

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
DRUGOSTOPENJSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

MATEJA SVETEJ

**PRIMERJAVA REZULTATOV DOLOČITVE ANTIGLIADINSKIH
PROTITELES IN PROTITELES PROTI TKIVNI
TRANSGLUTAMINAZI Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO IN
METODO MULTIPLEKS V DIAGNOSTIKI CELIAKIJE**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
DRUGOSTOPENJSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

MATEJA SVETEJ

**PRIMERJAVA REZULTATOV DOLOČITVE ANTIGLIADINSKIH
PROTITELES IN PROTITELES PROTI TKIVNI
TRANSGLUTAMINAZI Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO IN
METODO MULTIPLEKS V DIAGNOSTIKI CELIAKIJE**

**COMPARISON OF THE RESULTS OF ANTIGLIADIN ANTIBODIES
AND ANTIBODIES AGAINST TISSUE TRANSGLUTAMINASE
DETERMINED BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
AND MULTIPLEX METHOD IN THE CELIAC DISEASE
DIAGNOSTICS**

Ljubljana, 2012

Magistrsko nalogo sem opravljala na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko v UKC Maribor, v imunološkem laboratoriju.

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Božiču, da me je sprejel pod svoje mentorstvo ter za njegove strokovne in koristne nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Posebna zahvala gre somentorici mag. Evgeniji Homšak, da mi je omogočila izvedbo magistrske naloge v laboratoriju ter za nudenje strokovne pomoči pri nastajanju in izdelavi le-te. Največja zahvala pa gre moji družini, ki me je tekom študija podpirala in verjela vame ter mi omogočila, da sem smela biti spet študentka.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, spec. medicinske biokemije in somentorstvom asist., mag. Evgenije Homšak, spec. medicinske biokemije.

Podpis

Ljubljana, 2011

Predsednik diplomske komisije: prof.dr. Joško Osredkar, spec. medicinske biokemije

Mentor: prof. dr. Borut Božič, spec. medicinske biokemije

Somentorica: asist. mag. Evgenija Homšak, spec. medicinske biokemije

Član diplomske komisije: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farmacije

KAZALO

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
SEZNAM SLIK	VI
SEZNAM PREGLEDNIC	VII
1. UVOD	1
1.1. POGOSTOST	2
1.2. ETIOPATOGENEZA	3
1.3. KLINIČNA SLIKA IN POJAVNE OBLIKE CELIAKIJE	5
1.4. DIAGNOSTIKA CELIAKIJE	7
1.4.1. BIOPSIJA SLUZNICE TANKEGA ČREVESA	8
1.4.2. SEROLOŠKI OZNAČEVALCI CELIAKIJE	8
1.4.3. CELOKUPNI IMUNOGLOBULINI RAZREDA A	9
1.4.4. GENETSKE PREISKAVE	9
1.5. ZDRAVLJENJE CELIAKIJE	9
1.6. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA PROTITELES V SERUMU	9
1.6.1. Endomizijska protitelesa - EMA	10
1.6.2. Antigliadinska protitelesa - AGA	10
1.6.3. Protitelesa proti tkivni transglutaminazi - tTG	11
1.7. DOLOČANJE PROTITELES: PRINCIPI DOLOČANJA	11
1.7.1. ENCIMSKO IMUNSKI TEST NA TRDNEM NOSILCU – ELISA (ang.: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)	11
1.7.2. PRINCIP MULTIPLEKS METODE / X MAP TEHNOLOGIJA	12
1.7.3. TEST INDIREKTNE IMUNOFLUORESCENCE	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. VZORCI	16
3.2. OPREMA IN MATERIALI	16
3.2.1. Komplet reagentov α - Gliatest [®] S IgA in α - Gliatest [®] S IgG (Eurospital, Trst, Italija)	17
3.2.2. Komplet reagentov Eu-tTG [®] IgA umana (Eurospital, Trst, Italija)	17

