejsou již dnes vhodným screeningovým vyšetřením pro celiakii (nahrazeno anti-DGP), na rozdíl od testů anti-tTG jejichž senzitivita a specifita pro celiakii je okolo 98% (Kohout, 2012).

Při porovnání AGA IgA testů s anti-tTG IgA vyšetřených na OIA v roce 2012 (tabulka č. 13) byla jejich shoda poměrně vysoká (91,77%). Za falešně pozitivní z hlediska diagnostiky celiakie bychom měli považovat výsledky 10 pacientů s AGA IgA pozitivitou a anti-tTG IgA negativitou.

Tabulka č. 13: Srovnání shody vyšetření iAGA IgA s testem anti-tTG IgA

shoda: 91,77% vyloučeno: 4,15%		AGA IgA			
		negativní	hraniční	pozitivní	celkem
anti-tTG IgA	negativní	205	4	10	219
	hraniční	2	-	-	2
	pozitivní	9	4	7	20
	celkem	216	8	17	241

Gliadin je prolamin, jehož patogenetické sekvence – negativně nabitě peptidy DGP vznikající účinkem tTG, se přednostně, jak již bylo řečeno, až s 400 násobně větší afinitou váží na HLA II. receptory APC buněk u geneticky predisponovaných jedinců (Lochman I. et al., 2007). Protilátky proti nativnímu gliadinu jsou tak pro diagnostiku celiakie méně specifické.

ké než protilátky anti-DGP. Ověřením této skutečnosti bylo porovnání obou těchto testů ve třídě IgG (tabulka č. 14), kdy nález pozitivita AGA a současná negativita anti-DGP je daleko častější než pozitivita anti-DGP a současná negativita AGA protilátek.

Tabulka č. 14: anti-gliadinové protilátky IgG v porovnání anti-DGP IgG protilátek

shoda: 75,5 % vyloučeno: 4,14%		anti-DGP IgG			
		negativní	hraniční	pozitivní	celkem
AGA IgG	negativní	101	2	4	107
	hraniční	4	-	-	4
	pozitivní	30*	-	4	34
	celkem	135	2	8	145

*dokazuje nespecifitu AGA testu pro diagnostiku celiakie

Do konce 20. století byla celiakie řazena mezi onemocnění dětského věku, to však už neplatí (Kohout, 2012). Při porovnání věku pacientů vyšetřených na OIA v roce 2012, u nichž byl screening celiakie pozitivní (tabulka č. 15), registrujeme největší záchyt u dětí školního věku do postpubertálního období a na druhém místě byla kategorie dospělých skoro dvojnásobně převyšující děti do pěti let.

Tabulka č. 15: Statistika věku pacientů pozit. v rámci screeningu anti-tTG IgA, anti-DGP IgG

věk	počet	%
do 5 let	16	17,02
6 až 20	39	41,49
20 až 50	27	28,72
nad 50	12	12,77
celkem	94	100

Diagnózy pacientů pozitivních v rámci screeningu celiakie (anti-tTG IgA, anti-DGP IgG) za rok 2012 vyšetřených na OIA ZÚ Ostrava, dokreslují rozmanitost projevů tohoto onemocnění (tabulka č. 16).

Tabulka č. 16: Přehled nejčastějších diagnóz u pacientů pozitivních v rámci celiakálního screeningu.

obecná diagnóza	počet	%	specifická diagnóza	počet	%
E	11	11,70	K 900	23	41,07
K	39	41,49	K 30	11	19,64
R	21	22,34	R 104	10	17,86
Z	11	11,70	Z 039	7	12,50
ostatní*	12	12,77	Z 038	5	8,93
celkem	94	100	celkem	56	100

* ostatní diagnózy (D, I, J, L, T)

Jednou z rizikových skupin pro rozvoj celiakie, jsou pacienti s jiným autoimunitním onemocněním, potvrzením je třetí pozice obecné endokrinologické diagnózy (E). Tuto pozici v tabulce č. 16 má také diagnóza, která zahrnuje faktory ovlivňující zdravotní stav (Z).

Na druhém místě jsou pacienti s obecnou diagnózou, pod kterou spadají příznaky, znaky a nálezy nezařazené jinde (R). Můžeme to považovat za další důkaz nespecifity klinických projevů celiakie.

