

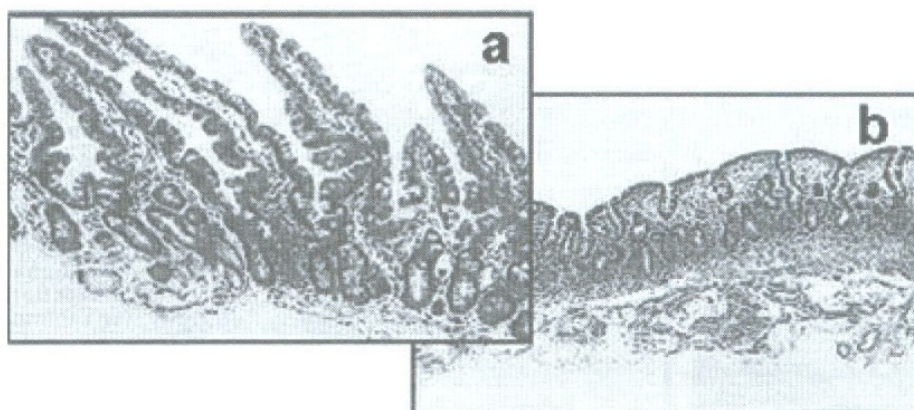
Možnosti laboratorní diagnostiky u pacientů s celiakií

Z. Heřmanová

Celiakie (celiakální sprue, gluten senzitivní enteropatie) je chronické zánětlivé onemocnění sliznice tenkého střeva, které se projevuje různě těžkým malabsorpčním syndromem. Řadí se mezi autoimunitní choroby. Za vznik a rozvoj onemocnění jsou zodpovědné zásobní proteiny pšenice (gliadiny). Gliadiny tvoří heterogenní skupinu bílkovin a jejich další specifikace je odvozena od pohyblivosti jednotlivých frakcí při škrobové gelové elektroforéze.

Vykazují významnou sekvenční homologii s geneticky příbuznými bílkovinami žita, ječmene, ovsa. Společným rysem těchto proteinů jsou opakující se sekvence s vysokým obsahem prolinu a glutaminu. Incidence onemocnění je odhadována až na 1 : 200 v běžné populaci, u osob s přidruženým dalším autoimunitním onemocněním je celiakie téměř 10x častější. Výskyt onemocnění je daleko čtenější než se v minulosti očekávalo, řada pacientů není diagnostikována.

Zánětlivé změny jsou lokalizovány na sliznici v proximální oblasti tenkého střeva. Dochází k vilózní atrofii sliznice, ke ztrátě klků, elongaci krypt a lymfocytární infiltraci postižené sliznice (obr. 1). Genetická predispozice k tomuto onemocnění je dokumentována vysokou incidencí HLA antigenů II. třídy, nejčastěji DQ2, DQ8.



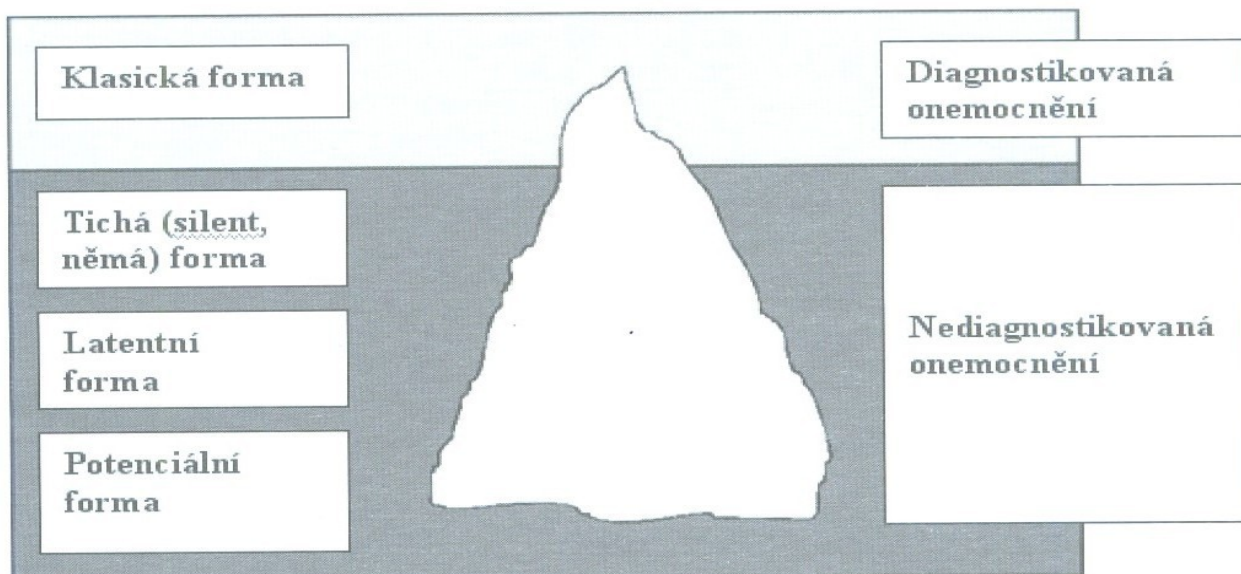
Obr. 1: Sliznice tenkého střeva u zdravého člověka (a) a u pacienta s celiakií (b).