3.2.3.	Kompleta reagentov Athena Multi-Lyte [®] Celiac IgA Plus Assay in Athena Multi-Lyte [®] Celiac IgG Plus Assay (Zeus Scientific, Raritan, Amerika) ..	17
3.2.4.	Komplet reagentov Antiendomysium [®] (Eurospital, Trst, Italija)	18
3.3.	METODE DOLOČANJA	18
3.3.1.	ELISA za določitev AGA razreda IgA in IgG ter anti-tTG razreda IgA...	18
3.3.2.	Multipleks metoda za določitev AGA razreda IgA in IgG ter anti-tTG razreda IgA	19
3.3.3.	Indirektna imunofluorescenca za določitev anti-endomizijskih protiteles	21
3.4.	STATISTIČNE METODE	21
4.	REZULTATI	23
4.1.	REZULTATI DOLOČITVE AGA (IgA, IgG)	23
4.1.1.	Prisotnost AGA glede na razrede Ig pri različnih metodah določanja.....	23
4.1.2.	Prisotnost AGA pri bolnikih s celiakijo in pri preiskovancih brez celiakije..	24
4.2.	REZULTATI DOLOČITVE PROTITELES PROTI TKIVNI TRANSGLUTAMINAZI.....	25
4.2.1.	Prisotnost protiteles proti tTG glede na metodo določanja.....	25
4.2.2.	Prisotnost protiteles proti tTG-IgA pri bolnikih s celiakijo in pri preiskovancih brez celiakije	25
4.3.	REZULTATI DOLOČITVE EMA PRI BOLNIKI S CELIAKIJ O IN PRI PREISKOVANCIH BREZ CELIAKIJ E	26
4.4.	REZULTATI UJEMANJA DOLOČITVE AGA IN ANTI-tTG Z EMA GLEDE NA UPORABLJENO METODO	27
4.5.	DIAGNOSTIČNA VREDNOST POSAMEZNIH PROTITELES NA OSNOVI DOBLJENIH REZULTATOV	29
4.5.1.	Diagnostična vrednost AGA-IgA	29
4.5.2.	Diagnostična vrednost AGA-IgG	30
4.5.3.	Diagnostična vrednost anti-tTG-IgA	31
4.5.4.	Diagnostična vrednost EMA.....	33
4.6.	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	35
5.	RAZPRAVA.....	38
6.	SKLEPI.....	44
7.	LITERATURA	45

POVZETEK

Celiakija je ena najpogostejših kroničnih bolezni prebavil in nastane kot posledica uživanja glutena pri genetsko predisponiranih osebah. Prekomeren imunski odziv na gluten povzroči značilne histološke spremembe tankega črevesa in nastanek specifičnih protiteles, ki jih lahko dokažemo v serumu bolnika.

Namen dela je bil primerjati rezultate določitve antigliadinskih protiteles in protiteles proti tkivni transglutaminazi v rutinski diagnostiki uveljavljene ELISA metode z novejšo multipleks metodo. Testirali smo 79 vzorcev, od tega je bilo 47 serumov preiskovancev s celiakijo ter 32 serumov preiskovancev brez prisotne celiakije. Metodi sta primerljivi, saj so se rezultati testiranja zelo dobro ujemale, predvsem pri AGA IgA testu (93%), ter pri anti-tTG (95%). Pri AGA IgG testu je ujemanje malo slabše (79%). Vse rezultate smo tudi primerjali z EMA testom, ki velja za zlati serološki standard v diagnostiki celiakije. Zelo dobro ujemanje z EMA zasledimo pri anti-tTG testih, kjer smo dobili pri ELISA metodi 95% ujemanje in pri multipleks metodi 97% ujemanje. AGA testi so pokazali slabo ujemanje z EMA (AGA IgA ELISA 49%, AGA IgA multipleks 55%, AGA IgG ELISA 57%, AGA IgG multipleks 67%).

Rezultati so pokazali, da so serološki označevalci AGA in tTG, če jih določamo z novejšo multipleks metodo, diagnostično občutljivejši in bolj diagnostično specifični ter s tem bolj učinkoviti pri odkrivanju celiakije kot pa označevalci, določeni z ELISA.

ABSTRACT

Celiac disease is one of the most common chronic gastrointestinal disorders. It is triggered by gluten consumption in genetically predisposed individuals. Excessive immune response to gluten causes characteristic histological changes in the small intestine and formation of specific antibodies which can be detected in patient serum.

