

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA SMOLE

KLINIČNI POMEN DOLOČANJA SEROLOŠKIH OZNAČEVALCEV PRI
PACIENTIH S CELIAKIJO

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA SMOLE

KLINIČNI POMEN DOLOČANJA SEROLOŠKIH OZNAČEVALCEV PRI
PACIENTIH S CELIAKIJO

CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETERMINING SEROLOGICAL MARKERS IN
PATIENTS WITH CELIAC DISEASE

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Gastroenterološki interni kliniki v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja mag. farm., spec. med. biokem. Somentor pri izdelavi diplomske naloge je bil asist. dr. Rado Janša, dr. med.

ZAHVALA

Posebej se zahvaljujem prof. dr. Jošku Osredkarju mag. farm., spec. med. biokem. in asist. dr. Radu Janši, dr. med., za pomoč pri pisanju diplomske naloge, za strokovne nasvete in koristne informacije.

Hvala moji družini in prijateljem, ter znancem, ki so me ves čas podpirali, mi pomagali in me spodbujali.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja mag. farm., spec. med. biokem. in somentorja asist. dr. Rada Janše, dr. med.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Božič

Članica diplomske komisije: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič

Ljubljana, oktober 2011

Barbara Smole

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	III
KAZALO GRAFOV.....	III
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1. UVOD.....	1
1.1 ZGODOVINA ODKRITJA CELIAKIJE.....	2
1.2 POGOSTOST CELIAKIJE.....	3
1.3 GLUTEN.....	3
1.4 POJAVNE OBLIKE IN KLINIČNA SLIKA CELIAKIJE.....	4
1.4.1 Tipična celiakija.....	4
1.4.2 Atipična celiakija.....	5
1.4.3 Asimptomatske oblike celiakije (tiha, latentna in potencialna celiakija).....	5
1.4.4 Refraktorna celiakija.....	6
1.5 POVEZAVA Z DRUGIMI BOLEZNIMI.....	6
1.6 DIAGNOSTIKA.....	8
1.7 SEROLOŠKI OZNAČEVALCI.....	9
1.7.1 Antigliadinska protitelesa (AGA).....	10
1.7.2 Antiendomizijska protitelesa (EMA).....	10
1.7.3 Protitelesa proti tkivni transglutaminazi.....	11
1.7.4 Princip določanja protiteles.....	11
1.8 BIOPSIJA SLUZNICE TANKEGA ČREVEŠA.....	12
1.9 GENETIKA.....	14
1.10 IMUNOLOGIJA.....	15
1.11 ZDRAVLJENJE.....	16
2. NAMEN DELA.....	18
3. MATERIALI IN METODE.....	19
3.1 MATERIAL.....	19
3.2 METODE.....	19
3.2.1 IZBOR IN OBDELAVA PODATKOV.....	19
3.2.2 KEMILUMINISCENČNI IMUNSKI TEST (CLIA) KOT OSNOVA PRIDOBLENIH SEROLOŠKIH PODATKOV.....	20

3.2.3 VREDNOTENJE REZULTATOV.....	24
4. REZULTATI.....	25
5. RAZPRAVA.....	29
6. SKLEP.....	32
7. LITERATURA.....	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikazuje mehanizem poškodbe sluznice in imunski odziv.....	4
Slika 2: Tipični simptom pri otrocih s celiakijo.....	5
Slika 3: Prikaz pojavnih oblik celiakije v obliki ledene gore.....	6
Slika 4: Obravnava bolnika s simptomi, značilnimi za celiakijo.....	9
Slika 5: Dokazovanje prisotnosti antiendomizijskih protiteles. Fino zamrežena struktura na sliki B predstavlja pozitiven izvid indirektne imunofluorescence. Imunofluorescenca na sliki A je negativen izvid oziroma nespecifična vezava.....	10
Slika 6: Analizator LIAISON (DiaSorin).....	21
Slika 7: Prikaz integrala z reagenti.....	21

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prikazuje razdelitev pacientov glede na potrditev ali izključitev celiakije in glede na spol.....	20
Graf 2: Prikazuje, katere podatke so vsebovale kartoteke pacientov.....	26
Graf 3: Prikazuje, kakšne so bile vrednosti seroloških testov in histološke slike pri bolnikih s celiakijo.....	27
Graf 4: Prikaz vrednosti tTG glede na histološke spremembe sluznice tankega črevesa ocenjene s klasifikacijo po Marshu.....	28

POVZETEK

Celiakija je kronična bolezen tankega črevesa, ki nastane zaradi nepravilnega imunskega odziva sluznice tankega črevesa na beljakovino gluten. Gluten se nahaja v žitih, kot so pšenica, ječmen, rž in oves. Bolniki s celiakijo morajo vnesti v svoj vsakdanjik nov način prehranjevanja in striktno upoštevati brezglutensko dieto. Bolezen se lahko pojavi že v otroštvu ali pa se razvije pozneje v odrasli dobi. Za postavitev diagnoze so nam v pomoč klinični znaki, dokazovanje seroloških označevalcev in histološki pregled sluznice – opravljena biopsija, ki velja za zlati standard, vendar je za človeka odvzem vzorca zelo neprijeten. Danes ponekod v posameznih primerih že odstopajo od biopsije tankega črevesa.

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali lahko za potrditev diagnoze pri celiakiji izpustimo biopsijo in se odločimo le na podlagi serološkega testa, predvsem na podlagi kvantitativne ravni protiteles proti tkivni transglutaminazi v serumu bolnika.

Za raziskavo smo pregledali 379 kartotek pacientov s sumljivo diagnozo na celiakijo; od tega je bila celiakija potrjena pri 259 bolnikih (68%), pri 120 bolnikih (32%) pa je bil sum na celiakijo ovržen. Iz kartotek smo izpisali vrednosti seroloških označevalcev in pogledali histološko sliko.

Z raziskavo smo ugotovili, da bi bilo najbolje narediti kompromis med histologijo in serologijo, kar pomeni, da biopsija ne bi bila potrebna pri tistih pacientih, katerih vrednosti protiteles tkivne transglutaminaze razreda IgA bi presegale 10-kratno ali večkratno vrednost mejne vrednosti tTG.

Ključne besede: celiakija, gluten, brezglutenska dieta, serološki označevalci, protitelesa tkivne transglutaminaze, biopsija.

ABSTRACT

Celiac disease is a chronic disease of the small intestine caused by an abnormal immune response against the protein gluten. Gluten is found in grains such as wheat, barley, rye and oat. People with celiac disease must eat a strictly gluten-free diet and must remain on the diet for the remainder of their lives. Celiac disease can occur at any time in childhood, adulthood and old age. Its diagnosis relies on characteristic histologic findings on small-bowel biopsy and clinical and/or histologic improvement on a gluten-free diet.

Our purpose of this research was to make the diagnosis of celiac disease without biopsy and decide only on the basis of serological tests, mainly based on quantitative levels of anti-tissue transglutaminase (tTG-IgA) from serum. For this study 379 patients' card indexes were examined, 259 patients being diagnosed with celiac disease and 120 patients where disease was not found. From the patients' card indexes the value of serological markers and histological reports were extracted. With study concludes that the best way would be to create a balance between histology and serology, which means that biopsy would not be needed for those patients whose anti-tissue transglutaminase IgA is in excess of 10 times or more than the threshold value of tTG.

Keywords: celiac disease, gluten, gluten-free diet, serological markers, antibodies transglutaminase tissue, biopsy.

SEZNAM OKRAJŠAV

AGA	antigliadinska protitelesa
anti-tTG	protitelesa proti tkivni transglutaminazi
ARA	antiretikulinska protitelesa
CLIA	kemiluminiscenčna imunska metoda (ang.: chemiluminiscence immunoassay)
DHD	dermatitis herpetiformis Duhring
EF	elektroforeza
ELISA	encimskoimunska metoda (ang.: enzyme-linked immunosorbent assay)
EMA	antiendomizijska protitelesa
ESPGHAN	Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano
HLA	humani levkocitni antigeni
HMW	visoka molekulska masa (ang.: high molecular weight)
IEL	intraepitelijski limfociti
IFN	interferon
IgA/IgG	imunoglobulin A/imunoglobulin B
IIF	indirektne imunofluorescence
IL	interlevkin
LMW	nizka molekulska masa (ang.: low molecular weight)
Pt	protitelesa
RLU	relativne svetlobne enote (ang.: relative luminiscence units)
T	temperatura
TCR	T-celični receptor
tTG	tkivna transglutaminaza

1. UVOD

Celiakija ali z drugim imenom glutenska enteropatija je imunsko pogojena sistemska bolezen, ki lahko prizadene celotno tanko črevo in nastane kot posledica uživanja glutena pri genetsko predisponiranih osebah. Gluten je prisoten v žitih, kot so pšenica, ječmen, rž, v ovsu pa v minimalnih količinah (1).

Pogostost bolezni v Evropi in ZDA ocenjujemo na okoli 1/100 prebivalcev, kar pomeni, da je celiakija ena najpogostejših kroničnih bolezni nasploh. To ni le bolezen otroške dobe, ampak se lahko bolezen pojavi v kateri koli starosti in v različnih kliničnih oblikah. Atipične celiakije je 9-krat več kot tipične celiakije. Pri odraslih so pogostejše prisotni zunajčrevesni znaki celiakije, ter resni zapleti te bolezni. Pogostejši je razvoj drugih avtoimunih obolenj, predvsem avtoimunskega tiroiditisa, lahko se razvije osteoporoza, hematološke motnje, nevrološke motnje in celo psihične bolezni (2).

Pri diagnostiki celiakije uporabljamo sodobna diagnostična merila za celiakijo, ki temeljijo na dokazu značilne reverzibilne okvare sluznice tankega črevesa, ki nastane kot posledica uživanja glutena. Ta merila kot zlati standard predvidevajo biopsijo sluznice tankega črevesa in histološki pregled, pomembno vlogo v diagnostiki pa igrajo specifične imunske spremembe, ki omogočajo diagnostiko na podlagi seroloških testov (3,4).

Revidirana merila ESPGHAN (Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano), ki jih uporabljamo v diagnostiki celiakije, predvidevajo eno biopsijo sluznice tankega črevesa in sočasno sledenje ravni seroloških označevalcev za celiakijo ter klinične znake po prehodu na brezglutensko dieto. Kadar obstaja dvom o primarno postavljeni diagnozi, uporabimo klasična merila ESPGHAN, ki predvidevajo tri biopsije (3,4).

Diagnostična merila ESPGHAN opredeljujejo celiakijo kot trajno motnjo tolerance na gluten, zato naj bi bila brezglutenska dieta pri bolniku doživljenjska. Revidirana merila za celiakijo so bila sprejeta po zaslugi odkritja specifičnih protiteles pri bolnikih s celiakijo, t.i. seroloških označevalcev za celiakijo. V diagnostičnem postopku lahko določamo koncentracije antigliadinskih protiteles (AGA) razredov IgA in IgG, antiendomizijskih protiteles (EMA) razreda IgA in IgG, ter protiteles proti tkivni transglutaminazi (t-TG) razredov IgA in IgG. Primernejši način določevanja protiteles je kvantitativna ocena tTG, kot kvalitativna ocena EMA protiteles (3,4).

V zadnjih letih v diagnostiki celiakije uporabljamo tudi genetske preiskave, predvsem določanje prisotnosti zapisa za HLA-DQ2 in HLA-DQ8. Najnovejša preiskava pa je določanje prisotnosti protiteles t-TG v kapilarni krvi, ki jo lahko opravimo ob bolnikovi postelji, rezultate pa dobimo v nekaj minutah. Test je le orientacijski (1,2).

1.1 ZGODOVINA ODKRITJA CELIAKIJE

Celiakijo pri odraslih je v 2. stoletju pred našim štetjem prvi opisal Grk Aretej iz Kapadokije. Okoli leta 1888 je angleški zdravnik Samuel Gee opisal klinične znake celiakije pri otrocih. Zdravljenje z brezglutensko dieto se je začelo kmalu, ko je Nizozemec Dicke prvi povezal nastanek te bolezni z beljakovino – glutenom – v žitih. Ugotovil je, da so imeli nizozemski otroci med drugo svetovno vojno manj težav s celiakijo, ker so takrat ljudje uživali manj moke in močnatih izdelkov, po vojni pa se je celiakija pri nizozemskih otrocih ponovno pojavila z enako pogostnostjo. Brezglutensko prehrano so opisali Anderson, Van de Kammer in Weiers v letih 1952 in 1953 (5). Okoli leta 1954 je John W Paulley z jemanjem vzorcev med operacijami zasledil nenormalno sluznico zgornjega dela črevesa, to so potrdili za bistveno lastnost, ki bi bila v pomoč pri diagnostificiranju celiakije. Prav tako pomembna ugotovitev je bila, da se pacientu z zdravljenjem z brezglutensko dieto sluznica povrne v izboljšano oz. normalno stanje (6). O prvih biopsijah (odvzemkih koščkov sluznice) tankega črevesa sta leta 1975. leta prva poročala avtorja Sakula in Shiner (5). Leta 1990 so odkrili krvni test, natančneje encimsko imunski test, ki vključuje sintezo specifičnih protiteles proti gliadinu, test pa ne izključuje popolnoma potrebe po biopsiji. Odvzem venske krvi, je za pacienta manj obremenjujoč odvzem vzorca potreben za preiskavo, kakor biopsija. Leta 1981 je Unsworth opisal antigliadinska protitelesa (AGA), Chorzelsky pa je 3 leta kasneje opisal antiendomizijska protitelesa (EMA). L. Sollid je leta 1989 opisal povezavo med celiakijo in HLA molekulo razreda II. Marsh je podrobno opisal spremembe črevesne sluznice pri pacientih s celiakijo leta 1992 (6). Leta 1997 je Dieterich objavil, da je tkivna transglutaminaza avtoantigen, proti katerim so usmerjena antiendomizijska protitelesa, (7) Shan pa je leta 2002 identificiral 33-merni peptid α -gliadina, ki vsebuje kar šest epitopov in deluje kot vodilni vnetni odziv na gluten pri pacientih s celiakijo (6).

