

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Genetické vyšetření predispozice celiakie

Adéla Bláhová

Bakalářská práce

2021

**THE UNIVERZITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL-TECHNOLOGY**

Department of Biological and Biochemical sciences

Genetic predisposition to coeliac disease testing

Adéla Bláhová

Bachelor thesis

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adéla Bláhová**
Osobní číslo: **C18203**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Genetické vyšetření predispozice celiakie**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Vypracovat literární rešerši na zadané téma, rozvést metodické možnosti laboratorní diagnostiky, popsat klinické projevy celiakie a její léčbu, zpracovat přehled alel HLA znaků asociovaných s celiakií a zohlednit moderní možnosti s využitím monitorovací techniky.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Hana Mrňáková**
Katedra porodní asistence a zdravotně sociální práce
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Genetické vyšetření predispozice celiakie**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 7. 2021

Adéla Bláhová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné Ph.D. a paní Mgr. Mrňákové Haně své odborné konzultantce práce za odborné vedení mé bakalářské práce, poskytování cenných rad, ale také za trpělivost a ochotu spolupracovat. Dále bych chtěla poděkovat rodině a svému příteli za podporu a pomoc jak při psaní bakalářské práce, tak po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou celiakie, včetně její diagnostiky. Teoretická část této práce je zaměřena na obecnou charakteristiku tohoto onemocnění, klinické projevy celiakie a jejich řešení. Detailně se teoretická část této práce zaměřuje na možnosti diagnostiky a léčby. Experimentální část této práce je věnována metodám genetického vyšetření predispozic celiakie pomocí určení alel HLA asociovaných celiakii, nejčastěji HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Tato část práce se dále zabývá popisem těchto metod a interpretací výsledků měření jednotlivých vzorků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Celiakie, diagnostika, genetika, predispozice, HLA alela.

TITLE

Genetic Predisposition to Coeliac Disease Testing

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on problematics of coeliac disease including its diagnostics. The theoretical part is dedicated to basic characteristics of the disease, description of clinical manifestation and its solution. In detail, the theoretical part deals with options of diagnostics and the treatment. The aim of experimental methodological part of this thesis is examination of genetics of coeliac disease predisposition by identification of HLA allele. HLA-DQ2 and HLA-DQ8 are most typically associated with the coeliac disease. This part is also involves description of methods and results interpretation.

KEYWORDS

Coeliac disease, diagnostics, genetics, predisposition, HLA allele.

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
TERMINOLOGIE	14
ÚVOD	15
1 CELIAKIE	16
1.2 Charakteristika	16
1.3 Klinické projevy	16
1.3.1 Abdominální projevy	17
1.3.2 Extraabdominální projevy	17
1.4 Historie	18
1.5 Patogeneze	19
1.6 Diagnostika	20
1.7 Screening	21
1.8 Sérologické vyšetření	21
1.9 Bioptické vyšetření	22
1.10 Histologické vyšetření	22
1.10.1 Histologický nález	23
1.11 Marshova klasifikace	24
1.12 Choroby asociované s celiakií	24
1.12.1 Diabetes mellitus 1. typu	24
1.12.2 Duhringova choroba	25
1.12.3 Glutenová ataxie	25
1.13 Komplikace celiakie	25
1.13.1 Refrakterní celiakie (RCD)	25
1.13.2 Nádorové onemocnění	26

1.14	Léčba.....	26
1.15	Výživa.....	27
2	GENETIKA	28
2.1	System HLA	28
2.2	Klasifikace HLA	28
2.3	Dědičnost HLA	29
2.4	Nomenklatura	29
2.5	Asociace s chorobami	31
2.6	HLA ve vztahu k celiakii	31
2.6.1	HLA DQ2 a DQ8.....	33
2.7	Význam genetického vyšetření.....	33
2.8	Genetické vyšetření.....	34
2.9	Metody vyšetření	34
2.9.1	Sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy (SSO)	35
2.9.2	Sekvenčně specifický test primerů (SSP).....	35
2.9.3	PCR v reálném čase (qPCR).....	36
2.9.4	Celiac Gene Screen.....	36
3	METODIKA	37
3.1.1	Vyhodnocení získaných vzorků.....	39
4	ZÁVĚR.....	44
5	POUŽITÁ LITERATURA	45
6	PŘÍLOHY	50

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Celiakální ledovec	17
Obrázek 2: Diagnostický algoritmus celiakie	20
Obrázek 3: Normální histologický nálezn	23
Obrázek 4: Marsh 3b	23
Obrázek 5: Ukázka tvorby názvu HLA	30
Obrázek 6: Chromozóm 6 a lokace genů HLA na krátkém raménku	32
Obrázek 7: Vzorek č. 1, DQ8 pozitivní	39
Obrázek 8: Vyhodnocení vzorku č. 1, alela HLA-DQA1	40
Obrázek 9: Vyhodnocení vzorku č. 1, alela HLA-DQB1	40
Obrázek 10: Vzorek č.2, DQ2.5 pozitivní	40
Obrázek 11: Vyhodnocení vzorku č. 2, alela HLA-DQA1	41
Obrázek 12: Vyhodnocení vzorku č. 2, alela HLA-DQB1	41
Obrázek 13: Vzorek č.3, DQ2.2 a DQ2.5 pozitivní	41
Obrázek 14: Vyhodnocení vzorku č. 3, alela HLA-DQA1	42
Obrázek 15: Vyhodnocení vzorku č. 3, alela HLA-DQB1	42
Obrázek 16: Vzorek č.4, negativní	42
Obrázek 17: Vyhodnocení vzorku č. 4, alela HLA-DQA1	42
Obrázek 18: Vyhodnocení vzorku č. 4, alela HLA-DQB1	43
Obrázek 19: Vzorek č.5, DQ8 a DQ2.5 pozitivní	43
Obrázek 20: Vyhodnocení vzorku č. 5, alela HLA-DQA1	43
Obrázek 21: Vyhodnocení vzorku č. 5, alela HLA-DQB1	43
Tabulka 1: HLA sérotypy patofyziologie celiakie a jejich vztah k HLA haplotypu	33
Tabulka 2: Naprogramované teploty a stanovený čas pro jednotlivé kroky PCR	38
Tabulka 3: Interpretace detekovaných alel ve vztahu k celiakii	39

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

α	Alfa
AGA	Protilátky proti nativnímu gliadinu
Anti-TG2	Protilátka proti rekombinantní humánní tkáňové transglutamináze 2. typu
APC	Antigen prezentující buňka
β	Beta
CCR3	Chemokinový receptor typu 3
CD4+	Označení pro pomocné T-lymfocyty
CD8+	Označení pro cytotoxické T-lymfocyty
CE	Značka shody s legislativou
CELIAC	Genetický predispoziční faktor
cm	Centimetr
CTLA - 4	Protein nacházející se na T buňkách
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
EMA	Endomyziální protilátky
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GIP	Gastrický inhibiční polypeptid
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
HLA	Human Leukocyte Antigens (systém lidských leukocytárních antigenů)
HLA-A	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-B	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-B27	Název konkrétní HLA alely

HLA-C	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-DP	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DQ	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DQA1	Hlavní histokompatibilní komplex třídy II, DQ alfa 1
HLA-DQA1*02:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQA1*03:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQA1*05	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQB1	hlavní histokompatibilní komplex třídy II, DQ beta 1
HLA-DQB1*02	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQB1*02:02	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQB1*02:03	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQB1*03:02	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQB1*03:05	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQ2	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQ2.5	Název konkrétní HLA alely
HLA-DQ8	Název konkrétní HLA alely
HLA-DR	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DR4	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB1*03:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-E	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
HLA-F	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
HUGO	Výbor pro genovou nomenklaturu
IEL	Intraepiteliální lymfocyty
IgA, IgG	Imunoglobulin A, G

IL	Interleukin
IMGT	ImMunoGeneTics project (Imunogenetický projekt)
INF	Interferon
IVD	In vitro diagnostic (diagnostika ve zkumavce, za umělých, laboratorních podmínek)
γ	Gama
ng	Nanogram
mg	Miligram
MHC	Major Histocompatibility Complex (hlavní histokompatibilní komplex)
PCR	Polymerase chain reaction (řetězová polymerázová reakce)
př. n. l.	Před našim letopočtem
qPCR	Quantitative PCR, Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RTG	Rentgen
SSO	Sequence-specific Oligonucleotide (technologie se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami)
SSP	Sequence-specific Primer (PCR se sekvenčně specifickými primery)
stol. n. l.	Století našeho letopočtu
tGA	Antitransglutaminázové protilátky třídy IgA
T1D	Diabetes mellitus 1. typu
TNF	Tumor necrosis factor
μ l	Mikrolitr
V	Volt, jednotka elektrického napětí
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
2q33	Konkrétní chromozomální oblast
5q31–q33	Konkrétní chromozomální oblast
19p13.1	Konkrétní chromozomální oblast

TERMINOLOGIE

<i>Amplifikace</i>	Zmnožení počtu kopií příslušného úseku, amplifikuje se například DNA, jejichž kopie slouží pro další vyšetření
<i>Biopsie</i>	Vyšetření odebraného vzorku živého lidského orgánu nebo tkáně
<i>Denaturace</i>	Změna vlastností látek (hlavně fyzikálních a fyziologických) vedoucí k pozměnění nebo ztrátě jejich přirozených funkcí
<i>Diabetes mellitus</i>	Onemocnění, jež je způsobeno nejčastěji nedostatkem inzulínu nebo jeho malou účinností, nazýváno také jako cukrovka či úplavice cukrová
<i>Diareický</i>	Způsobující průjem, průjmový
<i>Digestivní</i>	Týkající se trávení; trávicí
<i>ESPGHAN</i>	Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu
<i>Gelová elektroforéza</i>	Separáčnická a analyzácká metoda vhodná pro makromolekuly, jež se pohybují v závislosti na jejich velikosti, uspořádání či náboji v gelu
<i>Gen</i>	Základní jednotka dědičné informace uložená v chromozomu, je tvořena úsekem DNA
<i>Haplotyp</i>	Soubor alel na jediném chromozómu, které jsou zděděny společně
<i>Infertilita</i>	Neschopnost donosit plod a porodit živé dítě
<i>Interkalace</i>	Vmezeření určité látky mezi obě vlákna DNA
<i>Predispozice</i>	Skutečnost nebo stav, který usnadňuje vznik určité nemoci, či úrazu
<i>Symptom</i>	Příznak nemoci (Velký lékařský slovník [online])

ÚVOD

Celiakie je velmi časté a závažné celoživotní autoimunitní onemocnění vznikající při konzumaci lepku (glutenu) u geneticky predisponovaných jedinců. Vyskytuje se ve všech regionech světa s přetrvávajícím nárůstem nových počtů nemocných. V posledních letech výskyt onemocnění značně vzrostl a u dětí je to jedno z nejčastějších gastrointestinálních onemocnění. Celiakie se vyznačuje velkou škálou příznaků, z nejčastějších je to průjem, maloabsorpce nebo onemocnění kůže. Při diagnostice se postupuje podle kritérií, které vydává Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii a výživu – ESPGHAN. K potvrzení diagnózy využíváme sérologických testů, biopsie a genetického vyšetření. V dnešní době je možné za určitých podmínek některé kroky vynechat. Velké množství případů bohužel zůstává nedagnostikováno a to z mnoha důvodů, jedním z nich může být, že pacienti klinické příznaky připisují jiným onemocněním a na celiakii nejsou testováni. Základem účinné terapie je časná diagnostika a celoživotní dodržování bezlepkové diety.

Přítomnost haplotypů HLA-DQ2 a HLA-DQ8 asociovaných s onemocněním celiakie, které kódují stejně označené povrchové molekuly antigen – prezentujících buněk, představuje hlavní genetickou predispozici. Typizace HLA probíhá v molekulárních laboratořích jednou z metod polymerázové řetězové reakce. Nepřítomnost obou predisponujících alel HLA-DQ2 a HLA-DQ8 nám prakticky dovoluje onemocnění vyloučit.

1 CELIAKIE

1.1 Charakteristika

Celiakie, neboli glutenová enteropatie či celiakální sprue, je onemocnění střevní sliznice způsobené nesnášenlivostí lepku. Toto onemocnění je známé již z dob antiky. Poprvé celiakii jako moderní onemocnění popsal Samuel Gee, anglický pediatr, v roce 1888. Teprve až později se postupně zjistilo, že působením lepku z obilné mouky na střevní buňku je poškozována sliznice tenkého střeva, a že toto poškození způsobuje příznaky této choroby.

Lepek obsahuje toxické proteinové frakce, mezi které patří gliadiny a gluteniny. Gliadiny obsahují monomerní proteiny a gluteniny obsahují agregované proteiny (Sapone, 2012). U pacientů s celiakií tedy dochází po požití lepku k aktivaci přirozené i nespecifické imunitní odpovědi, následný chronický zánět určuje změny ve struktuře sliznice zahrnující atrofii klků, hyperplazii krypt a infiltraci lymfocytů. Tímto dochází ke ztrátě funkce střevní sliznice a nástupu příznaků. V praxi to probíhá tak, že po požití lepku u pacienta s celiakií tělo zahájí imunitní reakci na napadení tenkého střeva a jeho klků. Se zvyšujícím se počtem poškozených klků tělo obtížněji vstřebává živiny, a pokud nedojde k diagnostice a nasazení léčby, nastávají vážné zdravotní problémy (Ralbovsky, 2020).

Prevalence onemocnění se odhaduje přibližně na 1 % v různých částech světa, avšak dle specializovaného screeningového programu bylo odhaleno, že tato hodnota je ještě vyšší. Prevalence je častější u žen než u mužů v poměru 2:1. Mluví se i o tom, že u mužů je větší riziko, že zůstanou nediodagnostikováni. Je totiž menší pravděpodobnost, že podstoupí biopsii kvůli indikacím, jako jsou průjem, nebo úbytek váhové hmotnosti (Lebwohl, 2020). Celiakie se vyskytuje jak u dětí, tak u dospělých a má řadu různorodých projevů, i to je důvodem proč je stále velké množství nediodagnostikovaných pacientů. Větší riziko rozvoje mají pacienti s diabetem, autoimunitní poruchou, nebo příbuzní jedinců s tímto onemocněním, to je ovlivněno shodným typem HLA. Hlavní léčbou je přísné celoživotní dodržování bezlepkové diety. Neléčená celiakie je predisponujícím faktorem pro nádorová onemocnění, zejména trávicího traktu (Kohout, 1994; Naiyana, 2012; Sciurti, 2018).

