

Využití PCR metod při stanovení alergií na lepek

Bc. Nikola Königová

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola Königová**
Osobní číslo: **T12552**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Využití PCR metod při stanovení alergií na lepek**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

- 1. zpracujte literární přehled týkající se obilovin, celiakie, PCR-SSP a HLA**
- 2. popis současných možností molekulárně-biologického screeningu celiakie prováděného na Ústavu Imunologie ve Fakultní nemocnici v Olomouci**

Praktická část

- 1. zaměřte na PCR-SSP metody, za současného využití laboratorního systému pracoviště ve FN a interpretujte výsledky**
- 2. Stanovte četnost výskytu jednotlivých HLA-DQ heterodimerů u pacientů s podezřením na celiakii za rok 2012 a 2013**
- 3. Sumarizujte přínos této metodiky pro Dětskou kliniku ve FN v Olomouci.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Briani, Ch., Samaroo, D., Alaedini, A, Celiac disease: From gluten to autoimmunity, Autoimmunity Reviews. 2008, 7, s. 644-647.

Di Sabatino, A., Corazza, G.R. Celiac disease. The Lan cet, 2009, roč. 373, č. 9673, s. 1480-1493.

Fallang, L.E., Bergseng, E., Hotta, K., Berg-Larsen, A., Kim, C.Y., et al., Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation, Nat Immunol 2009, 10:1096-1101.

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.R., Mearin, M.L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Leigeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, K.P., European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease, JPGN, Volume 54, Number 1, January 2012.

Karell, K., et al, HLA Types in Celiac Disease Patients not Carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2), Heterodimer: Results From the European, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2003, Elsevier Science Inc., Human Immunology 64, 469-477.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

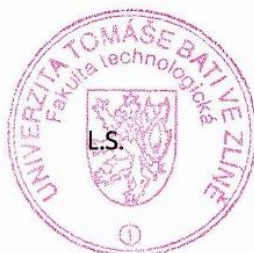
10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Königová Nikola; Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně7.4.2014.....

..........

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá problematikou laboratorní diagnostiky celiakie, geneticky podmíněného autoimunitního onemocnění, které vzniká abnormální reakcí na lepek v potravě. Odhadovaná prevalence celiakie je v Evropě a USA 1:100, v ČR 1:200-250, přičemž se častěji vyskytuje u žen než u mužů v poměru zhruba 2:1. Přestože literatura uvádí, že tímto onemocněním trpí až 1 % populace, mnozí z postižených si toho nejsou vědomi. Genetická predispozice k celiakii je spojena s antigeny tkáňové slučitelnosti, které jsou označovány jako HLA (z angl. Human Leukocyte Antigens). Asi 90-95 % pacientů s celiakií jsou nositeli heterodimeru HLA-DQ2, který je kódovaný alelami DQA1*05 a DQB1*02 a/nebo heterodimeru DQ8 kódovaného alelou DQB1*03:02 zpravidla v kombinaci DQA1*03 variantou. Molekulárně-genetická typizace těchto HLA znaků se proto u celiakie využívá jako genetický test s vysokou negativní prediktivní hodnotou. Praktická část této práce porovnává vybrané metody k vyšetření HLA znaků u celiakie, které využívají polymerázovou řetězovou reakci, a souborně zpracovává výsledky vyšetření provedených v laboratořích Ústavu imunologie Fakultní nemocnice Olomouc.

Klíčová slova: celiakie, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA typizace, PCR-SSP, obilné bílkoviny, lepek

ABSTRACT

This work deals with the laboratory diagnosis of celiac disease, a genetically conditioned autoimmune disease with an estimated prevalence in Europe and USA 1:100 and in Czech republic 1:200-250, female : male ratio of approximately 2:1. Literature indicates that this disease affects as many as 1 % of the population, while many of the disability are often not even aware of. Genetic predisposition to celiac disease is associated with tissue compatibility antigens which are referred to as HLA (from English. Human Leukocyte Antigens). About 90-95 % of patients with celiac carry heterodimers DQ2 or DQ5, encoded by DQA1*05 and DQB1*02 alleles both in cis or in trans configuration, and DQ8 molecules, encoded by DQB1*3:02 generally in combination with DQA1*03 variant. HLA molecular typing of celiac disease is essentially a genetic test with a negative predictive value. The practical part of this work compares some methods for testing for celiac disease HLA characters using polymerase chain reaction and comprehensively presents results of the tests carried out in the laboratories of the Institute of Immunology University Hospital Olomouc.

Keywords: celiac disease, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA typing, PCR-SSP, cereal proteins, gluten

Moje poděkování patří zejména Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za ochotu a trpělivost při zpracování diplomové práce. Dále mé poděkování patří doc. MUDr. Františku Mrázkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce a při práci v laboratoři. Díky patří i celému Ústavu imunologie za poskytnutí informací a příjemné pracovní podmínky při řešení experimentů. Tato práce vznikla s částečnou podporou projektu CZ.1.05./2.1.00/01.0030.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 OBILOVINY	13
1.1 STRUKTURNÍ USPOŘÁDÁNÍ OBILNÉHO ZRNA	13
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ZRNA	14
1.3 ZÁKLADNÍ SLOŽENÍ OBILNÝCH BÍLKOVIN	15
1.4 ALERGIE NA OBILOVINY	15
2 CELIAKIE	17
2.1 ETIOLOGIE ONEMOCNĚNÍ - LEPEK VE STRAVĚ.....	19
2.2 PATOGENEZE ONEMOCNĚNÍ.....	19
2.3 PROJEVY ONEMOCNĚNÍ	22
2.4 DIAGNÓZA ONEMOCNĚNÍ	23
2.5 GENETICKÁ VYŠETŘENÍ SOUVISEJÍCÍ S DIAGNOSTIKOU CELIAKIE	25
2.6 LÉČBA CELIAKIE.....	25
3 HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS – HLA	26
3.1 GENOVÁ OBLAST HLA.....	26
3.1.1 HLA I. třídy.....	27
3.1.2 HLA II. třídy	27
3.1.3 HLA III. třídy	28
3.2 NOMENKLATURA HLA.....	28
3.3 POLYMORFISMUS HLA SYSTÉMU	28
3.4 LABORATORNÍ METODY K URČOVÁNÍ HLA.....	29
3.5 HLA A AUTOIMUNITNÍ CHOROBY	29
4 PCR-SSP (POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE SE SEKVENČNĚ SPECIFICKÝMI PRIMERY)	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
5 CÍL PRÁCE	35
6 MATERIÁL A METODY	36
6.1 CHEMIKÁLIE.....	36
6.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	36
6.3 POUŽITÝ MATERIÁL.....	37
6.4 IZOLACE DNA.....	37
6.4.1 Izolace DNA z krve vysolovací technikou.....	37
6.4.2 Mikroizolace pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit	38
6.4.3 Izolace pomocí přístroje Arrow (NorDiag, Norsko).....	40

6.5	MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA	41
6.6	PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU, ELEKTROFORÉZA	42
6.7	URČENÍ HLA VARIANT RIZIKOVÝCH PRO CELIAKII POMOCÍ KOMPLETNÍ GENOTYPIZACE HLA-DQ LOKUSŮ	44
6.8	STANOVENÍ GENOTYPU HLA-DQB1* LOW (NÍZKÉ ROZLIŠENÍ).....	45
6.9	STANOVENÍ GENOTYPU DQA1*	47
6.10	CÍLENÁ DETEKCE HLA VARIANT RIZIKOVÝCH PRO CELIAKII	48
6.11	PODMÍNKY AMPLIFIKACE V TERMOCYKLÉRU PRO SOUPRAVU BAG- HISTOTYPE-CELIAKIE.....	50
6.12	HODNOCENÍ NÁLEZŮ VE VZTAHU K CELIAKII	50
6.13	VALIDACE METODY STANOVENÍ HLA ZNAKŮ ASOCIOVANÝCH S CELIAKII METODOU PCR-SSP POMOCÍ SOUPRAVY BAG-HISTOTYPE-CELIAKIE.....	51
7	VÝSLEDKY	53
7.1	REPREZENTATIVNÍ PŘÍKLADY URČOVÁNÍ HLA ALEL PREDISPONUJÍCÍCH K CELIAKII POMOCÍ METODY PCR-SSP	53
7.2	VÝSLEDKY VALIDACE SOUPRAVY BAG-HISTOTYPE-CELIAKIE	57
7.3	PŘEHLED VÝSLEDKŮ VYŠETŘENÍ ALEL RIZIKOVÝCH PRO CELIAKII POMOCÍ SOUPRAVY BAG-HISTOTYPE-CELIAKIE	58
8	DISKUZE	60
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	68
	SEZNAM OBRÁZKŮ	70
	SEZNAM TABULEK.....	71
	SEZNAM PŘÍLOH.....	72

ÚVOD

Celiakie je definovaná jako celoživotní chronické autoimunitní onemocnění se silnou genetickou vazbou na znaky tkáňové slučitelnosti HLA (z angl. Human Leukocyte Antigens) DQ2, DQ8, projevující se zánětlivými změnami různého stupně ve sliznici tenkého střeva, které jsou vyvolané trvalou intolerancí glutenu – bílkovinných komplexů zrn pšenice, ječmene, žita a ovsa. Základem diagnostiky je sérologické vyšetření s průkazem positivity protilátek proti endomysiu (ENA) a tkáňové transglutamináze (tTG). Charakteristické změny v histologii sliznice tenkého střeva začínají od přítomnosti zvýšeného počtu intraepiteliálních lymfocytů přes změny vzhledu krypt po různý stupeň atrofie až vymizení klků. Součástí diagnostiky je uspokojivá klinická, laboratorní a histologická odpověď na bezlepkovou dietu.

Před několika roky byla celiakie považována za vzácnou chorobu. Zavedení vysoce senzitivních a specifických sérologických testů protilátek proti endomysiu a tkáňové transglutamináze ukázalo na vysokou frekvenci nepoznaných případů atypických a “tichých“ forem celiakie. Prevalence celiakie se v evropské populaci uvádí okolo 1 %. Celiakie se objevuje častěji u žen než u mužů.

Celiakie je onemocnění se silnou genetickou vazbou. Základem genetické predispozice je asociace celiakie s variantami HLA-II. třídy DQ2/DQ8, které se ale v bílé populaci Evropy a USA vyskytují u 25–40 % jedinců. Až 95 % pacientů s celiakií má znak HLA–DQ2 a přibližně 5 % má znak HLA–DQ8. Nepřítomnost uvedených znaků u vyšetřovaných jedinců vylučuje přítomnost nebo budoucí vývoj celiakie s téměř 100% jistotou.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBILOVINY

Obiloviny se řadí mezi traviny a téměř všechny známé obiloviny patří do čeledi lunicovité, *Poaceae*. Obiloviny patřící do čeledi lipnicovité jsou si vzájemně podobné jak v tvorbě zrna a ve struktuře, tak v jeho chemickém složení [1].

Obiloviny jsou dnes nenahraditelnou součástí každodenního života a to nejen v potravinářském a krmivářském průmyslu, ale využívají se např. na výrobu destilátů či biopaliva.

Obiloviny z hlediska výživy, jak v přímé, tak i v nepřímé spotřebě jsou pro lidstvo velmi cenným přísunem energie, sacharidů, vlákniny, rostlinných bílkovin, minerálních látek (K, Mg, Fe a Ca) i vitaminů (B1, B2 a E). Při optimální denní spotřebě snižují hladinu cukru, cholesterolu a působí preventivně před řadou civilizačních chorob. Také zvyšují peristaltiku střev, čímž podporují trávení a čistí střeva [2, 3, 4].

1.1 Strukturní uspořádání obilného zrna

Plodem obilnin je obilka. Podle toho, zda na povrchu obilky jsou po výmlatu zachovány kvítkové orgány, plucha a pluška, rozlišujeme obilky pluchaté (obilka je uzavřena pluchou a pluškou) a nahé (povrch obilky tvoří oplodí).

Morfologická stavba zrna všech obilovin je zhruba stejná. Zrna se liší zejména tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev [1, 2].

Každá obilka se skládá z endospermu, klíčku a obalových vrstev (Obr. 1).

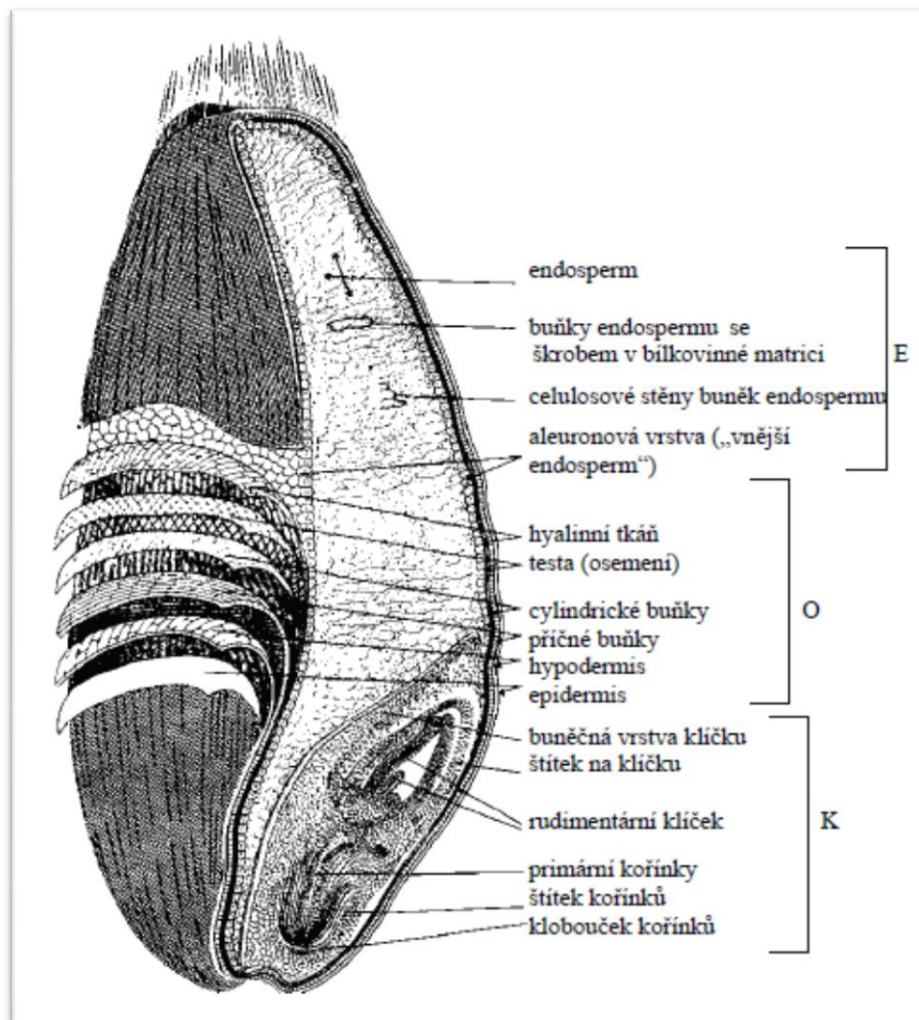
Endosperm – představuje 84-86 % hmotnosti zrna, obsahuje zejména škrob a bílkoviny a je oddělen vrstvou aleuronových buněk obsahující bílkoviny, tuky, minerální látky a vitamíny. Endosperm zajišťuje výživu zárodku obilky a je hlavním zdrojem energie a bílkovin ve výživě.

Aleuronová vrstva – obsahuje vysoký podíl bílkoviny, tyto buňky mají nejvyšší obsah minerálních látek ze všech buněk zrna. Při vymílání se výrazně zvyšuje obsah minerálií v mouce.

Moučné jádro – obsahuje hlavně škrob.

Klíček – nejmenší část obilky, je oddělen od endospermu štítkem, který obsahuje až 33% bílkovin. Slouží jako zárodek obilky, obsahuje mnoho živin jako jednoduché cukry, bílkoviny, aminokyseliny, vitamíny a tuky. Klíčky se před mletím odstraňují z důvodu nežádoucího žluknutí tuků.

Obaly – tvoří 8-14 % hmotnosti zrna, tvořeny oplodím a osemením, které chrání endosperm a klíček před vysycháním a poškozením [1, 2, 3].



Obr. 1: Anatomické složení obilky - Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním jeho morfologických vrstev [2].

1.2 Chemické složení zrna

Nejvíce zastoupenou složkou v obilném zrně jsou sacharidy, dále pak bílkoviny, lipidy, minerální látky, vitamíny, barviva a v menším množství složky s růstovými regulačními a genetickými funkcemi [5].

1.3 Základní složení obilných bílkovin

Obilné bílkoviny můžeme klasifikovat podle několika hledisek. Podle morfologického původu rozlišujeme bílkoviny endospermu, aleuronové vrstvy a zárodečné, pocházející z klíčku.

Podle biologické funkce v rostlině můžeme rozlišit bílkoviny metabolicky aktivní, tzn. cytoplasmatické s funkcemi v buňce a zásobní, které můžeme rozdělit na nízkomolekulární a vysokomolekulární.

Podle chemického složení rozlišujeme jednoduché bílkoviny bez jiných sloučenin a bílkoviny komplexní: lipoproteiny, glykoproteiny, nukleoproteiny [1, 2].

V roce 1907 publikoval Osborne frakcionaci pšeničných proteinů na základě jejich rozpustnosti v různých rozpouštědlech. Bílkoviny tak byly rozděleny do čtyř skupin:

1. albuminy - rozpustné ve vodě;
2. globuliny - rozpustné v roztocích solí;
3. prolaminy - rozpustné v 70% etanolu;
4. gluteliny - zčásti rozpustné ve zředěných roztocích kyselin a zásad.

Zvláštní postavení má zejména bílkovina pšeničná, která jako jediná vytváří běžně s vodou pružný gel, tzv. lepek, jehož fyzikální vlastnosti určují jakost pečiva. Proteiny gliadin a glutenin (pšeničné proteiny) vytváří s vodou lepek, který nemohou jíst lidé postižení celiakií [1].