1.2 POGOSTOST CELIAKIJE

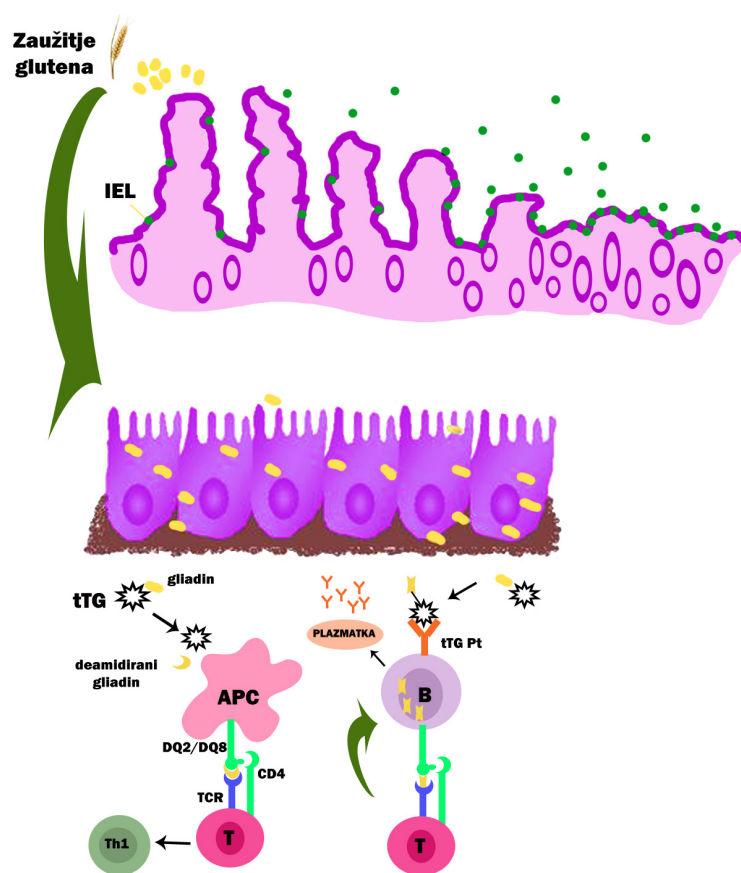
Celiakijo po svetu poznajo povsod tam, kjer ljudje uživajo žita – pšenico, rž, ječmen in oves. Pojavnost bolezni zaznavamo s prevalenco 1 primer na 1000 do 3000 rojstev. Najpogostejša je celiakija na Irskem, Škotskem in v skandinavskih državah (5). V Evropi in ZDA je incidenca te bolezni 1/100 prebivalcev, pri starejših osebah pa je še pogostejša, kar pomeni, da je celiakija ena najpogostejših kroničnih bolezni nasploh (1).

Danes menimo, da je ob atipičnih oblikah celiakije, bolezen še vedno prepogosto neodkrita. Velika večina ljudi ima lahko latentno obliko celiakije (razvije znake pozno), lahko ima malo kliničnih znakov bolezni – oligosimptomatske oblike, ali pa so celo življenje brez znakov obolenja – tihe oblike celiakije (5).

1.3 GLUTEN

Gluten je kompleksna mešanica v vodi netopnih beljakovin pšenice in sorodnih žit. Glede na topnost delimo te proteine v dve približno enaki skupini: v alkoholu topne proteine ali gliadine, ter v kislinah topne proteine ali glutenine (8). Gliadine delimo na α/β -, γ -, in ω -gliadine, medtem, ko glutenine delimo na glutenine z nizko molekulsko maso (LMW) in glutenine z visoko molekulsko maso (HMW) (9). Gliadini so prolamini, ki so topni v alkoholu in vsebujejo veliko aminokislin glutamina (35%) in prolina (15%). Prolamine v rži imenujemo sekalini, v ječmenu hordeini in v ovsu avenini (10). Frakcija α -gliadinov se je pokazala za najbolj škodljivo za bolnike s celiakijo (11).

Zaužitje glutena sproži antigenski odziv encima tkivne transglutaminaze (tTG). V lamini propriji sluznice so peptidi glutena izpostavljeni tkivni transglutaminazi (TG2), ki deamidira glutamin do negativno nabite glutaminske kisline. Spremenjeni peptidi glutena (neg. nabiti), se močno vežejo na HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 (poz. nabite) molekule (9). Podroben opis mehanizma poškodbe sluznice in imunskega odziva je opisan pod naslovom Imunologija. Mehanizem poškodbe sluznice in imunski odziv prikazuje Slika 1.



Slika 1: Prikazuje mehanizem poškodbe sluznice in imunski odziv

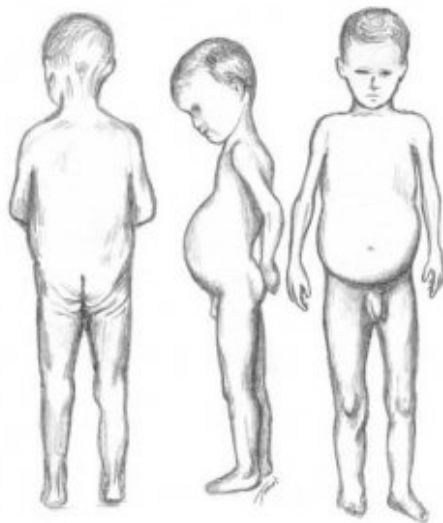
1.4 POJAVNE OBLIKE IN KLINIČNA SLIKA CELIAKIJE

Celiakija se lahko pojavi v otroštvu ali šele v odrasli dobi. Klinična slika je lahko zelo raznolika v odvisnosti od starosti bolnik, trajanja bolezni in obsega sprememb na črevesni sluznici. Pojavne oblike celiakije prikazane v obliki ledene gore, prikazuje Slika 3. Glede na klinično sliko ločimo več pojavnih oblik celiakije:

1.4.1 Tipična celiakija

Celiakija izražena v polni obliki. Prisotni so serološki označevalci celiakije, prav tako pa so vidne histološke spremembe sluznice tankega črevesa. Običajno se pojavi v starosti do dveh let s tipičnimi simptomi, kot so npr. kronična diareja, izguba telesne teže, napihnjen

trebuh, bruhanje, utrujenost... (12). Tipični simptom pri otrocih s celiakijo nam prikazuje Slika 2.



Slika 2: Tipični simptom pri otrocih s celiakijo

1.4.2 Atipična celiakija

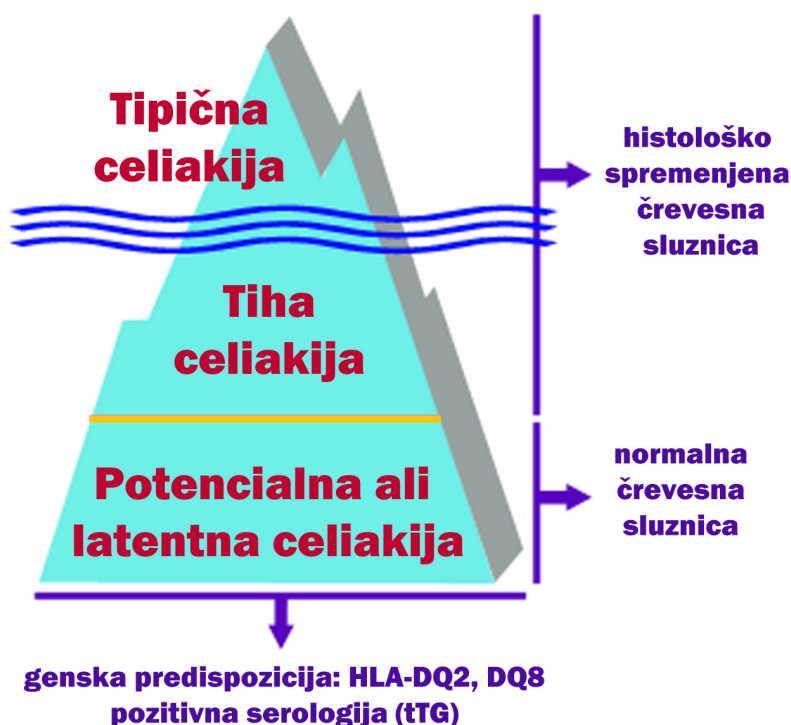
Celiakija z atipičnimi kliničnimi znaki. Pojavlja se napenjanje v trebuhu, nekaj težav s prebavili, drisko pa lahko zamenja tudi zaprtost (12). Prevladujejo neznačilni simptomi, kot so npr. rezistentna anemija, nizka rast, kožne spremembe (dermatitis herpetiformis Duhring), jetrne bolezni, nevrološke bolezni, osteoporoza, osteopenija, neplodnost, zapoznela puberteta, aftozni stomatitis, nespecifični artritis... (2,13).

1.4.3 Asimptomatske oblike celiakije (tiha, latentna in potencialna celiakija)

- Tiha celiakija je oblika bolezni, za katero je značilna tipična okvara črevesne sluznice, ki pa poteka brez izraženih simptomov, tudi če uživajo gluten. Za celiakijo značilna protitelesa so prisotna. Simptome in znake razvijejo kasneje v življenju.
- Latentna celiakija je oblika bolezni, za katero je značilna normalna črevesna sluznica, ob normalni prehrani, pri bolniku, ki je nekoč že imel dokazano tipično atrofično sluznico, ki pa se je po ustrezni brezglutenski dieti normalizirala. Tudi pri teh bolnikih odkrivamo za celiakijo značilna protitelesa. Pojavi se pri bolnikih, ki so podedovali gene, vendar se simptomi in znaki še niso razvili.

V obeh primerih je celiakija nevidna, simptomi in znaki se pokažejo kasneje v življenju.

- Potencialna celiakija je oblika bolezni, pri kateri ima bolnik normalno črevesno sluznico, zasledimo le za celiakijo prisotne gene (14,15,16,17).



Slika 3: Prikaz pojavnih oblik celiakije v obliki ledene gore

1.4.4 Refraktorna celiakija

Refraktorna celiakija je oblika celiakije, ki ne reagira na brezglutensko dieto, ki jo bolnik upošteva pol leta. Takrat moramo izključevati limfom in v terapijo uvedemo kortikosteroidno zdravljenje (18).

1.5 POVEZAVA Z DRUGIMI BOLEZNIMI

Celiakijo včasih odkrijemo tudi preko drugih bolezni kot so npr. herpetiformni dermatitis, slabokrvnost, afte, sladkorna bolezen, osteoporoza, tireoiditis, shizofrenija, IgA nefropatija, astma, alergije na sestavine hrane, artritis, limfom (8).

PRAVI CELIAKIJI PRIDRUŽENE BOLEZNI

Avtoimunske bolezni:

- tip 1 sladkorna bolezen,
- avtoimuni tireoiditis,
- Sjögrenov sindrom,
- kolagenska vaskularna bolezen,
- bolezni ščitnice,
- bolezni jeter,
- revmatoidni artritis.

Različne bolezni:

- selektivna IgA deficienca,
- Downov sindrom,
- IgA nefropatija,
- kronično vnetne črevesne bolezni,
- cistična fibroza.

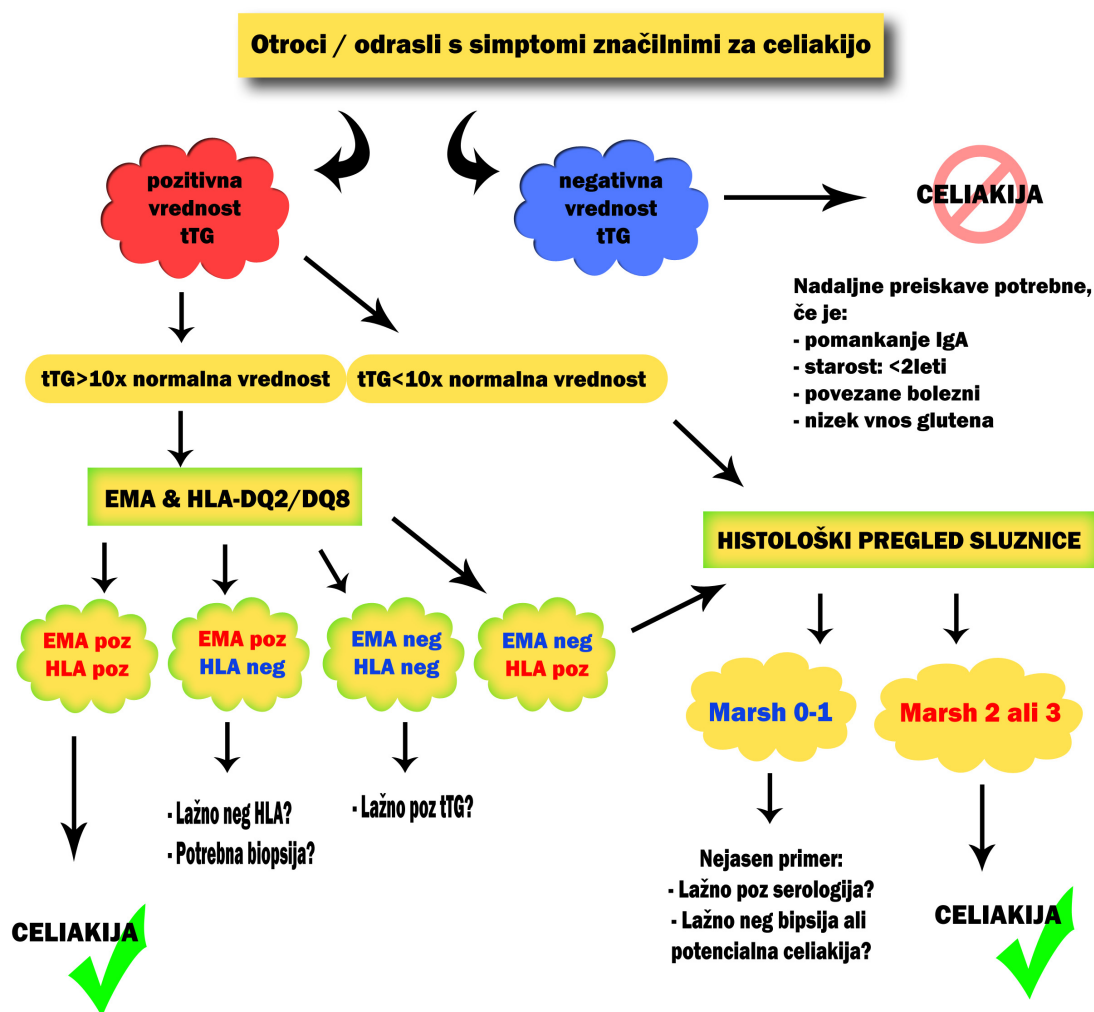
BOLEZNI, KI SO ZUNAJČREVESNE MANIFESTACIJE CELIAKIJE OZIROMA POSLEDICA NEZDRAVLJENE BOLEZNI:

- dermatitis herpetiformis Duhring,
- osteoporoza,
- aftozni stomatitis,
- hipoplazija zobne sklenine,
- mikrocitna anemija,
- nevrološke bolezni,
- karcinom ustne votline, požiralnika,
- non-Hodgkinov limfom tankega črevesa (19,20).