1.2 Klinické projevy

Nástup může být postupný se zpožděním měsíců, někdy i let po zavedení lepku do stravy (Sapone, 2012). Mezi typické příznaky u menších dětí se řadí opožděný růst, osifikace, podvýživa, nadmuté břicho, průjemy, hypovitaminóza, nedostatek železa a vápníku. V pubertě

se u dívek může objevit i opožděná menstruace. Dále sem řadíme poruchy vyplývající z těchto příznaků. Velký problém v diagnostice může nastat, když choroba probíhá oligosymptomaticky nebo úplně bezpříznakově. V takovém případě může být objevena až v pozdějším věku. Protože celiakie má velký rozsah klinických příznaků a vysoký výskyt asymptomatických jedinců, je představovaná jako ledovec (viz Obrázek 1).



Obrázek 1: Celiakální ledovec (Převzato a upraveno podle Dolinsek, 2013)

Špička je spojena s klasickými příznaky maloabsorpce živin a největší část ledovce potom odpovídá atypickým, tichým projevům. Hlavní příznaky se dají rozdělit do dvou skupin na abdominální a extraabdominální (Kohout, 1994; Sciurti, 2018).

1.2.1 Abdominální projevy

Do této skupiny řadíme pacienty se známkami a symptomy maloabsorpce, mezi které patří bolesti břicha zhoršující se po jídle a často vedou ke snížení příjmu potravy, nadýmání, objemná někdy kašovitá stolice, průjmy, kručení v břiše či nauzea a zvracení. Tento druh je častější u dětí.

1.2.2 Extraabdominální projevy

V tomto případě pacienti nemají gastrointestinální symptomy. Objevuje se proteinokalorická malnutrice spolu se sníženou hladinou celkové bílkoviny, únavou, slabostí

a poruchou vývoje u dětí. Můžeme pozorovat váhový úbytek, anémii způsobenou nedostatkem železa a kyseliny listové, osteomalacii či osteoporózu, hypovitaminózy, poruchy imunologického rázu spojené se zvýšenou náchylností k infekcím, infertilitu, nebo psychické poruchy, převážně deprese. Častý je i nedostatek střevní laktázy a s tím spojená laktózová intolerance (Kohout, 1994).

Subliknická celiakie je dalším druhem celiakie, má nevýrazné symptomy, které bývají na prahu klinické detekce. Poslední, špatně rozpoznatelná a většinou odhalená až ve stadiu komplikace je celiakie asymptomatická, zachycená většinou screeningem v rizikových skupinách (Frühauf, 2016).

1.3 Historie

V 8. - 10. stol. př. n. l. vznikají civilizační podmínky pro celiakii díky většímu příjmu pšenice a dalších obilovin. Za první historický doklad o úmrtí na celiakii považujeme „případ Cosa“. Tak je nazýván nález kostry mladé ženy v Itálii na nalezišti starořímského sídliště Cosa. Tato žena byla narozena v 1. stol. n. l. v oblasti s velkým množstvím pěstování pšenice. Bylo u ní shledáno množství příznaků naznačujících celiakii. Z těchto příznaků můžeme zmínit anémii, výšku postavy dosahující 140 cm a přítomnost genotypu HLA-DQ2.5.

Celiakii poprvé historicky ve 2. století našeho letopočtu popsal jeden z nejvýznamnějších starověkých lékařů, starořecký lékař Aretaeus z Kappadokie. Nemoc označil jako „koiliakos“, která podle něho spočívá ve vylučování nestrávené potravy stolicí. Za léčbu považoval odpočinek, protiprůjmovou a nenadýmavou dietu. Vyzoroval, že choroba se častěji vyskytuje u žen, a může ustoupit a poté se znovu navrátit.

Za první moderní popis celiakie je považována publikace Samuela Jonese Gee z roku 1888. Sám Samuel Gee popisuje celiakii jako chronickou poruchu trávení, která se vyvíjí postupně, pacient při ní hubne, bledne. Domníval se, že příčinou mohou být dietní zvyklosti, proto doporučuje dietní opatření. Dokonce sám nevědomky popisuje zlepšení při bezlepkové dietě. Vypráví příběh dítěte, jehož zdravotní stav se zlepšil po sezóně, při které se stravuje jen holandskými mušlemi. Roku 1908 přichází americký lékař Christian Archibald Herter s tehdy uznávanou teorií, že původem nemoci je zánět tenkého střeva způsobený abnormální odolností, nebo přerůstáním grampozitivních bakterií (*Bacillus bifidus*). Onemocnění nazýval jako „intestinal infantilism“. Celiakie v té době začala být označována jako „Geeova – Herterova choroba“. Sám pozoroval, že onemocnění je doprovázeno zpomalením růstu. Zkoumal

i tolerování stravy u nemocných, kde zjistil, že jsou dobře snášeny proteiny, hůře tuky a nejhůře sacharidy.

Roku 1918 začíná být celiakie označována za digestivní onemocnění, při kterém se zvětšují potíže po požití škrobu obsaženém v chlebu. Později se začíná zjišťovat, že onemocnění se může vyskytovat i bez průjmů a začíná se dělit na diareický a nediareický typ. Dalším posunem byla banánová dieta, se kterou přišel pediatr Sidney Valentine Haas, který takto léčil 8 dětí. Za problematické považoval škroby a sacharidy. Doporučoval dietu s vyloučením chleba, cereálií, ale i brambor, s konzumací 4 až 8 banánů denně. Toto přesvědčení o banánové dietě plynulo z jeho pozorování v Portoriku. Místní obyvatelé měst tam trpěli průjmy, zatímco farmáři, kteří se stravovali převážně banány, je neměli (Hoffmanová, 2019).

1.4 Patogeneze

U geneticky predisponovaných jedinců je celiakie patřící do střevních enteropatií vyvolaná požitím gliadinu a dalších příbuzných prolaminů. Gliadinové peptidy jsou rezistentní vůči gastrointestinálním enzymům, mají škodlivé účinky a také aminokyselinové sekvence specifické pro hlavní komplex histokompatibility třídy II HLA-DQ2, navíc ovlivňují střevní propustnost (Naiyana, 2012).

I když je patogeneze onemocnění známá, k vysvětlení nástupu onemocnění nestačí jen genetická predispozice a spotřeba lepku. HLA DQ2/DQ8 je přítomna u 30 – 40 % běžné populace, avšak celiakie postihuje 1 – 1,5 % lidí celosvětově. Předpokládá se tedy, že vznik celiakie může vyvolat více faktorů. Jak genetické predispozice, tak environmentální faktory, infekce, užívání antibiotik v kojeneckém věku, výživa nebo změny střevní mikroflóry (Caio, 2020).

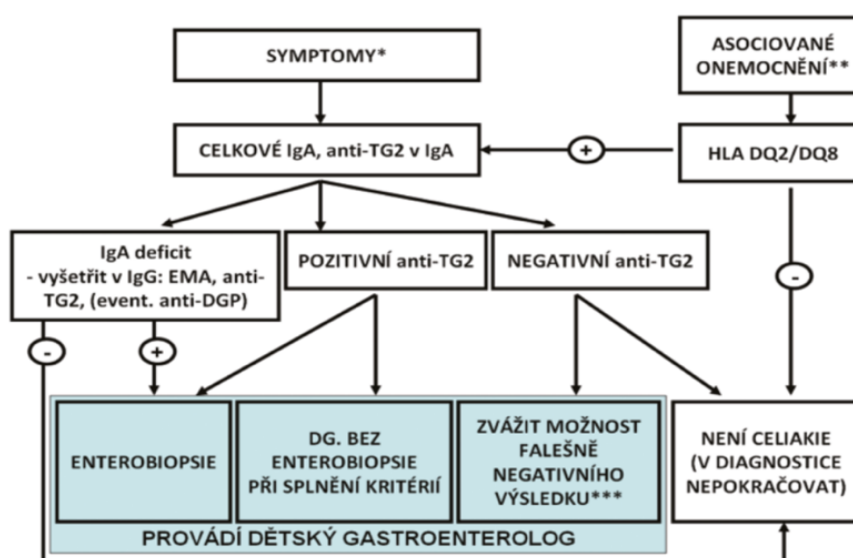
Jako jeden z faktorů je považován i věk při zavedení lepku, ale názory se u něho velmi liší. Dlouho se doporučovalo zavádět lepek až po ukončení 6. měsíce, v poslední době se doporučuje zavést lepek do stravy nejpozději v 6. měsíce. Můžeme se setkat i s názorem, že kvůli imunologické toleranci by měl být lepek zaváděn již po ukončení 4. měsíce (Králová, 2015). Celiakie se běžně vyskytuje v dětství se závažnými příznaky včetně chronického průjmu. Příznaky se mohou vyvinout i v pozdějším věku, kdy zahrnují úbytky na váze v důsledku maloabsorpce nebo anémie. Jedná se o celoživotní onemocnění, pokud by bylo neléčeno, je spojováno s větší nemocností a mortalitou (Naiyana, 2012).

1.5 Diagnostika

Ještě před 40 lety byla diagnóza celiakie považována za velmi vzácnou. Se zavedením specifických sérologických testů protilátek proti tkáňové transglutamináze a endomysinu se ukázalo, že existuje velké množství pacientů bez příznaků (Latta, 2012).

Diagnóza je založena na přítomnosti predisponujícího genetického faktoru lidského leukocytového antigenu HLA DQ2/DQ8 s pozitivní biopsií a sérologickými protilátkami při normálním stravování bez vynechání lepku (Naiyana, 2012). Schéma algoritmu u diagnostiky celiakie si můžeme prohlédnout na Obrázku 2.

Vzhledem k tomu, že celiakie byla dlouhou dobu problematikou především dětského lékařství, postupujeme podle kritérií, která byla určena Evropskou společností pro dětskou gastroenterologii a výživu – ESPGHAN. Kritéria pro dospělé se nijak neliší (Kohout, 2006). Roku 2012 ESPGHAN zavedla možnost vynechání biopsie u dětí splňujících konkrétní podmínky. Tyto podmínky dále aktualizovala, a od roku 2019 rozšířila kritéria, při kterých je možné u rizikových skupin a dětí se souhlasem rodičů vynechat biopsii. Platí, že tGA IgA musí být ≥ 10 násobku horní hranice normálních hodnot a EMA IgA musí mít pozitivní test ve druhém krevním vzorku. Nově mezi povinná kritéria pro sérologickou diagnózu bez biopsie není zařazeno testování lidského leukocytového antigenu DQ2/DQ8 a přítomnost příznaků. Vzhledem k tomu, že s pozdní diagnózou stoupá riziko rozvoje autoimunitních onemocnění, je včasná diagnostika důležitým krokem k zabráněním výskytu závažnějších onemocnění. (Husby, 2020; Shaun, 2020; Ralbovsky 2020).



Obrázek 2: Diagnostický algoritmus celiakie (Převzato od Frühauf, 2016)

Z důvodu velké rozmanitosti v diagnostice celiakie lze jako potvrzovací metodu využít pravidlo „čtyři z pěti“. Diagnóza může být potvrzena, pokud jsou alespoň čtyři z následujících kritérií splněna:

- typické příznaky celiakie,
- pozitivní autoprotilátky třídy IgA v séru,
- pozitivní HLA-DQ2 a nebo HLA-DQ8,
- nalezená enteropatie při biopsii tenkého střeva spojená s celiakií,
- odpověď na bezlepkovou dietu (Sapone, 2012).

1.6 Screening

Screening se vykonává za pomoci odběru protilátek typických pro celiakii. Jedny z nich jsou protilátky proti tkáňové transglutamináze, což je enzym, který se vytváří v enterocytech. Provádí se u příbuzných pacientů s celiakií, pacientů s chorobami častěji se vyskytujícími s celiakií jako je inzulindependentní diabetes mellitus, autoimunitní tyreoiditida, Bergerova IgA nefropatie, biliární cirhóza, či u pacientů s Downovým syndromem.

Dále se provádí u pacientů s typickými příznaky pro celiakii. Mezi ně můžeme zařadit jinak nevysvětlený váhový úbytek, bolesti břicha, anémii, osteoporózu či mužskou a ženskou neplodnost (Kohout, 2006).

V roce 2011 vzešel v České republice v platnost pokyn pro dvoustupňový screening, který je cílený na skupiny, u nichž se očekává vyšší riziko nediodagnostikované celiakie. První stupeň zahrnuje stanovení celkového IgA a sérových autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA. Druhý stupeň se indikuje, pokud jsou protilátky pozitivní a zahrnuje endoskopickou biopsii sliznice duodena (Latta, 2012).

1.7 Sérologické vyšetření

Diagnostické zpracování obvykle začíná sérologickými testy, které hrají velkou roli. Jejich cílem je hledat autoprotilátky produkované aktivací B lymfocytů po požití lepku. První vyšetření je tedy na základě odběru krve. Vyšetření protilátek poté provádíme v séru, pacient musí být v době odběru dostatečně zatížen lepkem, aby nedocházelo k falešné negativitě (Frühauf, 2016, Sciurti 2018). Mezi nejdůležitější testy řadíme antitransglutaminázové protilátky třídy IgA (tGA). To jsou testy s nejvyšší citlivostí na celiakii okolo 98 % a specifitou

odhadovanou na 90 %. Provádí se metodou ELISA a považují se za počáteční test na celiakii. Dále IgA antiendomysialní protilátky (EMA) prováděné nepřímou imunofluorescencí. Test má nižší citlivost ve srovnání s předchozím, ale vykazuje téměř absolutní specifitu pro celiakii a proto se považují za potvrzovací testy (Sapone, 2012). Zastaralým testem jsou antigliadinové protilátky třídy IgA (AGA). Ty mají mnohem nižší specifitu a citlivost než předchozí testy a jsou využitelné pouze u dětí mladších 2 let (Villanacci, 2020).