Na základě epidemiologických studií byl definován ledovcový model výskytu celiakie (obr. 2). Jen vrchol ledovce – klasická forma s vyjádřenými klinickými příznaky je běžně diagnostikována. Dále se popisuje forma tichá, latentní a potenciální, které mohou představovat až 80 % případů celiakie. Tichá (silent, němá) forma celiakie je charakterizována patologickými hodnotami sérologických testů, typickými změnami sliznice při enterobiopsii, ale klinický obraz je nevýrazný. U latentní formy zjistíme pozitivní laboratorní testy, ale na sliznici střev nejsou patrné změny. Potenciální forma se uvádí u osob s genetickou predispozicí, tj. HLA DQ2, HLA DQ8 a se zvýšeným počtem intraepiteliálních lymfocytů ve sliznici.

Klinické příznaky jsou značně heterogenní. Onemocnění začíná často v dětství, ale může se manifestovat i v pozdním věku. U dětí jsou v popředí známky neprosívání, hubnutí, opakované nebo dlouhodobé průjmy se steatorhoickou stolicí, nechutenství, plynatost, bolesti břicha, únava, opož-

děný růst, projevy z hypovitaminózy a malnutrice. U dospělých pacientů dominují spíše mimostřevní potíže – anémie, osteoporóza, u žen poruchy fertility. Mohou se souběžně vyskytovat i jiná autoimunitní onemocnění jako diabetes mellitus, tyreoiditidy. Diagnóze mohou unikat zejména tiché a latentní formy onemocnění, při nichž pacienti trpí pouze nespecifickými střevními dyspeptickými obtížemi či bolestmi břicha. Celiakie může mít i neurologické, kožní (dermatitis herpetiformis Dühringi), kardiální, hepatální, slizniční a kloubní projevy. Závažnost nediagnostikované celiakie spočívá v rozvoji malabsorpčního syndromu, poškození dalších orgánů a nebezpečí vzniku lymfomů zažívacího traktu. Při nasazení bezlepkové diety lze onemocnění udržet pod kontrolou, dojde k normalizaci klinického stavu i laboratorních testů.

Jednoznačné **stanovení diagnózy** celiakie je možné pouze biopsií proximální části tenkého střeva. Avšak pro vyhledávací screening, dlouhodobé sledování, k vyšetřování v rámci rodin, k monitorování do-



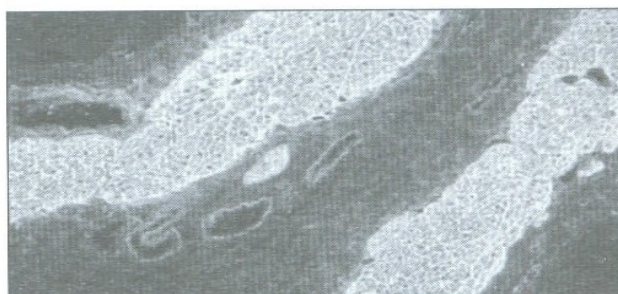
Obr.2: Ledovcový model výskytu celiakie

držování bezlepkové diety jsou k dispozici méně invazivní imunologické laboratorní testy. Krevními testy se stanoví přítomnost protilátek v séru pacientů. V rutinní praxi se nejvíce uplatňuje stanovení endomyziálních protilátek (EMA), protilátek proti tkáňové transglutamináze (atTG) a vyšetření antigliadinových protilátek (AGA). Lze konstatovat, že všechna vyšetření protilátek ve třídě IgA jsou více specifická pro celiakii než vyšetření protilátek ve třídě IgG, neboť imunoglobulin IgA je slizniční protilátka. Vyšetřování protilátek ve třídě IgG je jen doplňkové, ale má význam u pacientů s deficitem IgA. Tento deficit se vyskytuje přibližně u 2 % nemocných s celiakií a může vést k falešně negativním výsledkům testů. Literární údaje udávají u EMA IgA senzitivitu 83 – 95 %, specifitu 94 – 99 %, u atTG IgA senzitivitu 87 – 97 %, specifitu 88 – 98 %, u AGA IgA/IgG senzitivitu 65 – 97 % a specifitu 70 – 95%. Existují i některá speciální biochemická vyšetření, která mohou pomoci v diagnostice celiakie, nejsou však specifická pro dané onemocnění a vždy musí následovat upřesňující vyšetření.