1.6 DIAGNOSTIKA

Zaradi pogosto neznačilne klinične slike, dokončna diagnoza temelji na dokazovanju prisotnosti specifičnega reverzibilnega imunskega odgovora in dokazovanju značilnih histoloških sprememb sluznice tankega črevesa. Obravnava bolnika s simptomi, značilnimi za celiakijo prikazuje Slika 4. Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN) je leta 1970 sprejelo enotna diagnostična merila za celiakijo, »klasična merila«, ki temeljijo na biopsiji sluznice tankega črevesa, dandanes še vedno im. »zlati standard«. Ta merila za določitev diagnoze predvidevajo najmanj tri biopsije. Prvo biopsijo, opravimo v času, ko ima bolnik težave in uživa normalno hrano. Bolnik po tej biopsiji preide na brezglutensko dieto, ki traja vsaj 2-3 meseca, pri otrocih pa vsaj 6 mesecev. Normalizacijo histološke slike potrdimo z drugo biopsijo. Bolnik lahko nato preide na obremenitev z glutenom. Po 3-6 mesecih (v primeru kliničnega poslabšanja takoj) opravimo tretjo biopsijo sluznice tankega črevesa. Prisotnost značilnih histoloških sprememb potrdi končno diagnozo. Pri normalnem histološkem izvidu z obremenitvijo nadaljujemo in opravimo še četrto biopsijo po dveh letih.

Trenutno se v diagnostiki najpogosteje uporablja »revidirana merila« ESPGHAN, ki predvidevajo le eno biopsijo sluznice tankega črevesa, za dokončno postavitev diagnoze je dovolj klinično izboljšanje in normalizacija vrednosti za celiakijo specifičnih serumskih protiteles po prehodu na brezglutensko dieto po 3-6 mesecih (3,4).



Slika 4: Obravnava bolnika s simptomi, značilnimi za celiakijo

1.7 SEROLOŠKI OZNAČEVALCI

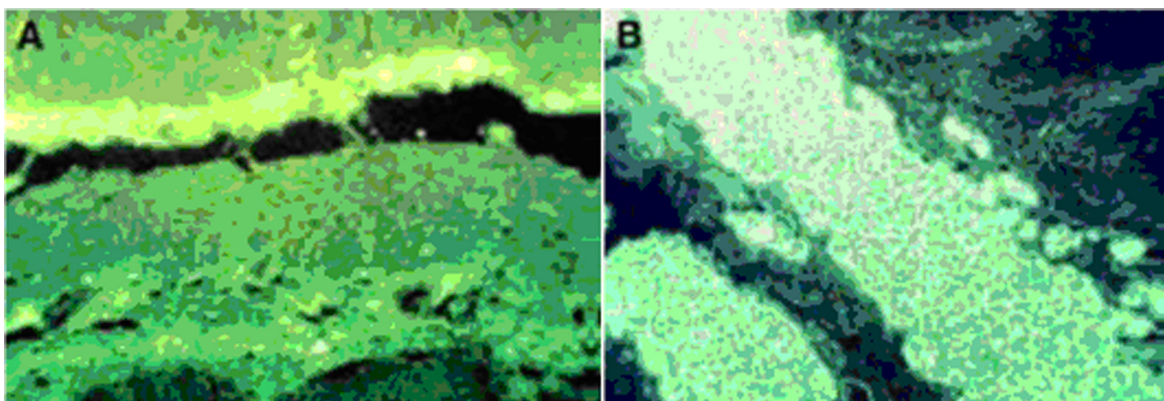
Serološki označevalci celiakije so specifična protitelesa, ki jih najdemo v serumu bolnikov s celiakijo. Sem sodijo antigliadinska protitelesa (AGA) razredov IgG in IgA, ki se danes zaradi slabe diagnostične specifičnosti in občutljivosti skoraj ne uporabljajo več, antiendomizijska protitelesa (EMA) razreda IgA in protiteles proti tTG. Osnova današnje diagnostike celiakije je dokazovanje tTG skupaj z EMA protitelesi (2).

1.7.1 Antigliadinska protitelesa (AGA)

Za njihovo določanje se najpogosteje uporablja encimsko-immunski test (ELISA). Protitelesa IgG AGA imajo visoko diagnostično občutljivost in so pozitivna pri 90-95% bolnikov s celiakijo, vendar imajo nizko diagnostično specifičnost (50%), ker so prisotna tudi pri drugih boleznih tankega črevesa. Protitelesa IgA AGA so diagnostično bolj specifična, ampak manj občutljiva in se zato uporabljajo v kombinaciji z IgG Pt (21).

1.7.2 Antiendomizijska protitelesa (EMA)

Za določanje EMA protiteles razreda IgA uporabljamo tehniko indirektno imunofluorescence (IIF). Dokazovanje prisotnosti antiendomizijskih protiteles prikazuje Slika 5. Kot antigen se uporabljajo rezine požiralnika primatov (opic) (1). EMA Pt imajo visoko diagnostično občutljivost (88-100%) in diagnostična specifičnost (100%). V serumu se lahko pojavijo po več letih bolezni, zato je lahko pri nekaterih bolnikih s celiakijo EMA negativna. To pa nam tudi pojasnjuje, zakaj je EMA ponavadi negativna pri otrocih mlajših od 5 let. Pri bolnikih s celiakijo pogosteje naletimo na imunodeficienco IgA razreda (2-3%), zato interpretacija takih testov ni možna. Torej, kadar so vrednosti seroloških označevalcev negativne, vendar še vedno obstaja sum na celiakijo, je potrebno narediti biopsijo sluznice tankega črevesa (21).



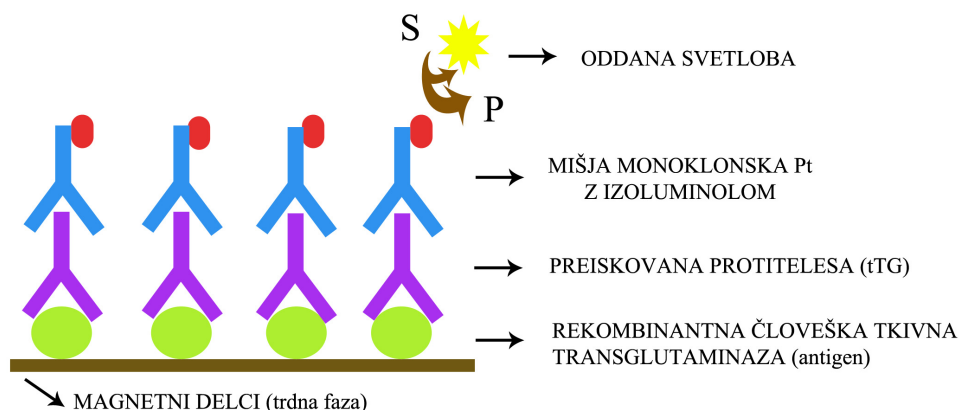
Slika 5: Dokazovanje prisotnosti antiendomizijskih protiteles. Fino zamrežena struktura na sliki B predstavlja pozitiven izvid indirektno imunofluorescence. Imunofluorescenca na sliki A je negativen izvid oziroma nespecifična vezava.

1.7.3 Protitelesa proti tkivni transglutaminazi

Leta 1997 je Dieterich opisal avtoantigen, proti kateremu so usmerjena antiendomizijska protitelesa, to je t.i. tkivna transglutaminaza (6). Antigen predstavlja encim tkivna transglutaminaza II. Gre za encim, odvisen od kalcija, ki katalizira križno povezavo med glutaminskimi in lizinskimi ostanki v proteinih. Gliadin oz. nekateri gliadinski peptidi predstavljajo pomemben substrat za ta encim (1). Protitelesa proti tkivni transglutaminazi so specifična za celiakijo in se sintetizirajo v lamini proprii, dokazujemo razred IgA in IgG (6). Klasično jih določamo z metodo ELISA (1). Leta 2005 so prvič objavili podatke o hitrem testu, ki omogoča dokazovanje protiteles proti tkivni transglutaminazi, kar ob postelji bolnika, rezultate pa lahko odčitamo v petih do desetih minutah. S to metodo izkoriščamo tkivno transglutaminazo v eritrocitih za odkrivanje protiteles proti t-TG v kapilarnem vzorcu krvi. Na ta način lahko indikacijo za biopsijo postavimo že ob prvem obisku in se s tem izognemo nepotrebnemu čakanju na izvide seroloških testov. Kljub vsemu tovrstni testi niso toliko diagnostično občutljivi in specifični kot serološki testi (1).

1.7.4 Princip določanja protiteles

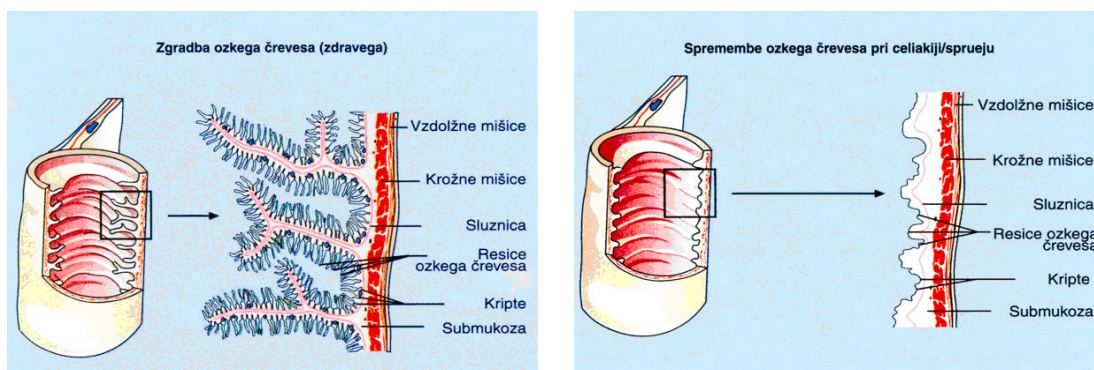
Za določanje protiteles v laboratorijski diagnostiki celiakije uporabljamo pretežno imunokemijske metode, zelo pogosto kemiluminiscenčni test. Med prvo inkubacijo se rekombinantna človeška tkivna transglutaminaza, kot antigen veže na magnetne delce. Med drugo inkubacijo preiskovana protitelesa, prisotna v vzorcu ali v kontroli, reagirajo z antigenom, vezanim na trdno fazo. Po vsaki inkubaciji se s spiranjem odstrani nevezan material. Z dodatkom »start« reagenta nastane reakcija in tako pride do oddajanja kemiluminiscenčne svetlobe. Svetlobni signal zazna fotopomnoževalka, ki nam rezultate poda v relativnih svetlobnih enotah RLU (ang.: relative luminiscence units) in nam pove, kolikšna je koncentracija protiteles proti tkivni transglutaminazi razreda IgA v preiskovanih vzorcih in v kontrolah.