V případě, že by u pacienta nastal deficit třídy IgA, vyšetřují se protilátky z třídy IgG (Latta, 2012).

1.8 Bioptické vyšetření

O diagnóze celiakie se můžeme domnívat již z klinických projevů, laboratorních výsledků nebo sérologických testů. Dalším krokem v diagnostice je biopsie sliznice tenkého střeva, která zůstává stále zlatým standardem, který musí být u dospělých vždy prováděn. (Naiyana, 2012). U dětí se biopsie tenkého střeva nemusí provádět a stanoví se tak diagnóza pouze ze sérologie na základě několika kritérií. Tato kritéria nám stanovují, že musí být přítomny klinické symptomy, nesmí být přítomen deficit IgA, pozitivita anti-TG2 musí být nad 10násobek normy, musí být pozitivní EMA z jiného vzorku a ověřena 10násobná pozitivita anti-TG2. Doporučuje se doplnit vyšetření HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Posledním kritériem je, že symptomy onemocnění musí po zavedení bezlepkové diety ustoupit.

Aby nebyl výsledek vyšetření ovlivněn, je důležité, stejně jako u sérologického vyšetření, že lepek nesmí být přes provedení biopsie vysazen. Biopsie jsou prováděny buď sací kapslí, ta se zavádí pod RTG, nebo endoskopickým vyšetřením, které nám kromě duodena umožňuje prozkoumat i jiné části gastrointestinálního traktu. Pokud se provádí zavedením sondy do bulbu a duodena, při odebírání je vhodné odebrat alespoň 4 vzorky (Villanacci, 2020; Frühauf, 2016).

1.9 Histologické vyšetření

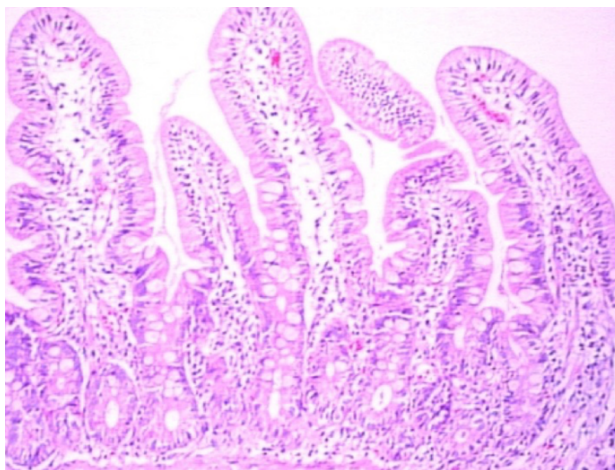
Vzorek střeva vykazuje řadu typických abnormalit, které se hodnotí dle systému klasifikace Marsh, následně modifikovaným Oberhuberem. Marsh I je charakterizovaná téměř normální sliznicí s výjimkou infiltrace klků pomocí intraepiteliálních lymfocytů. Marsh II se vyznačuje přítomností hypertrofie krypty a Marsh III, který můžeme vidět na Obrázku 4 je charakteristický zploštěním sliznice, která je způsobena vilózní atrofií a otokem lamina propria. U všech biopsií u celiakie je pozorováno zvýšení IEL, ale u některých pacientů může být

omezeno jen na špičky klků, avšak i u tohoto minimálního zvýšení pacienti vykazují některé typické rysy celiakie (Dunne, 2020).

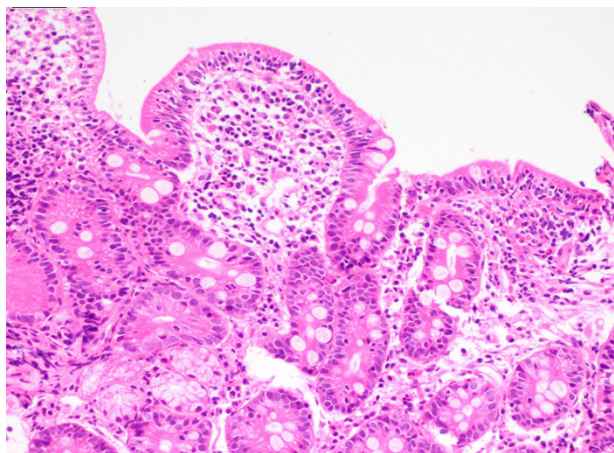
1.9.1 Histologický nález

Histologická diagnóza je založena na hodnocení následujících lézí:

- zvýšené intraepiteliální T-lymfocyty – jedná se o patologický stav tzv. lymfocytózu, hodnota 25 T-lymfocytů na 100 enterocytů,
- hyperplazie krypty – rozšíření regenerativních epiteliálních krypt,
- vilózní atrofie – změna poměru krypt a klků (3:1) až do úplného vymizení klků a také pokles výšky klků (Villanacci, 2020).



Obrázek 3: Normální histologický nález (převzato a upraveno podle Özer, 2017)



Obrázek 4: Marsh 3b (převzato a upraveno podle Özer, 2017)

Obrázky znázorňují histologické nálezy provedené za pomoci mikroskopie. Na Obrázku 3 je zobrazen normální histologický nález duodenální sliznice se 3 až 4 dlouhými klky.

Obrázek 4 znázorňuje Marsh 3b se zvýšeným počtem IEL, hyperplazií krypt a vilózní atrofii.

1.10 Marshova klasifikace

Podle Marshovy klasifikace hodnotíme normální sliznici jako Marsh 0 a na základě výše zmíněným lézí celiakii dále rozdělujeme do tří kategorií (Naiyana, 2012). První typ je infiltrativní u něho jsou klky v normě mezí, počet IEL je zvýšen. Druhý typ je hyperplastický, ten zahrnuje stejně jako typ jedna klky v morfologických mezích a zvýšení počet IEL, navíc má hyperplazii žlázových prvků. Třetí typ, neboli destruktivní, má stejně jako předchozí dva typy zvýšený počet IEL, ale oproti nim má různé stupně vilózní atrofie s hyperplazií krypt. Povrchové enterocyty mají v tomto stadiu sníženou výšku a nepravidelný okraj kartáče.

Protože mírná i úplná atrofie jsou seskupeny do jedné kategorie a to kategorie tři, Oberhuber a kolegové navrhli její modifikaci do tří podskupin. Všechny podskupiny mají patologické zvýšení IEL, ale liší se tím, že 3a má mírnou vilózní atrofii, u 3b hovoříme o průměrné vilózní atrofii a u 3c už o úplné vilózní atrofii.

Poslední dělení ve snaze zjednodušit práci navrhli Corazza a Villanacci. Léze, které charakterizují celiakii, rozdělili na neatrofické, s normálními klky, ale zvýšeným IEL patřící do stupně A a atrofické, které zařadili do stupně B. Druhý stupeň ještě rozdělili na B1 s poměrem klků a krypt menším než 3:1 a B2, u kterého již klky nejsou identifikovatelné (Villanacci, 2020).

V některých publikacích je uváděn ještě typ 4 tzv. hypoplastický s úplnou vilózní atrofii, hypoplazií krypt, celulární infiltrací lamina propria. U tohoto typu se mohou objevovat depozita kolagenu (Bureš, 2018).

1.11 Choroby asociované s celiakií

1.11.1 Diabetes mellitus 1. typu

U tohoto autoimunitního onemocnění dochází k destrukci beta buněk na pankreatických ostrůvcích, což způsobuje absolutní nedostatek inzulínu. Vědci se domnívají, že existuje genetická predispozice se specifickými alelami HLA-DQ a HLA-DR. Diabetes mellitus 1. typu (T1D) a celiakie se vyskytují společně v rodinách a dokonce i u jednotlivých jedinců častěji než se předpokládalo. Přibližně u 4 – 9 % pacientů s T1D se vyskytuje také celiakie, stejně jako

u pacientů s celiakií je zvýšené riziko T1D. Pacienti vyžadují inzulínovou terapii, hodnoty glykémie by měly být monitorovány po celý den (Bureš, 2018; Sciurti, 2018).

1.11.2 Duhringova choroba

Do nedávna bylo toto onemocnění považováno za formu celiakie, souvislost těchto dvou onemocnění byla pozorována již v 60. letech. Dnes už je jasné, že toto vzácné autoimunitní kožní onemocnění je samostatná choroba s celiakií asociovaná (Bureš, 2018). Duhringova dermatitida je chronické bulózní onemocnění, jedná se o kožní onemocnění zprostředkované IgA. Projevuje se puchýřkovitou vyrážkou, tyto charakteristické bubliny, naplněné kapalinou plazmového charakteru a zánětlivých buněk, jsou výsledkem změny buněčných struktur a struktur mezibuněčných spojů odpovědných za adhezi epiteliální tkáně. Bylo zjištěno, že onemocnění postihuje více muže, dospělého mladšího věku (Mendes, 2013)

1.11.3 Glutenová ataxie

Jedná se o autoimunitní onemocnění u geneticky predisponovaných jedinců vyvolané lepem (Bureš, 2018). Bývá definována jako sporadická cerebelární ataxie v přítomnosti cirkulujících antigliadinových protilátek a bez jiných příznaků ataxie (Vinagre–Aragón, 2018).

1.12 Komplikace celiakie

Nedodržování bezlepkové diety nebo pozdní diagnostika mohou vést ke komplikacím celiakie. Hlavní komplikace celiakie jsou metabolické, nutriční a hormonální. Existuje riziko lymfomů a adenokarcinomů tenkého střeva, u těhotných žen může nastat potrat, nebo mohou mít novorozence s vrozenými vadami (Posner, 2021). Často je u onemocnění přítomna laktózová intolerance. Může být přítomna epilepsie, psychiatrické komplikace jako jsou těžké deprese, častým nálezem je také atrofie sleziny (Bureš, 2018).

1.12.1 Refrakterní celiakie (RCD)

U malé skupiny pacientů léčených bezlepkovou dietou se vyskytuje tzv. refrakterní celiakie, která je charakterizována pokračujícími příznaky maloabsorpce s histologickým nálezem vilózní atrofie i přes dodržování bezlepkové diety trvající 6 – 12 měsíců. Typickým znakem tohoto druhu celiakie je zvýšený počet intraepiteliálních T lymfocytů (IEL). Pacienti

mohou být léčeni kortikosteroidy nebo imunosupresivy, kterými jsou například azathioprin nebo cyklosporin.

1.12.2 Nádorové onemocnění

Asi nejzávažnější komplikací je zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění. Ta vznikají s největší pravděpodobností z důvodů snížené funkce imunitního systému a zvýšené střevní propustnosti. Jedná se nejčastěji o karcinom jícnu, žaludku, nebo zhoubný lymfom střeva.

1.13 Léčba

Zatím jedinou léčbou je dodržování doživotní bezlepkové diety (vyloučení glutenu z potravy) pod dohledem odborníků. Může být doporučeno doplňující užívání vitamínů a minerálů. Většina pacientů na vyloučení lepku z potravy reaguje příznivě, někteří však na dietu nereagují a jsou současně vyšetřováni na intoleranci laktózy, nedostatečnost pankreatu, nebo zánětlivé onemocnění střev.

Pacienti jsou sledováni na gastroenterologii, kde se jim i provádí sérologické testy. První kontrola by měla nastat po roce jejího striktního dodržování. U vážných stavů celiakie je potřeba přibližně první tři měsíce léčby podávat systémové nebo topické glukokortikoidy a nutriční léčbu (Bureš, 2018; Chou, 2017; Cirmanová, 2015).

Léčba má za následek zmírnění a později vymizení klinických projevů. Nasazením bezlepkové léčby se pacienti také mohou vyhnout přidruženým autoimunitním chorobám. V případě, že už tyto onemocnění má i u nich může s nasazením bezlepkové diety dojít ke zlepšení. V průběhu léčby by se taky histologické a sérologické nálezy měly vrátit do normálu. Většinou se pacienti cítí lépe již pár dní po nasazení diety. Bezlepková dieta tedy umožňuje celiakovi dožít se průměrné délky života bez dalších komplikací (Megiorni, 2012; Příbylová, 2012).

Ve Španělsku byla představena neinvazivní metoda, kterou je možné sledovat, jestli pacient dodržuje bezlepkovou dietu. Provádí se za pomoci stanovení neimunogenních peptidů lepku tzv. GIP v moči. Přítomnost GIP v koncentrované moči byla zjistitelná už za 4 – 6 hodin a dala se detekovat ještě den až dva po požití lepku. Jelikož je senzitivita tohoto testu velmi vysoká, dá se využít i při konzumaci velmi malého množství lepku jako je 50 mg (Cirmanová, 2015).

1.14 Výživa

Účinnost léčby předpokládá úplné vyloučení potravin a nápojů s obsahem lepku. Celiak je tedy odkázán stravovat se potravinami, které jsou označovány jako bezlepkové. V dnešní době jsou alternativní bezlepkové potraviny stále dostupnější, a tak už není problém sehnat bezlepkové těstoviny, mouky, sušenky, směsi na pečení ani pivo. Tyto potraviny bývají označovány mezinárodně uznávanou značkou: přeškrtnutým klasem. Pro výrobu těchto speciálních potravin jsou použity buď přirozeně bezlepkové potraviny, nebo potraviny, u kterých byl obsah lepku snížen na 20 mg/kg. (Příbylová, 2012) Jako bezpečné potraviny jsou považovány rýže, brambory, kukuřice, sója, pohanka, proso, jáhly, čerstvé chlazené, nebo mražené maso bez přísad, cukr, med a mnoho dalších. Je potřeba pečlivě dbát na sledování složení potravin.