The purpose of this work was to compare the results of antigliadin antibodies (AGA) and antibodies against tissue transglutaminase (anti-tTG) determined by the established ELISA method with the newer multiplex method. We tested 79 serum samples, 47 belonging to patients with confirmed celiac disease and 32 to gastrointestinal patient without celiac disease. According to the results we found that the methods are comparable. Especially good comparability was found in the AGA IgA test (93%) and the anti-tTG test (95%). Poor correlation was observed in the AGA IgG test (79%). All results were also compared with EMA test, which is considered to be the gold standard in the serological diagnosis of celiac disease. Very good agreement with the EMA can be observed for the anti-tTG tests (95% and 97% for ELISA and multiplex method, respectively). AGA tests showed poor correlation with EMA (AGA IgA ELISA 49%, AGA IgA multiplex 55%, AGA IgG ELISA 57%, AGA IgG multiplex 67%).

The results showed that the serological markers AGA and tTG have higher sensitivity and specificity, if they are determined with the newer multiplex method and are thus more effective in detecting celiac disease.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ag	antigen
ALT	alanin-aminotransferaza
AST	aspartat-aminotransferaza
AGA	antigliadinska protitelesa
AGA-IgA	antigliadinska protitelesa razreda A
AGA-IgG	antigliadinska protitelesa razreda G
ELISA	encimsko imunska metoda (ang.: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EMA	antiendomizijska protitelesa
ESPGHAN	Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano
HLA	humani levkocitni antigen
IFN gama	interferon gama
IIF	indirektna imunofluorescenca
IgA	imunoglobulini razreda A
IgG	imunoglobulini razreda G
IL-15	interlevkin 15
KVČB	kronična vnetno črevesna bolezen
MICA	molekula HLA razreda I
MMP-1	matriks metoproteinaza 1
MMP-3	matriks metoproteinaza 3
NASPHGAN	Ameriško združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in

prehrano (*North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*)

NKG2D	receptor izražen na T celicah, celicah ubijalkah (NK) in makrofagih
Pt	protitelo
ROC krivulja	krivulja občutljivosti in specifičnosti (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
TNF alfa	tumor nekrotizirajoči faktor (ang.: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
tTG	tkivna transglutaminaza

SEZNAM SLIK

Slika 1: Prikaz imunskega mehanizma pri celiakiji

Slika 2: Prikaz normalne in atrofirane sluznice črevesja

Slika 3 : Pojavnost celiakije

Slika 4: Prikaz obarvanih polistirenskih kroglic pri multipleks metodi

Slika 5: Prikaz merjenja polistirenskih kroglic z laserji

Slika 6: Princip indirektne imunofluorescence

Slika 7: Prikaz pozitivnega in negativnega rezultata EMA z metodo IIF

Slika 8: Prisotnost AGA glede na razrede Ig pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

Slika 9: Prisotnost AGA pri preiskovancih s celiakijo in brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

Slika 10: Prisotnost Pt proti tTG-IgA pri preiskovancih s celiakijo in brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

Slika 11: Prikaz diagnostičnih vrednosti AGA-IgA glede na metodo

Slika 12: Prikaz diagnostičnih vrednosti AGA-IgG glede na metodo

Slika 13: Prikaz diagnostičnih vrednosti anti-tTG-IgA glede na metodo

Slika 14: Prikaz diagnostične vrednosti EMA

Slika 15: Prikaz diagnostičnih vrednosti seroloških označevalcev glede na metodo

Slika 16: ROC krivulje za AGA-IgA, AGA-IgG ter EMA

Slika 17: ROC krivulje za anti-tTG-IgA ter EMA

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz referenčnih vrednosti za AGA-IgA in AGA-IgG ter anti-tTG-IgA proizvajalca Eurospital

Preglednica II: Shema pipetiranja pri multipleks metodi

Preglednica III: Referenčne vrednosti pri multipleks metodi proizvajalca Zeus Scientific

Preglednica IV: Primerjava metod glede na prisotnost AGA v vzorcu

Preglednica V: Prisotnost AGA pri preiskovancih s celiakijo in brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

Preglednica VI: Primerjava metod glede na prisotnost Pt proti tTG v vzorcu

Preglednica VII: Prisotnost Pt proti tTG pri preiskovancih s celiakijo in brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

Preglednica VIII: Rezultati določitve EMA pri bolnikih s celiakijo in pri preiskovancih brez celiakije

Preglednica IX: Rezultati ujemanja določitve AGA in anti-tTG z EMA glede na uporabljeno metodo