Slika 6: Princip kemiluminiscenčnega testa (CLIA)

1.8 BIOPSIJA SLUZNICE TANKEGA ČREVEESA

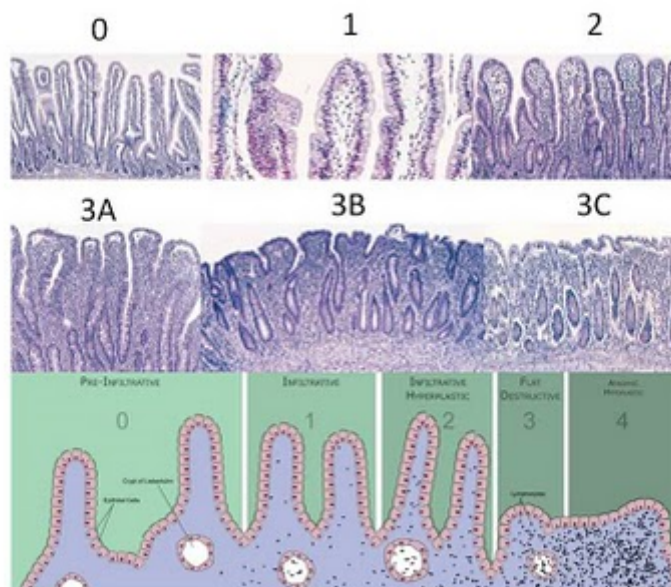
V času odkritja škodljivega učinka glutena je diagnostika celiakije temeljila na kliničnih znakih bolezni. Leta 1955 je bila opravljena prva peroralna biopsija tankega črevesa (Royer v Argentini in Shinnerjeva v Veliki Britaniji), ki je omogočila histološki pregled biptov sluznice tankega črevesa. Takrat so sicer že poznali spremembo sluznice tankega črevesa pri umrlih bolnikih s celiakijo, vendar je prevladovalo mnenje, da gre za artefakte, ki so nastali po smrti bolnikov. Šele mikroskopski pregled svežih biptov sluznice tankega črevesa je potrdil za celiakijo značilne histološke reverzibilne spremembe sluznice tankega črevesa. Spremembe, ki jih uživanje glutena povzroči pri bolnikih s celiakijo, pogosto označujemo z izrazom atrofija sluznice tankega črevesa. Ker sluznica tankega črevesa pravzaprav ni atrofična (Lieberkuhnove kripte so podaljšane), uporabljamo tudi izraza ploska sluznica tankega črevesa ali hiperplastična atrofija črevesnih resic. Najznačilnejše histološke spremembe, ki jih pri celiakiji opazimo, so: popolna ali delna atrofija črevesnih resic, podaljšanje Lieberkuhnovih kript in povečanje števila IEL. Zgradba tankega črevesa zdrave osebe in spremembe tankega črevesa pri bolniku s celiakijo prikazuje Slika 7. Biopsijo sluznice tankega črevesa v večini primerov opravimo v poteku diagnostične ezofago-gastro-duodenoskopije, ki omogoča natančen ogled mesta biopsije. Le nekateri centri biopsijo opravijo s pomočjo aspiracijske sonde (1).



Slika 7: Zgradba tankega (ozkega) črevesa zdrave osebe in spremembe tankega (ozkega) črevesa pri celiakiji

Prav biopsija sluznice tankega črevesa in dokaz značilnih histoloških sprememb predstavljata temelj diagnostičnih meril ESPGHAN. Pri opredelitvi sprememb sluznice tankega črevesa različni avtorji pri histološkem pregledu atrofijo delijo v 2-7 stopenj, najpogosteje pa se uporablja klasifikacija po Marshu, ki spremembe črevesne sluznice pri celiakiji deli v štiri značilne stopnje (1). Sprememba sluznice tankega črevesa ocenjena s klasifikacijo po Marshu je prikazana na Sliki 8.

- tip 0 - črevesna sluznica je normalna,
- tip 1 - oz infiltrativna stopnja, struktura sluznice je normalna, prisotna je infiltracija intraepitelijskih limfocitov (IEL),
- tip 2 - oz. infiltrativno-hiperplastična stopnja, črevesne resice so prisotne, predvsem hipertrofija in hiperplazija kript, epitelj pa je izrazito infiltriran z IEL,
- tip 3 - oz. ploska destruktivna stopnja je najznačilnejša sprememba, ki jo vidimo pri bolniku s celiakijo, lahko je blaga atrofija resic (3a), subtotalna atrofija resic (3b), ali pa totalna atrofija resic (3c), kripe so močno hiperplastične in hipertrofične, zelo izrazita je infiltracija epitela z limfociti,
- tip 4 - oz hipoplastična stopnja se pokaže pri redkih bolnikih, ki se ne odzivajo na zdravljenje (refraktorna celiakija) (6).



Slika 8: Sprememba sluznice tankega črevesa ocenjena s klasifikacijo po Marshu

1.9 GENETIKA

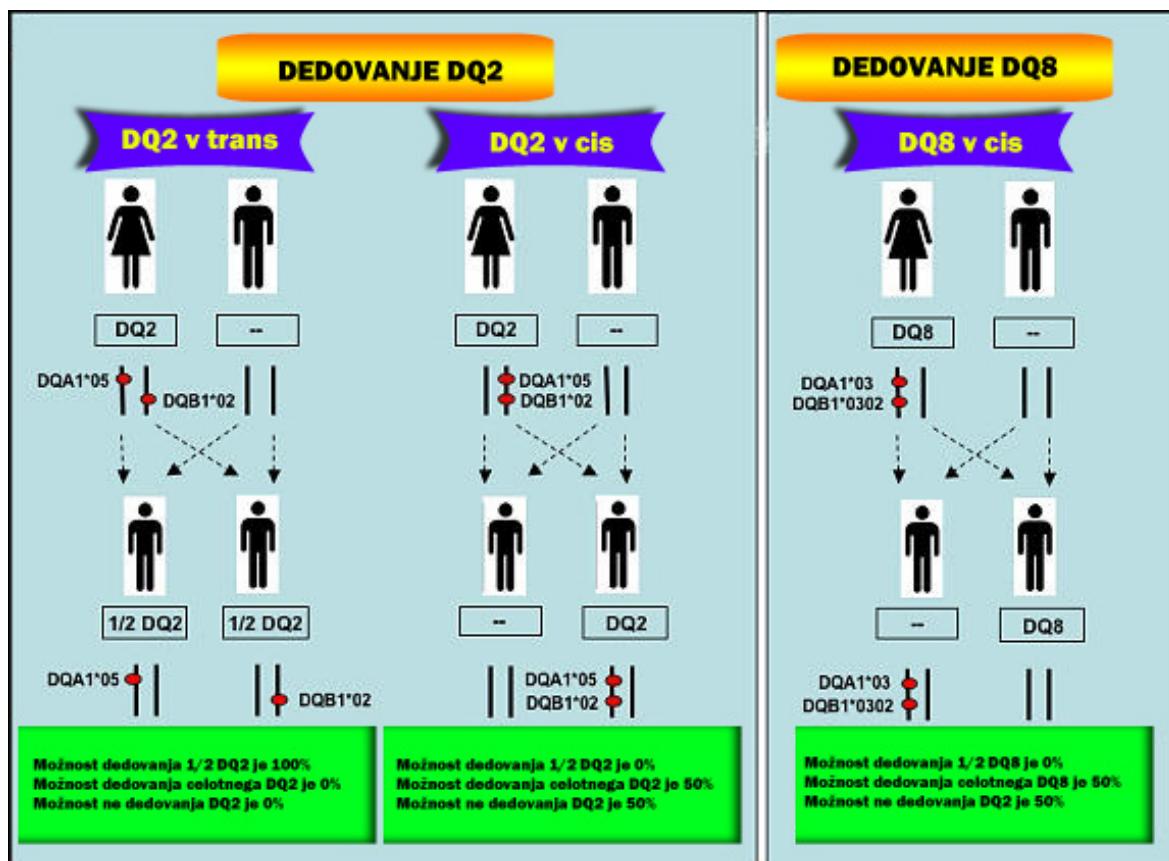
Za pojav celiakije so potrebni genetski in okoljski dejavniki. Pri ožjih družinskih članih (starših, bratih in sestrah) se celiakija pojavlja vsaj desetkrat pogosteje kot sicer v populaciji. Veliko večja je možnost, da zbolijo za celiakijo enojajčni dvojčeka (71%), kot dvojajčni dvojčeka (9%), v primeru, da ima drugi dvojčeka celiakijo (22).

Najbolj raziskana je povezava s HLA (humani levkocitni antigeni) antigeni, ki so kodirani na šestem kromosomu in izraženi na antigen predstavitevni celici, to so večinoma makrofagi, dendritične celice in limfociti B. Glavna naloga HLA-molekul je vezava in predstavitev peptidnih fragmentov T-celicam (23). Celice T se aktivirajo, ko prepoznajo antigen, ki je v kompleksu z molekulo HLA, aktivacija pa sproži tvorbo citokinov (24).

HLA delimo v razred I (HLA-A, -B in -C) in II (HLA-DR, -DQ in -DP) (25). HLA-molekule razreda II predstavljajo peptide T-celicam pomagalkam, medtem ko HLA-molekule razreda I predstavljajo peptidne antigene citotoksičnim T-celicam (23). HLA-DQ2 heterodimer je zapisan z aleli DQA1*05 in DQB1*02 in predstavlja $\frac{1}{4}$ prebivalstva. Kar 90% pacientov s celiakijo ima prisoten protein HLA-DQ2.

Pacienti, ki imajo negativen HLA-DQ2 protein imajo najverjetneje pozitiven HLA-DQ8 protein, zapisan z aleli DQA1*0301 in DQB1*0302 (6). Ta zapis nosi 5-12% bolnikov (2). Način dedovanja DQ2 in DQ8 molekule od staršev prikazuje Slika 9.

S pomočjo agarozne gelske EF določimo prisotnost molekul DQ2 in DQ8 iz polne krvi z dodatkom EDTA (6).

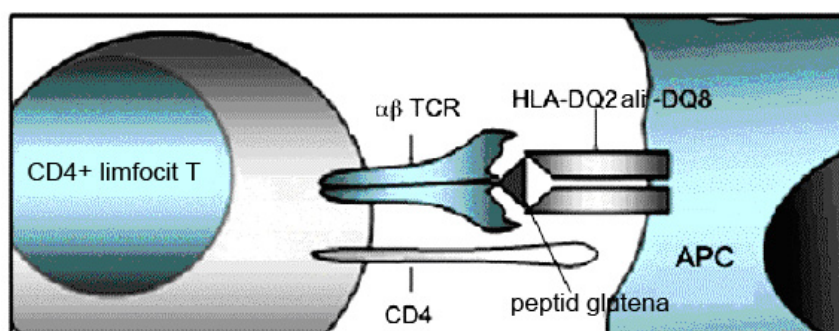


Slika 9: Način dedovanja DQ2 in DQ8 molekule od staršev

1.10 IMUNOLOGIJA

Celiakija se pojavi pri genetsko predispoziranih ljudeh kot posledica aktivacije celičnega in humoralnega odziva po izpostavljenosti glutenu (21,24). V okviru celičnega imunskega odziva imajo bolniki s celiakijo povišano število T-limfocitov v lamini proprijii in epitelju. Z aktivacijo CD8⁺ T-limfocitov v epitelju se poveča število IEL. IEL so T-celice s

citotoksičnimi lastnostmi, te nosijo dve vrsti T-celičnih receptorjev (TCR), lahko imajo alfa/beta TCR ali gama/delta TCR (26). Običajno ima IEL alfa/beta receptor, pri bolnikih s celiakijo pa je običajno povišano število IEL z gama/delta TCR. Po aktivaciji CD4⁺ T-limfocitov v lamini propriji pride do humoralnega imunskega odziva s poliferacijo B celic – te dozoriijo v plazmatke (27), ki proizvajajo IgA in IgG protitelesa (antigliadinska – AGA, antiendomizijska – EMA, protitelesa proti TG2 – anti-tTG), ter celičnega imunskega odziva, ki povzroči tvorbo vnetnih citokinov – posledično pride do poškodbe črevesne sluznice. Aktivacija celice T-pomagalka, ki je v kompleksu z molekulo HLA prikazuje Slika 10.



Slika 10: Aktivacija celice T-pomagalka, ki je v kompleksu z molekulo HLA

V okviru humoralnega imunskega odziva lahko v serumu pacientov s celiakijo, dokažemo prisotnost specifičnih protiteles, to so antigliadinska Pt (AGA) razredov IgG in IgA, antiendomizijska Pt razreda IgA in Pt proti tkivni transglutaminazi (t-TG) (21,26,28, 29,30).

1.11 ZDRAVLJENJE

Danes je še vedno edina dokazana uspešna oblika zdravljenja celiakije stroga prehrana brez glutena, ki jo mora bolnik upoštevati doživljenjsko. Bolnikom zagotavlja ustrezno zdravstveno stanje z izginotjem kliničnih znakov bolezni, normalizacije izvidov in ponovno vzpostavitev normalne črevesne sluznice.

Bolnik s celiakijo mora iz prehrane izključiti vsa živila, ki vsebujejo škodljive prolamine (pšenica, rž in ječmen), t.i. gluten. Pomembno je, da se zavedamo, da lahko tudi majhne količine glutena povzročijo resne zaplete. Treba je paziti na sestavo jedi, ker so sledi glutena lahko v različnih izdelkih. Živila brez glutena so označena v skladu s predpisi, ki urejajo označevanje živil za posebne prehranske namene in so označena z oznako "brez glutena", ki je na vidnem delu embalaže. Oznako brez glutena prikazuje Slika 11.



Slika 11: Oznaka »brez glutena«

Kadar bolnik slabše prenaša mlečni sladkor, priporočamo za krajši čas, dokler se sluznica tankega črevesa ne popravi, prehrano brez mleka. Dokazana pomanjkanja vitaminov in mineralov zdravimo usmerjeno npr. pomanjkanje železa nadomestimo z železovimi pripravki. Prehodno pomanjkanje encimov trebušne slinavke zdravimo z nadomestki pankreatičnih encimov (10,13).

2. NAMEN DELA

Visoka diagnostična specifičnost in občutljivost seroloških označevalcev sta nekatere protagoniste privedli do predlogov, naj se diagnoza celiakije postavi brez biopsije; to pa argumentirajo na podlagi velikega števila bolnikov z značilnimi simptomi in s pozitivnimi serološkimi označevalci. Nekateri pa so ravno nasprotnega mnenja in trdijo, da je biopsija potrebna ravno zaradi tega, ker so lahko simptomi slabo izraženi, vrednosti protiteles so lahko lažno zvišane ali znižane in podobno.