Důležité je nejen vyloučení potravin z obiloviny s obsahem lepku, ale také potravin se stopovým množstvím lepku. V současné době není v České republice žádná norma, která by udávala množství pšeničného tzv. modifikovaného škrobu do potravin a jeho přidávání je velice časté i do potravin, kde by ho laik nemusel očekávat. Udává se, že bezpečné množství lepku na den je 50 mg, ale to nelze považovat za platné u všech jedinců, neboť u některých celiaků i množství 10 mg vyvolá nepříznivé změny střevní sliznice (Pelkowski, 2014).

2 GENETIKA

Etiologie celiakie je ovlivněna mnoha faktory, jak genetickou predispozicí, tak environmentálními faktory, včetně lepku a jeho zavedení do kojenecké stravy.

HLA-DQA1 a HLA-DQB1 jsou hlavními klíčovými faktory genetické náchylnosti, označované výbojem pro genovou nomenklaturu HUGO jako CELIAC1. Téměř 95 % pacientů s celiakií nese heterodimery DQ2.5, kódované alelami DQA1*05 a alely DQB1*02 v cis nebo trans konfiguraci, nebo molekuly DQ8 kódované alelami DQB1*03:02 v obecné kombinaci s variantou DQA1*03 (Megiorni, 2012). 5q31–q33 (CELIAC2), 2q33 (CELIAC3) a 19p13.1 (CELIAC4) jsou tři chromozomální oblasti také uznávané jako genetické predispoziční faktory pro celiakii (Sciurti, 2018).

2.1 Systém HLA

HLA, neboli human leukocyte antigens, jsou transmembránové glykoproteiny, které představují hlavní histokompatibilní systém člověka. MHC kóduje rozsáhlý komplex genů determinujících povrchové molekuly, takzvané antigeny, umístěné v plazmatických buňkách. Jejich hlavní fyziologickou funkcí je předkládání antigenů, nebo jejich fragmentů buňkám imunitního systému, zejména T-lymfocytům. Lidský HLA systém se nachází na krátkém raménku 6. chromozómu (6p21.3), tvoří přibližně jednu tisícinu lidského genomu, to znamená, že obsahuje asi 260 genů, z nichž většina souvisí s imunitním systémem. Tato oblast se vyznačuje vysokou hustotou, velmi rozsáhlou vazebnou nerovnováhou a variabilitou genů.

HLA rozdělujeme do několika tříd, ve kterých se nacházejí jednotlivé lokusy. HLA I. i II. třídy jsou transmembránové glykoproteiny, tvořeny 2 řetězci. HLA I. třídy jsou heterodimery polymorfního α řetězce monomorfního β 2 mikroglobulinu, HLA II. třídy jsou heterodimery α a β řetězce (Medrano, 2012; Spierings, 2019). HLA má velmi rozmanitý význam použití, využívá se zejména v transplantační imunologii, při vyšetřování autoimunitních onemocnění, v nádorové imunoterapii, při monitoringu účinnosti léčby, nebo před zahájením farmakoterapie (Bartůňková, 2011).

2.2 Klasifikace HLA

HLA můžeme rozdělit do pěti oblastí: oblast rozšířené třídy I, třídy I, třídy III, třídy II a rozšířené třídy II. zahrnujících stovky genů s imunologickými funkcemi, vyznačující se vysokou hustotou, variabilitou genů a rozsáhlou vazebnou nerovnováhou (Sciurti, 2018).

Nejvíce využívané klasifikace jsou třídy I a II. Pro HLA I. třídy jsou typické HLA A, B a C, jsou exprimovány na všech somatických jaderných buňkách, řádově se jedná o několik set tisíc molekul. Do této třídy ještě zahrnujeme neklasické HLA-E, F a G, které se exprimují tkáňově specificky a jejich hlavním cílem je nastolení imunotolerance mezi matkou a plodem. Celkovým úkolem HLA I. třídy je vystavovat peptidy, které vznikly štěpením bílkovin v cytosolu například množením viru. HLA II. třídy obsahuje tzv. D oblast, později rozdělovanou na tři podoblasti DQ, DR a DP, které jsou exprimovány na profesionálních antigen prezentujících buňkách (APC). Mezi ně řadíme B lymfocyty, dendritické buňky a buňky monomakrofágového systému (monocyty, makrofágy). Exprese HLA II. třídy může být zvýšena prozánětlivými cytokiny $INF \gamma$ a $TNF \alpha$ (Spierings, 2019). Třída III leží mezi HLA I. a II. třídy a zahrnuje geny pro proteiny, které mají imunitní funkci (Nordquist, 2021; Dobrovolná 2014).

Důležitou roli v regulaci imunitního systému mají proteiny. Geny kódující proteiny zahrnují oblasti HLA třídy I a II. Můžeme zmínit například glykoproteiny pro prezentaci antigenu imunitním buňkám (Sciurti, 2018).

2.3 Dědičnost HLA

Sestava alel HLA každého jedince je tvořena tou, kterou zdědil od svých rodičů. Geny HLA jsou kodominantně exprimovány a zděděny podle mendelovských pravidel s pravděpodobností 25 %, že dva sourozenci budou genotypicky identičtí s HLA. Jedinec nese jeden haplotyp od matky a jeden od otce, tyto dva haplotypy tvoří jeho genotyp (Dobrovolná, 2014).

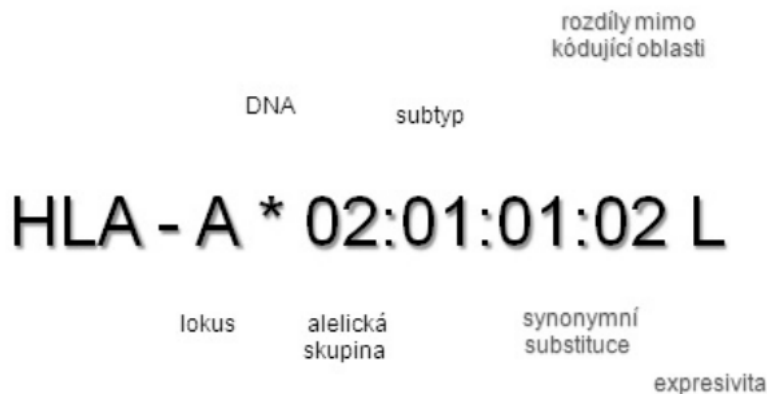
Genetické determinanty, kódující heterodimer DQ2, se obvykle dědí v cis formaci spolu s DRB1*03:01, který je spojován s velkým množstvím poruch souvisejících s imunitou. Alely DQA1*05 a DQB1*02 mohou být zděděny v trans formaci, každý kódovaný na jednom chromozómu od každého z rodičů, značený jako DQ2.5 trans (Medrano, 2012).

2.4 Nomenklatura

V roce 1968 byl zaveden Nomenklaturní výbor světové zdravotnické organizace (WHO) pro faktory HLA. Právě z tohoto roku je první zmínka o osmi pojmenovaných antigenech oddělených dle jednotlivých genů. V dnešní době jsou využívány dva typy nomenklatury. První, z roku 1975, který byl později roku 1984 upraven a je založen

na sérologických metodách a druhý, zaveden roku 1987, založen na určování alelových nukleotidových sekvencí.

První typ si ukážeme na příkladu HLA-B27, kde velké písmeno B značí lokus a číslo 27, které následuje, označuje antigen, konkrétně jeho specifitu a ta může mít maximálně dva číselné znaky. Názvosloví bylo nadále zdokonalováno, zavedli se přípony, které signalizují formu exprese určitých alel. Pro příklad, písmenem N se označují nulové alely, L značí, že gen kóduje protein s nízkou expresí, C se používá v případě, když jsou produkty exprimovány v cytoplazmě. Aby bylo možné pojmenovávat a zařazovat nové alely, bylo potřeba v roce 2010 změnit nomenklaturu HLA. Velkým přínosem bylo zavedení rozdělovačů v daném pořadí (alelická skupina:subtyp:synonymní substituce:rozdíly mimo kódující oblasti. Využití rozdělovačů je zobrazeno na Obrázku 5, kde je zároveň znázorněn příklad tvorby názvu HLA alely. Nově se začalo aplikovat řazení alel do P skupin, které umožňuje rozumově vyjadřovat výsledek podle biologické specifity. Dále do G skupin, využívající se pro alely mající stejnou nukleotidovou sekvenci pro exony, které kódují místo pro rozpoznávání antigenu. Databáze obsahující seznam alel a jejich nomenklaturu je dostupná na IMGT/HLA, verze z července roku 2010 obsahuje 5302 alel HLA (Dobrovolná, 2014; Torres, 2011).



Obrázek 3: Ukázka tvorby názvu HLA (převzato od Dobrovolná, 2014)

Na Obrázku 5 je zobrazen příklad nomenklatury za použití druhé metody, molekulárně-genetické. Oproti sérologickému typu může mít označení alel vícemístné. Na příkladu Obrázku 5 si tuto nomenklaturu přiblížíme. Velké písmeno A zde opět značí lokus, následuje oddělovač, který značíme hvězdičkou, za ním první dvě číslice 02 nám značí alelickou skupinu, za pomoci rozdělovače oddělené další dvě číslice 01, značící subtyp, znovu rozdělovač, za kterým další číslice označují subalely a písmeno na konci nám značí expresivitu (Penka, 2012).

2.5 Asociace s chorobami

V posledních 50 letech bylo prokázáno, že asociace s chorobami nelze vždy jednoznačně určit na jednu alelu, ale spíše na více účinků jednotlivých alel. Bylo dokázáno, že autoimunitní a infekční choroby mezi sebou sdílí jednotlivé genetické faktory HLA. Toto zjištění značí, že lidská genetická architektura vznikala v reakci na přirozené podněty, a že HLA ovlivňuje náchylnost ke komplexním chorobám. Zároveň bylo zjištěno, že HLA hraje velkou roli i v neurologických poruchách.

Do velké skupiny asociací patří nejčastěji autoimunitní onemocnění, nemalígní chronická onemocnění. Spouštěčem onemocnění bývají často environmentální faktory. Mezi příklady asociací můžeme zmínit ankylózní spondylitidu s HLA-B27 (Bechtěrevova nemoc), v tomto případě je onemocnění spojeno s jednou konkrétní alelou. Jinak je to u narkolepsie související s alelou HLA-DQB1*06:02, která může být spojena s více geny. Velmi silnou asociaci má celiakie, asociované alely jsou HLA-DQB1*02 a HLA-DQB1*03:02. Zmínit můžeme i revmatoidní artritidu asociovanou s HLA-DR4.

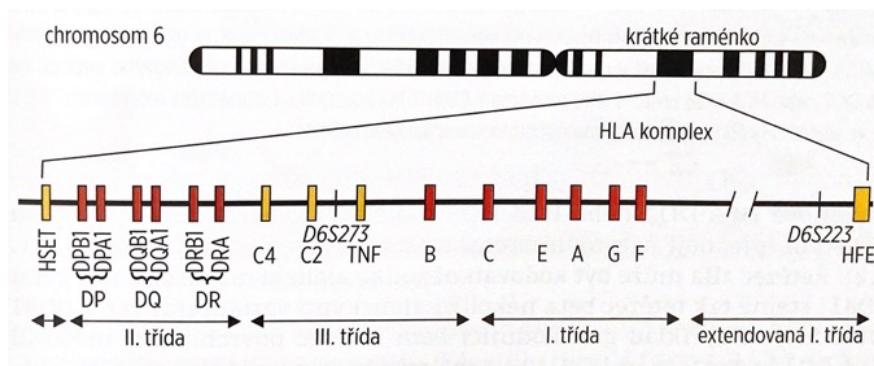
Objev asociace s chorobami pomohl k vývoji nových způsobů léčby a k prevenci různých onemocnění. V tuto chvíli však zdaleka nejsou objasněné všechny asociace a jejich funkce. Asociace s lokusy HLA I. třídy ovlivňují odpověď T-buněk CD8+ při infekci HIV, které se ukazuje pomalejší progresi onemocnění, u HLA II. třídy je ovlivňována odpověď CD4+ T-buněk, která je nedostatečná a tím je zvýšené riziko náchylnosti k infekcím (Matzaraki, 2017).

2.6 HLA ve vztahu k celiakii

I přes to, že celiakie je geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění, není stanovení genotypu HLA až tak významný nástroj při její diagnostice, spíše se využívá jako negativní predisponující hodnota (Megiorni, 2012). HLA alely jsou sice důležité, ale ne nezbytné pro rozvoj onemocnění. Důležitým faktorem jsou i tzv. non-HLA geny, ze kterých bylo prozatím identifikováno 39 lokusů. Spuštění onemocnění je spjata také s vázáním gliadinových zbytků z lepku přijímaného v potravě na specifické epitopy HLA, které jsou přítomny.

Genetickým faktorem pro vznik celiakie je přítomnost HLA genů II. třídy, které se nacházejí na raménku 6. chromozómu, ten můžeme vidět na Obrázku 6. Téměř u 95 % pacientů s prokázanou celiakií se vyskytuje genotyp HLA-DQA1*05 a HLA-DQB1*02, často nepřesně označovaný jako HLA-DQ2. Druhý genotyp vázaný s tímto onemocněním je

HLA-DQA1*03:01 a HLA-DQB1*03:02, někdy označován jako HLA-DQ8. (Dobrovolná, 2015) Riziko rozvoje onemocnění u pacientů s těmito rizikovými alelami se odhaduje na 36 až 53 %, dále také závisí na množství genu.



Obrázek 4: Chromozóm 6 a lokace genů HLA na krátkém raménku (převzato od Hoffmanová, 2019)

U alel HLA-DQ2 je prokázáno, že homozygotní jedinci mají riziko nejméně 5x vyšší než heterozygotní.

Téměř 40 % dědičnosti celiakie vysvětlují heterodimery HLA-DQ2 a HLA-DQ8, odhaduje se, že zbylá procenta zahrnují jiné geny než HLA. Bylo identifikováno mnoho genů, které mohou být zapojené do rizika rozvoje celiakie, i když jejich příspěvek k nástupu onemocnění je slabý. Podílejí se na řízení imunitní odpovědi, můžeme tam zahrnout geny kódující IL2, IL21, CTLA4 a CCR3 (Sciurti, 2018).