Proteiny neboli bílkoviny jsou biopolymery, jejichž molekuly dosahují někdy ohromných rozměrů. Relativní molekulová hmotnost těchto látek dosahuje hodnot řádově stovek tisíc až milionů [2, 6].

1.4 Alergie na obiloviny

Mezi nejdůležitější obiloviny v našich podmínkách řadíme pšenici (pšenice obecná nebo špalda), ječmen, žito a oves. Hlavními proteiny obilí jsou gliadiny, globuliny a gluteiny, které jsou obsaženy v tzv. lepku. Lepek je jednou z mnoha bílkovin obilné mouky, byť nejdůležitější [7, 8]. Gliadin, sekalin a hordein jsou zodpovědné za onemocnění, která se označují jako glutenové intolerance. Pod označením alergie na mouku je chápána imunologicky podmíněná přecitlivělost, která může být zaměřena proti jakékoliv bílkovině mouky. Dříve však byla alergie na mouku spojována výhradně s alergií na lepek.

Z hlediska imunologických mechanismů a cílových bílkovin dělíme alergie na mouku [6, 7, 8] následovně:

Typ A – alergie na lepek zprostředkovaná protilátkami izotypu IgE, tj. atopická přecitlivělost.

Typ B – alergie na lepek zprostředkovaná bílými krvinkami – lymfocyty, tj. neatopická přecitlivělost (celiakie).

Typ C – alergie na jiné bílkoviny mouky, přes izotyp IgE, tj. atopická přecitlivělost.

Typ D – alergie na jiné bílkoviny mouky přes lymfocyty, tj. neatopická přecitlivělost.

2 CELIAKIE

Celiakie, celiakální sprue nebo glutenová enteropatie - jsou společná označení pro celosvětově se vyskytující onemocnění dětí i dospělých. Jde o autoimunitní onemocnění vyvolané nesnášenlivostí lepku, resp. jeho peptidických štěpů s typickou sekvencí aminokyselin. Lepek je bílkovinný komplex obsažený v povrchové části obilných zrn. Štěpné produkty lepku tedy u geneticky vnímavých osob vyvolávají nepřiměřenou reakci imunitního systému s trvalou tvorbou protilátek k štěpným produktům lepku a posléze i k bílkovinám těla vlastním [9].

V dřívějších dobách bylo považováno onemocnění celiakií za velmi vzácné. Počet osob postižených chorobou se pohyboval okolo 1:1000. V současné době je odhad prevalence onemocnění asi 1:100 (1 %). Odhad prevalence v České republice vycházející z epidemiologických studií se pohybuje okolo 1:200, tj. 40000 – 50000 postižených. Diagnostikováno a následně léčeno je pouze 10 % z tohoto počtu postižených. Příznaky celiakie se mohou projevit u dětí od 3. – 6. měsíce po podávání prvních kašiček s obsahem lepku, u dospělých se příznaky celiakie mohou projevit kdykoliv, nejčastěji mezi 30. a 50. rokem života [10, 11].

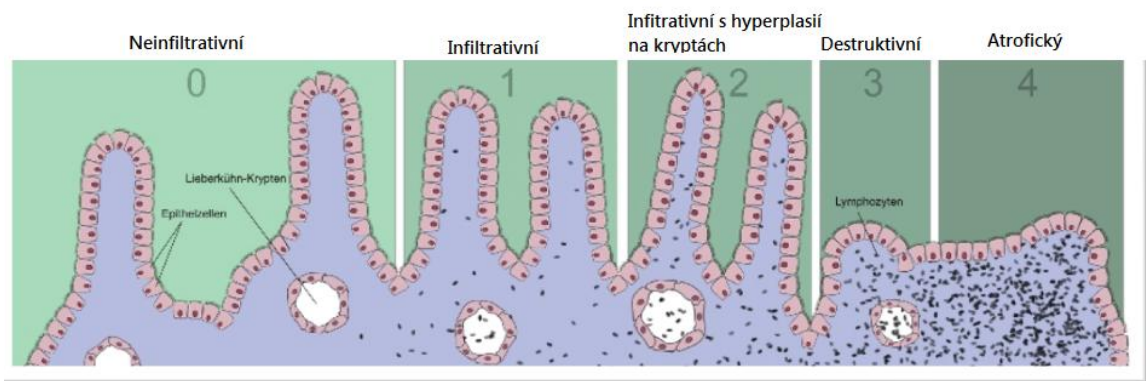
Samotná celiakie může být vyjádřena v několika formách. V současné době rozeznáváme pět forem celiakie, které se od sebe liší anamnézou, charakterem a intenzitou obtíží, které mohou být typické či atypické, a také histologickým nálezem na sliznici tenkého střeva (Obr. 2) [12].

Podle literatury [11, 13] se rozlišují tyto formy celiakie:

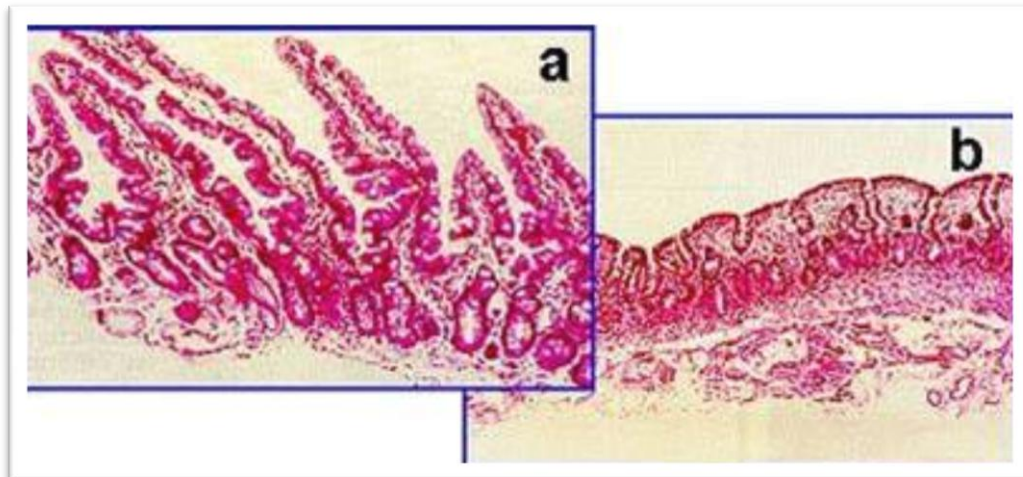
- *Symptomatická forma* se vyznačuje typickými (klasickými) i atypickými (mimostřevními) příznaky. Histologický nález na tenkém střevě je pozitivní, bývá pozitivní i imunohistochemické vyšetření. Zároveň jsou diagnostikovány v séru specifické protilátky.
- *Duhringova herpetiformní dermatitida* je zvláštním typem symptomatické formy s výraznými kožními projevy, u níž se objevují atypické nebo jen mírné příznaky intestinální. Histologické, imunohistochemické a sérologické vyšetření je pozitivní.
- *Silentní celiakie* se liší od atypické formy jen tím, že nejsou přítomny žádné klinické příznaky. Ostatní nálezy vyšetření jsou shodné.
- *Latentní celiakie* má pozitivní pouze sérologické vyšetření protilátek. Histologické nálezy a klinické příznaky nejsou přítomny.

- *Potenciální celiakie* má na rozdíl od ostatních forem všechny nálezy a příznaky negativní. Někdy mohou být přítomny ve zvýšené míře v submukózní vrstvě sliznice intraepiteliální lymfocyty (IEL).

Lepek je pro organismus pacienta s celiakií nepřijatelný. Je to bílkovina, která vyvolává přesun buněk odpovědných za imunologickou reakci do sliznice (tzv. imunokompetentní buňky). Tyto buňky, konkrétně zejména podtyp bílých krvinek označovaných jako lymfocyty, podmiňují produkci protilátek proti lepku. Důsledkem jejich působení ve střevní sliznici dochází k zánětu a poškození střevních klků (Obr. 3). Tyto tzv. intraepiteliální lymfocyty nachází také patolog ve zvýšené míře při mikroskopickém vyšetření sliznice u vzorků odebraných ze střeva pacientů s celiakií [14, 15].



Obr. 2: Schematické znázornění změn sliznice tenkého střeva podle Marshovy klasifikace [16].



Obr. 3: A) Sliznice tenkého střeva u zdravého člověka, B) sliznice tenkého střeva u pacienta s celiakií [17].

2.1 Etiologie onemocnění - lepek ve stravě

Složení lepku je zcela zvláštní zastoupením některých stavebních kamenů této bílkoviny, zejména aminokyselin. V celé rostlinné říši není druhá bílkovina s tak vysokým obsahem dvou aminokyselin (glutamin, prolin) a tato okolnost se významně uplatňuje při vzniku autoimunitní reakce [6, 9, 12].

Pšeničné proteiny se výrazně liší od ostatních rostlinných proteinů svojí schopností tvořit pružný gel-lepek. Po štěpení lepku proteolytickými enzymy vzniká kromě jiných částí též α -gliadin, což je polypeptid, který způsobuje typické příznaky celiakie. Dalším štěpením se vědcům podařilo izolovat z α -gliadinu peptid B 3142, který se skládá z 53 aminokyselin, jejichž sekvence je známá, a který je schopen sám vyvolat celiakii [18, 19, 20].

2.2 Patogeneze onemocnění

V patogenezi celiakie, podobně jako u jiných autoimunitních chorob, existuje genetická predispozice ke vzniku autoimunitní reakce provázené většinou tvorbou protilátek a spouštěč, který tuto reakci vyvolává. U celiakie je spouštěčem lepek [21].

U celiakie je genetická predispozice konkrétně podmíněna variantami dvou genů lokalizovaných na krátkém raménku šestého chromozomu (HLA-DQB1, HLA-DQA1). Přítomnost rizikových genetických variant spolu se selháním kontrolních mechanismů imunitního systému vede k abnormální reakci na antigeny lepku a tělo následně začíná produkovat

protilátky i proti vlastním antigenům (Obr. 4). Zvláště velké množství protilátek je produkováno proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG), enzymu štěpícímu bílkoviny včetně lepku, a proti vazivové tkáni svalových vláken, endomysiu (anti-EMA). Produkci protilátek k tkáňové transglutamináze, endomysiu i deaminovanému gliadinovému peptidu (DGP) zajišťují vyselektované B-lymfocyty, které se diferencují v plasmatické buňky. Ty se hromadí v prostorech pod atrofovanou sliznicí a produkují protilátky, které přecházejí do krevního oběhu a ostatních tělních tekutin, kde mohou být detekovány a stanovovány. Pokud přísun lepku v potravě končí nasazením bezlepkové diety, postupně vymírají i klony B-lymfocytů, které produkují protilátky proti tTG a DGP [22, 23, 24].

V patogenezi celiakie hrají významnou úlohu i monocyty, které produkují zánětlivé cytokiny (např. TNF, IL-1), látky vyvolávající zánět střevní sliznice, který se zanedlouho mění v chronický. Aktivita imunitních buněk vede různými efektorovými mechanismy zánětu k poškození až vymizení střevních klků a tím dochází ke špatnému trávení mléčného a řepného cukru a nedostatečnému vstřebávání bílkovin, tuků, některých vitaminů, vápníku a železa. Dochází k celkovému vyčerpávání organismu, které může vést až k jeho kolapsu. Důsledkem poškození sliznice tenkého střeva je tedy malabsorpce různého rozsahu, která se promítá do klinického obrazu [14, 22, 23, 25].

Náchylnost k celiakii je sice geneticky podmíněná, ale samotné geny neodpovídají za vznik nemoci. Kdyby byly zodpovědné výhradně geny, musela by se celiakie vyskytovat hojněji (zastoupení rizikových variant je v populaci mnohem vyšší než výskyt celiakie). To znamená, že náchylnost se dědí, ale navíc hrají roli ještě další faktory. Spouštěcími mechanismy může být stres, těhotenství, trauma, operace, virová infekce, chybné stravovací návyky a další [14, 24].

Hlavní složka genetické predispozice k celiakii je známá. Jedná se o asociaci k určitým variantám genů pro HLA antigeny II. třídy, které se nacházejí do oblasti skupiny genů HLA-DR a HLA-DQ. Jsou to geny kódující HLA glykoproteiny, jejichž molekulu tvoří alfa a beta řetězce a kombinací těchto řetězců vznikají různé varianty glykoproteinů [28].

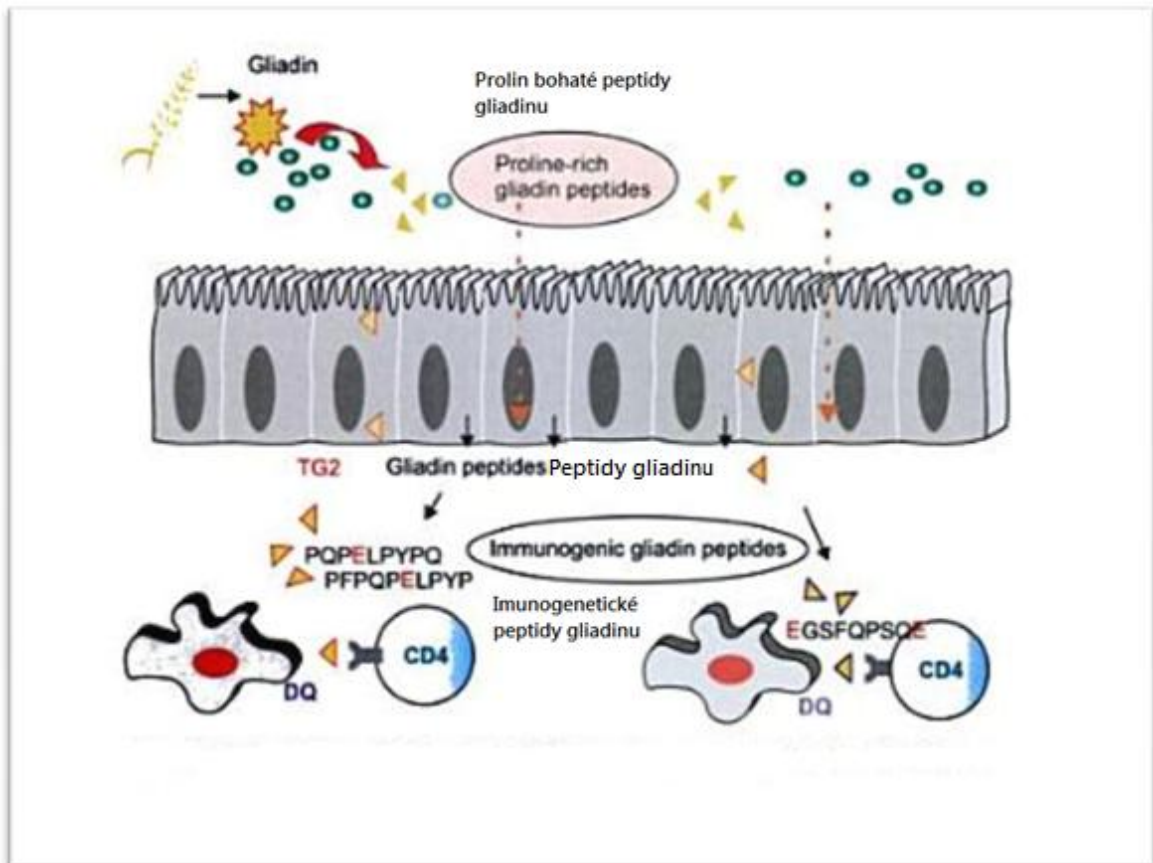
Riziko vzniku celiakie odpovídá kombinaci určitých HLA znaků, přičemž rizikové varianty HLA-DQ2 a HLA-DQ8 jsou rozšířeny po celém světě. Např. prevalence rizikového znaku HLA-DQ2 v běžné populaci koreluje s prevalencí celiakie. Přítomnost rizikových variant DQ2 a DQ8 je pro vznik celiakie nezbytná, ale nikoliv dostačující. Riziková kombinace DQA1*05:01/DQB1*02:01 (heterodimer HLA-DQ2) se vyskytuje v populaci ve 20-30 %, ale jen u 1 % jejich nosičů dochází k rozvoji celiakie. Z tohoto poznatku lze vy-

vodit, že existují další non-HLA geny nebo zevní faktory nutné k rozvoji celiakie a screeningový test rizikových HLA alel je nevhodný pro vyhledávání potenciálních pacientů pro svou nízkou specifitu [26, 28].

Celiakie jako multi-faktoriální onemocnění je tedy asociovaná s molekulami HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) nebo DQ8 (DQA1*03:01/DQB1*03:02). HLA-DQ2 molekula je exprimována u většiny osob trpících celiakií (>90 %), DQ8 alela asi u 8 %. Expresie zmíněných alel je nezbytná, ne však dostatečná k propuknutí celiakie, v současné době se předpokládá pouze asi 50% vliv genetické složky na vznik celiakie. Z malé skupiny osob trpících celiakií a negativních pro heterodimery HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) a HLA-DQ8 (DQA1*03:01/DQB1*03:02), je drtivá většina pozitivní alespoň na jednu složku z heterodimeru DQ2 (zejména DQB1*02). Z tohoto pohledu je absence zmíněných alel velmi dobře využitelná pro vyloučení celiakie [27, 29].

Rizikové HLA alely predisponují pacienty k celiakii tím, že preferenčně prezentují peptidy z glutenu pomocným CD4 T-buňkám lamina propria tenkého střeva. Tyto T-buňky se po rozpoznání glutenových peptidů aktivují a produkují řadu cytokinů, z nichž převažuje interferon gama. Je spouštěčem kaskády zánětlivých reakcí ve střevní stěně, což vede k drobným lézím tenkého střeva. Gluten z potravy obsahuje velké množství epitopů rozpoznávaných T-buňkami a tyto epitopy obsahují velké množství aminokyselin prolinu a glutaminu. Právě vysoký podíl prolinu způsobuje, že tyto peptidy jsou rezistentní na štěpení žaludečními, pankreatickými i intestinálními proteázami. Potrava bohatá na gluten pak zvyšuje množství těchto imunoreaktivních epitopů v tenkém střevě. Současně jsou některé glutaminy z glutenových peptidů katalyticky deamidovány tTG a tato deaminace posiluje jejich imunogennost tím, že se lépe vážou na vazebná místa uvedených HLA proteinů [25, 28, 29].