Cilj te diplomske naloge je ugotoviti, ali je serološka preiskava dovolj zanesljiva za postavitev diagnoze celiakije, da bi zmanjšali število agresivnih posegov t.i. biopsije in preveriti diagnostično občutljivost ter diagnostično specifičnost serološke preiskave. Ugotoviti želimo ali lahko v nekaterih primerih postavimo diagnozo tudi brez biopsije, samo na podlagi serološkega testa, poudarek je predvsem na merjenju tTG in za kolikokrat mora biti ta vrednost povišana od normalne vrednosti tTG.

Drugi vidik diplomske naloge je bila seznanitev s postopki za določanje seroloških označevalcev celiakije s kemiluminiscenčno imunokemijsko metodo, s katero pridobivamo rezultate, ki naj bi nadomestili histološki pregled vsaj v delu pacientov.

Iz kartotek pacientov bomo izpisali podatke o histoloških preiskavah in vrednostih seroloških testov ter jih med seboj primerjali.

3. MATERIALI IN METODE

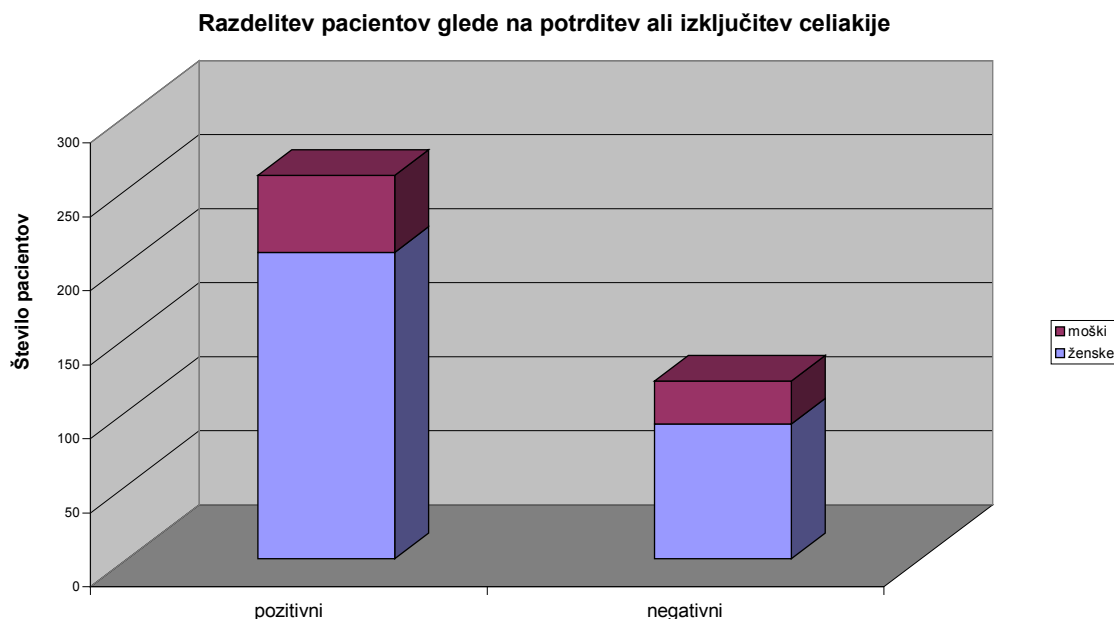
3.1 MATERIAL

Podatki v kartotekah pacientov, ki so bili napoteni na Gastroenterološko interno kliniko na laboratorijske preiskave ob sumu na celiakijo ali kontrolnem pregledu v obdobju od leta 2000 do leta 2010.

3.2 METODE

3.2.1 IZBOR IN OBDELAVA PODATKOV

Iz 379 kartotek pacientov iz obdobja 2000 do 2010 smo izpisali starost, spol, diagnozo, histologijo, vrednosti seroloških označevalcev in ali je pacient na brezglutenski dieti. Povprečna starost pacientov je bila 36 let, najvišja starost 82 let in najnižja 6 let. Med kartotekami so bili bolniki s celiakijo in pacienti pri katerih je obstajal sum na celiakijo. Pacientov s potrjeno celiakijo je bilo 259 (68%), od tega je bilo 207 ženskega (80%) in 52 moškega spola (20%), 120 pacientov (32%) od tega 91 ženskega (75,8%) in 29 moškega spola (24,2%), pa je bilo takih, kjer je bil le sum na celiakijo, kasneje pa so izvidi pokazali, da lahko celiakijo izključijo. Razdelitev pacientov glede na potrditev ali izključitev celiakije in glede na spol prikazuje Graf 1.



Graf 21: Prikazuje razdelitev pacientov glede na potrditev ali izključitev celiakije in glede na spol

3.2.2 KEMILUMINISCENČNI IMUNSKI TEST (CLIA) KOT OSNOVA PRIDOBLJENIH SEROLOŠKIH PODATKOV

Kemiluminiscenčni imunski test (CLIA), temelji na kemiluminiscenci, ki nastane kot posledica encimske reakcije. Ta test uporabljamo za posredno kvantitativno določitev protiteles proti tkivni transglutaminazi razreda IgA. Prisotnost protiteles razreda IgA, v povezavi še z drugimi laboratorijskimi testi in klinično sliko, nam je v pomoč pri postavljanju diagnoze celiakije, pri klinični obravnavi in pri spremljanju zdravljenja bolnika s celiakijo. Kot antigen se uporablja rekombinantna človeška tkivna transglutaminaza, s katero so premazani magnetni delci (trdna nosilec), za označevalno telo pa uporabimo mišja monoklonska protitelesa, na katerih je konjugiran izoluminolni derivat.

3.2.2.1 Analizator

Z analizatorjem LIAISON, proizvajalca DiaSorin, ki deluje na principu kemiluminiscence, smo kvantitativno merili protitelesa proti tkivni transglutaminazi v serumu pacienta.

Analizator LIAISON je popolnoma avtomatiziran, enostaven in hiter za uporabo. Prve rezultate nam poda po 35 min, ko smo vstavili vzorec. Za analizo zadostuje 20 μ L vzorca seruma ali plazme.

Analizator je potrebno kalibrirati v primeru:

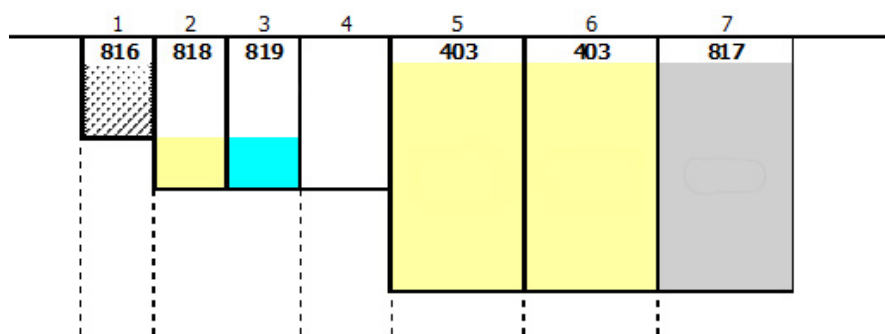
- uporabe novih reagentov v integralu
- če je od prejšnje kalibracije minilo več kot dva tedna
- če je bil analizator servisiran
- če so kontrolne vrednosti izven kontrolnega območja



Slika 6: Analizator LIAISON (DiaSorin)

3.2.2.2 Uporabljeni reagenti v integralu

Reagenti so zloženi v posebnem stojalu – integralu. Vsak integral je označen s črtno kodo, da ga analizator prepozna. Reagenti v integralu si sledijo po naslednjem vrstnem redu:



Slika 7: Prikaz integrala z reagenti

1. Magnetni delci (2,3 mL): Magnetni delci prekriti z rekombinantno človeško tkivno transglutaminazo, dodani so še BSA, fosfatni pufrer, stabilizatorji in 0,01% natrijevega azida.
2. Kalibrator 1 (0,9mL): Človeški serum (plazma), ki vsebuje nizko koncentracijo rekombinantne človeške tkivne transglutaminaze razreda IgA, z dodatkov BSA, fosfatnega pufra, konzervansov in neaktivnega rumenega barvila.
3. Kalibrator 2 (3,2 mL): Človeški serum (plazma), ki vsebuje visoko koncentracijo rekombinantne človeške tkivne transglutaminaze razreda IgA, z dodatkom BSA, fosfatnega pufra, konzervansov in neaktivnega modrega barvila.
4. Prazna
5. Razredčevalno sredstvo (2x28 mL): Vsebuje BSA, fosfatni pufer, konzervanse in neaktivno rumeno barvilo.
6. Razredčevalno sredstvo (2x28 mL): Vsebuje BSA, fosfatni pufer, konzervanse in neaktivno rumeno barvilo.
7. Konjugat (23 mL): Mišja monoklonska protitelesa, na katerih je konjugiran izoluminolni derivat, dodani so še BSA, fosfatni pufer in konzervansi.

Reagente hranimo v hladilniku pri 2-8 °C. Integral z reagenti ima tesnilo, ki ga odstranimo po rahlem in previdnem vodoravnem stresanju. Odstranimo tesnila pri vsakem reagentu in zavrtimo kolesce na dnu posode z magnetnimi delci, dokler suspenzija ne postane rjave barve, posledično pride do raztopitve magnetih delcev. Integral z reagenti vstavimo v analizator in pustimo stati 30 min, da premeša in dokončno raztopi magnetne delce.

Ko odstranimo tesnilo, so reagenti uporabni štiri tedne v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C in zadostujejo za 100 vzorcev.

Ostali potrebni material:

- kontrola za oddano svetlobo LIAISON (319101)
- tekočina za izpiranje LIAISON (319100)
- »start« reagent LIAISON (319102)
- vreče za odpadke LIAISON (450003)
- negativna in pozitivna kontrola LIAISON (310321)
- komplet za čiščenje (310990)

3.2.2.3 POSTOPEK KEMILUMINISCENČNEGA TESTA

Z upoštevanjem navodil operaterja bomo dosegli pravilno delovanje testa. Za prepoznavanje vsebine v integralu so reagenti označeni s črtno kodo, ki jo analizator prepozna s pomočjo čitalnika za črtne kode. V primeru nepravilnega delovanja čitalnika, lahko podatke vnesemo ročno. Prve rezultate dobimo v 35 minutah.

Postopek kemiluminiscenčnega testa z analizatorjem:

1. Redčenje vzorcev in kontrol s pufrom (1:20)
2. Vstavitev kalibratorjev, vzorcev in kontrol
3. Dodajanje magnetnih delcev, prekritimi z rekombinantno človeško tkivno transglutaminazo (antigen)
4. Dodajanje razredčenega vzorca s preiskovanimi protitelesi
5. Inkubacija - 10 min (vezava preiskovanih protiteles iz vzorca ali kontrole na rekombinantno človeško tkivno transglutaminazo)
6. Spiranje nevezanih protiteles z izpiralnim pufrom
7. Dodajanje izoluminola, vezanega na mišja monoklonska protitelesa
8. Inkubacija -10 min (reakcija konjugata s protitelesi vezanimi na trdno fazo)
9. Spiranje nevezanih protiteles z izpiralnim pufrom
10. Dodatek vzpodbujevalnega »start« reagenta
11. Merjenje oddane svetlobe

Analizator LIAISON s pomočjo fotopomnoževalke izmeri jakost svetlobnega signala, ki je odvisen od količine konjugata izoluminol-protitelo in rezultate poda v relativnih svetlobnih enotah (RLU), te pa so sorazmerne s koncentracijo protiteles v kalibratorjih, vzorcih in kontrolah. Rezultate koncentracij poda v enotah/ mL (kU/mL).

Območje merjenja: 0,2-800 kU/ml tkivna transglutaminaza IgA

Vzorci, katerih koncentracija protiteles presega merilno območje analizatorja razredčimo s pomočjo funkcije »Dilute« (priporočljivo redčenje je 1:20). Za pridobitev pravilne končne vrednosti, analizator samodejno rezultat pomnoži s faktorjem redčenja. Razredčevalno sredstvo omogoča redčitev 25 vzorcev.

3.2.3 VREDNOTENJE REZULTATOV

Pražna vrednost razlikovanja med prisotnostjo in odsotnostjo tkivne transglutaminaze IgA je 8 kU/mL. Rezultate vzorcev interpretiramo:

Negativen rezultat: < 8 kU/mL

Pozitiven rezultat: > 8 kU/mL

Negativen rezultat nam pove, da v telesu niso prisotna protitelesa proti tkivni transglutaminazi, to je v primeru, ko ne gre za celiakijo, ali pa je celiakija prisotna, vendar je bolnik na brezglutenski dieti.

Pozitiven rezultat nam pove, da so v telesu prisotna protitelesa proti tkivni transglutaminazi, višja je vrednost rezultata, z večjo gotovostjo lahko potrdimo celiakijo.

DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Pri iskanju bolnikov s celiakijo ne želimo izpustiti kakšnega bolnika (občutljivost), za diagnozo celiakije pa potrebujemo potrditev (specifičnost).

Diagnostična občutljivost rezultata preiskave je verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah pri katerih je bolezen prisotna. Večja je občutljivost testa, manjše je število lažno negativnih rezultatov.

$$\text{OBČUTLJIVOST (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \times 100\%$$

Diagnostična specifičnost rezultata preiskave je verjetnost negativnega izida testa pri osebah, ki nimajo bolezni. Večja je specifičnost testa, manjše je število lažno pozitivnih rezultatov.

$$\text{SPECIFIČNOST (\%)} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100\%$$

4. REZULTATI

KATERE PODATKE SO VSEBOVALE KARTOTEKE PACIENTOV?