Diagnóza celiakie je nepravděpodobná u osob, které nemají žádnou z těchto HLA-DQ alel, avšak i u zdravých osob se výše jmenované genotypy vyskytují. Z tohoto důvodu nelze přítomnost HLA-DQA1*05 a HLA-DQB1*02 nebo HLA-DQA1*03:01 a HLA-DQB1*03:02 považovat za potvrzení dané diagnózy bez dalších vyšetření (Brdička, 2015). Podle počtu alel, které nesou DQA1*05 a DQB1*02 jsou pacienti řazeni do skupin s vysokým nebo středním rizikem celiakie (Medrano, 2012).

Souvislost mezi HLA a pohlavím dokazuje skutečnost, že ženy bývají častěji DQ2.5 či DQ8 pozitivní, zatímco negativní DQ2.5/DQ8 mají často muži (Megiorni, 2012).

2.6.1 HLA DQ2 a DQ8

Molekuly II. třídy HLA-DQ2 a HLA-DQ8 mají klíčový význam v patogenezi celiakie. Tyto povrchové molekuly jsou složeny z řetězců α a β . Řetězec α může být kódován několika alelickými variantami genu DQA1 a řetězec β několika variantami DQB1, toto můžeme vidět v tabulce. Příkladem může být gen kódující β řetězec HLA-DQ2, který je označován jako DQB1*02 a má tři alelické varianty: DQB1*02:01, DQB1*02:02 a DQB1*02:03. Gen kódující β řetězec HLA-DQ8 má pouze dvě alelické varianty a to DQB1*03:02, DQB1*03:05 (Hoffmanová, 2019). Studie zjistila, že homozygotnost DQB1*02 bývá ve velkém množství případů spojena se zvýšeným rizikem a agresivnějšími formami celiakie (Megiorni, 2012).

Tabulka 1: HLA sérotypy patofyziologie celiakie a jejich vztah k HLA haplotypu (Převzato od Olerup SSP HLA typing kits, 2015)

HLA sérotyp	HLA haplotyp	
	genotyp pro alfa řetězec	genotyp pro beta řetězec
HLA-DQ2.5	DQA1*05:01	DQB1*02:01
HLA-DQ2.2	DQA1*02:01	DQB1*02:02
HLA-DQ8	DQA1*03:01	DQB1*03:02

Ve skutečnosti alely HLA-DQ2.5/DQ8 nese asi 30 % běžné populace, ale onemocnění se u nich nevyskytuje, u 3 % z nich dojde k intoleranci lepku. Z tohoto důvodu je jasné, že přítomnost této alely není vždy dostatečná pro rozvoj onemocnění (Sciurti, 2012; Megiorni, 2012).

K vyšetření alel kódujících HLA-DQ2 a HLA-DQ8 se využívají metody typizace oligonukleotidů specifických pro polymerázovou řetězovou reakci (Sapone, 2012).

2.7 Význam genetického vyšetření

Vyšetření genotypu HLA pro diagnostiku celiakie je vhodné provádět u příbuzných celiaků prvního stupně, převážně u dětí z rodin s opakovaným výskytem, u pacientů s klasifikací Marsh typu I a II, tj. se zvýšeným IEL a hyperplazii krypt, ale bez vilózní atrofie. Dále podle ESPGHAN z roku 2012 u pacientů s nejasnou diagnózou, kam řadíme pacienty s výsledkem negativní sérologie a mírnou změnou infiltrace ve vzorcích z biopsie. Posledním zmiňovaným významem typizace HLA je rozlišení asymptomatických pacientů s pravděpodobnějším výskytem celiakie než u běžné populace, u kterých bude potřeba

pravidelně sledovat hladinu protilátek (Brdička, 2015; Sciurti, 2018). Vyšetření je také vhodné provádět u pacientů se speciálními genetickými poruchami, kam řadíme například Downův nebo Turnerův syndrom. Právě u těchto pacientů může být výhodou včasné odhalení predisponujících alel pro celiakii, díky němuž mohou být osvobozeni od opakovaných sérologických vyšetření nebo biopsií (Megiorni, 2012; Verma, 2018).

Výhodou genetického vyšetření je, že může pomoci s diagnózou, pokud u pacienta nebyly provedeny sérologické testy před zavedení bezlepkové diety (Lebwohl, 2020).

Přibližně 95 % pacientů s celiakií nese alelu HLA-DQ2, ti kteří jsou HLA-DQ2 negativní naopak bývají pozitivní HLA-DQ8. Tato skutečnost nám ukazuje vysoké genetické riziko onemocnění. Studie také potvrdily, že nepřítomnost predisponujících alel HLA-DQ2, HLA-DQ8 nebo obou prakticky onemocnění celiakie vylučuje (Naiyana, 2012).

Pozitivní vliv na psychickou stránku nese provedení typizace HLA s negativním výsledkem, jedinci si jsou poté více jisti svým velmi nízkým rizikem pro vznik celiakie (Megiorni, 2012).

2.8 Genetické vyšetření

Typizace HLA pro určení asociací s nemocemi se zpravidla provádí v molekulárních laboratořích. Indikace k vyšetření jsou: pozitivní rodinná anamnéza, gastrointestinální potíže, do kterých patří maloabsorpce a průjmy, dále jiná autoimunitní onemocnění, sideropenická anemie nebo neprospívání. Vyšetření se provádí z DNA ze stěru z dutiny ústní nebo z periferní krve odebrané do zkumavky s K2EDTA/K3EDTA, zhruba 2 až 5 ml.

Při stanovení lze využít několik molekulárních metod: metoda PCR se sekvenčně specifickými primery, kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real Time PCR), nebo Reverse Dot Blot analýza.

V dnešní době se stávají hojně využívané stanovení za pomoci komerčních souprav, které byly vyvinuty pro specifický genotyp celiakie s přidruženými alelami DQA1/DQB1 (DQA1*05, DQB1*02 a DQB1*03:02). Tento způsob je výhodnější v tom, že je rychlejší a snazší. Pro správné vyhodnocení je důležitá vysoká specifita, detailní výsledky a usnadněná interpretace. Olerup SSP AB navrhl Olerup SSP® DQA1*02,05; DQB*02, 03:02 test na alely asociované s celiakií, který tato kritéria splňuje (Megiorni, 2012).

2.9 Metody vyšetření

V dnešní době máme k dispozici několik metod využívaných pro určení alel HLA asociovaných s celiakií. Jejich nevýhodou je, že jsou časově náročné a drahé. Zahrnují

hybridizaci sond specifických pro oligonukleotidy (SSOPH), amplifikaci PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR - SSP) a typizaci na bázi sekvencí (SBT). Tyto tři stanovení se začali využívat už v 80. letech, kdy se PCR metoda stala rutinní používanou v laboratorním stanovení (Reinton, 2006).

Mnohem vhodnější je tedy použít rychlejší metodu s vysokou citlivostí, a to PCR v reálném čase (qPCR) spolu s PCR – SSP. Bylo zjištěno, že využití qPCR sice vykazuje vysokou specifitu, ale pokud potřebujeme z vyšetření získat větší podrobnosti, jako například homozygotnost a heterozygotnost, je vhodnější použít metodu PCR – SSP (Selleski, 2015).

2.9.1 Sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy (SSO)

Jako jedna z prvních vyvinutých metod typizace HLA založených na PCR byl test SSO. Metoda využívá krátké sondy, které jsou komplementární k omezenému počtu známých alel HLA. Ze vzorku DNA se vyberou generické primery, které budou amplifikovat většinu alel konkrétního lokusu a provede se PCR.

Můžeme využít tradiční SSO, kde produkt je denaturován do jednotlivých řetězců a následně vázán na membránu, která je poté hybridizována s různými SSO sondami. K hybridizaci dojde, pokud je amplifikovaná sekvence DNA komplementární s oligonukleotidovou sondou.

V běžné praxi, se ale spíše využívá reverzní SSO, která se od tradiční liší tím, že amplifikovaný produkt je přidán k pevné matici s navázanými sondami.

Metoda má hned několik výhod, z nichž můžeme zmínit krátkou dobu testování, testování jednoho vzorku, ale zároveň využití i pro větší množství vzorků. Nevýhodou naopak je, že z důvodu velkého počtu alel HLA může SSO poskytnout nejednoznačné výsledky typizace, které vyžadují následné testování.

2.9.2 Sekvenčně specifický test primerů (SSP)

SSP byla nejprve využívána k typizaci genů HLA-DR, ale se zdokonalením metody se rozšířila oblast využitelnosti pro všechny zbývající geny HLA třídy I a třídy II. Test je založený na principu využití primerů, které amplifikují pouze omezený počet alel.

Zpravidla jsou připravené sady primerů dodávány v zásobnících výrobcem. DNA ze vzorku pacienta se přidá ke směsi pufru, nukleotidů a polymerázy a následně je rovnoměrně rozdělena do platíček s primery. Takto připravený vzorek se podrobí PCR a po vyhotovení se detekuje za pomoci gelové elektroforézy.

Protože SSP testy jsou velice přesné, dají se využít k rozlišení nejednoznačných výsledků provedených jinými metodami. Jelikož je metoda náchylná ke změnám testovacích podmínek, je třeba při práci dbát na jejich dodržení. Nevhodné podmínky při provádění mohou způsobit nspecifickou vazbu primeru nebo nedostatek specifické vazby. Výhodou této techniky je, že pro její použití není třeba složitého vybavení, postačí termální cyklovač, pracovní stanice PCR a zařízení pro elektroforézu (Lara-Armi, 2020; Madden, 2019).

2.9.3 PCR v reálném čase (qPCR)

Každý test PCR vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy.

PCR v reálném čase přináší rychlejší výsledky zejména tím, že současně amplifikuje a detekuje DNA v reálném čase. Odlišuje se také tím, že výsledky jsou analyzovány počítačem a není potřeba gelové elektroforézy. Udává, kolik specifické DNA nebo genu je ve vzorku. Amplifikace probíhá ve třech základních krocích. Denaturace, nasedání primerů neboli annealing a extenze templátového řetězce. Oproti klasické PCR metodě má obrovskou výhodu, že je možné sledovat nárůst produktu v každém cyklu amplifikace.

Ke kvantifikaci a detekci využívá fluorescenční barviva, které se nspecificky interkaluje s dvouvláknovou DNA a sekvenčně specifické DNA sondy. K vyhodnocení není zapotřebí gelové elektroforézy. Výsledky jsou analyzovány počítačem

Metoda je schopna poskytnout spolehlivé a reprodukovatelné výsledky. Výhodou je, že je možné ji použít i pro malé objemy vzorků a to v nejrůznějších aplikacích (Engstrom-Melnyk, 2015; Garibyan, 2013).

2.9.4 Celiac Gene Screen

Tato levná a snadná metoda založená na typizaci za pomoci PCR byla vyvinuta společností BioDiagene SRL v Itálii. Její rychlost dokazuje skutečnost, že je schopná izolovat DNA přibližně do jedné minuty, samotné PCR, zahrnující amplifikaci alel HLA-DQ provede za 90 minut. Celková doba od začátku testu po dosažení výsledku je kratší než 2 hodiny.

Celiac Gene Screen poskytuje informaci, zda je u pacienta přítomna alela DQ2 a nebo DQ8. Ke stanovení se používá vzorek krve, odebraný do zkumavek s EDTA. Samotný test zahrnuje tři kroky: lýza krve, amplifikace a na závěr fluorescenční detekce pomocí BioRun Reader (Verma, 2018).

3 METODIKA

V rámci studia byla zařazena i krátkodobá praxe v genetické laboratoři GENvia s. r. o. se sídlem na adrese Sýkovecká 276/54, Praha – Kyje, 19800. Níže uvedené postupy a výsledky jsou v souladu s metodickými postupy zmíněné laboratoře.

Principy použité metody:

Vyšetření je založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) alelově specifických primerů. Díky těmto primerům, specifickým pro alely asociované s konkrétním onemocněním jsou v první fázi amplifikovány PCR produkty. Ve druhé fázi jsou tyto produkty separovány pomocí gelové elektroforézy. Následně jsou pomocí programu SCORE identifikovány produkty (alely) asociované s onemocněním. Vyšetření je prováděno na základě protokolu OLERUP SSP® Instructions for Use 2015 za použití CE IVD kitů:

Úvod

Pracovní postup podrobněji popisuje HLA typizaci alel asociovaných s celiakií pomocí polymerázové řetězové reakce alelově specifických primerů. Vyšetření je zaměřené na detekci predispozičních alel (DQ2.5, DQ8, DQ2.2) vyskytujících se u více než 95 % osob trpících celiakií. Vyšetření je prováděno CE IVD kitem Olerup SSP® DQA1*02, 05; DQB1*02, 03:02 na základě protokolu OLERUP SSP® Instructions for Use 2015.

Příprava přístrojů, pomůcek a roztoků

- použít DNA izolovanou komerčním kitem o koncentraci 10–40 ng/ul
- rozmrazit reagentie a reakční platíčka

Postup

V prvním kroku je prováděna metoda PCR. Nejprve je potřeba pro každý vzorek DNA namíchat do 1,5 ml zkumavky mix, který se skládá z 130 µl demineralizované vody a 78 µl Master mix (obsahující Taq polymerázu). Z tohoto mixu se odpipetuje do jamky číslo 23, sloužící jako negativní kontrola, 8 µl a přidají se 2 µl demineralizované vody. Ke zbývajícím mixu se přidá 52 µl DNA a po 10 µl se rozpipetuje do jamek 1 až 22, které obsahují směsi primerů pro detekované alely. Platíčko se zalepí krycí fólií, promíchá ve třepačce a přenesení do termálního cyklovače. Přístroj udržuje naprogramované teploty po dobu, která je nutná k proběhnutí jednotlivých kroků PCR. Analýza je prováděna pomocí softwaru OLERUP.