Jen méně než 0,5 % pacientů s celiakií nemá HLA-DQ2 ani HLA-DQ8 rizikové varianty. Genetické vyšetření lze tak využít k zamítnutí diagnózy celiakie s vysokou pravděpodobností, protože nepřítomnost rizikových alel HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 vylučuje celiakii z 99%. Genetické vyšetření rizikových alel nepatří mezi rutinní screeningová vyšetření při podezření na celiakii. Využívá se především tam, kde bychom mohli získat pomocí běžných sérologických testů falešně negativní informaci, zejména u dětí mladších 2 let, u pacientů s prokázanou mírnou enteropatií, na bezlepkové dietě nebo s IgA a IgG deficitem. Toto vyšetření je zvláště efektivní také u osob s pozitivní rodinnou anamnézou. Vyšetření se využívá pro vyloučení diagnózy celiakie v případě nejasného onemocnění [28, 30].



Obr. 4: Imunopatogenetický mechanismus celiakie – spuštění imunitní odpovědi a trvalého střevního zánětu.

Nestrávené gliadinové fragmenty z lepku přítomné v intestinálním lumen jsou transportovány epiteliální vrstvou a v intaktní formě přecházejí do lamina propria, kde jsou gliadinové epitopy rozpoznávány APC a pomocí specifických HLA molekul prezentovány gliadin-specifickým CD4⁺ T buňkám, které proliferují a produkují INF γ [32].

2.3 Projevy onemocnění

U dětí se celiakie projevuje většinou klasickými příznaky, jako jsou neprospívání, zpomalení růstu, nepřibývání na váze, bolesti a vzednutí břicha, mastné stolice, případně průjmy a postupný vývoj bílkovinné podvýživy. Častá je chudokrevnost a také otoky nohou. U dospělých se choroba může projevovat podobně. Hlavními příznaky bývají zejména úbytek na váze, průjmy, křečovitě bolesti břicha, snížená chuť k jídlu, osteoporóza nebo deprese. U dospělých jsou však velmi časté případy s méně vyvinutými příznaky nebo je celiakie bezpříznaková [11].

Na podkladě poškození střevní sliznice lepkem dochází ke špatnému vstřebávání základních živin (hlavně tuků a bílkovin), minerálů (Ca, Fe), žlučových kyselin a vitamínů rozpustných ve vodě i v tucích. Z těchto důvodů dochází k poruchám tvorby a vývoje kostí se zvýšeným rizikem vzniku zlomenin dlouhých kostí a obratlů páteře (důsledek nedostatku vitamínu D a Ca). Dalšími možnými příznaky jsou anemie – chudokrevnost (nedostatek Fe), svalová slabost, trvalá únava, neuropsychické projevy (parestzie, deprese, úzkost), poruchy menstruačního cyklu a reprodukce, zhoršení zraku (nedostatek vitamínu A). Pacienti s celiakií bývají náchylnější ke vzniku infekcí a nedodrží-li dietu, může se objevit častější výskyt nádorových onemocnění než u běžné populace [9, 11].

Celiakie se někdy také objevuje spolu s jinými onemocněními, které jí mohou předcházet, nebo po ní naopak následovat. Tyto tzv. přidružené choroby mají někdy význam i v diagnostice, když na možnost celiakie upozorní. Lékaři by měli naopak vždy pátrat po těchto nemocech, když má pacient zjištěnou celiakii.

Mezi choroby přidružené k celiakii patří: cukrovka (diabetes mellitus 1. typu, který vzniká v mládí, není spojen s obezitou a pacienti si musí od začátku píchat insulin, oproti 2. typu je daleko méně častý), imunodeficience IgA (chybí protilátky IgA, které jsou důležité pro slizniční imunitu), onemocnění štítné žlázy, neplodnost a kožní choroba zvaná dermatitis herpetiformis Dühring. Ta se projevuje vyrážkami podobnými herpesu (opar způsobený herpes virem). Objevuje se zejména na loktech, kolenou, hýždích a v obličeji. Pokud se správně dodržuje bezlepková dieta, mizí spolu se střevními projevy i vyrážky [31, 33].

2.4 Diagnóza onemocnění

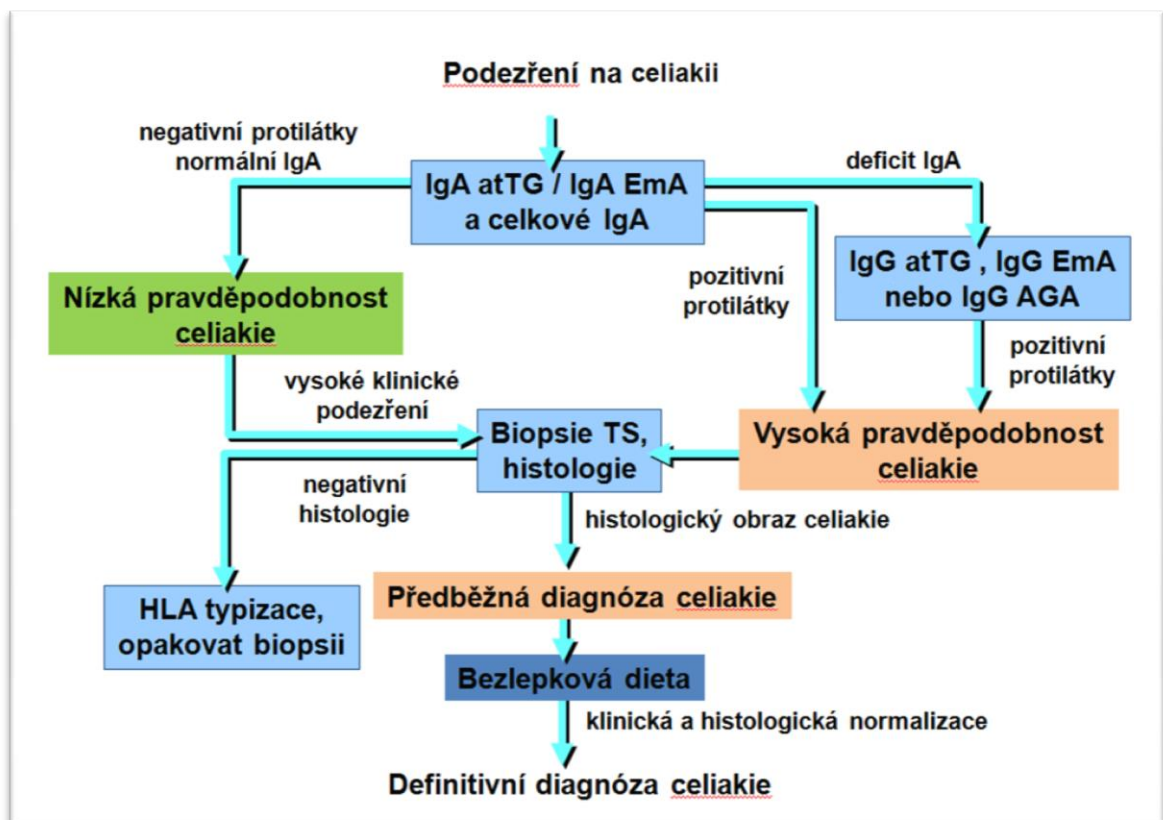
Celiakie je dosud, zejména u dospělých osob, diagnostikována zřídka a často pozdě. Příznaky jsou často málo nápadné a atypické. Mimostřevní projevy se vyskytují jak u dětí školního věku, tak i u dospělých. Stanovení diagnózy a následná léčba bezlepkovou dietou vedou ke zlepšení kvality života nemocných.

Diagnostika (Obr. 5) nemoci spočívá ve stanovení protilátek proti gliadinu, tkáňové transglutamináze a endomysiu. Pro konečné potvrzení celiakie je ovšem část třeba histologické vyšetření vzorku střevní sliznice, biopsie [34, 35].

V pomocné diagnostice celiakie se uplatnilo také již zmíněné zjišťování HLA-DQ2 a DQ8 znaků a rutinní vyšetření nových typů autoprotilátek (viz výše). Pro diagnózu celiakie jsou tedy stanoveny jasná kritéria. Krevní testy nám mohou pomoci při vyhledávání jedinců

s podezřením na celiakii. U dětí předškolního věku si můžeme kromě biochemických vyšetření pomoci i resorpčními testy [36].

Nejnovější doporučení říkají, že pokud jsou přítomny klinické příznaky spolu s pozitivním nálezem anti-tTG IgA protilátek, je třeba pacienta odeslat ke gastroenterologovi. Pokud je hladina těchto protilátek nižší než desetinásobek normy, je doporučováno ověření diagnózy biopsií. Naopak při průkazu jejich desetinásobného zvýšení nad hodnotu normálu, má být tato pozitivita ověřena vyšetřením anti-EMA protilátek a určením HLA typizace. Průkazem přítomnosti rizikových HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 variant je možno v takovém případě potvrdit diagnózu celiakie bez enterobioptického vyšetření [28, 37].



Obr. 5: Schematické znázornění obecného postupu při podezření na celiakii [19].

2.5 Genetická vyšetření související s diagnostikou celiakie

K průkazu rizikových predispozičních variant HLA-DQ2 a HLA-DQ8 se v současné době využívá metoda PCR (polymerase chain reaction) v různých modifikacích. PCR využívá enzymatické amplifikace fragmentů HLA-DQA1 a HLA-DQB1 genů izolovaných z primárního vzorku lidské krve (odběr do K₃EDTA) pomocí sekvenčně specifických primerů za cyklického střídání specifických reakčních teplot. Získaný produkt amplifikace může být typizován enzymaticky značenou reverzně hybridizační reakcí se sekvenčně specifickými probami imobilizovanými na membráně nebo k odlišení alel dochází již na úrovni PCR amplifikace s následnou identifikací produktů agarózovou elektroforézou [28]. Lze také využít genotypizace pomocí PCR s detekcí produktu v reálném čase („real-time“ PCR).

Přítomnost HLA DQ2/DQ8 a klinická a laboratorní odpověď na bezlepkovou dietu v dlouhodobém sledování potvrdí diagnózu. Celiakie se u pacientů s negativitou HLA DQ2/DQ8 vyskytuje jen asi v 0,4 %. Nepřítomnost HLA DQ2/DQ8 diagnózu celiakie proto vylučuje a je nutné hledat jinou příčinu uvedených nálezů [38, 39, 40].

2.6 Léčba celiakie

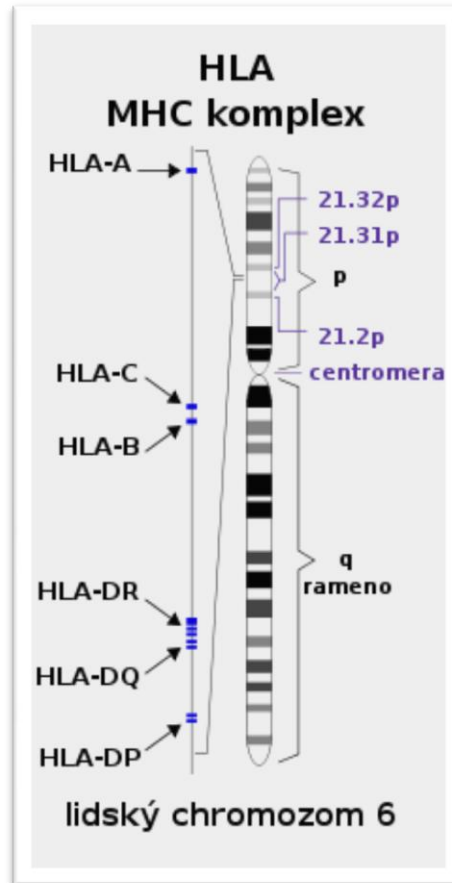
Dosud jedinou možnou léčbou celiakie je celoživotně striktně dodržovaná bezlepková dieta. V praxi to znamená vyloučení všech potravin obsahujících pšenici, ječmen, žito a oves. Doporučovaná je konzumace mouky rýžové, kukuřičné, sójové či přímo bezlepkové. Toto platí v případě, že byla celiakie řádně diagnostikována [41, 42, 43].

3 HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS – HLA

Hlavní histokompatibilitní komplex (MHC, z angl. major histocompatibility complex), neboli lidské leukocytární antigeny (HLA, z angl. human leukocyte antigens) člověka jsou polymorfní glykoproteiny vyskytující se na povrchu většiny jaderných buněk. Jsou zodpovědné za buněčnou imunitu zprostředkováním kontaktu antigenu (antigenního peptidu) s receptorem T lymfocytů [44].

3.1 Genová oblast HLA

HLA komplex představuje polymorfní systém genů, které kódují HLA molekuly exprimované na membráně buněk imunitního systému i jiných buněčných typů. Oblast genů HLA komplexu zaujímá přibližně jednu tisícinu lidského genomu. Nachází se na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.3)(Obr. 6), obsahuje více než dvě stě genů, 128 funkčních genů a 96 pseudogenů. Lokusy HLA genů rozdělujeme na klasické - HLA-A, -B, -C, -DR, -DP, -DQ a neklasické - HLA-E, -F, -G, ty mají ve srovnání s geny klasickými omezenou buněčnou distribuci a nižší stupeň polymorfismu. Uvnitř HLA oblasti se nacházejí také jiné geny s důležitými imunologickými funkcemi, např. geny pro složky komplementu nebo pro proteiny membránového transportu. Jsou zde také geny pro mediátory zánětu. Klasické HLA geny jsou velmi polymorfní, podle nomenklatury Světové zdravotnické organizace (WHO) existuje již více než 10 tisíc alel těchto genů [45].



Obr. 6: Znázornění HLA komplexu na šestém chromozomu [46].

3.1.1 HLA I. třídy

Geny HLA I. třídy existují ve formě několika lokusů. Jako klasické jsou označovány HLA-A, HLA-B, HLA-C a jako neklasické HLA-E, HLA-F a HLA-G. HLA glykoproteiny I. třídy jsou heterodimery skládající se z transmembránového řetězce α a s ním nekovalentně asociovaného β_2 -mikroglobulinu [47]. Zatímco řetězec α je kódován v HLA, β_2 -mikroglobulin je kódován genem lokalizovaným mimo HLA oblast na 15. chromozomu [48, 49]. β_2 -mikroglobulin je svou strukturou podobný molekulám imunoglobulinů a je do rodiny imunoglobulinů zařazován spolu s řetězcem α molekul HLA I. třídy [50, 51].

3.1.2 HLA II. třídy

Geny HLA II. třídy se nacházejí ve formě tří lokusů, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP [47]. Za fyziologických okolností se jejich antigeny vyskytují jen na buňkách prezentující antigen - APC (antigen-presenting cell), jako jsou dendritické buňky, monocyty, makrofágy

nebo B-lymfocyty. HLA glykoproteiny II. třídy se skládají ze dvou nekovalentně asociovaných transmembránových řetězců α a β . Oba dva řetězce jsou na rozdíl od HLA I. třídy ukotveny v cytoplazmatické membráně a jsou kódovány v genové oblasti HLA [48, 50].

3.1.3 HLA III. třídy

Geny HLA III. třídy nejsou HLA geny v pravém slova smyslu, zahrnují geny pro polymorfni sérové a membránové molekuly úzce spjaté s imunologickými funkcemi jako propeordinový faktor Bf a proteiny komplementu C2 a C4 [48]. Množství dalších genových lokusů v HLA je geneticky vázáno s HLA geny, ale funkčně s nimi nesouvisí. Zahrnují geny pro TNF (tumor necrosis factor), stejně jako další geny, které jsou-li defektní, podmiňují určitá onemocnění [49, 50].

3.2 Nomenklatura HLA

Vysoký stupeň polymorfismu odráží platné zásady pro označování HLA znaků. Nomenklatura HLA závisí na tom, zda byl konkrétní znak určen sérologickou nebo molekulárně genetickou technikou. V případě molekulárně genetické typizace je každá alela nejprve definována písemným označením lokusu, následovaným hvězdičkou (např. HLA-DRB1*) a poté kombinací číslic (např. 02:01). První část číselného označení ukazuje, ke které sérologické specifitě daná alela přísluší, druhá část alelu označuje na základě její aminokyselinové sekvence. Název alely může obsahovat třetí číselnou část, která charakterizuje tzv. „tichou“ variantu dané alely (záměna nukleotidů bez změny aminokyselinové sekvence) a čtvrtou, která odpovídá polymorfismu mimo kódující oblasti HLA genu. Písmeno na konci názvu může vyjadřovat poruchy v expresi alely [45, 53].

3.3 Polymorfismus HLA systému

Nárůst nových alel byl v minulosti poměrně pomalý. Zásadní obrat do HLA typizace přinesla aplikace molekulárně genetických technik. Počet nových alel definovaných pomocí jejich nukleotidové sekvence narůstá téměř exponenciálně. Uvnitř sérologicky definovaných HLA specifit se ukrývá velké množství alel, které lze určit preciznějšími DNA technikami. Odlišnosti v sekvencích jednotlivých alel jsou často minimální. Např. rozdíl mezi HLA-DRB1*04:03 a *04:04 spočívá v záměně alaninu na 47. pozici aminokyselinového řetězce na kyselinu glutamovou. Tato pozice se nalézá v třetí hypervariabilní oblasti beta-řetězce molekuly DR4, tj. té části HLA molekuly, která interaguje s antigenním peptidem a

s receptorem T-buněk (TCR). Tak se i zdánlivě malý rozdíl v sekvenci může projevit ve spektru prezentovaných antigenních peptidů. Odlišné aminokyseliny v důležitých pozicích totiž ovlivňují vazbu a prezentaci antigenu, čímž spoluurčují průběh imunitní reakce [45, 50].