Preglednica X: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje AGA-IgA

Preglednica XI: Diagnostična vrednost AGA-IgA glede na metodo

Preglednica XII: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje AGA-IgG

Preglednica XIII: Diagnostična vrednost AGA-IgG glede na metodo

Preglednica XIV: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje anti-tTG-IgA
glede na metodo

Preglednica XV: Diagnostična vrednost anti-tTG-IgA glede na metodo

Preglednica XVI: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje EMA

Preglednica XVII: Diagnostična vrednost EMA

Preglednica XVIII: Diagnostična vrednost posameznih protiteles glede na uporabljeno
metodo

Preglednica XIX: Površine pod ROC krivuljo za posamezne serološke označevalce ob
uporabi različnih metod

1. UVOD

Celiakija je imunska kronična vnetna bolezen tankega črevesja, ki nastane kot posledica uživanja glutena pri genetsko predisponiranih osebah (1, 2). Gluten je beljakovina, ki jo najdemo v žitih in sicer v pšenici, piri, ječmenu, rži in ovsu. Največji delež glutena je v pšenici, najmanjši pa v ovsu. Pri bolnikih s celiakijo sproži imunski odziv ter povzroči histološke spremembe tankega črevesa in ga zato v prehrani teh bolnikov ne sme biti. (3) Prenehanje uživanja glutena mora biti doživljensko, saj že majhna količina glutena v hrani lahko ponovno povzroči spremembe črevesne sluznice.

O pojavu celiakije govorita dve hipotezi: evolucijska in imunska. Evolucijska hipoteza govori o postopnem povečevanju prisotnosti glutena v hrani, kar lahko privede do nastanka celiakije. Človek v pradavnini ni užival glutena, saj se je pridelava žit pričela šele pred 10.000 leti. Ta žita (npr. riž v Aziji, sorgum in proso v Afriki, koruza v Ameriki), niso vsebovala beljakovine gluten. Ob koncu ledene dobe pa se na jugovzhodu Azije med južno Turčijo in Irakom prične pridelava divjih žit, ki so vsebovale gluten. Pridelava pšenice in ječmena je povezana s širjenjem poljedelskih ljudstev čez Sredozemlje in Panonsko nižino in skozi tisočletja so se te kulture razširile po vsej Evropi. Z naraščanjem prebivalstva se je povečevala potreba po hrani in s tem selekcioniranje in vzgajanje novih vrst žit z večjim pridelkom in večjo vsebnostjo glutena. Pomemben delež prebivalstva ni nikoli razvil tolerance na beljakovino gluten in njihov HLA sistem je reagiral nanj z imunološko intoleranco, ki pa lahko privede do nastanka celiakije (4).

Opis bolezni zasledimo že v drugem stoletju našega štetja, vendar je šele leta 1888 Samuel Gee opisal klinično sliko bolezni in jo imenoval celiakija. Wim Dicke je leta 1950 odkril patogeno vlogo glutena kot sestavine posameznih žit, štiri leta pozneje pa je Paulley opisal karakteristično histološko sliko sluznice tankega črevesa s poudarkom na diagnostičnem pomenu biopsije tankega črevesa.(5)

Dejavniki, ki vplivajo na nastanek bolezni so: dejavniki okolja, imunološki dejavniki in genetski dejavniki. Najpomembnejši dejavnik okolja je gluten, lahko pa so tudi virusi (humani adenovirus), glive (*Candida albicans*). (6, 7, 8). Gluten je sestavljen iz proteinov, ki so v vodi netopni in jih glede na topnost delimo na dve skupini. V prvo skupino spadajo prolamini, ki so topni v alkoholu in jih v pšenici imenujemo gliadini, v rži sekalini, v ječmenu hordeini in v ovsu avenini. V drugo skupino glutenskih proteinov spadajo proteini, ki so topni v kislinah in se v pšenici imenujejo glutenini. (7)

Gliadine ločimo glede na elektroforezno aktivnost in izoelektrično fokusiranje v 3 tipe: α/β , γ , ω gliadine. Lahko vsebujejo skupke hidrofobnih aminokislin, katerim sledi prolin. Takšna struktura inhibira intestinalne/pankreatične peptidaze (pepsin, himotripsin) in prepreči razgradnjo samih gliadinov. V α/β frakciji gliadinov so peptidi z določenim aminokislinskim zaporedjem, ki sprožijo patofiziološki proces. (6,7)