Endomyziální protilátky se stanovují metodou nepřímé imunofluorescence (Obr. 3). Jako substrát se nejčastěji používá opičí jícen, méně lidský pupečník.

Princip metody: k příslušnému substrátu fixovanému na reakčním místě podložního sklíčka se přidá vyšetřovaný naředěný vzorek. Je-li v séru přítomna specifická protilátka, dojde k vytvoření komplexu antigen-protilátka. Po inkubaci a promytí se k ozřejmění reakce na reakční místa nakape sekundární protilátka, obvykle zvířecího původu, která je kon-

jugována s vhodným fluorochromem. Po inkubaci a promytí se přidá montovací médium, přiloží krycí sklíčko a preparát se prohlíží ve fluorescenčním mikroskopu. Pozitivní reakce se projeví fluorescencí struktur exprimujících antigeny, proti nimž byly v séru přítomny protilátky. Endomyzium je tenká vrstva pojivové tkáně, která pokrývá jednotlivá svalová vlákna. Při vyhodnocování reakce je třeba správně určit fluorescenci endomyzia a nezaměnit nále s fluorescencí hladké svaloviny.



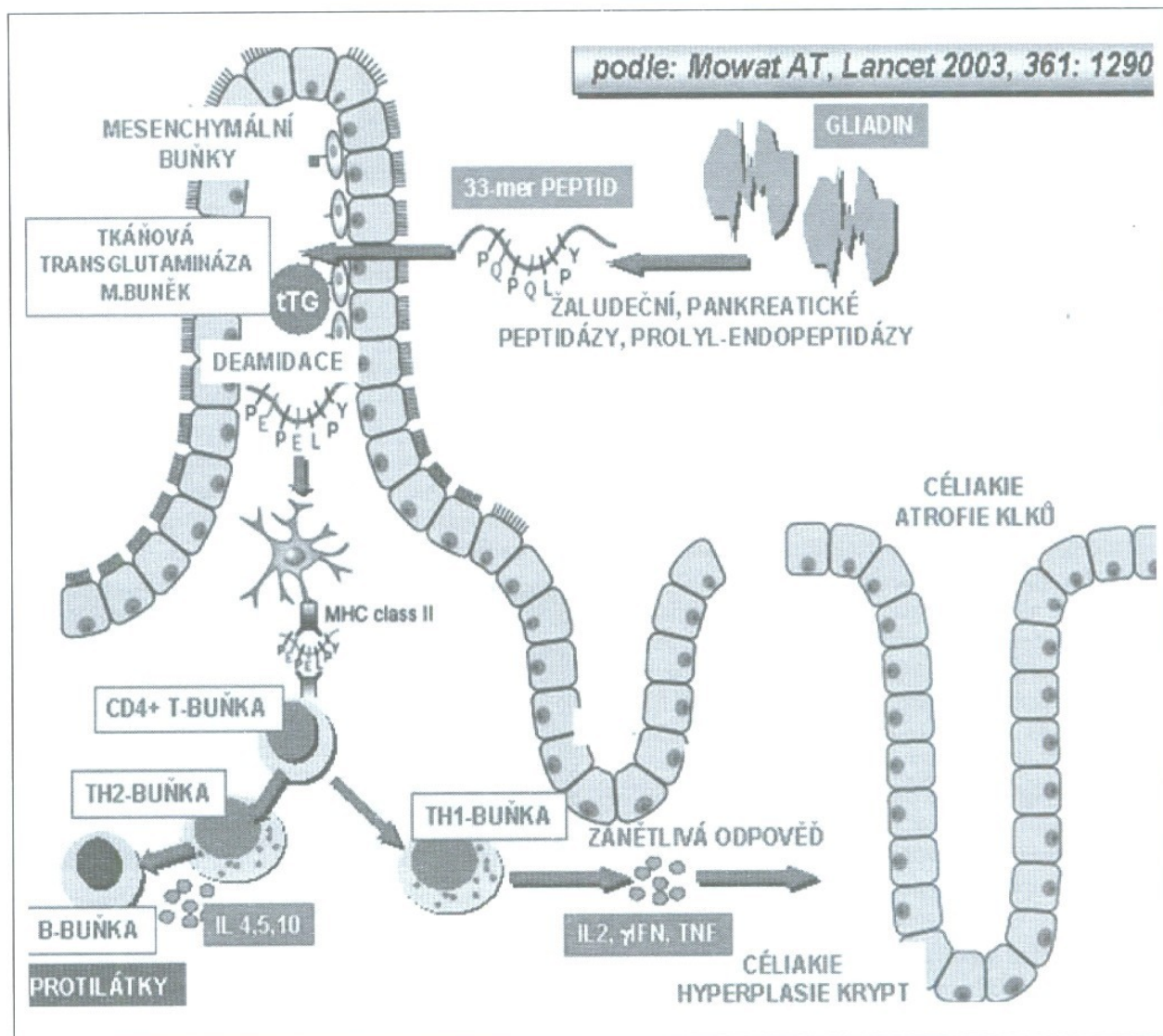
Obr. 3: Endomyziální protilátky (substrát: opičí jícen)