3.4 Laboratorní metody k určování HLA

Stanovení HLA typu vyšetřovaného jedince nazýváme HLA typizace. Typizaci můžeme provádět na dvou úrovních. Starší sérologická typizace definuje HLA antigeny, tedy molekuly HLA exprimované na buněčných membránách. Novější molekulárně-genetická typizace určuje HLA alely, tj. sekvence nukleotidů kódující HLA antigeny. Používá se také termín DNA typizace nebo genotypizace HLA. Sérologický postup využívá panely protilátek (soubory diagnostických antisér) pokrývajících spektrum známých HLA znaků. K průkazu reakcí mezi HLA antigeny a antiséry se nejčastěji používá tzv. mikrolymfocytotoxický test. Pro genotypizaci HLA potřebujeme specifická DNA diagnostika, většinou primerové páry nebo sondy, které jsou komplementární k nukleotidovým sekvencím jednotlivých alel, resp. jejich skupin. Jednou z nejvhodnějších metod ke genotypizaci HLA je polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP). Ve specializovaných laboratořích se k přesné typizaci používá také sekvenování (SBT, Sequencing Based Typing). Pro sérologickou HLA typizaci laboratoř potřebuje heparinovanou krev, pro genotypizaci jako protisrážlivé činidlo slouží EDTA. Výsledky sérologické typizace jsou známy do druhého dne, při genotypizaci může být doba od odběru do vydání výsledků z organizačních důvodů několik dnů. Při urgentní typizaci (např. určení HLA typu kadaverózního dárce ledvin) je výsledek znám zhruba do čtyř hodin od dodání krevního vzorku [45, 48, 50, 54].

3.5 HLA a autoimunitní choroby

S nárůstem vědomostí o HLA systému bylo zjištěno, že některé HLA antigeny se vyskytují častěji u pacientů s určitými chorobami než u zdravé populace. Etiologický princip pro většinu HLA asociovaných onemocnění je nejasný. Většina těchto onemocnění pochází z autoimunity, ne však všechny. Jsou spojeny s abnormální autoimunitní reakcí zřetelně zaměřenou proti jednomu nebo více vlastním antigenům [48].

Průkazná souvislost mezi určitými znaky HLA s daným onemocněním se označuje jako asociace. Asociaci matematicky definujeme podle hodnoty relativního rizika (RR). Hodno-

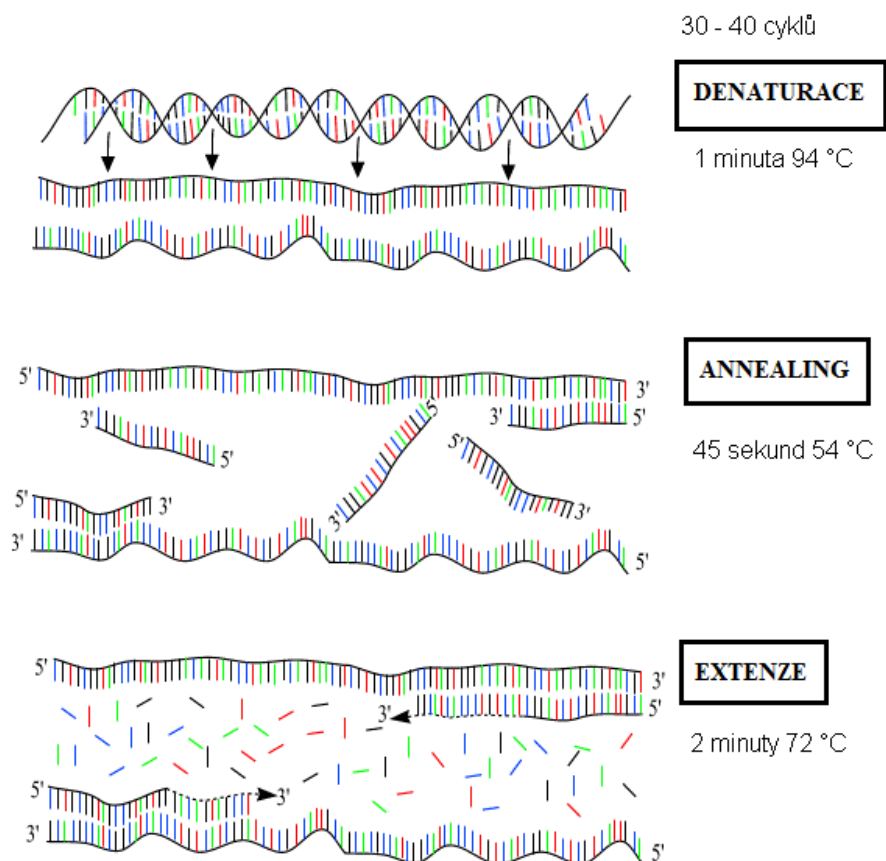
ta RR udává, kolikrát častěji onemocní danou chorobou jedinci s rizikovým znakem ve srovnání s jedinci, kteří tento znak nemají. Známa je asociace antigenu HLA-B27 s ankylozující spondylitidou (Morbus Bechtěrev). U revmatoidní artritidy a zvláště u inzulin-dependentního diabetes mellitus je situace složitější. U sérologické HLA typizace byla u pacientů s revmatoidní artritidou popisována slabá asociace s antigeny HLA-DR1, resp. HLA-DR4. S rozvojem DNA typizace se zjistilo, že s revmatoidní artritidou jsou asociovány pouze některé alely ze skupin HLA-DR1 a DR4. Pro tyto alely je charakteristická přítomnost LQRA aminokyselinového motivu ve třetí hypervariabilní oblasti β -řetězce DR1. Nedávné výsledky klinického výzkumu poukazují na možnost využít určení rizikových alel HLA-DRB1*04 k predikci vývoje onemocnění, popř. k návrhu léčby [45, 50].

Celiakální sprue patří mezi autoimunitní choroby asociované s HLA. Jak už bylo zmíněno, jedná se o chronické onemocnění sliznice střeva způsobené přecitlivělostí na lepek. U pacientů je pozorován výskyt heterodimeru DQ2 nebo heterodimeru DQ8. Heterodimer DQ2 je kódován alelami DQA1*05 a DQB1*02. Heterodimer DQ8 je kódován alelami DQA1*03:01 a DQB1*03:02 [38, 45, 55].

4 PCR-SSP (POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE SE SEKVENČNĚ SPECIFICKÝMI PRIMERY)

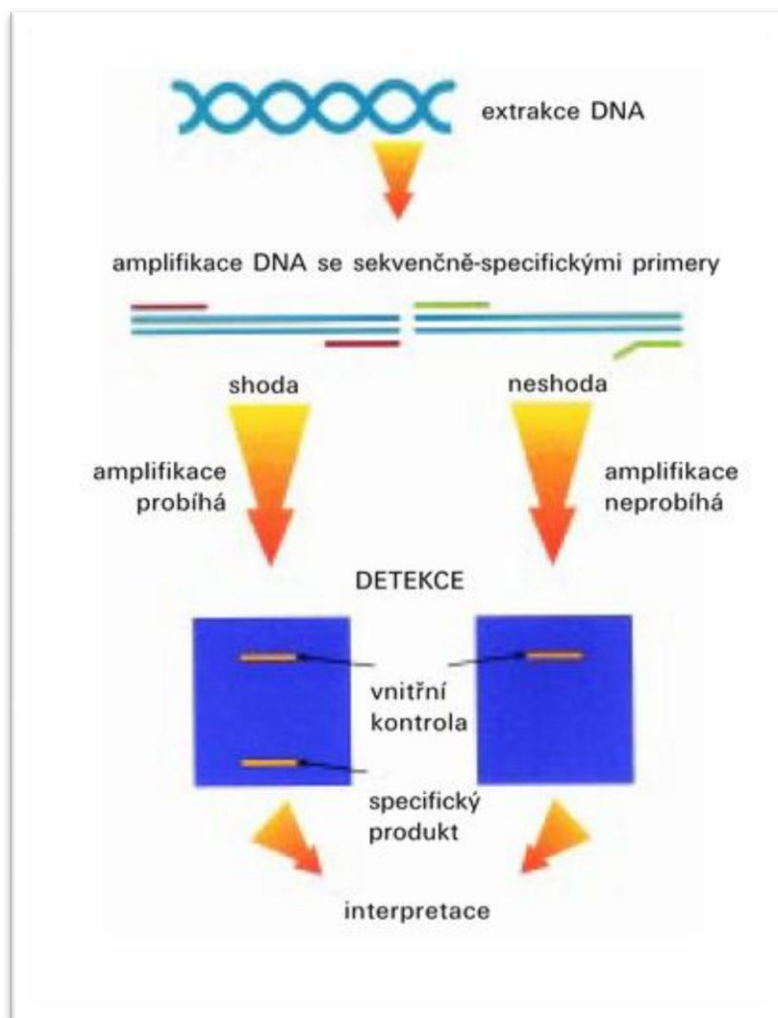
Polymerázová řetězová reakce byla popsána v roce 1984 v Kalifornii panem Kary Mullisem [56, 57]. Zásadním krokem pro vyvinutí metody byl objev termostabilní DNA polymerázy. Tato DNA polymeráza byla primárně izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech, proto se enzym z tohoto mikroorganismu označuje jako Taq polymeráza [57, 58].

Význam Taq polymerázy spočívá v tom, že i v případech, kdy je opakovaně vystavována vysokým teplotám pohybujících se okolo 95°C zůstává stabilní. Po navázání na jednovláčkovou (ss)DNA je Taq polymeráza schopna prodlužovat řetězce od 5' konce k 3' konci za optimální teploty 72 °C a tvořit kopie templátové DNA [57]. Pro PCR je nezbytné stanovit optimální množství Taq polymerázy (Obr. 7).



Obr. 7: Schematické znázornění průběhu PCR. Nejdříve dochází k denaturaci DNA, potom k annealingu, kdy nasedají primerové páry, a nakonec k extenzi, kdy DNA polymeráza

připojuje podle templátu volné nukleotidy a tím prodlužuje řetězce [50].



Obr. 8: Schematický princip typizace HLA pomocí PCR-SSP [59].

PCR-SSP je modifikací PCR, která využívá k odlišení DNA variant sekvenčně specifické primery. Tato technika patří dlouhodobě k nejpoužívanějším pro účely HLA typizace. Primery pro PCR-SSP se od sebe navzájem liší svými 3' konci, kterými se váží na polymorfismy v HLA alelách a specificky amplifikují tyto sekvence. Specifické primery zajistí vznik PCR produktu pouze v případě, že se ve vzorku nachází „správná“ alela, ke které jsou navrženy (Obr. 8). S narůstajícím počtem nově nalezených HLA alel přibývají i sady

těchto specifických primerů, které se komerčně prodávají i s interpretačními programy. Tato metoda může sloužit pro nízké rozlišení (low resolution) a s jistým omezením i vysoké rozlišení (high resolution) HLA typizace [60, 61].

K provedení PCR je třeba několik základních složek. Na prvním místě se jedná o templátovou DNA, u které chceme provést testování. Důležité je zvolit optimální množství testované DNA; v případě, že jí je mnoho, může být proces PCR inhibován nebo docházet k nespecifické amplifikaci. Další nedílnou součástí jsou primery, jež umožní prokázat, zda cílový úsek DNA nese specifickou sekvenci či nikoli. Taq polymeráza zprostředkovává replikaci specifického fragmentu. Jako stavební kameny pro syntézu nového vlákna slouží deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP) čtyř typů - dATP, dTTP, dCTP a dGTP. Důležitou součástí směsi PCR tvoří také hořečnaté kationy. Představují kofaktory DNA polymerázy, kdy kontrolují kontakty fosfátových skupin a aktivního místa DNA polymerázy. Také optimální koncentrace hořečnatých iontů je při PCR velmi důležitá, protože při vyšších koncentracích může docházet k tvorbě nespecifických produktů [56, 57, 62].

Metoda PCR se provádí v tzv. termocyklérech. Jedná se o cyklické opakování tří na sebe navazujících kroků. Prvním krokem je denaturace deoxyribonukleové kyseliny na 2 řetězce ssDNA. Druhá fáze spočívá v ochlazení vzorku, primery nasedají na komplementární sekvence ssDNA (angl. „annealing“). V posledním kroku zprostředkovává Taq DNA polymeráza prodloužení vláken od 5' konce ke konci 3' (angl. „extension“). V průběhu prvního cyklu PCR pokračuje syntéza nového úseku za stanovený úsek, ale při dalších cyklech je již syntéza úseku ohraničena primery [56, 57]. Každý cyklus v PCR teoreticky zdvojnásobí množství amplifikovaného fragmentu DNA. Jedná se v podstatě o logaritmický nárůst počtu kopií, kterých jsou v závěru PCR přinejmenším miliony. Za optimálních podmínek se amplifikuje se pouze určitá část DNA, ostatní úseky DNA se neamplifikují [57].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem práce je v teoretické části zpracování literárního přehledu, který se zabývá

- 1) základní charakteristikou obilovin,
- 2) intolerancí obilného lepku, která se projevuje jako onemocnění celiakie,
- 3) HLA systémem, který významně souvisí s genetickou vnímavostí k celiakii,
- 4) molekulárně-biologickými metodami k určování HLA znaků.

V praktické části je práce zaměřena na současné možnosti molekulárně-biologického vyšetření HLA znaků u celiakie prováděného na Ústavu imunologie ve Fakultní nemocnici v Olomouci, zejména na

- 1) provedení a interpretaci metody PCR-SSP, která se využívá k detekci HLA variant predisponujících k celiakii;
- 2) porovnání různých přístupů k vyšetření rizikových variant metodou PCR-SSP, včetně jejich vzájemného porovnání a ověření výsledků;
- 3) zpracování dat o výskytu jednotlivých HLA-DQ heterodimerů u pacientů s podezřením na celiakii za roky 2012 a 2013.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Chemikálie

<i>Název</i>	<i>Výrobce</i>
Agarosa	Serva, Německo
CaCl ₂	Sigma, Česká republika
EDTA	Sigma, Česká republika
dNTPs	Sigma, Česká republika
Ethanol	Fagron, Česká republika
Etidium bromid	Top-Bio, Česká republika
Glycerol	Sigma, Česká republika
H ₂ O	Fresenius, Česká republika
H ₃ BO ₃	Sigma, Česká republika
MgCl ₂	Sigma, Česká republika
NaCl	Serva, Německo
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma, Česká republika
Proteináza K	Serva, Německo
Sacharóza	Lachner, Česká republika
SDS	Serva, Německo
Spermidin	Sigma, Česká republika
Taq DNA polymeráza	Top-Bio, Česká republika
Tris HCl	Sigma, Česká republika
Trizma-base	Sigma, Česká republika
TritonX100	Serva, Německo
Tween 20	Sigma, Česká republika

6.2 Přístrojové vybavení

<i>Název</i>	<i>Výrobce</i>
Centrifuga Hettich 16 R (izolace DNA)	Hettich, Německo
Centrifuga MLW T 62.1 (PCR-SSP)	Hettich, Německo
Dokumentační systém Gel Logic 112 Systém	Kodac, Česká republika
Elektronické váhy AND - FA 200	AD Instruments, UK
Flow-box SKAN - B48S	Life Science Solutions, Španělsko
Fotoaparát Digimage systém	Biotech, Česká republika

Fotoaparát Polaroid DS34	Polaroid, USA
Izolátor DNA NorDiag Arrow 8.31.01	NorDiag, Norsko
Mikrovlňka Le cygne electronics	Sportif Groupe, Česká republika
Minicentrifuga MINI-LABNET	LabNet, Korea
pH metr Jenway 3310	Omega, USA
Spektrofotometr Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific, USA
Termoblok Grant QBT1	Grants Instrument, UK
Termocykler DNA Biometra Professional basic	Biometra, Německo
Termocykler DNA ENGINE TETRAD 2	MJ Research, USA
Třepačka Vortex VX-100	VELP Scientifica, Itálie
UV-transiluminátor MEB 20 Ultralum	Ultra-Lum
Zdroj napětí Bio-Rad PowerPac 300	Major Science, Taiwan

6.3 Použitý materiál

Výchozím biologickým materiálem byla periferní žilní krev odebraná venepunkcí pacientům indikovaným k vyšetření asociace HLA systému s celiakií. Krev byla odebrána do zkumavek s K₃EDTA. Vzorky krve byly získány od pacientů z Fakultní nemocnice v Olomouci, zejména z Dětské kliniky. Všichni pacienti byli vybráni na základě svého informovaného souhlasu.

6.4 Izolace DNA

Prvním krokem u molekulárně genetických technik bývá v řadě případů izolace nukleových kyselin (NK), zde konkrétně izolace DNA. Kontaminace DNA může výrazně ovlivnit výsledky analýz, proto je velmi důležité zachovat při práci čisté prostředí. Možná kontaminace vzorku jinou DNA (např. produkty PCR) může ve výsledku podat falešně pozitivní nebo neinterpretovatelné výsledky [63].

Pro izolaci DNA byly v této diplomové práci zvoleny tři laboratorní metody, a to vysolovací technika dle Millera [64], komerční mikroizolace DNA na kolonce a poloautomatická extrakce pomocí přístroje Arrow Blood DNA.

6.4.1 Izolace DNA z krve vysolovací technikou

Chemikálie:

- roztok LB1 (300 mM sacharóza, 10 mM Tris Cl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1% TritonX100)

- roztok R (10 mM Tris pH 7,5)
- roztok proteinázy (40% glycerol, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM CaCl₂, 20 mg/ml proteináza K)
- roztok P (10 mM TrisCl, 40 mM EDTA, 4 mM CaCl₂, 300 mM NaCl, 4% SDS)
- NaCl
- 96% ethanol
- 70% ethanol
- 10 mM Tris pH 8

Postup:

1. Ze vzorku krve je nejdříve odpipetováno a zamraženo 0,5 ml krve jako záloha.
2. Do zbývajících objemu (5-10 ml) vzorku je přidán roztok LB1, do celkového objemu 45 ml.
3. Poté je vzorek protřepán, dojde k lýze buněk a následně je centrifugován 5'/4000 rpm.
4. Supernatant je slit do odpadní nádoby a k sedimentu je přidáno 5 ml roztoku R. Důkladným třepáním dochází k rozbití sedimentu, vzorek je centrifugován 5'/4000 rpm.
5. Supernatant je slit a k sedimentu je přidáno 930 µl roztoku R. Po rozbití sedimentu je přidáno 40 µl proteázy a 370 µl roztoku P.
6. Zkumavka se vzorkem je vložena do termostatu a inkubována přes noc při 37°C. Po vytažení z termostatu a ochlazení na pokojovou teplotu je přidáno 400 µl 5M NaCl.
7. Vzorek je protřepán a následně centrifugován 15'/4000 rpm/RT. Po centrifugaci je supernatant přelit do 2 ml mikrozskumavky a centrifugován 10'/14 000 rpm/RT.
8. Po přesunutí do flow-boxu je supernatant přelit do 15 ml zkumavky a DNA vysrážena přidáním 3,5 ml 96% ethanolu. Následně je vzorek dvakrát promyt v 0,5 ml 70% ethanolu a přepipetován do šroubovací 1,5 ml eppendorfky a rozpuštěn zahřátím po dobu 5' při 70°C v 10 mM Tris pH 8.
9. DNA je skladována v lednici, popř. mrazáku.