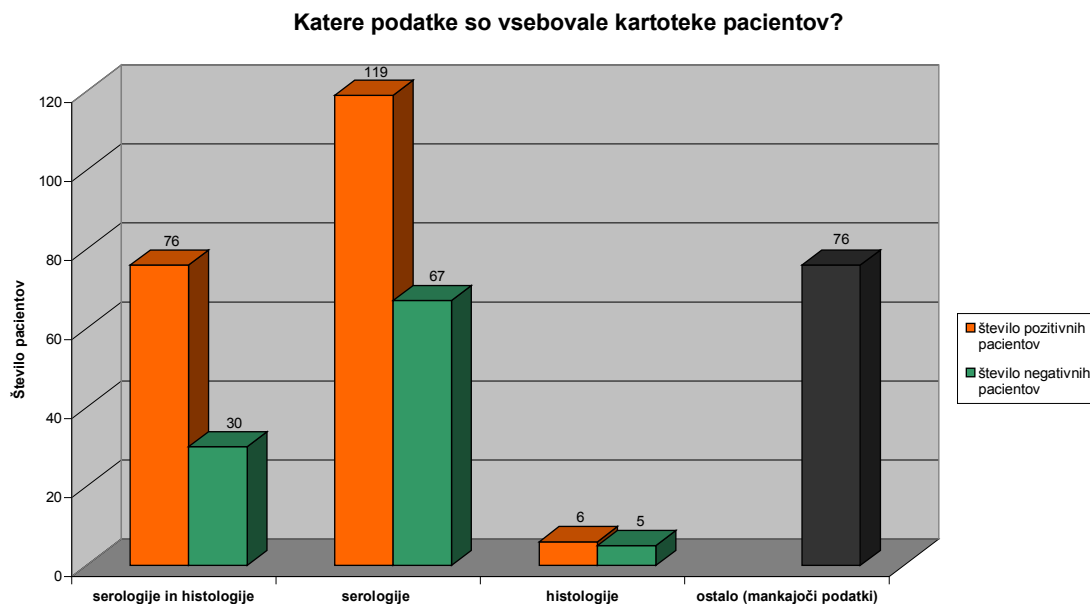
Značilne histološke spremembe sluznice in povišani serološki označevalci so glavna diagnostična merila za potrditev celiakije. V raziskavo smo vključili 379 kartotek pacientov, iz katerih smo si izpisali vrednosti seroloških označevalcev in histološko sliko tankega črevesa. Nekateri pacienti so imeli oba podatka, nekateri so imeli samo vrednosti seroloških označevalcev brez histološke slike ali ravno obratno, nekaj pa je bilo takih, ki niso imeli ne enega ne drugega podatka. Dobili smo naslednje podatke:

106 pacientov je imelo podane vrednosti serološkega testa in histološko sliko tankega črevesa. Od tega je imelo 76 bolnikov vidno histološko spremembo sluznice, značilno za celiakijo, pri ostalih 30 bolnikih pa histološke spremembe sluznice niso bile diagnostične za celiakijo, največkrat je bil vzrok gastritis.

Pri 186 pacientih so bili v kartotekah podani le rezultati seroloških testov, ni pa bilo podatkov o histoloških preiskavah. Od tega je bilo 119 bolnikov s potrjeno celiakijo, pri 67 pacientih pa so bili rezultati seroloških označevalcev negativni in celiakija je bila izključena.

Pri 11 pacientih so bili podani le podatki o histoloških preiskavah. Od tega je imelo 6 pacientov histološko spremembo sluznice, ocenjeno s klasifikacijo po Marshu, pri ostalih 5 pacientih pa ni šlo za celiakijo, ampak za gastritis.

73 kartotek pacientov ni vsebovalo nobenih podatkov o seroloških testih ali o histoloških preiskavah, zato smo jih izločili iz analize.

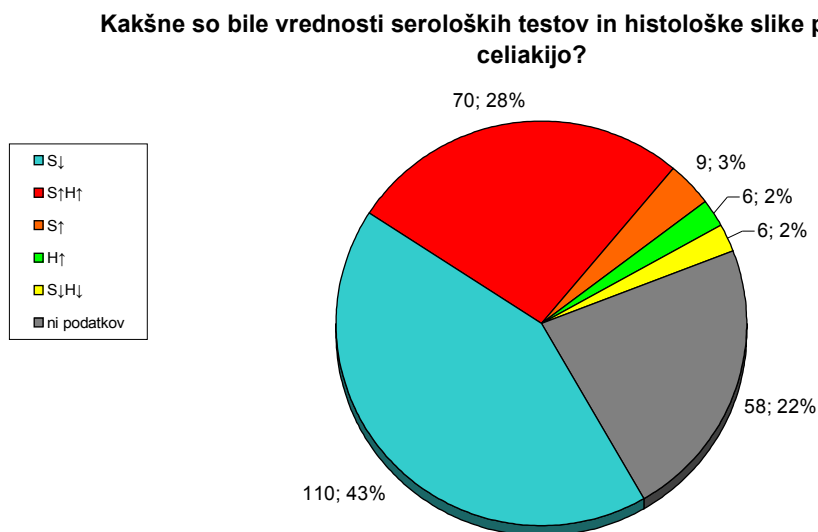


Graf 22: Prikazuje, katere podatke so vsebovale kartoteke pacientov.

KAKŠNE SO BILE VREDNOSTI SEROLOŠKIH TESTOV IN HISTOLOŠKE SLIKE PRI BOLNIKI S CELIAKIJO?

Še bolj natančno smo hoteli izvedeti, kakšne so bile vrednosti seroloških testov in histološke slike, ter naše delo nadaljevali s podatki iz zgornjega grafa, iz katerega smo uporabili samo bolnike s celiakijo.

Pri 259 bolnikih s celiakijo smo pogledali vrednosti seroloških označevalcev in histološke spremembe sluznice tankega črevesa. Podatke o histologiji in serologiji hkrati je imelo 76 bolnikov s celiakijo. Od tega je bilo 70 bolnikov s povišanimi vrednostmi seroloških označevalcev in histološko spremembo sluznice ocenjeno s klasifikacijo po Marshu, za kar desetino manjša skupina s 6 bolniki, pa je imela znižane vrednosti seroloških označevalcev in histološko spremembo sluznice ocenjeno s klasifikacijo po Marshu. Največja skupina s 110 bolniki s celiakijo, je imela v kartoteki samo podatke o vrednostih seroloških označevalcev, te so bile znižane. Ravno obratno je bilo pri 9 bolnikih s celiakijo, katerih vrednosti seroloških označevalcev so bile povišane. Histološko sliko ocenjeno s klasifikacijo po Marshu, je imelo 6 bolnikov. Zaradi manjkajočih podatkov smo spet izključiti 58 kartotek bolnikov s celiakijo.

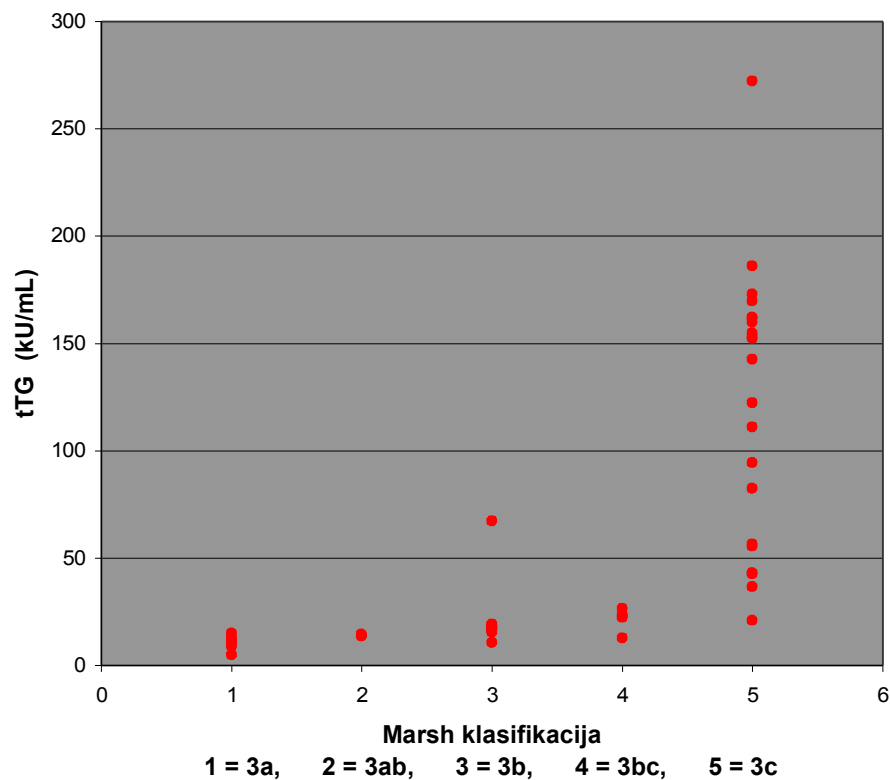


Graf 23: Prikazuje, kakšne so bile vrednosti seroloških testov in histološke slike pri bolnikih s celiakijo

VREDNOSTI tTG GLEDE NA KLASIFIKACIJO PO MARSHU

Glavni cilj diplomskega dela je ugotoviti, ali lahko opustimo biopsijo in potrdimo celiakijo zgolj na osnovi serološkega testa, predvsem na podlagi vrednosti tTG. Normalna vrednost tTG je pod 8 kU/mL. Iz kartotek smo poiskali bolnike s celiakijo, ki so imeli podatke o histološko spremenjeni sluznici tankega črevesa ocenjeni s klasifikacij po Marshu tipa 3. Za našo analizo je bilo ustreznih 57 bolnikov s celiakijo, ki smo jih razdelili v pet skupin. V prvo skupino smo dali 10 bolnikov z blago atrofijo resic (3a), njihova povprečna vrednost tTG je bila 10,61. 4 bolnike smo dali v drugo skupino (3ab) in izračunali, da je njihovo povprečje tTG znašalo 14,03. Subtotalna atrofija resic (3b) je bil kriterij za tretjo skupino, ki je ustrezal 17 bolnikom, rezultat povprečne vrednosti tTG pa je bil 19,95. Četrta skupina (3bc) je ustrezala 5 bolnikom, povprečna vrednost tTG je znašala 21,5. Za nas je bila zelo pomembna peta skupina, ki je imela 21 bolnikov s totalno atrofijo resic (3c), njihova povprečna vrednost tTG pa je znašala 118,32.

Vrednosti tTG glede na klasifikacijo po Marshu



Graf 24: Prikaz vrednosti tTG glede na histološke spremembe sluznice tankega črevesa ocenjene s klasifikacijo po Marshu.

5. RAZPRAVA

Celiakija je kronična bolezen sluznice tankega črevesja, ki se lahko pojavi v otroštvu ali pa se razvije šele pozneje v odrasli dobi. Zdravimo jo s pomočjo brezglutenske diete, ki jo mora bolnik upoštevati doživljenjsko.

Neupoštevanje brezglutenske diete se pokaže s spremenjeno klinično sliko, s povišanimi vrednostmi seroloških označevalcev, poveča se število IEL, lahko pa pozneje nastopi maligna alteracija raka, zato je potrebno brezglutensko dieto striktno upoštevati. Z upoštevanjem le te, se popravijo klinični znaki bolezni, sluznica tankega črevesa pa se povrne v normalno stanje. Povrnitev sluznice v normalno stanje traja nekaj mesecev, odvisno od stopnje okvare.

Pri odkrivanju celiakije je kot zlati standard še vedno veljala biopsija tankega črevesa, ki je za človeka zelo nelagodna, zato smo z našo raziskavo želeli ugotoviti, če lahko postavimo diagnozo za celiakijo tudi brez biopsije.

Za pomoč pri raziskavi smo pregledali 379 kartotek pacientov, ki so bili v letih 2000 do 2010 obravnavani na Gastroenterološki interni kliniki. Izmed vseh kartotek je bilo 259 (68%) bolnikov s potrjeno celiakijo, pri 120 (32%) pacientih pa ni šlo za celiakijo. 298 bolnikov je bilo ženskega spola 81 pa moškega. Od tega je imelo potrjeno celiakijo 207 žensk (torej kar 55%) in 52 moških (le 14%). V številnih člankih in literaturi lahko zasledimo, da se celiakija v večji meri pojavlja pri predstavnicah ženskega spola. Na podlagi naših rezultatov lahko tudi mi potrdimo to trditev.

Z grafom številka 2 smo želeli prikazati, katere podatke so večinoma, vsebovale kartoteke pacientov. Naredili smo štiri skupine in nato še vsako skupino razdelili na bolnike s celiakijo in bolnike brez celiakije.

Prva skupina s 106 pacienti je imela podane podatke o rezultatih seroloških testov in podatke o histološki sliki sluznice tankega črevesa. Od tega je imelo 76 bolnikov histološko spremembo sluznice ocenjeno s klasifikacijo po Marshu, 30 bolnikov pa ni imelo histološke slike, značilne za celiakijo, pač pa je šlo pri večini za vnetje želodčne sluznice, t.i. gastritis, ki je pogosto posledica okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*. Trije pacienti so imeli vnetje sluznice požiralnika oz t.i. refluksni ezofagitis.