V r. 1997 Dieterichová a kol. identifikovali **tkáňovou transglutaminázu (TG)** jako jeden z hlavních endomyziálních autoantigenů. Je to Ca^{2+} dependentní enzym, katalyzující deaminaci glutaminu na glutamát, rovněž vede ke vzniku intramolekulární vazby glutaminu na další primární amin, např. lysin, a vede k agregaci glutaminových peptidů. Působením TG na gliadin vznikají neoantigeny, které se váží na HLA molekuly a jsou potom následně rozpoznávány T lymfocyty. Vznik nových epitopů enzymatickou modifikací je dalším možným me-

chanismem v procesu narušení tolerance a vzniku autoimunitního onemocnění. U pacientů s celiakií je zvýšená aktivita TG a nacházíme u nich rovněž autoprotilátky proti TG. Obr. 4 znázorňuje působení TG na střevní sliznici.

Stanovení atTG je prováděno klasickou metodou ELISA. V současné době většina diagnostických souprav využívá jako antigen lidskou rekombinantní transglutaminázu. Referenční hodnoty se liší u jednotlivých souprav, většinou je pro protilátky atTG IgA uváděna horní hranice normy 10 - 15 U/ml, některé soupravy definují i tzv. gray-zone v rozsahu

15 - 20 U/ml. Stanovení protilátek atTG s lidským rekombinantním antigenem vykazuje nižší falešnou pozitivitu než dřívější ELISA metody s morčecím antigenem. Princip metody: do jamek mikrotitrační destičky s navázaným antigenem přidáme předředěné vzorky séra, standardy a kontroly. Po inkubaci a promytí pipetujeme konjugát. Po další inkubaci a promytí přidáme bezbarvý substrát. Reakci ukončíme přidáním zastavovacího roztoku. Barevnou změnu substrátu hodnotíme na fotometru. Platí přímá úměra, čím větší koncentrace protilátky ve vzorku, tím intenzivnější zbarvení reakce v jamce.



Obr. 4: Působení TG na střevní sliznici.

Antigliadinové protilátky (AGA) byly v minulosti jediným dostupným imunologickým testem pro celiakii. I když jsou AGA v současnosti nahrazovány stanovením EMA a atTG, zůstávají v nabídce většiny imunologických laboratoří. K průkazu AGA se většinou používá opět ELISA metoda. Specifita

a senzitivita stanovení je závislá na typu použitého antigenu, resp. na způsobu jeho purifikace. AGA jsou produkovány B lymfocyty ve střevní sliznici. Výskyt protilátek ve třídě IgG je poměrně častý, může jít ale o nespecifický nález a být způsoben dietními návyky.

Při bezlepkové dietě klesá hladina více u AGA IgA než u AGA IgG.

Stanovení **antiretikulinových protilátek (ARA)** a **antijejunálních protilátek** se neuplatňuje v rutinní laboratorní diagnostice.

Závěr: celiakie je onemocnění, které se může manifestovat pod různým klinickým obrazem. Protože u pacientů s neléčenou celiakií kromě malabsorpč-

ního syndromu stoupá i riziko vzniku maligního lymfomu GIT, je včasné stanovení diagnózy a nastavení bezlepkové diety velmi důležité. Pro potvrzení celiakie je rozhodující enterobiopsie, ale k širokému screeningu jsou vhodnější neinvazivní imunologické laboratorní metody, které nacházejí své uplatnění v ordinacích různých specialistů.

FONS 2009; 19(4): 32-35