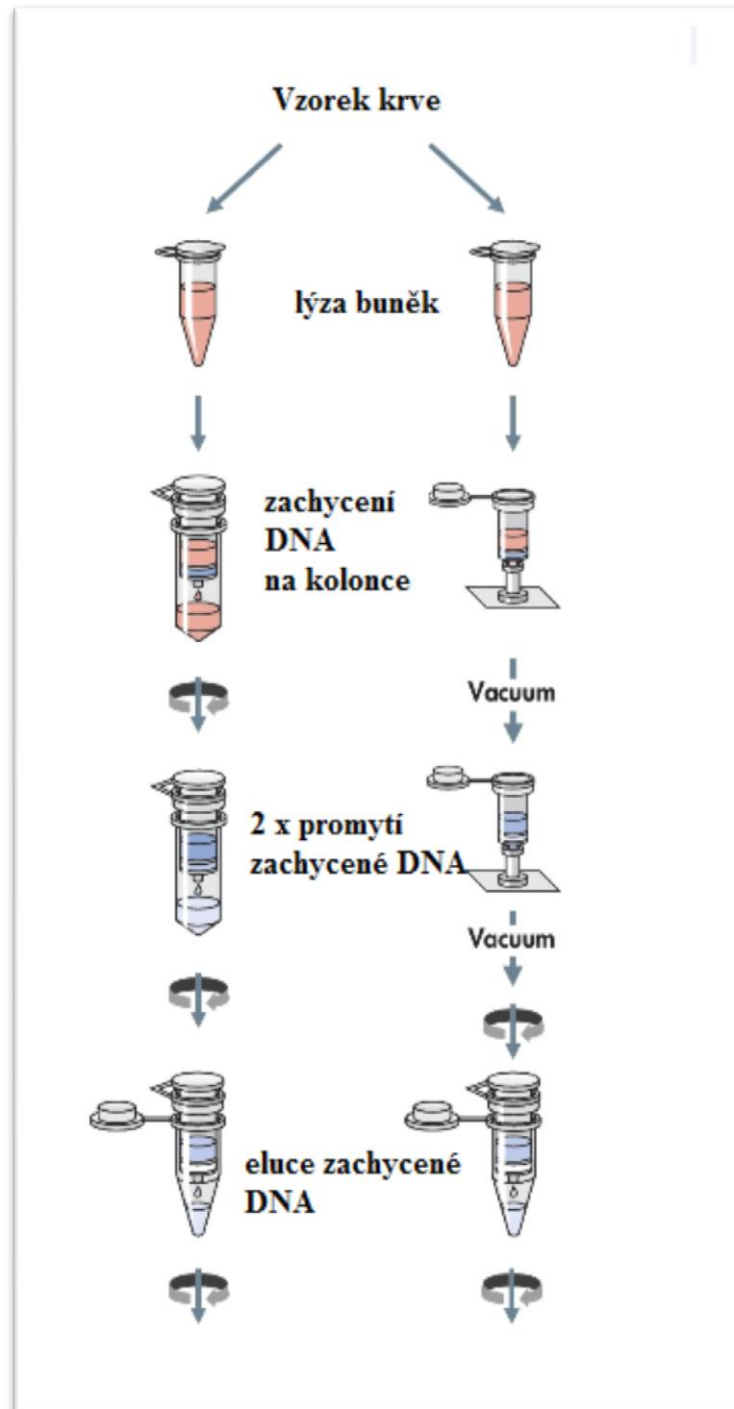
6.4.2 Mikroizolace pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Obr. 9)

Chemikálie:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Německo (názvy roztoků jsou uvedeny podle originálního návodu)
- ethanol absolutní

Postup:

1. Do 1,5ml sterilní mikrozkušavky je napipetováno 20 μ l QIAGEN proteázy, dále 200 μ l krevního vzorku pacienta a 200 μ l AL pufru.
2. Směs je 15 vteřin třepána na vortexu a poté 10 minut inkubována v termobloku při 56°C.
3. Mikrozkušavka je poté krátce centrifugována, k obsahu je přidáno 200 μ l 96% ethanolu a následně je vzorek třepán 15 vteřin na vortexu.
4. Výsledná směs je přelita do filtrační kolonky vložené ve 2 ml mikrozkušavce a centrifugována 1'/8000 rpm/20°C.
5. Filtrační kolonka je přemístěna do nové 2 ml mikrozkušavky a stará zkušavka i s filtrátem je vyhozena. Do kolonky je napipetováno 500 μ l promývacího roztoku AW1 a centrifugováno 1'/8000 rpm/20°C.
6. Filtrační kolonka je opět přemístěna do nové 2 ml mikrozkušavky a stará s filtrátem je vyhozena a do kolonky je napipetováno 500 μ l roztoku AW2.
7. Mikrozkušavka s filtrační kolonkou je centrifugována 3'/14000 rpm/20°C. Filtrační kolonka je vložena do 1,5 ml mikrozkušavky s ustriženým vrškem a původní 2 ml mikrozkušavka s filtrátem je vyhozena.
8. Do filtrační kolonky je napipetováno 210 μ l elučního AE roztoku a inkubováno 3 minuty při pokojové teplotě (rozpouštění DNA).
9. Filtrační kolonka je umístěna v 1,5 ml mikrozkušavce je centrifugována 1'/8000 rpm/20°C, poté je kolonka vyhozena a je ponechána 1,5 ml mikrozkušavka s filtrátem obsahujícím DNA, která je následně přepipetována do 1,5ml šroubovací mikrozkušavky s víčkem s těsněním.
10. Zkušavka je označena identifikačním číslem vzorku. Izolovaná DNA je uchovávána v lednici, případně v mrazicím boxu [65].



Obr. 9: Schéma mikroizolace DNA, upraveno podle materiálů firmy Qiagen [65].

6.4.3 Izolace pomocí přístroje Arrow (NorDiag, Norsko)

Automatický izolátor DNA NorDiag Arrow pracuje na principu extrakce DNA pomocí magnetických mikrokuliček. Umožňuje provádět izolaci až z dvanácti vzorků najednou.

Chemikálie:

- izolační souprava Arrow Blood DNA 500 - cartridges s roztoky k izolaci, jednorázové pumpičky, jednorázové špičky

Postup:

1. Součástí sady Arrow Blood DNA 500 jsou jednorázové pumpičky s pipetovacími špičkami a cartridges (kazety) s reagensy. Do přístroje se navíc vkládají 1,5 ml mikrokumavky se vzorkem krve a prázdné eluční 1,5 ml mikrokumavky pro zachycení DNA.
2. Přístroj provádí izolaci DNA v několika krocích. Nejdříve dochází k lýze buněk, poté je DNA v lyzátu navázána na magnetické částice, DNA na částicích je několikrát promyta a separována mezi každým promytím pomocí magnetického pole.
3. Komplex částic s DNA je resuspendován v elučním pufru při vyšší teplotě a purifikovaná DNA bez magnetických částic je separována do eluční mikrokumavky.
4. Pro izolaci byl použit protokol pro izolaci DNA z 500 μ l krve s cílovým elučním objemem 300 μ l pufru pro rozpuštění získané DNA.
5. Roztok DNA je po eluci po dokončení protokolu přepipetován do 1,5 ml šroubovací mikrokumavky s víčkem s těsněním označené identifikačním číslem vzorku.

6.5 Měření koncentrace DNA

Pro měření koncentrace DNA ve vzorku je vhodná metoda spektrofotometrie. Maximum absorbance DNA spadá do oblasti vlnové délky 260 nm. Čistota nukleové kyseliny se zjistí podle poměru absorbance při 260nm/280nm. Optimální hodnota tohoto poměru spadá do rozmezí 1,8 – 2,0 [63].

Chemikálie:

- eluční AE pufr, QIAGEN, Hilden, Německo
- deionizovaná voda

Postup:

Měření koncentrace DNA se provádí pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 a příslušného ovládacího a databázového programu ND-1000 V3.5.2. Pro inicializaci jsou použity 2 μ l deionizované H₂O a jako „blank“ roztok 2 μ l AE pufru. Proměřuje se 2 μ l jednotlivých vzorků DNA a v programu se značí příslušným identifikačním kódem.

6.6 Příprava agarózového gelu, elektroforéza

Elektroforéza se uskutečňuje ve vhodném nosiči, kterým bývá nejčastěji agarózový či polyakrylamidový gel [63]. Při této diplomové práci byl využíván 2% agarózový gel. Elektroforéza na agarózovém gelu zde byla využita k rozdělení a průkazu produktů PCR (amplikonů).

Chemikálie:

- agaróza
- ethidium bromid, vodný roztok 10mg/ml, výsledná koncentrace v gelu 0,5 µg/ml
- 0,5x koncentrovaný TBE pufr, (ředění 5x TBE pufru - 0,5 mol/l TrisCl, 0,66 mol/l H₃BO₃ a 5 mmol/l)
- EDTA

Postup:

1. Do Erlenmayerovy baňky jsou naváženy 2 g agarózy.
2. Je přilito 100 ml 0,5x TBE pufru, povařeno v mikrovlnné troubě a v momentě, kdy je agaróza dokonale rozpuštěná a homogenizovaná je baňka přemístěna do vodní lázně.
3. Při dosažení teploty 70 °C jsou do roztoku napipetovány 4 µl roztoku etidium bromidu a obsah baňky je opatrně promíchán krouživým pohybem.
4. Roztok je poté nalit na připravenou misku s hřebínky v drážkách. Gel se nechá ztuhnout cca 30 minut do mléčného zakalení.
5. Po vyjmutí hřebínků se gel přenesse do horizontální elektroforetické komůrky s elektroforetickým pufrem (0,5x TBE pufr).
6. Jednotlivé PCR produkty jsou nanášeny pomocí vícekanálové pipety. Mezi každým nanesením je pipeta promyta v elektroforetickém pufru.
7. Po nanesení vzorků na gel je komora uzavřena a zapnut zdroj napětí (Obr. 10), na kterém je nastaveno 130 V a čas 20 minut.
8. Po ukončení elektroforézy je gel položen na plochu UV transluminátoru a po ozáření UV světlem je obraz gelu vyfocen na analogový snímek pomocí Polaroidu nebo je provedena fotodokumentace elektronicky pomocí přístroje Kodak Gel Logic systém (Obr. 11).
9. Software přístroje Kodak Gel Logic systém umožní zachycení a analýzu obrazu přímo na monitoru nebo po vytištění.



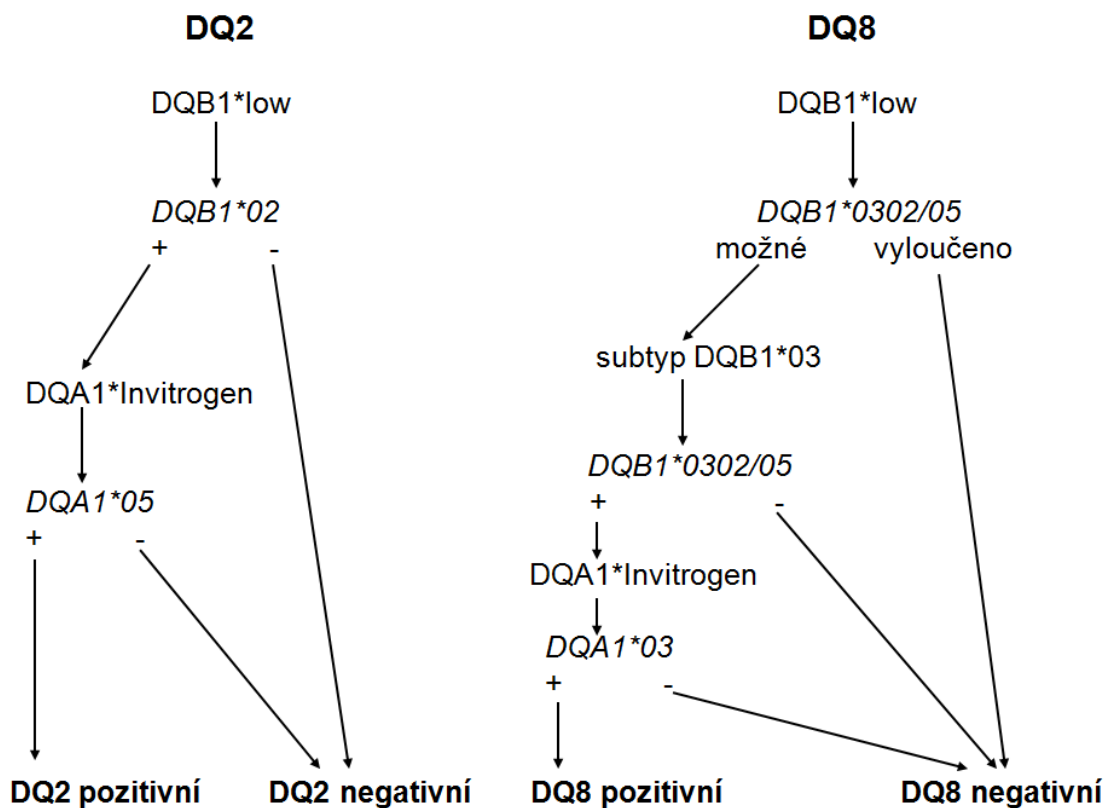
Obr. 10: Zdroj napětí, elektroforetická komora.



Obr. 11: Fotodokumentace pomocí přístroje Kodak Gel Logic system.

6.7 Určení HLA variant rizikových pro celiakii pomocí kompletní genotypizace HLA-DQ lokusů

Podstatou tohoto přístupu je provedení kompletní genotypizace lokusů HLA-DQB1, event. HLA-DQA1 pomocí metody PCR-SSP. Cílem je efektivně a jednoznačně rozlišit kombinaci HLA alel/alelických skupin u vyšetřovaného jedince. S využitím širší sestavy specifických primerů, které cílí na vybrané polymorfní pozice HLA genů, tak získáváme na vyšetřovaných lokusech kompletní HLA-genotyp [66, 67]. Z genotypu pak odvozujeme přítomnost rizikových alel (HLA-DQB1*02,*03:02; HLA-DQA1*03,*05; viz „Interpretace výsledků“ v dalším odstavci). Vyšetření provádíme tak, že začneme genotypizací lokusu HLA-DQB1 a dále pokračujeme dle výsledku (tzv. „stavebnicový“ přístup, Obr. 12).



Obr. 12: Schéma postupu a interpretace při vyšetření heterodimerů DQ2 a DQ8 (použita předchozí nomenklatura HLA systému).

Interpretace výsledků vyšetření při kompletní genotypizaci HLA-DQ lokusů:

Pozn. Výsledný genotyp musí být součástí výsledku – umožní hodnotit i pozitivitu jednotlivých rizikových alel (např. HLA-DQB1*02), nejen heterodimerů.

Heterodimer DQ2

Není-li ve výsledku DQB1*02, je komentář „Heterodimer DQ2 (DQA1*05, DQB1*02) negativní“.

Je-li ve výsledku DQB1*02, provádíme vyšetření DQA1* , dále se řídíme podle výsledku:

Není-li ve výsledku DQA1*05, je komentář „Heterodimer DQ2 (DQA1*05, DQB1*02) negativní“.

Je-li ve výsledku DQA1*05, je komentář „Heterodimer DQ2 (DQA1*05, DQB1*02) pozitivní“.

Heterodimer DQ8

Není-li ve výsledku DQB1*03 s možností alel DQB1*03:02 a/nebo DQB1*03:05, je komentář „Heterodimer DQ8 (DQA1*03, DQB1*03:02/03:05) negativní“.

Je-li ve výsledku DQB1*03 s možností alel DQB1*03:02 a/nebo DQB1*03:05, provedeme subtyp DQB1*03, dále se řídíme podle výsledku:

Není-li v subtypu DQB1*03:02 a/nebo DQB1*03:05, je komentář „Heterodimer DQ8 (DQA1*03, DQB1*03:02/03:05) negativní“

Vyjde-li v subtypu DQB1*03:02 a/nebo DQB1*0305, vyšetříme DQA1* , dále se řídíme podle výsledku:

Pokud nezjistíme DQA1*03, je komentář „Heterodimer DQ8 (DQA1*03, DQB1*03:02/03:05) negativní“.

Zjistíme-li DQA1*03, je komentář „Heterodimer DQ8 (DQA1*03, DQB1*03:02/03:05) pozitivní“.

Správný komentář k výsledku je následující:

Heterodimer DQ2 (DQA1*05, DQB1*02) pozitivní / negativní

Heterodimer DQ8 (DQA1*03, DQB1*03:02/03:05) pozitivní / negativní

6.8 Stanovení genotypu HLA-DQB1* low (nízké rozlišení)

Typizační souprava pro DQB1* lokus (firma Olerup) je tvořena jednotlivými primerovými páry, které jsou komplementární k určitým alelám. Pokud vyšetřovaná DNA příslušnou alelu obsahuje, dojde k dokonalému navázání primerů k její sekvenci a amplifikaci přísluš-

ného fragmentu DNA. K detekci produktů PCR reakce se používá elektroforéza na agarózovém gelu s přidavkem etidium bromidu (popsána výše). Produkty PCR reakce jsou pak zviditelněny pomocí ultrafialového záření. Přítomnost specifického PCR produktu je hodnocena jako pozitivita příslušné reakce. Výčet pozitivních reakcí je vnesen do interpretačního software, který určí konkrétní HLA alely; následně je provedena kontrola výsledku s interpretační tabulkou, která je součástí příbalového letáku soupravy.