V drugo skupino smo razvrstili paciente, ki so imeli v kartotekah le vrednosti seroloških označevalcev. Vsega skupaj je bilo 186 pacientov, od tega 119 bolnikov s potrjeno celiakijo, pri 67 pacientih pa so bile vrednosti seroloških označevalcev negativne in je bila celiakija izključena. Vrednosti seroloških označevalcev pri bolnikih s celiakijo so bile tako pozitivne kot tudi negativne. Pozitivne vrednosti so pri nekaterih veljale za potrditev diagnoze, pri tistih z že potrjeno diagnozo pa so kazale na dietne prekrške. Negativne vrednosti seroloških označevalcev so pomenile, da se bolnik strogo drži brezglutenske diete. Pacienti iz te skupine so imeli najverjetneje že nekoč v preteklosti narejeno biopsijo, zato v kartoteki ni histološke slike, ali pa so šele na začetku preiskave za postavitev diagnoze in bodo na endoskopijo še napoteni.

Tretja skupina z 11 pacienti je imela v kartotekah samo histološko sliko, ki je pri 5 bolnikih pokazala, da ne gre za celiakijo ampak za gastritis. Pri 6 bolnikih je bila histološka slika ocenjena s klasifikacijo po Marshu, od tega je bilo pri 4 bolnikih zabeleženo, da gre za totalno atrofijo resic.

Četrta skupina ni vsebovala podatkov o seroloških testih ali histološki sliki. Najbolj številčne so bile kartoteke bolnikov s celiakijo, v katerih je bilo v kontrolnem pregledu zapisano le, da gre za urejeno stanje.

Raziskavo o povezanosti med serološkimi označevalci in histologijo smo prikazali v grafu številka 3. Od vseh 379 kartotek pacientov smo za nadaljnjo raziskavo uporabili samo 259 kartotek; šlo je za bolnike s celiakijo. Te kartoteke smo morali spet razdeliti kakor na začetku, glede na preiskave, ki jih je opravil bolnik oz. glede na podatke, ki so jih vsebovale kartoteke. Največ bolnikov je imelo v izvidu samo vrednosti seroloških označevalcev; te vrednosti so bile pri 109 bolnikih znižane. V skoraj vseh primerih je torej šlo za kontrolne preglede. Izvidi so pokazali, da bolniki upoštevajo brezglutensko dieto. Na dietne prekrške je bilo opozorjenih 16 bolnikov s celiakijo, saj so imeli povišane vrednosti seroloških označevalcev. Možnosti, zakaj ne upoštevajo diete, je lahko več. Bolniki, predvsem tisti, ki so pred kratkim zboleli za celiakijo, morda še niso povsem seznanjeni s tem katera živila lahko zaužijejo in kaj vse spada pod dietno prehrano. Nekateri se ravno zaradi tega ne zavedajo, da delajo dietne prekrške. Med bolniki s celiakijo so tudi taki, ki se zavedajo dietnih prekrškov, morda pa se ne zavedajo dobro posledic, ki jih lahko prinese neupoštevanje brezglutenske diete. Histološko sliko sluznice tankega črevesa je imelo 6 bolnikov. Povezanost med serološkimi testi in histološko sliko pa smo lahko raziskali pri

bolnikov, ki so imeli v kartotekah podana oba rezultata. Pri 59 bolnikih s celiakijo smo opazili povišane rezultate seroloških označevalcev in spremenjeno sluznico tankega črevesa, iz česar je bila lahko postavljena potrditvena diagnoza za celiakijo. 11 bolnikov je imelo vrednosti seroloških označevalcev znižane ter spremembo sluznice ocenjeno s klasifikacijo po Marshu. Tak rezultat nam pove, da je bolnik začel z zdravljenjem z brezglutensko dieto. Koncentracija seroloških označevalcev po upoštevanju brezglutenske diete se hitreje zniža oz normalizira, sluznica tankega črevesa pa potrebuje več časa, da se povrne v normalno stanje.

Bolnike s celiakijo, ki so imeli podatke o vrednostih seroloških označevalcev in histološko sliko ocenjeno s klasifikacijo po Marshu, smo uporabili za odgovor na naše bistveno vprašanje raziskave: Ali lahko postavimo diagnozo celiakije le na podlagi seroloških označevalcev, predvsem določanja protiteles tkivne transglutaminaze?

V grafu številka 4 smo prikazali vrednosti protiteles tkivne transglutaminaze, glede na histološko sliko sluznice tankega črevesa, ocenjeno s klasifikacijo po Marshu. Klasifikacija po Marshu je razdeljena na 5 stopenj, ki se med seboj razlikujejo glede na stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa.

Kot že povedano je normalna vrednost tTG pod 8 kU/mL. Povprečna vrednost tTG pacientov iz prve in druge skupine je rahlo povišana glede na prazno vrednost (cut off). Iz grafa lahko razberemo, da gre za prenosorazmernost, večje so histološke spremembe črevesne sluznice tankega črevesa, višje so vrednosti tTG. V tretji in četrti skupini so vrednosti tTG približno 3-krat višje od prazne vrednosti, v peti skupini pa je povečana kvantitativna raven protiteles za kar 10-krat. Celiakijo potrdimo s tem večjo gotovostjo, čim večje je število enot (>100 enot), kadar rezultat serološkega testa pokaže visoke vrednosti seroloških označevalcev in še posebej, kadar je vrednost seroloških označevalcev 10- ali večkrat višja od prazne vrednosti.

Lahko bi torej naredili kompromis med histologijo in serologijo, kadar bi bile vrednosti tTG 10- ali večkrat povišane, biopsijo ne bi bila potrebna, pri manjših vrednostih tTG pa bi bila za postavitev diagnoze pri celiakiji biopsija še vedno potrebna.

6. SKLEP

- Za odločanje na osnovi seroloških parametrov so najboljši primeri:
 - visoke vrednosti seroloških označevalcev,
 - kadar je število enot čim večje (>100 enot),
 - kadar so vrednosti 10- ali večkrat povišane glede na prazno vrednost.
- Kljub dobri diagnostični specifičnosti in občutljivosti serološke preiskave, histološkega pregleda ne moremo popolnoma opustiti.
- Kompromis med histologijo in serologijo:
 - vrednosti tTG 10- ali večkrat povišane - biopsija ne bi bila potrebna,
 - manjše vrednostih tTG - biopsija bi bila potrebna.

7. LITERATURA

1. Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D; Novosti v diagnostiki celiakije; Srečanje pediatrov (20; 2010; Maribor); 97-101
2. Zabukovec M, Vidmar V, Mičetić-Turk D; Celiakija v severovzhodni Sloveniji v obdobju 1999-2009; Medicinski razgledi 2011; Letnik 50, Številka 2; 122-124
3. Walker-Smith JA GS, Schmerling DM, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Arch Dis Child 1990; 65:909- 11.
4. http://www.celiac-disease-consortium.nl/attachments/080_Mearin%20ESPGHAN%20CD%20WG%20voor%20CDC%20november%202010.pdf, dostop 21.11.2011
5. Tatjana B; Celiakija in brezglutenska prehrana: priročnik; Slovensko društvo za celiakijo; Ljubljana-Maribor; 1996; 8-9
6. Farré C, Arranz E; Celiac disease; Ergon; Madrid; 2008; 1-79
7. Arató A; Historical aspects of coeliac disease; International Coeliac Disease Meeting; Maribor; 2007; 31-35
8. Tušek Bunc K; Celiakija v ambulantni zdravniku družinske medicine; Celiakija- Glasilo Slovenskega društva za celiakijo; 2006: 5
9. Koning F; Toxicity of prolamins in coeliac disease; Coeliac Disease Meeting; Maribor; 2007; 49-54
10. Brencelj J, Sedmak M; Celiakija; Medicinski razgledi 2010; Letnik 49, Številka 4; 471-477

11. Ciril K; Izbrana poglavja iz pediatrije III; Celiakija, klinična genetika, otroška kardiologija. Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, Ljubljana 1993; 1 - 168.
(Rok Orel; Etiopatogeneza celiakije; 13-20)

12. Babič M, Colarič D, Eder K, Elbl T, Kompolšek T, Murko A, Špilak M; IZZIVI DRUŽINSKE MEDICINE; Učno gradivo – zbornik seminarjev študentov Medicinske fakultete Univerze v Mariboru 4. letnik 2007/2008
Maribor, 2007; 53-61
Kotnik B, Kramar U: Celiakija

13. http://www.schaer.com/smartedit/documents/download/AZ_SLO.pdf, dostop 13.10.2011

14. Troncone R, Borrelli M; The clinical spectrum of coeliac disease; International Coeliac Disease Meeting; Maribor; 2007; 89-94

15. Mäki M, Collin P, Visakorpi J.K.; Coeliac Disease; Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease, 1996, Finland; Lancet 1997
(J.K.Visakorpi; Changing Features of Coeliac Disease; 1-6)

16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803427>, dostop 13.10.2011

17. <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1592>, dostop 13.10.2011

18. Kocjančič A, Mrevlje F; Interna medicina; EWO d.o.o.; Ljubljana, 1998; 390

19. Collin P. Risk groups of coeliac disease. International Coeliac disease meeting; 13-16 september 2007; Maribor, UKC Maribor, 2007

20. Gangl L. Celiakija in pridružene bolezni. Celiakija danes, zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji; 2002 maj; Maribor, Slovenija. Maribor: Slovensko društvo za celiakijo; 2005

21. <http://www.mojdoktor.hr/UserFiles/157-161.pdf>, dostop 13.10.2011
22. Saavalainen P (Holopainen); Genetics of coeliac disease; International Coeliac Disease Meeting; Maribor; 2007; 61-65
23. Sollid ML, Lie AB. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. Clin Gastroenterol Hepatol. 2005; 3 (9): 843-51
24. Mäki M, Collin P, Visakorpi J.K.; Coeliac Disease; Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease, 1996, Finland Lancet 1997 (Sollid ML, Lundin KEA, Sjöström H, Molberg Ø, Thorsby E; HLA-DQ Molecules, Peptides and T Cells in Coeliac Disease; 265-272)
25. Kolarič B; HLA kompleks; Medicinski Mesečnik, Junij-September 2008, Letnik 4, Št. 6-9; 196-201
26. Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D; Sodobni Principi Diagnostike Celiakije; zdravstveni vestnik, 2006; 75: II-89–97
27. Kotnik V, Imunološki priročnik; Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 2010; 73-82
28. Sollid ML; Immunology of Coeliac Disease; International Coeliac Disease Meeting; Maribor; 2007; 55-58
29. Mäki M, Collin P, Visakorpi J.K.; Coeliac Disease; Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease, 1996, Finland; Lancet 1997 (Ferguson A, Arranz E, Kingstone K, Gillett H; Oral tolerance, Immune Expression and Enteropathy: relevance to Potential, Latent and Silent Coeliac Disease; 53-58)
30. Mäki M, Collin P, Visakorpi J.K.; Coeliac Disease; Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease, 1996, Finland; Lancet 1997 (Savilahti E; Immunohistochemical Markers of Latent Coeliac Disease; 140-151)

PRILOGA

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	SPOL	ČAS TEŽAV (starost)	EMA	tTG	HISTOLOGIJA	DIAGNOZA
1	ž	21	poz	poz	Marsh 3c	celiakija
2	ž	42	poz	poz	Marsh 3b	celiakija
3	ž	21	poz	poz	Marsh 3b	celiakija
4	ž	82	poz	poz		celiakija
5	ž	37	poz	poz		celiakija
6	ž	28	poz	poz		celiakija
7	m	25	poz	poz		celiakija
8	m	24	poz	poz		celiakija
9	ž	30	poz	poz	Marsh 3b do 3c	celiakija
10	ž	24	poz	poz	Marsh 3b	celiakija
11	ž	42	poz	>17	Marsh 3b do 3c	celiakija
12	ž	31	poz	>17	Marsh 3a	celiakija
13	ž	60	poz	>17	Marsh 3b	celiakija
14	m	27	poz	>17	Marsh 3b	celiakija
15	ž	49	poz	272,2	Marsh 3c	celiakija
16	ž	31	poz	186,1	Marsh 3c	celiakija
17	ž	43	poz	173	Marsh 3c	celiakija
18	ž	60	poz	169,8	Marsh 3c	celiakija
19	ž	19	poz	162	Marsh 3c	celiakija
20	m	30	poz	161,8	Marsh 3c	celiakija
21	ž	36	poz	159,8	Marsh 3c	celiakija
22	ž	36	poz	154,7	Marsh 3c	celiakija
23	ž	51	poz	152,9	Marsh 3c	celiakija
24	ž	46	poz	152,2	Marsh 3c	celiakija
25	m	20	poz	142,6	Marsh 3c	celiakija
26	ž	57	poz	122,2	Marsh 3c	celiakija
27	ž	67	poz	110,9	Marsh 3b	celiakija
28	ž	22	poz	94,5	Marsh 3c	celiakija
29	ž	25	poz	82,4		celiakija
30	ž	28	poz	67,2	Marsh 3b	celiakija
31	ž	41	poz	56,4	Marsh 3c	celiakija
32	m	22	poz	55,6	Marsh 3c	celiakija
33	ž	23	poz	55,6	Marsh 3c	celiakija
34	ž	18	poz	43,1	Marsh 3c	celiakija
35	ž	33	poz	42,7	Marsh 3c	celiakija
36	ž	60	poz	36,6	Marsh 3c	celiakija
37	ž	39	poz	26,5	Marsh 3b do 3c	celiakija
38	m	30	poz	23,6	Marsh 3b do 3c	celiakija
39	ž	41	poz	22,5	Marsh 3b do 3c	celiakija
40	ž	32	poz	22,3	Marsh 3b do 3c	celiakija
41	ž	32	poz	20,9	Marsh 3c	celiakija
42	ž	28	poz	19,2	Marsh 3b	celiakija
43	m	62	poz	19,2	Marsh 3b	celiakija
44	ž	40	poz	18,8	Marsh 3b	celiakija
45	ž	75	poz	18,4	Marsh 3b	celiakija
46	m	40	poz	17,9	Marsh 3b	celiakija
47	ž	28	poz	17,9	Marsh 3b	celiakija