Nejčetnější diagnózy se týkaly nemoci trávicí soustavy (K). Přestože, patří mezi typické projevy celiakie, jejich podíl z celkového součtu činí necelých 42 %.

Pojem „ostatní diagnózy“ (viz tabulka č. 16) zahrnuje: nemoci krve a imunity (D), nemoci oběhové soustavy (I), nemoci dýchací soustavy (J), nemoci kůže a podkožního vaziva (L), poranění, otravy, následky působení vnějších příčin (T).

Popis specifických diagnóz: K900 – celiakie; K30 – dyspepsie; R104 – jiná a neurčená břišní bolest; Z039 – pozorování pro podezření na onemocnění nebo patologický stav, NS; Z038 – pozorování pro podezření na jinou nemoc a patologický stav.

6 Závěr

Analýzou dat pro diagnostiku a monitorování průběhu celiakie, která byla poskytnuta oddělením imunologie a alergologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě z roku 2012, jsem ověřila výtěžnost používané laboratorní diagnostiky a mohu konstatovat, že metody a metodický postup pro diagnostiku celiakie používaný na tomto oddělení poskytuje výsledky odpovídající literárním údajům a lze ho tedy považovat za správný.

7 Literatura

1. Akobeng AK, et al. *Effect of breast feeding on risk of coeliac disease : a systematic review and meta-analysis of observational studies*. Arch Dis Child., 2006 ; 91 (1) : 39-43
2. Binder W. L. et al.: *Celiac Disease Serology with Deamidated Gliadin Peptide (DGP) Assays*. INOVA News, No. 3, 2008.
3. Catassi C. et al.: *A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease*. Am J Clin Nutr. 2007, 85 (1): 160-166
4. *Celiac Disease: Risk Alleles in the HLA-Genes – Typing of DQ2 and DQ8*. Uživatelský manuál pro soupravy RDB2105 AID. 2013.
5. De Paolo R. W. et al., *Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens*. Nature 471, 2011, str. 220-224.
6. Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., et al. *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease*. Nat Med 1997 Jul; 3 (7):797-801.
7. Frič P., *Cílený screening celiakie (metodický pokyn)*. Věstník MZ-ČR, částka 3., 28. 2. 2011, str. 51-54.
8. Frühauf P., Szitányi P., Vyhnánek R.: *Nové doporučení ESPGHAN pro diagnostiku celiakie*. Pediatrie pro praxi, 2012; 13(3): str. 211-213.
9. Grebíková J., Šipková E., Šipka O.: *„Mrňousek po mamince?!“*. Pediatrie pro praxi, 2012; 13(5): 338-341.
10. Hulín P., Dostálek P., Hochel I. : *Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách*. Chem. Listy 2008; 102, str. 327-337.
11. Jurgoš Ľ., Kužela L., Hrušovský Š., a kol. : *Gastroenterológia*. Vydavateľství Slovenskej akadémie vied – VEDA, Bratislava 2006. ISBN 80- 224- 0893-X.

12. Kohout P., *Novinky v bezlepkové dietě*. Interní Med. 2008, 10 (3): 113-116.
13. Kohout P., *Celiakie*. Postgraduální medicína 02/2012, str. 207-210.
14. Kohout P., Rušavý Z., Šerclová Z. : *Vybrané kapitoly z klinické výživy I*. Praha, Maxdorf, 2010, 1. vydání, str. 87 – 96, ISBN 978-80-87250-08-2.
15. Kohout P., Pavlíčková J.: *Celiakie a bezlepková dieta. Dieta a rady lékaře*. Vydavatelství Maxdorf, 2006, 3. vydání, ISBN 80 -7345 – 070 – 4.
16. Lochman I., Martis P., Burlingame R. F., Lochmanová A.: *Multiplex Assays to Diagnose Celiac Disease*. Ann N.Y.Acad.of Sci. Doi, 2007, 1109; 330-337.
17. Lochman I., Kurz IPVZ Praha, 2011. Nепublikováno.
18. Lochman I., Lochmanová A.: *Novinky v laboratorní diagnostice alergie*. Sborník postgraduálního kurzu XXVII. Sjezdu českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, Olomouc, 6. - 9. 10. 2010, Solen, s.r.o., 2010, str. 1-5
19. Lochmanová A.: *Disertační práce*, 2008
20. Mrosková S., Ondriová I., Schlosserová A., *Staronová doporučení prevence celiakie*. Sestra, 02/ 2011.
21. Nevorál J., Kotalová R., *Celiakální sprue (glutensenzitivní enteropatie)*. Postgraduální medicína 01/2002, str. 14-22.
22. Norris JM, et al., *Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction on the diet of infants at increased risk of disease*. JAMA, 2005; 293 (19) : 2343-2351
23. *Memorandum - Celiakální sprue, Současný stav a sociální situace nemocných v České republice*. Vox Pediatrice, 2004, 4, s. 30-31.
24. Penka M., Tesařová E., a kol., *Hematologie a transfuzní lékařství II.*, Transfuzní lékařství. Grada 2012, 1. vydání. ISBN 978-80-247-3460-6.
25. Vacek Zdeněk, *Histologie a histologická technika, 1. část Histologie*. Vydal: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1. vydání, rok 1996, ISBN 80-7013-201-9.