Postup:

1. Z mrazničky jsou vytáhnutы originální destičky s lyofilizovanými primery, alobal odstříhnut a odlepen. Destičky jsou popsány číslem vyšetřované DNA a vloženy do základny. Destička má první zkumavku vlevo nahoře označenou číslem šarže, která je zaznamenána do pracovního protokolu. Z mrazničky je vytažena zkumavka s Olerup Master Mixem bez Taq polymerázy.
2. Do 1,5 ml zkumavky je nepipetováno 60 μl PCR- H_2O , 26,5 μl Master Mixu a 0,5 μl Taq DNA polymerázy. Obsah je promíchán a krátce centrifugován.
3. Ke směsi je přidáno 6 μl testované DNA, obsah promíchán a krátce centrifugován.
4. Směs je rozpipetována do všech mikrozkušavek s lyofilizovanými primery pomocí dávkovací pipety po 10.
5. Mikrozkušavky jsou uzavřeny důkladně fólií nebo proužky vršků, destička zcentrifugována a bez spodní základny vložena do cykléru.
6. Na cykléru je zvolen program Dynal, objem nastaven na 10 μl . Program trvá asi 1 h 20 min, v té době je připraven agarózový gel.
7. Po ukončení PCR programu je provedena elektroforéza.
8. K dokumentaci výsledků je používán pracovní protokol, který je v elektronické podobě.
9. Do pracovního listu je přenesena řádně označená fotografie gelu po ukončení agaróové elektroforézy PCR produktů.
10. Reakce je považována za pozitivní, pokud došlo ke specifické amplifikaci - kromě kontrolního proužku je v dráze gelu i proužek specifický, nebo tam je jenom specifický proužek bez kontrolního.
11. Reakce je považována za nevalidní, pokud není přítomen žádný proužek o očekávané velikosti („vypadlá“ reakce), nebo pokud je výsledek reakce nejasný. Proužky, které délkou jednoznačně neodpovídají velikosti specifického nebo kontrolního produktu, nejsou brány v úvahu.

6.9 Stanovení genotypu DQA1*

Stanovení genotypu lokusu HLA-DQA1 technikou PCR-SSP (firma Invitrogen) pracuje na obdobném principu, který byl popsán u stanovení genotypu DQB1 v předchozí podkapitole. Také zde vydáváme celý výsledek typizace (genotyp) a komentujeme přítomnost určitých kombinací alel (spolu s lokusem DQB1) se vztahem k celiakii. K interpretaci používáme aktuální pracovní list a pomocnou dokumentaci.

Chemikálie:

- soupravy pro PCR-SSP od firmy Invitrogen k typizaci lokusu DQA1
- Taq DNA polymeráza

Postup:

1. Z krabice v mrazničce je vytažena destička s primery (jsou pod olejem) a originální PCR pufr (1 zkumavka pro jeden vzorek).
2. Destička je vložena do základny a je odtržena adhezivní fólie.
3. K originálnímu PCR pufru je přidáno 80 μ l PCR- H_2O a 2,4 μ l Taq DNA polymerázy. Obsah je promíchán a krátce centrifugován.
4. 8 μ l směsi je přidáno do zkumavky negativní kontroly. Ke směsi je přidáno 5 μ l testované DNA. Obsah je promíchán a krátce centrifugován.
5. Směs je rozpipetována do všech ostatních zkumavek po 8 μ l.
6. Destička je přelepena novou adhezivní fólií, která je mírně přitlačena. Destička je krátce centrifugována.
7. Destička je vložena do cykleru - program UNI ve složce HLA. Po ukončení programu je přenesena destička k elektroforéze.
8. Destička je nachystána tak, aby první reakce byla vlevo dole. Je nabíráno 8 μ l amplikonu (řady po 8 reakcích) v pořadí zdola nahoru a nanášeno na gel odshora dolů.
9. K interpretaci výsledků je používán originální formulář „DQA1 SSP UNITRAY WORKSHEET“ (dále pracovní list), který je součástí příbalového CD ke kitu.
10. Na pracovním listu je vyplněno pole Sample ID, zapsána šarže kitu, datum expirace kitu, datum vyšetření a šarže polymerázy.
11. Do pracovního protokolu je přenesena řádně označená fotografie gelu.
12. Vyhodnocuje se každá PCR reakce – do protokolu se запиše pozitivní reakce a nevalidní reakce.
13. Výsledek se vyhodnocuje tak, aby byly pokryty získané pozitivní reakce reakcemi očekávanými pro jednu DQA1 alelu nebo kombinaci dvou DQA1 alel. Tyto alely

jsou zapsány do řádků „1st match DQA1*“ a „2nd match DQA1*“. K alelám do řádku je zakřížkována jejich očekávaná reaktivita (pozitivní reakce).

14. Je zkontrolováno, zda nějaká pozitivní reakce nechybí nebo nepřebývá proti pozorovanému výsledku.
15. Výsledek (jednu nebo dvě alely) je zapsán do pole „High Resolution Typing Result“.

6.10 Cílená detekce HLA variant rizikových pro celiakii

Pro provedení techniky PCR-SSP pro účely přímé molekulárně genetické detekce vybraných rizikových HLA znaků používáme komerční soupravu BAG-Histotype-Celiakie (firma BAG Healthcare). Tato souprava pracuje na obdobném principu (PCR-SSP) jako soupravy používané k určení kompletního genotypu na lokusech HLA-DQA1 a DQB1. Na rozdíl od těchto souprav se však zaměřuje na konkrétní alely/alelické skupiny v lokusech HLA-DQB1 a DQA1, které jsou asociovány s celiakií. Výsledkem vyšetření je vyjádření o přítomnosti těchto alel u pacienta (pozitivní/negativní), přičemž nezjišťujeme kompletní genotyp pacienta. Výsledkem je tedy přítomnost/nepřítomnost následujících HLA alel:

DQB1*02 + / -
DQA1*05 + / -
DQB1*03:02 + / -
DQA1*03 + / -

Chemikálie:

- souprava pro PCR-SSP od firmy BAG Healthcare k typizaci alel asociovaných s celiakií
- Taq DNA polymeráza
- H₂O pro PCR

Postup:

1. Z krabice je vytažen požadovaný počet testů s primery a originální PCR pufr.
2. Jeden test sestává ze tří řad po 8 zkumavkách. Podle počtu vzorků je připraven požadovaný počet testů a označený čísly vyšetřovaných DNA.
3. Do 1,5 ml zkumavky je napipetováno 239 µl PCR-H₂O, 28 µl 10x koncentrovaného originálního pufru a 7 µl Taq DNA polymerázy. Obsah je promíchán a krátce centrifugován.

4. 10 µl směsi bez DNA je přidáno do zkumavky s negativní kontrolou. Ke směsi je přidáno 6 µl testované DNA, obsah promíchán a krátce centrifugován.
5. Směs je rozpipetována do všech ostatních zkumavek po 10.
6. Na destičku je přelepena adhezivní fólie a důkladně přitlačena. Plátek je krátce centrifugován.
7. Destička je vložena do cykléru (Tab. 1) a je spuštěn program určený pro tento komerční kit. Po ukončení PCR programu je provedena elektroforéza.
8. K dokumentaci výsledků je používán formulář (interpretační list), který je součástí komerčního kitu.
9. Do pracovního listu je přenesena řádně označená fotografie gelu po ukončení agarózové elektroforézy PCR produktů soupravy.
10. Každá PCR reakce je zvlášť vyhodnocena, do pracovního listu jsou zapsána čísla pozitivních reakcí a nevalidních reakcí. Pozorované pozitivní reakce odpovídají HLA alelám/alelickým skupinám, které jsou následně odvozeny. Je zkontrolováno, zda nějaká pozitivní reakce nechybí nebo nepřebývá proti pozorovanému výsledku.
11. Je rozhodnuto o pozitivitě nebo negativitě vyšetřovaného pro nejvýznamnější znaky DQB1*02, DQB1*03:02/03:05, DQA1*05, DQA1*03 a výsledky jsou zapsány do pracovního listu.
12. Na základě přítomnosti uvedených znaků je rozhodnuto o pozitivitě nebo negativitě heterodimerů „DQ2“ a „DQ8“.
13. Jsou-li u vyšetřovaného zároveň pozitivní znaky DQB1*02 a DQA1*05, je “Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní”. V opačném případě je “Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní”.
14. Jsou-li u vyšetřovaného zároveň pozitivní znaky DQB1*03:02/03:05 a DQA1*03, je “Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) pozitivní”. V opačném případě (i když je pozitivní jen jeden z těchto znaků) je “Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní”.

6.11 Podmínky amplifikace v termocykléru pro soupravu BAG-Histotype-Celiakie

Program - KROK	Teplota	Čas	Počet cyklů
První denaturace	96 °C	5 min	1 cyklus
Denaturace	96 °C	20 sek	5 cyklů
Annealing+Prodloužení	68 °C	1 min	
Denaturace	96 °C	20 sek	10 cyklů
Annealing	64 °C	50 sek	
Prodloužení	72 °C	45 sek	
Denaturace	96 °C	40 sek	15 cyklů
Annealing	61 °C	50 sek	
Prodloužení	72 °C	45 sek	
Konečné prodloužení	72 °C	5 min	1 cyklus

Tab. 1: Podmínky amplifikace v termocykléru.

6.12 Hodnocení nálezů ve vztahu k celiakii

Na základě zhodnocení přítomnosti/nepřítomnosti rizikových HLA alel a jejich kombinací se můžeme vyjádřit k predispozici k celiakii u konkrétního vyšetřovaného jedince. Závěrečná interpretace u běžných výsledků je uvedena v Tabulce 2. Příklady hodnocení některých méně častých a problematických výsledků jsou uvedeny Tabulce 3.

Genotyp	Sérologický ekvivalent	Hodnocení
DQA1*05:01- DQB1*02:01	DQ2 pozitivní	vysoká predispozice k celiakii
DQA1*05:05- DQB1*03:01 současně s DQA1*02:01- DQB1*02:02	DQ2 pozitivní	vysoká predispozice k celiakii
DQA1*05:05- DQB1*03:01 bez druhé predispoziční alely	DQ2 negativní	nehodnotitelná predispozice k celiakii
DQA1*02:01- DQB1*02:02 bez druhé predispoziční alely	DQ2 pozitivní!!!!	nízká predispozice k celiakii!!!!

DQA1*03:01- DQB1*03:02	DQ8 pozitivní	vysoká predispozice k celiakii
Všechny HLA-DQ genotypy, které neobsahují ani jednu z alel vázaných s celiakií		celiakie vysoce nepravděpodobná!!!

Tab. 2: Hodnocení nálezů ve vztahu k celiakii.

Genotyp	Sérologický ekvi- valent	Hodnocení
DQA1*05:05 DQB1*03:01 DQA1*03:03 DQB1*02:02	DQ2 pozitivní	vysoká predispozice k celiakii
DQA1*05:05 DQB1*04 DQA1*02:03 DQB1*02:02	DQ2 pozitivní	vysoká predispozice k celiakii
DQA1*05:01 DQB1*02:01 DQA1*03:03 DQB1*02:01	DQ2 pozitivní	vysoká predispozice k celiakii
DQA1*05:05 DQB1*03:01 DQA1*03:03 DQB1*03:02	DQ8 pozitivní	nedoložitelná predispozice k celiakii
DQA1*02:01 DQB1*03:03 DQA1*05:05 DQB1*03:01		nehodnotitelná predispozice k celiakii

Tab. 3: Problematické nálezy HLA-DQ genotypu a jejich interpretace.

6.13 Validace metody stanovení HLA znaků asociovaných s celiakii metodou PCR-SSP pomocí soupravy BAG-Histotype-Celiakie

Chemikálie:

- souprava BAG HealthCare – HISTO TYPE Celiac Disease
- Taq polymeráza
- H₂O pro PCR

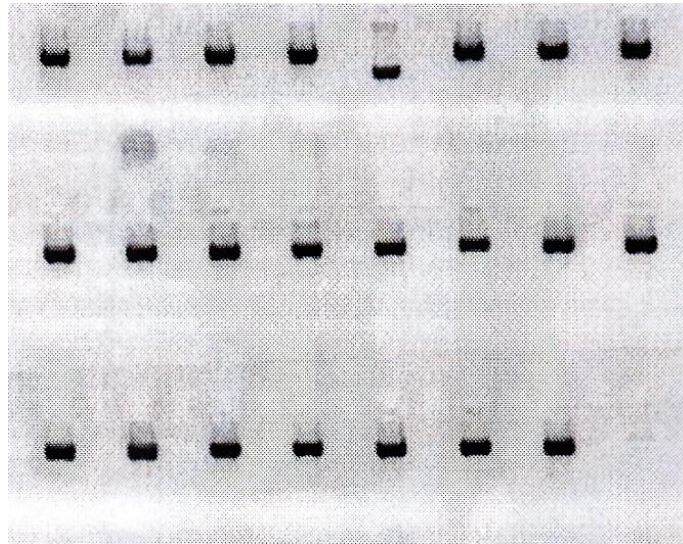
Způsob validace:

Genotypizace referenčních vzorků, u kterých již bylo vyšetření provedeno genotypizací kompletních lokusů HLA-DQB1 a DQA1.

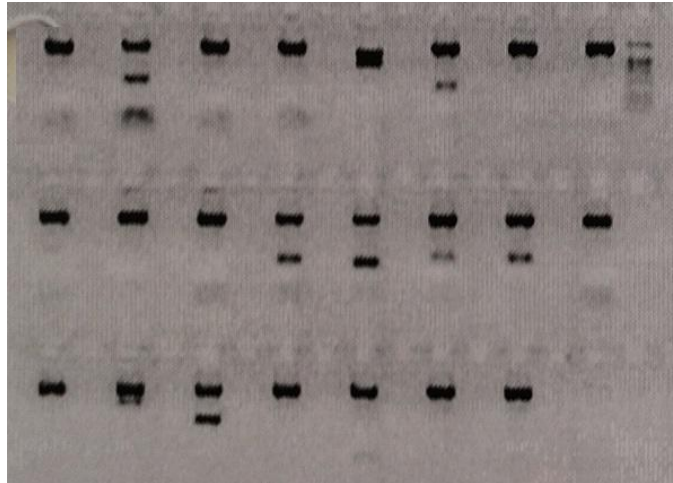
Kritérium validace:

Soulad (kompatibilita) mezi výsledkem získaným genotypizací kompletních lokusů HLA-DQB1 a DQA1 již validovanou metodou. Stávající metoda byla pravidelně ověřována systémem externího hodnocení kvality (typizací neznámých vzorků).

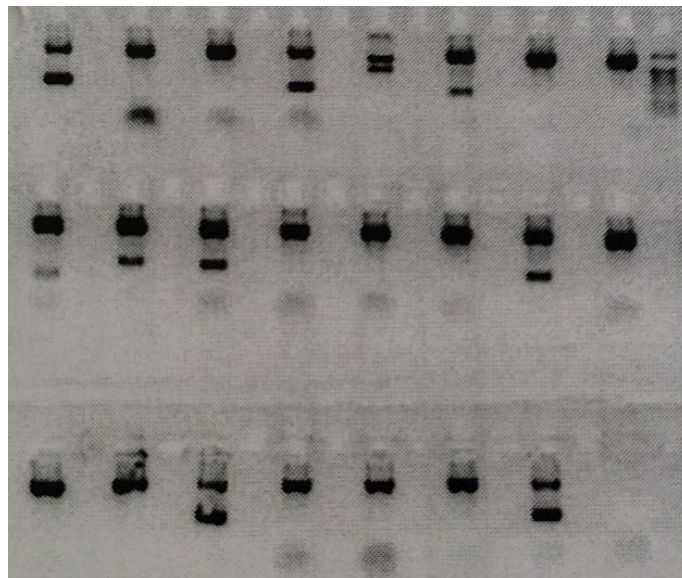
v horním řádku interpretační tabulky a podle nich odvozena pozitivita jednotlivých alel (vyznačeno červeně v levém sloupci tabulky). V tomto případě byla ze sledovaných alel zjištěna přítomnost variant *DQB1*03:02* a *DQA1*03:01*, což odpovídá pozitivitě pro heterodimer *DQ8* (vysoká predispozice k celiakii).



Obr. 15: Fotografie gelu s výsledky genotypizace soupravou BAG-Histotype-Celiakie – pacient 1. Žádná pozitivní reakce, rizikové alely nepřítomny. Tento výsledek může být pozorován např. pro genotyp *HLA-DQB1*05,*06* (celiakie vysoce nepravděpodobná).



*Obr. 16: Fotografie gelu s výsledky genotypizace soupravou BAG-Histotype-Celiakie – pacient 2. Pozitivní reakce č. 2, 5, 6, 12, 13, 14, 15, 18, 19. Odečet z interpretačního listu indikuje pozitivitu DQB1*02:01, DQB1*03:02, DQA1*03:01 i DQA1*05:01; ve výsledku je heterodimer DQ2 i DQ8 pozitivní (vysoká predispozice k celiakii).*



Obr. 17: Fotografie gelu s výsledky genotypizace soupravou BAG-Histotype-Celiakie – pacient 3. Pozitivní reakce č. 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 15, 19, 23.

*čet z interpretačního listu indikuje pozitivitu DQB1*02:01, DQB1*03:01, DQA1*05:01 a DQA1*05:05; ve výsledku je heterodimer DQ2 pozitivní a DQ8 negativní (vysoká predispozice k celiakii).*

7.2 Výsledky validace soupravy BAG-Histotype-Celiakie

Odzkoušení metodiky na vybraných referenčních vzorcích dle návodu výrobce

Metoda byla odzkoušena provedením testovacích vyšetření postupně na pěti vybraných vzorcích DNA dle návodů v příbalovém letáku firmy BAG. Vybrané vzorky pokrývaly nejdůležitější kombinace výsledků (přítomnost rizikových alel pro celiakii). Množství Taq polymerázy a DNA bylo upraveno na koncentrace používané v laboratoři. Výsledky vyšetření ve všech případech odpovídaly předpokladům (Tab. 4).