48	ž	39	poz	17,8	Marsh 3b	celiakija
49	ž	33	poz	17,5	Marsh 3b	celiakija
50	ž	46	poz	17,4	Marsh 3b	celiakija
51	ž	53	poz	17,1	Marsh 3b	celiakija
52	m	20	poz	16,9	Marsh 3b	celiakija
53	ž	39	poz	16,8	Marsh 3b	celiakija
54	ž	43	poz	16,8	Marsh 3b	celiakija
55	ž	25	poz	16,1	Marsh 3b	celiakija
56	m	62	poz	15,4	Marsh 3b	celiakija
57	m	15	poz	15	Marsh 3a	celiakija
58	m	46	poz	14,5	Marsh 3a do 3b	celiakija
59	m	41	poz	14,1	Marsh 3a do 3b	celiakija
60	ž	20	poz	13,9	Marsh 3a do 3b	celiakija
61	ž	46	poz	13,6	Marsh 3a do 3b	celiakija
62	ž	23	poz	12,7	Marsh 3a	celiakija
63	ž	41	poz	12,7	Marsh 3a	celiakija
64	ž	34	poz	12,6	Marsh 3b do 3c	celiakija
65	ž	34	poz	11,9	Marsh 3a	celiakija
66	m	21	poz	11,2	Marsh 3a	celiakija
67	m	19	poz	10,6	Marsh 3a	celiakija
68	ž	47	poz	10,5	Marsh 3b	celiakija
69	ž	29	poz	10,4	Marsh 3a	celiakija
70	ž	30	neg	10,3	Marsh 3a	celiakija
71	m	27	poz	10,3		celiakija
72	ž	19	neg	9,9		celiakija
73	ž	19		8,8		celiakija
74	ž	23	poz	8,8	Marsh 3a	celiakija
75	ž	35	neg	8,5	Marsh 3b do 3c	celiakija
76	ž	28	neg	8,5		celiakija
77	ž	37	poz	7,9		celiakija
78	ž	48	poz	7,5		celiakija
79	ž	53	neg	7,1		celiakija
80	m	55	poz	6,9		celiakija
81	ž	25	poz	6,8		celiakija
82	ž	66	poz	6,8	Marsh 3c	celiakija
83	ž	21	neg	6,6		celiakija
84	ž	30	neg	6,5		celiakija
85	ž	23		6		celiakija
86	ž	37	poz	5,3		celiakija
87	ž	19	neg	5,3		celiakija
88	ž	21	neg	4,9	Marsh 3a	celiakija
89	ž	19	neg	4,7		celiakija
90	m	19		4,7		celiakija
91	ž	29	neg	4,7		celiakija
92	ž	34	neg	4,6	Marsh 3b	celiakija
93	ž	60		4,2		celiakija
94	ž	43		4,2	Marsh 3c	celiakija
95	m	20	neg	3,9		celiakija
96	m	22	neg	3,6		celiakija
97	ž	16	neg	3,6		celiakija
98	m	20	neg	3,6		celiakija
99	ž	51	neg	3,5		celiakija
100	ž	37	neg	3,3	Marsh 3b	celiakija

101	ž	24	neg	3,1		celiakija
102	ž	19	neg	3,1	Marsh 3b	celiakija
103	ž	70	neg	3		celiakija
104	ž	19	neg	2,9		celiakija
105	ž	48	neg	2,8		celiakija
106	ž	31		2,8		celiakija
107	m	26	neg	2,8		celiakija
108	ž	20	neg	2,7		celiakija
109	ž	39	neg	2,6		celiakija
110	ž	33	neg	2,5		celiakija
111	ž	68	neg	2,5		celiakija
112	ž	40	neg	2,5		celiakija
113	ž	34	neg	2,5		celiakija
114	ž	50		2,4		celiakija
115	ž	19	neg	2,3		celiakija
116	ž	24	neg	2,2		celiakija
117	m	23	neg	2,2		celiakija
118	ž	72	neg	2,1		celiakija
119	ž	19	neg	2		celiakija
120	m	26	neg	2		celiakija
121	ž	47	neg	2		celiakija
122	ž	42	neg	2		celiakija
123	ž	34	neg	1,9		celiakija
124	ž	39	neg	1,9		celiakija
125	m	21	neg	1,8		celiakija
126	ž	20	neg	1,8		celiakija
127	m	44	neg	1,7		celiakija
128	m	25		1,6		celiakija
129	ž	61	neg	1,5		celiakija
130	ž	40	neg	1,4		celiakija
131	ž	30		1,4		celiakija
132	ž	23	neg	1,3		celiakija
133	m	31	neg	1,3		celiakija
134	ž	46	neg	1,2		celiakija
135	ž	25	neg	1,1		celiakija
136	ž	27	neg	1,1		celiakija
137	m	31	neg	1		celiakija
138	ž	57	neg	1		celiakija
139	ž	22	neg	0,8		celiakija
140	ž	34	neg	0,8		celiakija
141	m	20	neg	0,8		celiakija
142	ž	18	neg	0,68		celiakija
143	ž	48		0,5		celiakija
144	ž	44	neg	0,4		celiakija
145	ž	24	neg	0,4		celiakija
146	m	24		0,3		celiakija
147	ž	20	neg	0,1		celiakija
148	ž	29	neg	0,1		celiakija
149	ž	49	neg	neg		celiakija
150	ž	50	neg	neg		celiakija
151	ž	17	neg	neg		celiakija
152	ž	37	neg	neg		celiakija
153	ž	57	neg	neg		celiakija

154	ž	24	neg	neg		celiakija
155	ž	22	neg	neg		celiakija
156	ž	34	neg	neg		celiakija
157	ž	38	neg	neg		celiakija
158	m	19	neg	neg		celiakija
159	m	37	neg	neg		celiakija
160	ž	28	neg	neg		celiakija
161	ž	34	neg	neg		celiakija
162	ž	53	neg	neg		celiakija
163	ž	41	neg	neg		celiakija
164	ž	42	neg	neg		celiakija
165	ž	64	neg	neg		celiakija
166	ž	44	neg	neg		celiakija
167	ž	25	neg	neg		celiakija
168	ž	44	neg	neg		celiakija
169	ž	21	neg	neg		celiakija
170	ž	21	neg	neg		celiakija
171	ž	34	neg	neg	Marsh 3b	celiakija
172	ž	26	neg	neg		celiakija
173	ž	35	neg	neg	Marsh 3c	celiakija
174	m	20	neg	neg		celiakija
175	m	35	neg	neg		celiakija
176	ž	50	neg	neg		celiakija
177	m	23	neg	neg		celiakija
178	ž	48	neg	neg		celiakija
179	ž	22	neg	neg		celiakija
180	m	47	neg	neg		celiakija
181	ž	19	neg	neg		celiakija
182	ž	18	neg	neg		celiakija
183	ž	31	poz		Marsh 3c	celiakija
184	ž	26	poz			celiakija
185	ž	29	poz			celiakija
186	ž	45	poz			celiakija
187	ž	75	poz			celiakija
188	ž	55	neg		Marsh 3b do 3c	celiakija
189	ž	22	neg			celiakija
190	ž	30	neg			celiakija
191	m	21	neg			celiakija
192	ž	22	neg			celiakija
193	ž	51	neg			celiakija
194	ž	58	neg			celiakija
195	m	17	neg			celiakija
196	m	35			Marsh 3c	celiakija
197	ž	28			Marsh 3c	celiakija
198	m	31			Marsh 3c	celiakija
199	ž	53			Marsh 3c	celiakija
200	ž	46			Marsh 3b do 3c	celiakija
201	ž	67			Marsh 3b	celiakija
202	ž	24				celiakija
203	ž	33				celiakija
204	ž	33				celiakija
205	m	40				celiakija
206	ž	43				celiakija

207	ž	40				celiakija
208	ž	30				celiakija
209	ž	19				celiakija
210	ž	20				celiakija
211	ž	69				celiakija
212	ž	75				celiakija
213	m	65				celiakija
214	ž	52				celiakija
215	ž	65				celiakija
216	m	32				celiakija
217	ž	21				celiakija
218	ž	45				celiakija
219	ž	56				celiakija
220	ž	47				celiakija
221	ž	39				celiakija
222	ž	59				celiakija
223	ž	41				celiakija
224	ž	25				celiakija
225	ž	28				celiakija
226	m	47				celiakija
227	m	19				celiakija
228	ž	23				celiakija
229	ž	21				celiakija
230	ž	27				celiakija
231	ž	17				celiakija
232	ž	21				celiakija
233	ž	39				celiakija
234	ž	27				celiakija
235	ž	21				celiakija
236	ž	39				celiakija
237	ž	60				celiakija
238	ž	57				celiakija
239	m	25				celiakija
240	ž	31				celiakija
241	m	54				celiakija
242	ž	38				celiakija
243	ž	21				celiakija
244	m	17				celiakija
245	ž	36				celiakija
246	ž	24				celiakija
247	ž	28				celiakija
248	ž	22				celiakija
249	ž	22				celiakija
250	ž	27				celiakija
251	ž	28				celiakija
252	ž	54				celiakija
253	ž	64				celiakija
254	m	46				celiakija
255	ž	57				celiakija
256	m	19				celiakija
257	ž	36				celiakija
258	ž	29				celiakija
259	ž	47				celiakija

260	m	36	neg	2,3	refluksni ezofagitis	
261	ž	25	neg	1,7	refluksni ezofagitis	
262	ž	31	neg	1	refluksni ezofagitis	
263	ž	48	neg	1,8	okužba s H. pylori	
264	ž	50	neg	1,5	hiperplastični polipi	
265	ž	61	neg	5,6	hiatalna kita	
266	ž	49	neg	neg	gastritis	
267	ž	48	neg	neg	gastritis	
268	ž	43	neg	neg	gastritis	
269	m	43	neg	neg	gastritis	
270	m	29	neg	neg	gastritis	
271	ž	32	neg	neg	gastritis	
272	ž	50	neg	neg	gastritis	
273	ž	22	neg	neg	gastritis	
274	ž	32	neg	neg	gastritis	
275	ž	45	neg	neg	gastritis	
276	ž	32	neg	neg	gastritis	
277	m	30	neg	neg	gastritis	
278	m	44	neg	4,9	gastritis	
279	ž	54	neg	2,3	gastritis	
280	ž	58	neg	2,1	gastritis	
281	ž	32	neg	1,9	gastritis	
282	ž	26	neg	1,8	gastritis	
283	ž	40	neg	1,4	gastritis	
284	ž	39		0,7	gastritis	
285	m	31		0,6	gastritis	
286	ž	21			gastritis	
287	ž	53	neg		gastritis	
288	m	27			gastritis	
289	m	39			gastritis	
290	m	39			gastritis	
291	ž	33			gastritis	
292	ž	24	neg	12,3	duodenitis	potreben ponovni pregled
293	m	39	neg	neg	bulbitis	
294	ž	50	neg	2,3	bulbitis	disaharidazo intoleranco
295	ž	39	neg	neg		
296	ž	28	neg	neg		
297	ž	43	neg	neg		
298	ž	81	neg	neg		
299	m	55	neg	neg		
300	ž	28	neg	neg		
301	ž	36	neg	neg		
302	ž	64	neg	neg		laktozna intoleranca
303	ž	47	neg	neg		
304	ž	51	neg	neg		
305	ž	50	neg	neg		
306	ž	63	neg	neg		
307	m	37	neg	neg		
308	ž	35	neg	neg		
309	m	22	neg	neg		

310	ž	23	neg	neg		
311	ž	29	neg	neg		
312	m	18	neg	neg		
313	ž	23	neg	neg		laktozna intoleranca
314	ž	46	neg	6,4		
315	ž	20	neg	5,3		
316	ž	33	neg	4,8		
317	m	22	neg	4,4		
318	ž	49	neg	3,8		
319	ž	39	neg	3,7		
320	m	26	neg	3,3		
321	ž	51		3,2		
322	m	41		2,9		
323	m	24	neg	2,8		
324	ž	26	neg	2,8		
325	ž	59	neg	2,8		
326	ž	37	neg	2,7		
327	m	39		2,7		
328	ž	63	neg	2,5		
329	ž	17	neg	2,3		
330	m	32	neg	2,2		
331	ž	28	neg	2,1		
332	ž	37	neg	1,8		
333	ž	27	neg	1,7		
334	ž	65	neg	1,6		
335	ž	21	neg	1,6		
336	ž	21	neg	1,6		
337	ž	35	neg	1,6		
338	ž	39	neg	1,5		
339	ž	24		1,5		
340	ž	21	neg	1,3		
341	ž	43	neg	1,1		
342	m	55		1		
343	ž	24	neg	1		
344	ž	23	neg	0,9		
345	ž	41	neg	0,9		
346	ž	41	neg	0,8		
347	ž	27	neg	0,8		
348	ž	37	neg	0,7		
349	ž	24	neg	0,7		
350	ž	21	neg	0,7		
351	ž	23	neg	0,6		
352	ž	38	neg	0,5		
353	m	37	neg	0,4		
354	ž	39	neg	0,4		
355	ž	43	neg			
356	m	31	neg			
357	ž	27	neg			
358	m	27	neg			
359	ž	6	neg			
360	m	43	neg			
361	ž	31	neg			
362	ž	73				

363	ž	27				
364	ž	30				
365	ž	30				
366	ž	39				
367	ž	30				
368	ž	43				
369	ž	43				
370	ž	29				
371	m	41				
372	m	36				
373	m	19				
374	m	65				
375	ž	27				
376	ž	31				
377	ž	65				
378	ž	54				
379	ž	30				