Internetové zdroje

25. AdLa-tTG. *Tkanivová transglutamináza, protilátky třídy IgA (tTG Ab IgA)*. 2011. (staženo 2. 4. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.adla.sk/images/upload/TKANIVOV%20TRANSGLUTAMINZA,%20protitky%20triedy%20IgA%20%28tTG%20Ab%20IgA%29.pdf>
26. AdLa-DGP. *Gliadín deaminovaný, protilátky třídy IgG (DGP-G)*. 2011. (staženo 15. 3. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.adla.sk/images/upload/DGP-G.pdf>
27. Celiakie a já, *Genetické predispozice k celiakii*, březen 2013. (staženo 15. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.celiakieaja.cz/celiakie/geneticke-predispozice-k-celiakii.html>
28. Chlumská A., *Celiakia-histologické nálezy v duodenální sliznici a ich diagnostický význam*. (staženo 20. 3. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.cytopathos.sk/doc/celiakia.pdf>
29. Ifcor. (staženo 15. 1. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: http://www.ifcor.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=97:anti-retikulin&catid=3&Itemid=3
30. Kocna P., (staženo 10. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/glab/gl cs4.htm>
31. Maňásková D., *Genetika celiakie*. 2011. (staženo 10. 2. 2013b) Dostupné online na Word Wide Web: http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/e-genetika
32. Maňásková D., *Historie celiakie*. 2011. (staženo 10. 2. 2013a) Dostupné online na Word Wide Web: http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/b-historie
33. Musil D., *Interní medicína pro praxi, Celiakie – jak uchopit klinického chameleona*. 2004 :6. (staženo 3. 3. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.solen.cz/artkey/int-200406-0015.php>

34. Novotný T., *Celiakie- zanedbatelná nosologická jednotka*. Medical Tribune 3/2008. (staženo 24. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.tribune.cz/clanek/11443>
35. Pharmanews. *Celiakie*. 2007. (staženo 13. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: http://www.pharmanews.cz/2007_03/site/ celiakie.html
36. Šípek A.. *Novinky z patogeneze celiakie*. 2011. (staženo 15. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.gate2biotech.cz /novinky-z-patogeneze-celiakie/>
37. Testceliakie. (staženo 20. 1. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.testceliakie.cz/patogeneze-celiakie.html>
38. Testline. (staženo 12. 1. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://www.test-line.cz/file/988/Gliadin%20letak%20100907.pdf>
39. Wikipedia, B-lymfocyt. (staženo 10. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://cs.wikipedia.org/wiki/B-lymfocyt>
40. Wikipedia, Celiakie. (staženo 10. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Celiakie>
41. Wikipedia, endomysium. (staženo 10. 2. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Endomysium>
42. Wikipedia, Gee. (staženo 3. 3. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: [http://en.wikipedia.org/wiki/Samuel Gee](http://en.wikipedia.org/wiki/Samuel_Gee)
43. Wikipedia, Imunoglobulin A. (staženo 8. 1. 2013) Dostupné online na Word Wide Web: http://cs.wikipedia.org/wiki/Imunoglobulin_A