Paralelní otestování vzorků dvěma porovnávanými metodami

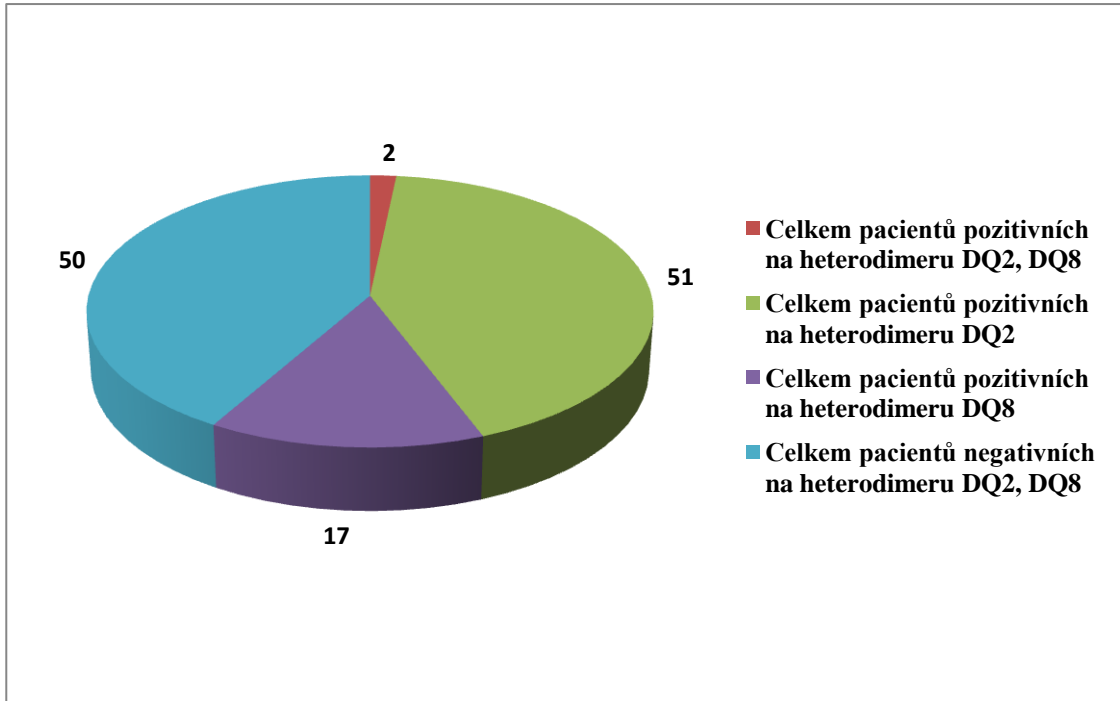
Šest náhodně vybraných vzorků k vyšetření HLA-DQ2 a HLA-DQ8 z rutinního provozu laboratoře bylo vyšetřeno paralelně metodou původní (kompletní genotypizace lokusů HLA-DQB1 a DQA1) a validovanou (souprava BAG-Histotype-Celiakie). Výsledky obou metod byly v souladu u všech testovaných vzorků (Tab. 4).

č.DNA	Stávající metoda (kompletní DQB1, DQA1 typizace)		Validovaná metoda (Histotype Celiac Disease)		Soulad výsledků
	Heterodimer DQ2	Heterodimer DQ8	Heterodimer DQ2	Heterodimer DQ8	
Krok 1 - Primární odzkoušení metodiky					
15915	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	ano
15937	negativní	negativní	negativní	negativní	ano
15944	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	ano
15973	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	ano
15974	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní	ano
Krok 2 - Paralelní otestování vzorků					
16779	negativní	negativní	negativní	negativní	ano
16785	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	ano
16786	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	ano
16789	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	ano
16793	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	ano
16796	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	ano

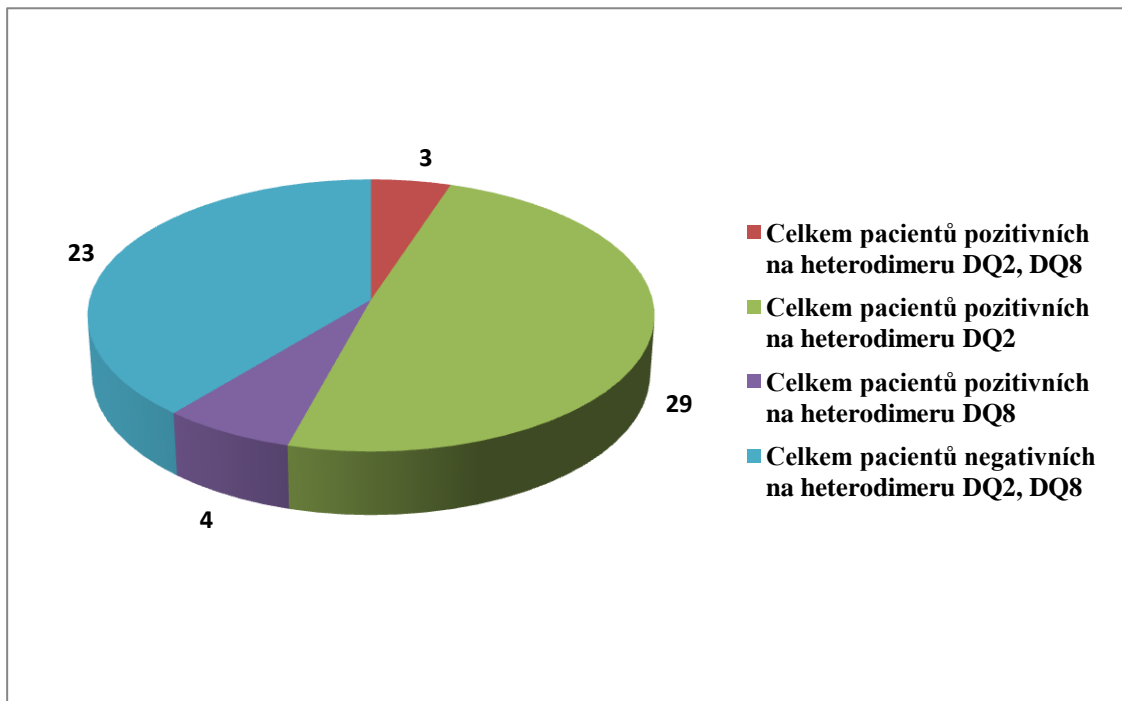
Tab. 4: Tabulka uvádějící výsledky validace metody typizace soupravou BAG-Histotype Celiakie (Histotype Celiac Disease) porovnáním s kompletní genotypizací DQB1 a DQA1 lokusů. Na základě výše uvedených výsledků byl validační test schválen jako úspěšný.

7.3 Přehled výsledků vyšetření alel rizikových pro celiakii pomocí soupravy BAG-Histotype-Celiakie

S cílem podat přehled o vyšetření rizikových alel pro celiakii na Ústavu imunologie ve Fakultní nemocnici v Olomouci byly zpracovány výsledky za roky 2012 a 2013. Celkově bylo vyšetření (genotypizace) rizikových alel provedeno u vzorků DNA od 120 pacientů za rok 2012 a od 59 pacientů za rok 2013. Jednalo se převážně o pacienty z Dětské kliniky FN Olomouc. Ze 120 pacientů vyšetřených za rok 2012 (Obr. 18) bylo 51 (42,5 %) pozitivních pouze pro heterodimer DQ2, 17 (14,2 %) pro heterodimer DQ8 a 2 pacienti pro oba heterodimery (1,7 %). U zbývajících 50 pacientů (41,7 %) nebyl zjištěn ani jeden z vyšetřovaných heterodimerů. Z 59 pacientů vyšetřených v roce 2013 (Obr. 19) bylo 29 (49,2 %) pozitivních pro DQ2 heterodimer, 4 (6,8 %) pro DQ8 heterodimer a 3 pacienti (5,1 %) byli nosiči obou heterodimerů. Ostatní pacienti (N=23; 39%) nebyli nosiči ani jednoho z heterodimerů DQ2 nebo DQ8 (Obr. 20).



Obr. 18: Graf znázorňující přehled výsledků vyšetření rizikových variant pro celiakii (heterodimery DQ2, DQ8) u pacientů za rok 2012.



Obr. 19: Graf znázorňující přehled výsledků vyšetření rizikových variant pro celiakii (heterodimery DQ2, DQ8) u pacientů za rok 2013.

8 DISKUZE

V této diplomové práci jsou stručně shrnuty dosavadní poznatky o bílkovinách obilovin, intoleranci obilné bílkoviny lepku, která se projevuje jako celiakie, a molekulárně genetických metodách (založených na PCR) využívaných při diagnostice dědičné vnímavosti k onemocnění celiakií. Diplomová práce uvádí srovnání metod používaných k diagnostice predispozice k celiakii na Ústavu imunologie FN Olomouc. Součástí práce je přehled výsledků vyšetření rizikových variant lokusů HLA-DQB1 a HLA-DQA1 u pacientů s podezřením na celiakii pomocí komerčního kitu BAG-Histotype-Celiakie za rok 2012 a 2013 včetně četností výskytu jednotlivých heterodimerů DQ2 a DQ8 jako predispozičních variant u celiakie.

Za rok 2012 bylo vyšetřeno celkem 120 pacientů; 70 z nich (58,3 %) bylo pozitivních alespoň pro jeden z heterodimerů DQ2 nebo DQ8. U těchto pacientů lze tedy vyšetření interpretovat jako přítomnost silné predispozice k celiakii. U zbývajících 50 pacientů (41,7 %) negativních pro oba heterodimery lze onemocnění vyloučit (pokud nenesou ani jednotlivé složky heterodimerů) nebo je u nich predispozice k onemocnění mírná (zejména u nosičů HLA-DQB1*02). Podobné výsledky byly zjištěny i za rok 2013: identifikovali jsme 36 nosičů (61%) alespoň jednoho z DQ2/DQ8 heterodimerů (silná predispozice k celiakii) a 23 pacientů (39%) bez těchto heterodimerů (žádná nebo mírná predispozice k celiakii).

Z porovnávání dvou přístupů používaných na Ústavu imunologie FN Olomouc a založených na PCR-SSP (původní plná HLA typizace lokusů DQB1* a DQA1* a nově zavedená cílená identifikace rizikových alel komerční soupravou BAG-Histotype-Celiakie) je zřejmé, že jsou oba vhodné k určování HLA alel rizikových pro celiakii. Plná HLA typizace je vhodná spíše pro specializované HLA laboratoře, poskytuje však „plnohodnotný“ výsledek včetně odvození počtu kopií rizikových variant („kvantifikace“ rizika). Je tak vhodnější i pro výzkumné aplikace (např. populační studie). Při kompletní („up front“) genotypizaci je však tento postup poměrně nákladný; postupná genotypizace („stavebnicový přístup“) je pak časově náročnější a vyžaduje složitější algoritmus. Cílená identifikace rizikových alel (zde souprava BAG-Histotype-Celiakie) je redukována na jediný test, což je spojeno s jednodušším provedením a obecně nižší cenou za vyšetření. Nevýhodou tohoto přístupu je nemožnost odlišit počty kopií rizikových variant.

Přibližně 30 až 40 % lidí z bílé populace má rizikový znak HLA-DQ2 a pouze 1 % rozvíjí celiakii. Mimo oblast HLA se proto předpokládá několik dalších genomových oblastí s pravděpodobným vlivem na vnímavost k celiakii. Jsou lokalizovány na různých chromo-

zomech a spojeny s geny kódujícími proteiny se známou imunitní funkcí, jako jsou cytokiny, cytokinové receptory a chemokiny (CTLA4, IL2, IL21, CCR3, IL12A, IL-18RAP, RGS1, SH2B3 a TAGAP). Jejich příspěvek ke genetické složce celiakie je však poměrně malý ve srovnání s přítomností znaků HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Silný vztah mezi genovou oblastí HLA a celiakií dokládá účinek přítomnosti HLA-DQ2 molekuly na vývoj choroby. Bylo navíc zjištěno, že HLA-DQ2 homozygotní jednotlivci mají nejméně 5 krát vyšší riziko rozvoje choroby ve srovnání s HLA-DQ2 heterozygotními jedinci [25, 31]. Protože soupravy cílené pouze na rizikové alely nejsou zpravidla schopny určit, zda se jedná o homozygota nebo heterozygota, efekt genové dávky (dvě kopie rizikové alely u homozygota nebo jedna u heterozygota) nelze těmito soupravami stanovit. K hlavnímu účelu vyšetření, tj. vyloučení celiakie u osob bez přítomnosti predisponujících HLA variant, však tyto soupravy dostačují [31, 66].

HLA typizace nemá u celiakie absolutní diagnostickou hodnotu, ale je důležitým faktorem vzhledem ke své negativní prediktivní hodnotě. V případě chybění HLA-DQ predisponujících alel je celiakie velmi nepravděpodobná. Naopak pozitivní výsledek znamená pouze to, že daný jedinec má genetickou predispozici pro celiakii a onemocnění se u něj může rozvinout. HLA typizace je běžným požadavkem k vyšetření při pochybnostech v diagnostice celiakie, tj. při nejistých nebo rozporných výsledcích ze sérologických testů nebo biopsie. HLA vyšetření je také užitečným screeningem prvního stupně u příbuzných pacientů s celiakií vzhledem k vyšší prevalenci v rodinách. Rodinné studie ukázaly, že celiakie se vyskytuje téměř výhradně v přítomnosti vysoce rizikových molekul DQ (DQ2.5, DQ8 a DQ2.x s dvojitou dávkou DQB1*02). Ve skutečnosti je postiženo až 20 % blízkých příbuzných, pozitivních pro rizikové DQA1/DQB1 alely. HLA typizace tedy slouží jako účinný nástroj k odlišení osob, které vyžadují pravidelné klinické a sérologické kontroly [24, 26, 27].

V tomto ohledu by podrobné vyšetření HLA-DQA1/DQB1 alel mohlo sloužit k určení přesnějšího rizika onemocnění a vhodných následných opatření. Naopak negativní výsledek testu má pozitivní psychologický dopad na jedince, kdy je riziko vzniku onemocnění velmi nízké [25, 31].

ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byl zpracován přehled o současných znalostech o onemocnění celiakii. Byly zde uvedeny základní informace o příčinách (lepek v potravě), projevech, průběhu a různých typech celiakie a o diagnostických možnostech u této choroby včetně molekulárně biologických metod. Dále byla tato práce zaměřena především na HLA systém v souvislosti s genetickou predispozicí k celiakii. V závěru teoretické části je pak popsána metoda PCR-SSP využívaná pro diagnostiku onemocnění.

V úvodu experimentální části byly popsány postupy pro izolaci DNA a vyšetření HLA znaků rizikových pro celiakii jednak pomocí kompletní typizace lokusů HLA-DQB1 a DQA1 podstatu dále s využitím soupravy pro detekci pouze vybraných alel BAG-Histotype-Celiakie. Ve výsledkové části práce byly demonstrovány reprezentativní výsledky vyšetření rizikových alel, srovnány výše uvedené metody k diagnostice rizikových variant a zpracován přehled výsledků vyšetření predispozice k celiakii na Ústavu imunologie ve FN Olomouc. Uvedené nálezy byly v závěru práce diskutovány.

Celiakie je běžné multifaktoriální onemocnění, při kterém přítomnost specifických HLA-DQA1 a HLA-DQB1 alel představuje hlavní genetickou podmínku pro vznik onemocnění. Přestože určování rizikových HLA alel nemá absolutní diagnostický význam, pozitivní test ukazuje na přítomnost genetické predispozice k celiakii (neznamená nutně vývoj onemocnění). Negativní výsledek testu má významnější hodnotu, protože se nesnášenlivost lepku bez přítomnosti specifických alel HLA prakticky nevyskytuje. Protože jsou HLA znaky stabilními „markery“ po celý život, jejich typizací lze rozlišit ve vztahu k celiakii geneticky citlivé a nevnímavé jedince. HLA typizace je proto považována za pevnou oporu v diagnostickém algoritmu celiakie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hrabě, J., Buňka, F., Hoza, I., *Technologie výroby potravin rostlinného původu pro kombinované studium*. 1. vydání. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Academia Centrum, 2008, 189s. ISBN 978-80-7318-520-6.
- [2] Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková, M., *Cereální chemie a technologie I: Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vydání. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2004. ISBN 80-7080-530-7.
- [3] Kopáčová, O., *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007, ISBN 978-80-7271-184-0.
- [4] *Morfologie obilného zrna*. (staženo 10. 7. 2013), Dostupné online na WWW: http://etext.czu.cz/php/skripta/kapitola.php?titul_key=81&idkapitola=4
- [5] Kučerová, J., *Technologie cereálií*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008, 141 s.
- [6] Hulín, P., et al., *Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách*. Chem. Listy 102, 2008, 327–337.
- [7] Bidat, É., Loigerot, CH., *Alergie u dětí*. 1. vyd. Praha: nakladatelství Potrál, 2005, 148 s, ISBN 80-7178-936-4.
- [8] Fuchs, M., *Alergie číhá v jídle a pití*, 2. rozšířené přepracované vydání. Plzeň: nakladatelství ADÉLA, 2007, 267s. ISBN 80-902532-2-9.
- [9] Bušínová, I.: *Bezlepková kuchařka*, 1.vyd. Praha: Grada, 2007, ISBN 978802471270-3.
- [10] Di Sabatino, A., Corazza, G.R., *Celiac disease*. The Lan cet, 2009, roč. 373, č. 9673, s. 1480-1493.
- [11] Kohout, P., Pavlíčková, J., *Celiakie a bezlepková dieta*, 3. vydání. Praha: nakladatelství MAXDORF s.r.o. 2006, 166 s. ISBN 80-7345-070-4.
- [12] Frič, P., Mengerová, O., *CELIAKIE Bezlepková dieta a rady lékaře*, 1. vydání. Čestlice: Medica Publishing, 2008, 186 s., ISBN 978-80-85936-62-9.
- [13] Kohout, P., *Diagnostika a léčba celiakie*. Interní medicína pro praxi, 2006, roč. 8, č. 7, s. 324-326.
- [14] Červenková, R., Lukáš, M.: *Celiakie*. 1.vyd. Praha: Galén, 2006, ISBN 807262-425-3.