Tabulka 2: Naprogramované teploty a stanovený čas pro jednotlivé kroky PCR (Upraveno podle Olerup SSP HLA typing kits, 2015)

Krok PCR	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (sec)
Počáteční denaturace	1	94	120
Denaturace	10	94	10
Annealing a extenze	10	65	60
Denaturace	20	94	10
Annealing	20	61	50
Extenze	20	72	30
Udržování	udržování	4	

Druhým krokem je provedení gelové elektroforézy. Amplifikované produkty se přenesou na 2% agarózový gel. Spustíme elektroforézu při 150 V na 20 minut a nasnímáme produkty pomocí systému DigiDoc–ITLS.

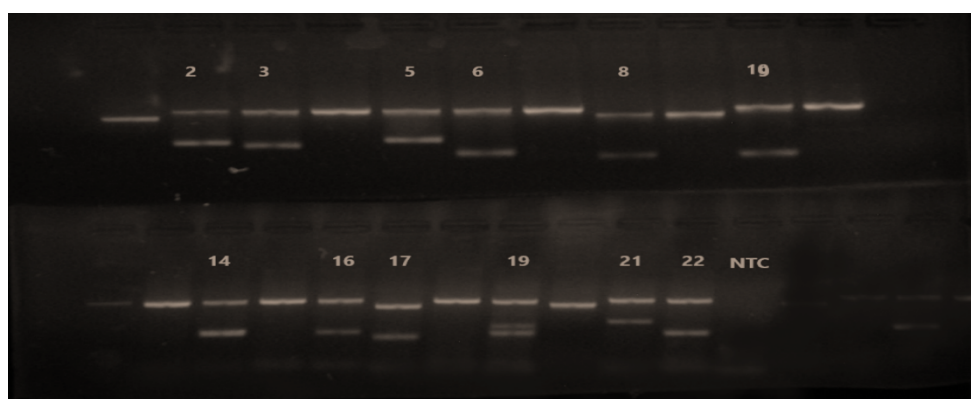
K analýze výsledků se využívá software Start SCORE. Za pomoci fotografií nasnímaného gelu označíme v obrázku znázorňující gel produkty PCR, tak aby se shodovaly. Z takto získaných dat software zobrazí detekované alely **HLA-DQA1 a HLA-DQB1**.

Tabulka 3: Interpretace detekovaných alel ve vztahu k celiakii (upraveno dle Olerup SSP HLA typing kits, 2015)

Genotyp	Serologický ekvivalent	Interpretace
DQA1*05 DQB1*02	DQ2.5 pozitivní DQ8 negativní	Nalezený genotyp HLA je asociovaný s rizikem celiakie.
DQA1*03 DQB1*03:02	DQ8 pozitivní DQ2 negativní	Nalezený genotyp HLA je asociovaný s rizikem celiakie.
DQA1*02 DQB1*02	DQ2.2 pozitivní DQ8 negativní	Nalezený genotyp HLA je asociovaný ojedinělým rizikem celiakie
Jakýkoliv jiný genotyp	DQ2 negativní DQ8 negativní	Nalezený genotyp HLA není asociovaný s rizikem celiakie.

3.1.1 Vyhodnocení získaných vzorků

Na následujících příkladech lze vidět 5 různých fotografií gelů elektroforézy z archivu laboratoře GENvia s. r. o. Jedná se o 5 vzorků vyšetřených v rámci „Mezilaboratorního hodnocení kvality“ v květnu roku 2021 a jejich různé způsoby vyhodnocení. Pozitivním výsledkem na snímcích gelů jsou zvýrazněné pruhy u alel asociovaných s celiakii. V tabulkách se zeleným textem, ve sloupcích „*common*“ a „*alleles*“ lze vidět pozitivní alely, které vyhodnotil program SCORE.



Obrázek 5: Vzorek č. 1, DQ8 pozitivní (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Na Obrázku 7 u vzorku č. 1, lze vidět, že produkt byl amplifikován na pozici 2, 3, 5, 6, 8, 10, 14, 16, 17, 19, 21, 22.

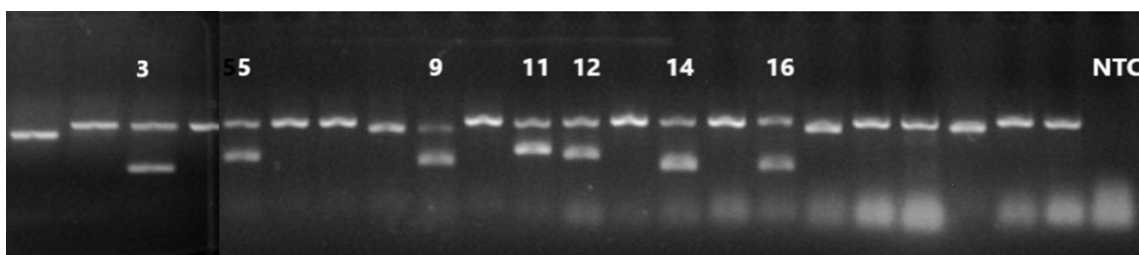
Podle Obrázku 8 vidíme, že dle získaných dat software SCORE detekoval alely: DQA1*03:01, DQA1*05:05, na Obrázku 9 lze vidět, že program detekoval alely: DQB1*03:01, DQB1*03:02. Jako pozitivní nález hodnotíme kombinaci alel DQA1*03 - DQB1*03:02 (DQ8 pozitivní). Při vyhodnocení vzorku č. 1 bylo prokázáno, že je DQ8 pozitivní a DQ2 negativní, vzorek je tedy asociovaný s rizikem celiakie. Toto hodnocení znázorňuje Tabulka 3.

HLA-DQA1	4/30/2021 1:		3.41.0	Alleles not covered: DQA1*04:01:01:01-04:08, DQA1*06:01:01:01-06:02
HLA-DQB1	4/30/2021 1:		3.41.0	
Previous typing results		Allele combinations		
Authorised interpretation		common	alleles	
		DQA1*03:01:01:01	DQA1*05:05:01:01	0 -
		rare	combinations	
		DQA1*03	DQA1*05	0 -

Obrázek 6: Vyhodnocení vzorku č. 1, alela HLA-DQA1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Allele combinations			
common	alleles		
DQB1*03:01:01:01	DQB1*03:02:01:01	0	DQ7(3) DQ8(3)
rare	combinations		
DQB1*03	DQB1*03	0	-, DQ8(3), Null, DQ7(3) DQ7(3), -, DQ8(3), Null
DQB1*03	DQB1*06	0	DQ7(3), -, DQ8(3), Null -

Obrázek 7: Vyhodnocení vzorku č. 1, alela HLA-DQB1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)



Obrázek 8: Vzorek č.2, DQ2.5 pozitivní (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Na Obrázku 10 lze vidět, že vzorek č. 2 měl pozitivní reakce na pozicích: 3, 5, 9, 11, 12, 14 a 16

Software SCORE detekoval u vzorku č. 2 alely: DQA1*01, DQA1*05:01 a alely DQB1*02:01, DQB1*04, DQB1*05, DQB1*06, to lze vidět na Obrázcích 11 a 12. Jako pozitivní nález hodnotíme kombinaci alel: DQA1*05 - DQB1*02 (DQ2.5 pozitivní).

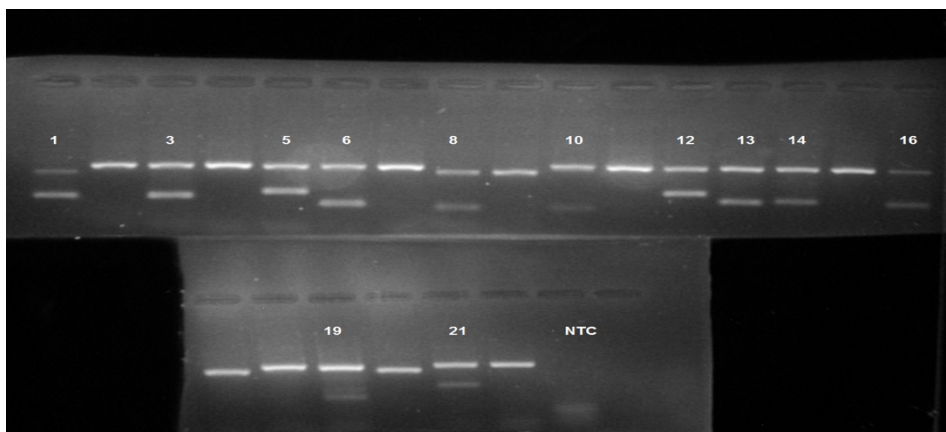
Vzorek č. 2 je tedy DQ2.5 pozitivní a DQ8 negativní. Nalezený genotyp je asociován s rizikem celiakie.

Allele combinations			
common	alleles		
DQA1*01	DQA1*05:01:01:01	0	-
rare	combinations		
DQA1*01	DQA1*05	0	-, Null

Obrázek 9: Vyhodnocení vzorku č. 2, alela HLA-DQA1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Allele combinations			
common	alleles		
DQB1*02:01:01:01		0	DQ2
DQB1*02:01:01:01	DQB1*04	0	DQ2
DQB1*02:01:01:01	DQB1*05	0	DQ2
DQB1*02:01:01:01	DQB1*06	0	DQ2
rare	combinations		
DQB1*02	DQB1*02	0	-, DQ2, Null
DQB1*02	DQB1*03	0	DQ2, -, Null
DQB1*02	DQB1*04	0	DQ2, -, Null
DQB1*02	DQB1*05	0	DQ2, -, Null
DQB1*02	DQB1*06	0	DQ2, -, Null

Obrázek 10: Vyhodnocení vzorku č. 2, alela HLA-DQB1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)



Obrázek 11: Vzorek č.3, DQ2.2 a DQ2.5 pozitivní (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Na Obrázku 13 lze u vzorku č. 3 vidět pozitivní reakce na pozicích 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 19 a 21

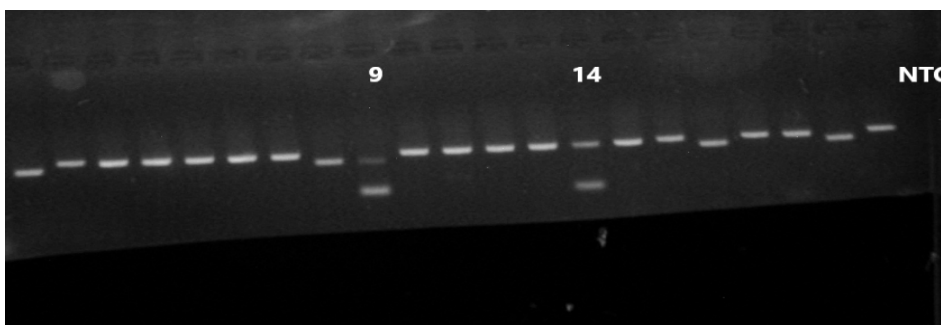
Z Obrázku 14 vidíme, že program Olerup detekoval alely DQA1*02:01, DQA1*05:05, na Obrázku 15 lze vidět, že program detekoval alely DQB1*02:02, DQB1*03:01. Jako pozitivní nález hodnotíme kombinaci alel DQA1*05 - DQB1*02 (DQ2.5 pozitivní) a DQA1*02 - DQB1*02 (DQ2.2 pozitivní). Dle poznatků výše bylo zjištěno, že hodnocený vzorek je DQ2.5 pozitivní, DQ2.2 pozitivní a zároveň také DQ8 negativní. Nalezený genotyp HLA je asociovaný s rizikem celiakie.

Allele combinations			
common	alleles		
DQA1*02:01:01:01	DQA1*05:05:01:01	0	-
rare	combinations		
DQA1*02	DQA1*05	0	-, Null

Obrázek 12: Vyhodnocení vzorku č. 3, alela HLA-DQA1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Allele combinations			
common	alleles		
DQB1*02:02:01:01	DQB1*03:01:01:01	0	DQ2
rare	combinations		
DQB1*02	DQB1*03	0	DQ2, -, Null

Obrázek 13: Vyhodnocení vzorku č. 3, alela HLA-DQB1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)



Obrázek 14: Vzorek č. 4, negativní (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Na Obrázku 16 lze vidět, že vzorek č. 4 byl amplifikován na pozicích 9 a 14. Hodnocení výsledků vzorku získaných z gelové elektroforézy lze vidět v tabulce v příloze A. Tabulka znázorňuje jednotlivé pozice a v nich amplifikované alely DQA1 a DQB1.

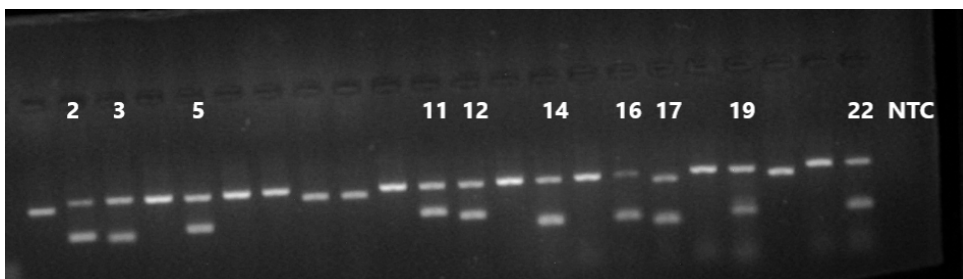
Z Obrázků 17 a 18 je zřejmé, že program Olerup detekoval alely: DQA1*01, DQA1*04, DQA1*05, DQA1*06, DQB1*03, DQB1*04, DQB1*05, DQB1*06. Nebyla nalezena dvojice alel asociovaných s celiakií, byla detekována pouze alela DQA1*05 bez druhé predispoziční alely. Vzorek č. 4 je DQ2 i DQ8 negativní, nalezený genotyp není asociovaný s rizikem celiakie.