- [15] Lanzenberger, T.M.B.: *Vaříme zdravě bez lepku*, 1.vyd. (překlad) Praha: Vašut. 2005, ISBN 978-80-7236-348-3.
- [16] Sliznice střeva (staženo 21. 7. 2013), Dostupné online na WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Celiakie>
- [17] Sliznice tenkého střeva (staženo 21.7.2013), ESPGAN - European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition, Dostupné online na WWW: <http://www.espgan.med.up.pt/>
- [18] Maňasková, D., *Lepek*. Dostupné online na WWW: <http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt/celiakie/alepek>
<http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt/celiakie>
- [19] Briani, Ch., Samaroo, D., Alaedini, A, *Celiac disease: From gluten to autoimmunity*, Autoimmunity Reviews. 2008, 7, s. 644-647.
- [20] Kohout, P., Pavlíčková, J., *Celiakie*, Čestlice: Pavla Momčilová, 1994, Etiopatogeneze choroby, 12 s., ISBN 80-901137-6-1.
- [21] Kohout P., *Celiakie*. Postgraduální medicína, 2012, str. 207-210.
- [22] Nevoral J., Kotalová R., *Celiakální sprue (glutensenzitivní enteropatie)*. Postgraduální medicína 01/2002, str. 14-22.
- [23] Kagnoff, M.F., *Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease*, J Clin Invest 2007, 117:41-49.
- [24] Lochman I., Martis P., Burlingame R. F., Lochmanová A., *Multiplex Assays to Diagnose Celiac Disease*. Ann N.Y.Acad.of Sci. Doi, 2007, 1109; 330-337.
- [25] Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.R., Mearin, M.L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, K.P., *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*, JPGN, Volume 54, Number 1, January 2012.
- [26] Salazar, M., Deulofeut, R., Yunis, J.J., Bing, D.H., Yunis, E.J., *A fast PCR-SSP method for HLA-DQ generic typing*, Tissue Antigens, Volume 41, Issue 2, pages 102–106, February 1993.
- [27] Karell, K., et al, *HLA Types in Celiac Disease Patients not Carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2), Heterodimer: Results From the European*, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2003, Elsevier Science Inc., Human Immunology 64, 469–477.

- [28] Štefelová, P., *Celiakie – Autoimunitní onemocnění vyvolané gliadinem*, bakalářská práce, vedoucí práce RNDr. Ivo Lochman, CSc., Ostrava, 2013, 20-23 s.
- [29] *Test celiakie*. (staženo 25. 7. 2013) Dostupné online na WWW:
<http://www.testceliakie.cz/patogeneze-celiakie.html>
- [30] Maňásková D., *Genetika celiakie*, (staženo 25. 7. 2013) Dostupné online na WWW:
<http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt/celiakie>
- [31] Chandesris, M.O., Malamut, G., Verkarre, V., Meresse, B., Macintyre, E., et al., *Enteropathy-associated T-cell lymphoma: a review on clinical presentation, diagnosis, therapeutic strategies and perspectives*, *Gastroenterol Clin Biol* 2010, 34:590-605.
- [32] Mehra, N.K., *The HLA Complex in Biology and Medicine*, A resource Book, 2010.
- [33] *Popis celiakie*. (staženo 16. 7. 2013). Dostupné online na WWW:
<http://nemoci.vitalion.cz/celiakie/>
- [34] Jodl, J., *Dieta bezlepková pro celiakii u dětí*. 1 vydání. Praha: Avicenum, 1989, 103 s.
- [35] Časopis sestra, *Celiakie dospělých – často opomíjené onemocnění*, číslo 6, ročník 20, 2010.
- [36] Book, L., et al. *Prevalence and clinical characteristics of celiac disease in Downs syndrome in a U.S. study*. *American Journal of Medical Genetics*, 2001, Vol. 98, Issue 1, p. 70-74.
- [37] Grebíková J., Šipková E., Šipka O.: „*Mrňousek po mamince?!*“. *Pediatric pro praxi*, 2012; 13(5): 338-341.
- [38] Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Montuori, M., et al., *HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: evidence for gender differences and parent-of-origin effects*, *Am J Gastroenterol* 2008, 103:997-1003.
- [39] Latta, J., *Celiakie – od screeningu k diagnóze*, *Interní Med.* 2012; 14(5): 221–223.
- [40] Bátorvský, M., *Diagnosis and therapy of celiac disease: today and tomorrow*, *Gastroent. Hepatol* 2012; 66(5): 372–376.
- [41] Lukáš, K., Žák, A., *Gastroenterologie a hematologie - učebnice*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. 380 s. ISBN 978-80-247-1787-6.
- [42] Kohout P., *Novinky v bezlepkové dietě*. *Interní Med.* 2008, 10 (3): 113-116.
- [43] Kohout P., Rušavý Z., Šerclová Z., *Vybrané kapitoly z klinické výživy I*. Praha, Maxdorf, 2010, 1. vydání, str. 87 – 96, ISBN 978-80-87250-08-2.

- [44] Shiina, T., Tamiya, G., Oka, A., Takishama, N., Yamagata, T., Kikkawa, E., Iwata, K., Tomizawa, M., Okuaki, N., Kuwano, Y., Watanabe, K., Fukuzumi, Y., Itakura, S., Sugawara, C., Ono, A., Yamazaki, M., Tashiro, H., Ando, A., Ikemura, T., Soeda, E., Kimura, M., Bahram, S., Inoko, H., *Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1796938 bp HLA class I region*, 1999, PNAS 96: 13282 – 13287.
- [45] Hlavní histokompatibilní komplex člověka – základy teorie a praxe. (staženo 17.7.2013). Dostupné online na WWW:
http://www.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=4730.
- [46] Lidský chromozom (staženo 22.7.2013), Dostupné online na WWW:
<http://www.osel.cz/index.php?clanek=4276>
- [47] Hořejší, V., Bartůňková, J., *MHC glykoproteiny - prezentace peptidových fragmentů*, p. 66-75, *Základy imunologie*, Trion, Praha, 2005.
- [48] Nussbaum, R.L., McInnes, R.R. a Willard, H.F., *Genetika imunitního systému*, p. 268-279. *Klinická genetika*, Triton, 2004, Praha.
- [49] Hořejší, V., Bartůňková, J., *Základy imunologie*, 3. vydání, ISBN: 80-7254-686-4.
- [50] Sittová, M., *Molekulární analýza a typizace polymorfizmů lidského HLA*, bakalářská práce, vedoucí práce RNDr. Radek Horváth, PhD., Brno, 2010.
- [51] Krejsek, J. a Kopecký, O., *Klinická imunologie*, Nucleus HK, Hradec Králové, 2004.
- [52] Megiorni, F., Pizzuti, A., *HLA-DQA1 and DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing*, *Journal of Biomedical Science* 2012, 19:88.
- [53] Zima, T., *Laboratorní metody*, Část 1. Biochemické metody, 1. vydání, Společnost všeobecného lékařství, Praha, 2008.
- [54] Carosella, E.D., *From MAC to HLA*, Professor Jean Dausset, the pioneer, 2009, *Hum. Immunol.* 70: 661-662.
- [55] Zubillaga, P., Vidales, M.C., Zubillaga, I., Ormaechea, V., García-Urkía, N. a Vitoria, J.C., *HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease*. *JPGN.* 34: 548-554, 2002.
- [56] Rohoň, P. et al. *Molekulární biologie v hematologii – od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi*. 1. vydání. Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, s.127, ISBN 978-80-244-2224-4.

- [57] Špíšek, R., *Vyšetřovací metody v imunologii*. Metody molekulární biologie, 2. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2011. Kapitola 2.3, s. 84–91. ISBN 978-80-247-3533-7.
- [58] Knoll, A, Vykoukalová, Z., *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. 1. vydání. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002. 168 s. 80–7157-616-6.
- [59] Petřek, J., *Hlavní histokompatibilní komplex člověka (HLA) v klinické imunologii: nomenklatura a možnosti laboratorní diagnostiky*, Alergie, 2. vydání, 2000.
- [60] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, 1988, Science 239: 487 – 491.
- [61] Smitalová, D., *Souvislost vybraných genů imunitní odpovědi a úspěšnosti transplantace krvetvorných kmenových buněk*, bakalářská práce, vedoucí práce doc. MUDr. František Mrázek, Ph.D., Olomouc, 2013.
- [62] Motáková, N., *Souvislost polymorfismu genu BDNF s vnímavostí k infarktu myokardu – genetická asociační studie u českých pacientů*, diplomová práce, vedoucí práce doc. MUDr. František Mrázek, Ph.D., Olomouc, 2012.
- [63] Holasová, Š., Radilová, H., Bunčec, M., *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. 1.vydání, Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2006. 47 s. ISBN 80-246-1072-8.
- [64] Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*, Nucleic Acids Res. 16, 1988, 1215.
- [65] Izolace DNA, *QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*, QIAGEN, duben 2010.
- [66] Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., Jabri, B., *Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis*, Annu Rev Immunol 2011, 29:493-525.
- [67] Fallang, L.E., Bergseng, E., Hotta, K., Berg-Larsen, A., Kim, C.Y., et al., *Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation*, Nat Immunol 2009, 10:1096-1101.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

anti-EMA	protilátky proti endomysiu
APC	antigen-presenting cell; antigen-prezentující buňky
Bf	properdinový faktor
DGP	deaminovaný gliadinový peptid
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfáty
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
ELFO	elektroforéza
EtBr	Etidium bromid
HLA	human leukocyte antigens
H ₂ O	destilovaná voda
IEL	intraepiteliální lymfocyty
IgA	alergen-specifické IgA protilátky
IgE	alergen-specifické IgE protilátky
IgG	alergen-specifické IgG protilátky
K ₃ EDTA	triethylentetraoctová kyselina
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR-SSP	polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

RR	relativní riziko
RT	room temperature; pokojová teplota
SBT	Sequencing Based Typing; sekvenování
ssDNA	single-stranded DNA; jednovláčková DNA
Taq polymeráza	termostabilní DNA polymeráza
TBE	Tris/borát/EDTA
TCR	receptor T-buněk
TG	transglutamináza
TNF	tumor necrosis factor
tTG	tkáňová transglutamináza
WHO	světová zdravotnická organizace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Anatomické složení obilky - Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním jeho morfologických vrstev.	14
Obr. 2: Schematické znázornění změn sliznice tenkého střeva podle Marshovy klasifikace.	18
Obr. 3: A) Sliznice tenkého střeva u zdravého člověka, B) sliznice tenkého střeva u pacienta s celiakií.	19
Obr. 4: Imunopatogenetický mechanismus celiakie – spuštění imunitní odpovědi a trvalého střevního zánětu.	22
Obr. 5: Schematické znázornění obecného postupu při podezření na celiakii.	24
Obr. 6: Znázornění HLA komplexu na šestém chromozomu.	27
Obr. 7: Schematické znázornění průběhu PCR.	31
Obr. 8: Schematický princip typizace HLA pomocí PCR-SSP.	32
Obr. 9: Schéma mikroizolace DNA, upraveno podle materiálů firmy Qiagen.	40
Obr. 10: Zdroj napětí, elektroforetická komora.	43
Obr. 11: Fotodokumentace pomocí přístroje Kodak Gel Logic systém.	43
Obr. 12: Schéma postupu a interpretace při vyšetření heterodimerů DQ2 a DQ8.	44
Obr. 13: Fotografie gelu s výsledky genotypizace variant rizikových pro celiakii.	53
Obr. 14: Interpretační list pro soupravu BAG-Histotype-Celiakie, který odpovídá výsledkům genotypizace v Obr. 13.	54
Obr. 15: Fotografie gelu s výsledky genotypizace soupravou BAG-Histotype-Celiakie – pacient 1.	55
Obr. 16: Fotografie gelu s výsledky genotypizace soupravou BAG-Histotype-Celiakie – pacient 2.	56
Obr. 17: Fotografie gelu s výsledky genotypizace soupravou BAG-Histotype-Celiakie – pacient 3.	56
Obr. 18: Graf znázorňující přehled výsledků vyšetření rizikových variant pro celiakii u pacientů za rok 2012.	59
Obr. 19: Graf znázorňující přehled výsledků vyšetření rizikových variant pro celiakii u pacientů za rok 2013.	59

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Podmínky amplifikace v termocykléru.	50
Tab. 2: Hodnocení nálezů ve vztahu k celiakii.	50
Tab. 3: Problematické nálezy HLA-DQ genotypu a jejich interpretace.	51
Tab. 4: Tabulka uvádějící výsledky validace metody typizace soupravou BAG-Histotype-Celiakie.	58

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. I: Výsledky genotypizací za rok 2012.	73
Příloha č. II: Výsledky genotypizací za rok 2013.	82
Příloha č. III: Interpretační list pro soupravu BAG-Histotype-Celiakie.	87

PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY GENOTYPIZACÍ ZA ROK 2012

Číslo vzorku DNA, 2012	Výsledek	Hodnocení	DQ2	DQ8
Leden				
17197	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
17198	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
17237	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 pozitivní DQA1*05 negativní DQA1*03 pozitivní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) pozitivní	-	+
17291	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
17300	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
17324	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
17330	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
17350	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
Únor				
17359	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
17366	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
17380	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 pozitivní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 pozitivní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) pozitivní	-	+
17382	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
17417	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-

18421	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
18422	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 pozitivní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 pozitivní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) pozitivní	+	+
Celkem pacientů	120		53	19

PŘÍLOHA P II: VÝSLEDKY GENOTYPIZACÍ ZA ROK 2013

Číslo vzorku DNA, 2013	Výsledek	Hodnocení	DQ2	DQ8
Leden				
18491	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18495	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18503	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18509	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18526	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
Únor				
18528	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
18532	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18548	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
18549	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18581	DQB1*02 negativní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18582	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-
18585	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 pozitivní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) pozitivní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	+	-
18601	DQB1*02 pozitivní DQB1*03:02/03:05 negativní DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ2 (DQB1*02, DQA1*05) negativní Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní	-	-

	DQA1*05 negativní DQA1*03 negativní	Heterodimer DQ8 (DQB1*03:02/03:05, DQA1*03) negativní		
Celkem pacientů	59		32	7

PŘÍLOHA P III: INTERPRETAČNÍ LIST

Score: BAG / Celiac Disease_V5_315S1_3.9.0

Update 07/2012 (V5.2)

Lot: 315S1

Auswertediagramm / Evaluation diagram

HISTO TYPE Celiac Disease

HLA DRB1 – DQA1 – DQB1 associations:
 1. DRB1*03 - DQA1*05:01 - DQB1*02:01
 2. DRB1*04 - DQA1*03:01 - DQB1*03:02
 3. DRB1*07 - DQA1*02:01 - DQB1*02:02
 DRB1*11 - DQA1*05:05 - DQB1*03:01
 4. DRB1*07 - DQA1*02:01 - DQB1*02:02
 In case of a HLA-DQB1*02 homozygous sample, the risk of CD development is 5 times higher than by a DQB1*02 heterozygous sample

Reaction pattern:
 1, 5, 6, 19
 2, 12, 13, 14, 15, 18
 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, (15), 17, 23
 3, 6, 7, 17

Susceptibility to Celiac Disease:
 high →
 high → very high

Ser.Type	Positive Reactions	1070 1070																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
DR3	DRB1*03:01:01-01:03:01:05-41,43-67N,68N-75,77-80,82,83 / *11:07,53,103,105,107,125 / *14:104,111w / DRB3*01:14																								
DR4	DRB1*04:01:01-05:11w,05:12-62,64-81N,82-94N,95-109,111-119N,120N-124 / *03:49 / *08:38 / *11:102:01,102:02																								
DR7	DRB1*07:01:01:01:01:02,01:02w-01:04,03:09,10N-21																								
DR11	DRB1*11:01:01-21,23-29,31w,32,33w,34,35w-37:02,39-52w,53-65:02w,66,68-70,72-96w,97-129 / *03:08,65																								
DQ2	DQB1*02:01:01-01:05,04,07?																								
DQ2	DQB1*02:02:06w																								
DQ2	DQB1*02:03																								
-	DQB1*02:05																								
DQ7(3) / -	DQB1*03:01:01-01:01:03:01:03-01:06,16,19,21,22,24,27-29,35,36,42																								
DQ7(3)	DQB1*03:01:02																								
DQ8(3) / -	DQB1*03:02:02,02,04,05,03,05,04,11,18,32,37																								
DQ8(3)/DQ3	DQB1*03:02:03:05:01,05:02																								
DQ9(3) / -	DQB1*03:03:02:01-03:02:03,03:04,15,17,26,30,31,33,34,38,39,41,43																								
DQ7(3)	DQB1*03:04																								
DQ3 / DQ4	DQB1*03:03:03,06,20:25 / DQB1*04:01:01-07																								
-	DQB1*03:02:05:07																								
-	DQB1*03:08																								
-	DQB1*03:09:44																								
DQ8(3)	DQB1*03:10																								
-	DQB1*03:12																								
-	DQB1*03:13																								
-	DQB1*03:14																								
DQ4	DQB1*04:02:02																								
-	DQB1*04:08																								
-	DQA1*02:01																								
-	DQA1*03:01:01																								
-	DQA1*05:01:01:01:01:01:02, 01:02?																								
-	DQA1*05:02																								
-	DQA1*05:03, 06, 07																								
-	DQA1*05:04																								
-	DQA1*05:05:01:01:01:01:03,08-11																								
-	Kontaminationskontrolle/Contamination Control																								
-	Länge in bp / length in bp	220	200	140	177	800	150	140	150	105	200	185	120	95	145	135	135	105	485	235	90	200	205	235	24

w = schwache Reaktion / weak reaction / Die Größe der internen Kontrolle in Mix 5 ist 429bp / The size of the internal control in mix 5 is 429bp
 * Die spezifische Bande in Mix 18 und 21 kann schwächer sein als die anderen spezifischen Reaktionen. / The specific band in Mix 18 and 21 may be weaker than the other specific bands.