Allele combinations			
common	alleles		
DQA1*01		0	-
DQA1*01	DQA1*01	0	-
DQA1*01	DQA1*04:01:01:01	0	-
DQA1*01	DQA1*06:01:01:01	0	-
rare	combinations		
DQA1*01	DQA1*01	0	-, Null
DQA1*01	DQA1*04	0	-, Null
DQA1*01	DQA1*05:10	0	-, Null
DQA1*01	DQA1*06	0	-, Null

Obrázek 15: Vyhodnocení vzorku č. 4, alela HLA-DQA1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Allele combinations			
common	alleles		
DQB1*04		0	DQ4
DQB1*04	DQB1*04	0	DQ4
DQB1*04	DQB1*05	0	DQ4
DQB1*04	DQB1*06	0	DQ4
DQB1*05		0	DQ5(1)
DQB1*05	DQB1*05	0	DQ5(1)
DQB1*05	DQB1*06	0	DQ5(1)
DQB1*06		0	DQ6(1), -, DQ1
DQB1*06	DQB1*06	0	DQ6(1), -, DQ1
rare	combinations		
DQB1*03	DQB1*03	0	-
DQB1*03	DQB1*04	0	-, DQ4, Null
DQB1*03	DQB1*05	0	-, DQ5(1), Null
DQB1*03	DQB1*06	0	-, DQ6(1), DQ1, Null
DQB1*04	DQB1*04	0	-, DQ4, Null
DQB1*04	DQB1*05	0	-, DQ4, -, Null
DQB1*04	DQB1*06	0	-, DQ4, -, Null
DQB1*05	DQB1*05	0	-, DQ5(1), Null
DQB1*05	DQB1*06	0	-, DQ5(1), -, Null
DQB1*06	DQB1*06	0	-, DQ6(1), DQ1, Null

Obrázek 16: Vyhodnocení vzorku č. 4, alela HLA-DQB1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)



Obrázek 17: Vzorek č. 5, DQ8 a DQ2.5 pozitivní (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Z Obrázku 19 lze vidět, že poslední vzorek č. 5 byl amplifikován na pozicích: 2, 3, 5, 11, 12, 14, 16, 17, 19 a 22

Program Olerup v tomto případě detekoval alely: DQA1*03, DQA1*05:01 a DQB1*02:01, DQB1*03:02, což lze vidět na Obrázcích 20 a 21. Jako pozitivní hodnotíme kombinaci alel DQA1*05 – DQB1*02 (DQ2.5 pozitivní) a DQA1*03 – DQB1*03:02 (DQ8 pozitivní).

Vzorek je tedy DQ2.5 pozitivní i DQ8 pozitivní. Nalezený genotyp HLA je asociovaný s rizikem celiakie.

Allele combinations			
common	alleles		
DQA1*03	DQA1*05:01:01:01	0	-
rare	combinations		
DQA1*03	DQA1*05	0	-, Null

Obrázek 18: Vyhodnocení vzorku č. 5, alela HLA-DQA1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

Allele combinations			
rare	combinations		
DQB1*02:01:01	DQB1*03:02	1	DQ2

Obrázek 19: Vyhodnocení vzorku č. 5, alela HLA-DQB1 (upraveno dle archivu GENvia s. r. o., 2021)

4 ZÁVĚR

Celiakie je nejčastější gastrointestinální autoimunitní onemocnění, jehož výskyt stále stoupá. Vyznačuje se různorodostí příznaků od maloabsorpce po dermatologické projevy. Velikou komplikací při diagnostice celiakie je fakt, že může probíhat i úplně bezpříznakovou formou. Diagnostika celiakie zahrnuje tři fáze. Zpravidla začíná sérologickými testy, vyšetření protilátek v séru. Z krve se provádí genetické testy na přítomnost HLA DQ2/DQ8 a v závěru se onemocnění potvrzuje biopsií. V dnešní době umožnila ESPGHAN, u dětí vynechat za přesně stanovených podmínek biopsii. Histologický nález hodnotíme dle Marshovy klasifikace, ve stupních od 0 do 3, kde 0 nám značí normální sliznici a 3 stupeň označujeme jako tzv. destruktivní, dle míry destrukce dělíme dále na 3 podskupiny.

Celiakie je asociovaná s množstvím chorob, z nichž můžeme zmínit diabetes mellitus 1. typu, Duhringovu chorobu nebo glutenovou ataxii. Komplikací neléčené celiakie mohou být nádorové onemocnění. Proto je důležitá včasná diagnostika a zahájení léčby. Zatím jedinou možností léčby je doživotní bezlepková dieta.

Celiakie je z velké míry ovlivněna genetickou predispozicí. Toto tvrzení dokazuje jeho silná asociace s alelami HLA II. třídy, nacházející se na krátkém raménku 6. chromozómu. Konkrétně hovoříme o alelách HLA-DQB1*02 a HLA-DQB1*03:02. Fakt, že přibližně 95 % pacientů s celiakií je DQ2 pozitivní a zbývající bývají většinou pozitivní na DQ8, dokládá vysoké genetické riziko onemocnění. Stanovení genotypu HLA se zpravidla využívá jako negativní predisponující hodnota. Vhodné je k odhalení asymptomatických pacientů, či u pacientů s nejasnou diagnózou. Přítomnost predisponujících alel však neznamená vždy přítomnost onemocnění, ale naopak jejich nepřítomnost nám dovoluje onemocnění s vysokou pravděpodobností vyloučit.

Genotypizace HLA molekul se provádí z DNA, buď ze stěru z dutiny ústní, nebo z periferní krve. Při vyšetření je vhodné použít metodu rychlou s vysokou citlivostí a specifitou, což je PCR v reálném čase. Vzhledem k tomu, že v určitých případech potřebujeme z vyšetření získat větší podrobnosti, je vhodnější použít metodu PCR – SSP. V dnešní době bývá hojně využívána metoda za použití komerčních souprav.

POUŽITÁ LITERATURA

ALI, Naheed. *Kniha pro celiaky: nové poznatky pro nemocné, lékaře a pacienty*. Hodkovičky [Praha]: Pragma, 2015, 240 s. ISBN 978-80-7349-434-6.

BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, 164 s. ISBN 978-80-247-3533-7.

BRDIČKA, Radim a William DIDDEN. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén, 2015, 187 s. ISBN 978-80-7492-182-7.

BUREŠ, Jan. Celiakie v roce 2018. *Vnitřní lékařství* [online]. 2018, **64**(6), 602-610 [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: doi:10.36290/vnl.2018.084

CAIO, Giacomo, Lisa LUNGARO, Matteo GUARINO, Nicola SEGATA, Giorgio ZOLI, Umberto VOLTA a Roberto De GIORGIO. Effect of Gluten-Free Diet on Gut Microbiota Composition in Patients with Celiac Disease and Non-Celiac Gluten/Wheat Sensitivity. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(6), 2-23 [cit. 2021-5-23]. Dostupné z: doi:10.3390/nu12061832

CARRERAS, Enric, Carlo DUFOUR, Mohamad MOHTY a Nicolaus KRÖGER. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [online]. 7th edition. Cham (CH): Springer, 2019, 689 s. [cit. 2021-6-28]. ISBN 978-3-030-02277-8. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553942/>

CIRMANOVÁ, Veronika. Odborníci na celiakii diskutovali o možnostech diagnostiky a léčby. *Medical Tribune* [online]. Praha: MEDICAL TRIBUNE CZ, 2015, **11**(18) [cit. 2021-7-7]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/37196-odbornici-na-celiakii-diskutovali-o-moznostech-diagnostiky-a-lecby>

DOBROVOLNÁ, Marie, Milena VRANÁ a Jan Evangelista DYR. POLYMORFISMUS HLAVNÍHO HISTOKOMPATIBILNÍHO SYSTÉMU ČLOVĚKA: FUNKCE – INDIKACE – DETEKCE – INTERPRETACE. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2015, s. 45–50 [cit. 2021-6-28]. ISBN 00092770. ISSN 00092770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_01_45-50.pdf

DOLINSEK, Jernej. *SNAZŠÍ ŽIVOT S CELIAKIÍ: PŘÍRUČKA PRO ZAHÁJENÍ BEZLEPKOVÉ DIETY* [online]. 2. vydání. Itálie: Athesia, 2013, 76 s. [cit. 2021-7-4]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/3055590-Snazsi-zivot-s-celiakii.html>

DUNNE, Margaret R., Greg BYRNE, Fernando G. CHIRDO a Conleth FEIGHERY. Coeliac Disease Pathogenesis: The Uncertainties of a Well-Known Immune Mediated Disorder. *Frontiers in Immunology* [online]. 2020, **11**(1374), 1-14 [cit. 2021-5-1]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.01374

ENGSTROM-MELNYK, Julia, Pedro L. RODRIGUEZ, Olivier PERAUD a Raymond C. HEIN. Clinical Applications of Quantitative Real-Time PCR in Virology. *Methods in*

Microbiology [online]. 2015, **42**, 161-197 [cit. 2021-7-2]. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mim.2015.04.005.

FRÜHAUF, Pavel, Jiří BRONSKÝ, Petr DĚDEK, Jiří NEVORAL, Radana KOTALOVÁ, Josef SÝKORA, Natália SZITÁNYI, Lubomír ZAHRADNÍČEK a Alena ŠEBKOVÁ. Celiakie - doporučený postup pro diagnostiku a terapii u dětí a dospívajících. *Pediatric pro praxi*. 2016, **17**(3). ISSN 12130494. Dostupné z: doi:10.36290/ped.2016.045

GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, **133**, 1-4 [cit. 2021-7-2]. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1

HO, Shaun SC, Sophie HALL, Jacqueline I. KEENAN a Andrew S. DEN. Australasian Pediatric Gastroenterologists' Perspectives and Practices of Celiac Disease Diagnosis and Management. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. 2021, , 1-9 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: doi:10.1007 / s10620-021-06988-2

HOFFMANOVÁ, Iva. *Celiakie*. Praha: Mladá fronta, 2019, 270 s. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-5414-0.

HUSBY, Steffen, Sibylle KOLETZKO, Ilma KORPONAY-SZABÓ, Kalle KURPPA, Maria Luisa MEARIN, Carmen RIBES-KONINCKX, Raanan SHAMIR, Auricchio RENATA, Castillejo GEMMA, CHRISTENSEN Robin, DOLINSEK Jernej, GILLETT Peter, HRÓBJARTSSON Asbjørn, KOLTAJ Tunde, MAKI Markku, NIELSEN Sabrina Mai, POPP Alina, STORDAL Ketil, WERKSTETTER Katharina, WESSELS Margreet a Riccardo TRONCONE. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. January 2020, **70**(1), 141-156 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: doi:10,1097 / MPG.0000000000002497

CHOU, Roger, Ian BLAZINA, Christina BOUGATSOS, Katherine MACKEY, Sara GRUSING a Shelley SELPH. Screening for Celiac Disease. *A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force* [online]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2017, , 1-60 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK447450/>

KOHOUT, Pavel a Jaroslava PAVLÍČKOVÁ. *Celiakie: víte si rady s bezlepkovou dietou?*. Praha: Forsapi, 2010, 129 s. ISBN 978-80-87250-09-9.

KOHOUT, Pavel a Jaroslava PAVLÍČKOVÁ. *Celiakie: Dieta bezlepková*. Čestlice: Medica Publishing, 1994, 110 s. ISBN 80-901-1376-1.

KOHOUT, Pavel. Diagnostika a léčba celiakie. *Interní medicína pro praxi*. 2006, **8**(7), 324-326.

KRÁLOVÁ, Anna a Petra SEDLÁŘOVÁ. Zavádění lepku do stravy kojence. *Florence* [online]. 2015, **7**(8), 11-13 [cit. 2021-7-7]. Dostupné z: https://issuu.com/ambitmedia/docs/web_komplet_florence_7-15

LARA-ARMI, Fernanda Formaggi, Jeane Eliete Laguila VISENTAINER, Hugo Vicentin ALVES, Marco Antonio ROCHA-LOURES, Janisleia Silva Ferreira NEVES, Cristiane Maria COLLI, Quirino Alves de Lima NETO, Ricardo Alberto MOLITERNO a Ana Maria SELL. Optimization of HLA-B*27 ALLELE Genotyping by PCR-SSP. *Clinics* [online]. 2020, , 1-7 [cit. 2021-7-2]. Dostupné z: doi:10.6061/clinics/2020/e1840

LATTA, Jiří. Celiakie – od screeningu k diagnóze. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2012, **14**(5), 221-223 [cit. 2021-7-7]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/05/09.pdf>

LEBWOHL, Benjamin a Alberto RUBIO-TAPIA. Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology* [online]. 2021, **160**(1), 63–75 [cit. 2021–6–28]. Dostupné z: doi:10.1053 / j.gastro.2020.06.098

MADDEN, Kathleen a Devon CHABOT-RICHARDS. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory: an International Journal of Pathology. *Virchows Arch* [online]. 2019, **474**, 139-147 [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: doi:10.1007 / s00428-018-2501-3

MATZARAKI, Vasiliki, Vinod KUMAR, Cisca WIJMENGA a Alexandra ZHERNAKOVA. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biology* [online]. 2017, **18**(1) [cit. 2021–6–28]. ISSN 1474–760X. Dostupné z: doi:10.1186/s13059–017–1207–1

MEDRANO, Luz María, Bárbara DEMA, Arturo LÓPEZ-LARIOS, Carlos MALUENDA, Andrés BODAS, Natalia LÓPEZ-PALACIOS, NÚÑEZ Concepción, M. Ángeles FIGUEREDO a Miguel FERNÁNDEZ-ARQUERO. HLA and Celiac Disease Susceptibility: New Genetic Factors Bring Open Questions about the HLA Influence and Gene-Dosage Effects. *PLoS One* [online]. 2012, **7**(10), 1-7 [cit. 2021-7-7]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048403>

MEGIORNI, Francesca a Antonio PIZZUTI. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2012, **19**(88), 1-4 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: doi:10.1186 / 1423-0127-19-88

MENDES, Fernanda Berti Rocha, Aducto HISSA-ELIAN, Marilda Aparecida Milanez Morgado de ABREU a Virgílica Scaff GONÇALVES. Review: dermatitis herpetiformis. *An Bras Dermatol.* [online]. 2013, **88**(4), 594–599 [cit. 2021–6–28]. Dostupné z: doi:10.1590 / abd1806–4841.20131775

NAIYANA, Gujral, Freeman J. HUGH a Thomson ALAN BR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2012, **18**(42), 6036–6059 [cit. 2021–4–5]. Dostupné z: doi:10,3749/wjg.v18.i42.6036

NORDQUIS, Helen a Radia T. JAMIL. Biochemistry, HLA Antigens. *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC., 2021, , 1-7 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546662/>

ÖZER, Erdener. Celiac sprue. *PathologyOutlines.com* [online]. 2017 [cit. 2021–5–11]. Dostupné z: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/smallbowelceliacsprue.html>

Olerup SSP HLA typing kits. Instructions for Use Olerup SSP® HLA typing kits including Taq polymerase 2015 [Revised December 2020]. Dostupné na: <https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/technical/instructions-for-use/>

PELKOWSKI, Timothy D. a Anthony J. VIERA. Celiakie: diagnostika a léčba. *Medicina pro promoci* [online]. MEDICAL TRIBUNE CZ, únor 2014 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/32829>

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2012, 208 s. ISBN 978-80-247-3460-6.

POSNER EB, HASEEB M. Celiakie. [Aktualizováno 2020 20. listopadu]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 – leden Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441900/>

PŘIBYLOVÁ, Petra. Bezlepková dieta pro praxi. *Medicina pro praxi* [online]. Solen, 2012, **9**(2), 78-81 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2012/02/10.pdf>

RALBOVSKY, Nicole M. a Igor K. LEDNEV. Analysis of individual red blood cells for Celiac disease diagnosis. *Talanta* [online]. 2021, **221** [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: doi:10.1016 / j.talanta.2020.121642

REINTON, Nils, Asle HELGHEIM, Hamid SHEGARFI a Amir MOGHADDAM. A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1*05, DQB1*02 and DQB1*0302 to aid diagnosis of celiac disease. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2006, **316**, 125-132 [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2006.08.008

SAPONE, Anna, Julio C BAI, Carolina CIACCI, Jernej DOLINSEK, Peter HR GREEN, Marios HADJIVASSILIOU, Katri KAUKINEN, SANDERS David S, SCHUMANN Michael, ULLRICH Reiner, VILLANTA Danilo, VOLTA Umberto, CATASS Carlo, FASANO Alessio a Kamran ROSTAMI. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* [online]. 2012, **10**(13), 1-14 [cit. 2021-7-7]. ISSN 1741-7015. Dostupné z: doi:10.1186 / 1741-7015-10-13.

SELLESKI, Nicole, Lucas Malta ALMEIDA, Fernanda Coutinho de ALMEIDA, Lenora GANDOLFI, Riccardo PRATESI a Yanna Karla de Medeiros NÓBREGA. SIMPLIFYING CELIAC DISEASE PREDISPOSING HLA-DQ ALLELES DETERMINATION BY THE REAL TIME PCR METHOD. *Arquivos de Gastroenterologia* [online]. 2015, **52**(2), 143-146 [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: doi:10.1590/S0004-28032015000200013

SCIURTI, Martina, Fabiola FORNAROLI, Federica GAIANI, Chiara BONAGURI, Gioacchino LEANDRO, Francesco Di MARIO a Gian Luigi DE 'ANGELIS. Genetic susceptibility and celiac disease: what role do HLA haplotypes play? *Acta Biomed* [online]. 2018, **89**(9-S), 17-21 [cit. 2021-7-13]. Dostupné z: doi:10.23750 / abm.v89i9-S.7953

SPIERINGS, Eric a Katharina FLEISCHHAUER. Histocompatibility. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [online]. 2019, 7 [cit. 2021-6-28]. Dostupné z: doi:10.1007 / 978-3-030-02278-5_9

TORRES, Margareth Afonso, Maria Elisa Hue MORAES a . Nomenclature for factors of the HLA system. *Einstein* [online]. São Paul, 2011, 9(2), 249-251 [cit. 2021-7-11]. Dostupné z: doi:10.1590 / S1679-45082011MD1914

UNDLIEN, Dag E, Benedicte A LIE a Erik THORSBY. HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends Genetics* [online]. 2001, 17(2), 93-100 [cit. 2021-7-13]. Dostupné z: doi:10.1016/s0168-9525(00)02180-6.

VERMA, Anil K, Alka SINGH, Simona GATTI, Elena LIONETTI, Tiziana GALEAZZI, Chiara MONACHESI, Elisa FRANCESCHINI, MAKHARIA Govind K, CATASSI Carlo a Vineet AHUJA. Validation of a novel single-drop rapid human leukocyte antigen-DQ2/-DQ8 typing method to identify subjects susceptible to celiac disease. *JGH Open: An open access journal of gastroenterology and hepatology* [online]. 2018, 2(6), 311-316 [cit. 2021-7-10]. Dostupné z: doi:10.1002/jgh3.12090

VILLANACCI, Vincenzo, Alessandro VANOLI, Giuseppe LEONCINI, Giovanni ARPA, Tiziana SALVIATO, Luca Reggiani BONETTI, PARENTE Paola, Carla BARONCHELLI a Luca SARAGONI. Celiac disease: histology-differential diagnosis-complications. A practical approach. *Pathologica - Journal of the Italian Society of Anatomic Pathology and Diagnostic Cytopathology* [online]. September 2020, 112(3), 186-196 [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: doi:10.32074 / 1591-951X-157

VINAGRE-ARAGÓN, Ana, Panagiotis ZIS, Richard GRUNEWALD a Marios HADJIVASSILIOU. Movement Disorders Related to Gluten Sensitivity: A Systematic Review. *Nutrients* [online]. 2018, 10(8), 1-14 [cit. 2021-6-28]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10081034

Slovníky. Velký lékařský slovník [online]. ©1998-2021 [cit. 2021-06-22]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>.

5 PŘÍLOHY

Příloha A Hodnocení výsledků typizace DQA1 a DQB1

Příloha A Hodnocení výsledků typizace DQA1 a DQB1 (upraveno dle Olerup SSP HLA typing kits, 2015)

Pozice	Amplifikované DQA1 alely	Amplifikované DQB1 alely
1	*02:01:01:01–02:01:02	–
2	*03:01:01, 03:01:03–03:04	–
3	*05:01:01:01–05:09, 05:11	–
4	*05:02–05:03:01:02, 05:04?, 05:06:01:01–05:07	–
5	*05:01:01:01–05:03:01:02, 05:05:01:01–05:09, 05:11	–
6	*05:02?, 05:04?, 05:05:01:01– 05:05:01:10, 05:08–05:09, 05:10?, 05:11	–
7	*05:09	–
8	*02:01:01:01–02:01:02, 03:01:01, 03:01:03	–
9	*01:01:01:01– 01:01:01:03, 01:01:01:05–01:16N	–
10	*05:02?, 05:04?, 05:05:01:01– 05:05:01:10, 05:08, 05:10?, 05:11	–
11	*05:01:01:01–05:01:02, 05:02?, 05:03:01:01–05:03:01:02, 05:04?, 05:06:01:01–05:07	–
12	–	*02:01:01–02:39, 02:41–02:71, 02:73– 02:104
13	–	*02:02:01:01–02:03, 02:06, 02:10–02:12, 02:26, 02:50, 02:62, 02:64–02:65, 02:95, 02:97
14	–	*02:01:01–02:01:24, 02:04–02:05, 02:07:01–02:09, 02:13–02:25, 02:27– 02:47, 02:49, 02:51–02:61, 02:63, 02:66– 02:79, 02:81–02:83, 02:85–02:88, 02:90– 02:94, 02:96N, 02:98–02:104, 03:01:01:01–03:01:01:12, 03:01:01:14– 03:23:02, 03:25:01–03:78, 03:80–03:96, 03:98–03:163, 03:166–03:274, 04:01:01:01–04:02:01:01, 04:02:01:04– 04:42, 05:01:01:01–05:02:10, 05:02:12– 05:13, 05:15–05:83, 05:85–05:158, 06:01:01:01–06:37, 06:39–06:85, 06:87– 06:101, 06:105–06:217, 06:219, 06:221– 06:226, 06:228–06:249

15	-	<p>*02:03, 02:77, 03:03:02:01-03:03:15, 03:06, 03:12, 03:15, 03:20, 03:25:01-03:26, 03:30-03:31, 03:33-03:34, 03:38-03:41, 03:43, 03:65, 03:74, 03:79, 03:86-03:91Q, 03:95N-03:99Q, 03:104-03:105, 03:111-03:113, 03:117, 03:123-03:124, 03:126, 03:136-03:137, 03:141, 03:145, 03:149, 03:155-03:156, 03:168, 03:176-03:177, 03:200, 03:209, 03:212, 03:222, 03:227, 03:230, 03:234, 03:238-03:239, 03:248-03:249, 03:258, 03:270, 04:03:01-04:03:03, 06:03:10, 06:51:01, 06:66, 06:96, 06:168, 06:172</p>
16	-	<p>*02:01:01-02:01:06, 02:01:08-02:01:20, 02:01:22-02:02:05, 02:04-02:16, 02:18N-02:36, 02:38-02:76, 02:78-02:94, 02:96N-02:104, 03:02:01:01-03:02:09, 03:02:11-03:02:13, 03:02:15-03:02:26, 03:07-03:08, 03:11, 03:18, 03:32, 03:37, 03:45, 03:62-03:64, 03:66N-03:68, 03:70, 03:81, 03:85, 03:106-03:107, 03:125, 03:146, 03:153, 03:161, 03:174-03:175, 03:178-03:179, 03:184-03:185, 03:189-03:190, 03:199, 03:203-03:205, 03:210-03:211, 03:213N-03:215, 03:220-03:221, 03:223-03:225, 03:228-03:229, 03:233, 03:237N, 03:240, 03:245, 03:247, 03:251, 03:261, 03:263, 03:265, 03:269N, 03:273-03:274, 06:29, 06:63, 06:123, 06:139</p>

17	-	<p>*03:02:01:01-03:02:10, 03:02:12-03:03:04, 03:03:06-03:03:15, 03:06, 03:08, 03:11-03:12, 03:15, 03:18, 03:20, 03:23:02, 03:25:01-03:26, 03:30-03:34, 03:37-03:41, 03:43, 03:45, 03:62-03:63, 03:65-03:68, 03:70, 03:79, 03:81, 03:85-03:89, 03:91Q, 03:95N-03:99Q, 03:104-03:107, 03:110, 03:112, 03:117, 03:123-03:126, 03:136-03:137, 03:145-03:146, 03:149, 03:153, 03:155-03:156, 03:161, 03:168, 03:174-03:179, 03:185, 03:189-03:190, 03:200, 03:203-03:204, 03:209-03:213N, 03:215, 03:217, 03:221-03:225, 03:227-03:230, 03:233-03:234, 03:237N-03:239, 03:245, 03:247-03:249, 03:251, 03:258, 03:261, 03:263, 03:265, 03:269N-03:270, 03:273-03:274, 04:03:01-04:03:03, 06:02:05, 06:03:10, 06:03:26, 06:04:07, 06:19:01-06:19:02, 06:63, 06:87, 06:139, 06:168, 06:190:01</p>
18	-	<p>*03:04:01-03:04:03, 03:09, 03:11, 03:14:01-03:14:02, 03:80, 03:138, 06:246</p>
19	-	<p>*03:01:01:01-03:01:01:12, 03:01:01:14-03:103, 03:106-03:108, 03:110-03:153, 03:155-03:188, 03:190-03:257, 03:259-03:274, 04:01:03, 04:03:03, 04:09</p>
20	-	<p>*03:06?-03:08?, 03:11?, 03:13?-03:15?, 03:17:01?-03:18?, 03:19:01-03:19:02, 03:20?, 03:23:01?-03:23:02?, 03:25:02?-03:26?, 03:37?, 03:40?, 03:48?, 03:52?-03:71?, 03:74?-03:78?, 03:81?-03:82?, 03:101?-03:104?, 03:106?-03:112?, 03:118N?, 03:120?-03:131?, 03:133?-03:137?, 03:140?-03:149?, 03:150, 03:151?-03:163?, 03:165?-03:167?, 03:170?-03:179?, 03:183?-03:185?, 03:187?-03:189?, 03:192?-03:194?, 03:201?-03:205?, 03:207?-03:210?, 03:212?-03:221?, 03:223?-03:230?, 03:232?-03:238?, 03:240?, 03:244?, 03:255?-03:262?, 03:267?-03:274?</p>

21	-	<p>*03:01:01:01–03:01:01:12, 03:01:01:14–03:01:07, 03:01:09–03:01:39, 03:04:01–03:04:03, 03:09–03:10:02:02, 03:13–03:14:02, 03:16, 03:19:01–03:19:02, 03:21–03:22, 03:24, 03:27–03:29, 03:35–03:36, 03:42, 03:44, 03:46–03:60, 03:69, 03:71, 03:73, 03:75–03:77, 03:80, 03:82–03:84N, 03:92–03:94, 03:101–03:103, 03:108, 03:114–03:116, 03:118N–03:122, 03:127–03:131, 03:133–03:135, 03:138–03:140, 03:142–03:144, 03:147–03:148, 03:150, 03:152, 03:157–03:160, 03:162–03:167, 03:169–03:173, 03:180, 03:182–03:183, 03:186–03:188, 03:191–03:198, 03:201–03:202, 03:206–03:208, 03:216, 03:218–03:219, 03:231–03:232, 03:235–03:236, 03:241–03:243, 03:246, 03:252–03:257, 03:260, 03:264, 03:266–03:268, 03:271</p>
22	-	<p>*03:02:01:01–03:02:26, 03:07–03:08, 03:11, 03:18, 03:32, 03:37, 03:45, 03:63–03:64, 03:66N–03:68, 03:70, 03:85, 03:106–03:107, 03:125, 03:146, 03:153, 03:161, 03:174–03:175, 03:178–03:179, 03:184–03:185, 03:189–03:190, 03:199, 03:203–03:205, 03:210–03:211, 03:213N–03:215, 03:220–03:221, 03:223–03:224, 03:228–03:229, 03:233, 03:237N, 03:240, 03:245, 03:247, 03:251, 03:261, 03:263, 03:265, 03:269N, 03:273–03:274, 06:29, 06:123, 06:139</p>
23	-	-