Med imunološke dejavnike sodijo celični in humoralni imunski mehanizmi, tkivna transglutaminaza, ki povzroča nastanek novih antigenov (deamidacija gliadina, kovalentna vezava z gliadinom) ter intraepitelijski limfociti in IL-15 (NKG2D, MICA). (6)

Celiakija je gensko pogojena bolezen, za katero je značilna prisotnost haplotipa HLA DQ2 v 90 do 95%, redkeje je prisoten haplotip HLA DQ8 in sicer le v 5 do 10%. (3) Lahko pride do spremenjenega izražanja: metaloproteinaze 1 in 3 (MMP-1, MMP-3), genov, povezanih s prenašalnimi sistemi in procesi delitve ter diferenciacije, prolil-endopeptidaze (PREP), tkivne transglutaminaze, genov, vpletenih v procese apoptoze in oksidativnega stresa. (6,7,8)

1.1. POGOSTOST

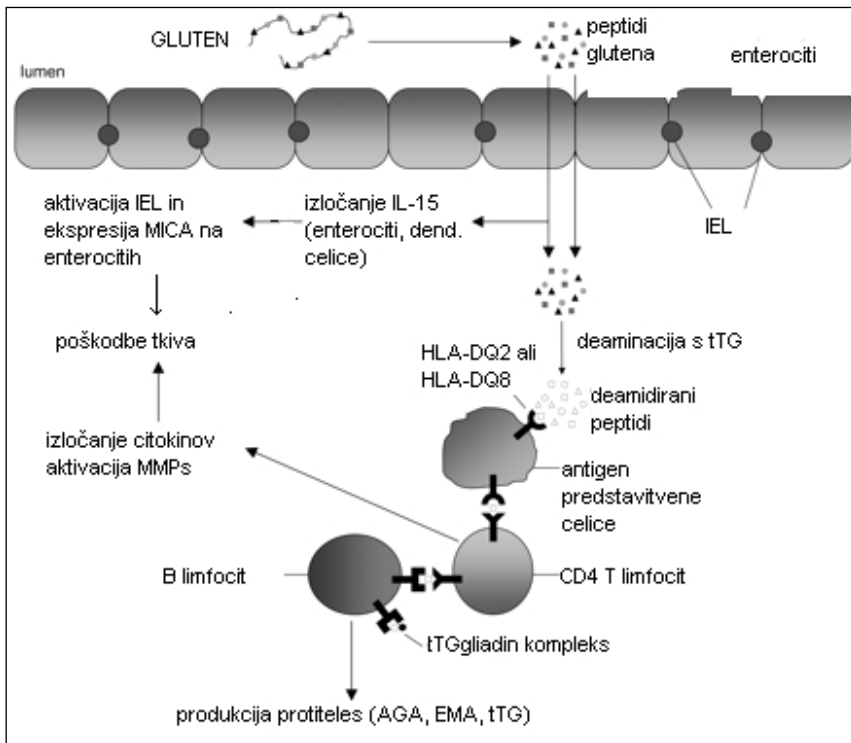
Celiakija je ena najpogostejših kroničnih boleznih prebavil in se lahko pojavi v kateremkoli starostnem obdobju. Je premalokrat diagnosticirana, saj lahko nastopi v atipični obliki, lahko pa tudi v tihi, latentni ali potencialni obliki pri že zelo majhnih otrocih, mladostnikih in odraslih. V Evropi zanjo boleha kar pol odstotka prebivalstva. Ob koncu 80-ih let je bila v Evropi najvišja incidenca celiakije na Švedskem, takoj za njo pa v Italiji. Redka je v Afriki in na Kitajskem. Incidenca celiakije, ugotovljena 1976 v Sloveniji, je bila 1:2000, leta 1989 1:780 in leta 1999 1:550. Številne raziskave so pokazale, da je dejansko število bolnikov s celiakijo veliko in da le ti predstavljajo celo okoli 1% populacije. Atipične celiakije naraščajo, razmerje med simptomatsko in asimptomatsko obliko je 1:5 do 1:7. (9,10).

Celiakija se pojavlja znotraj posameznih družin. Prevalenca boleznih med sorodniki prvega kolena se ocenjuje med 2 in 12 %, pri nas 8,4 %. Prevalenca pri HLA identičnih dvojčkih je 40 %, pri monozigotih pa 75 %. (9,10)

1.2. ETIOPATOGENEZA

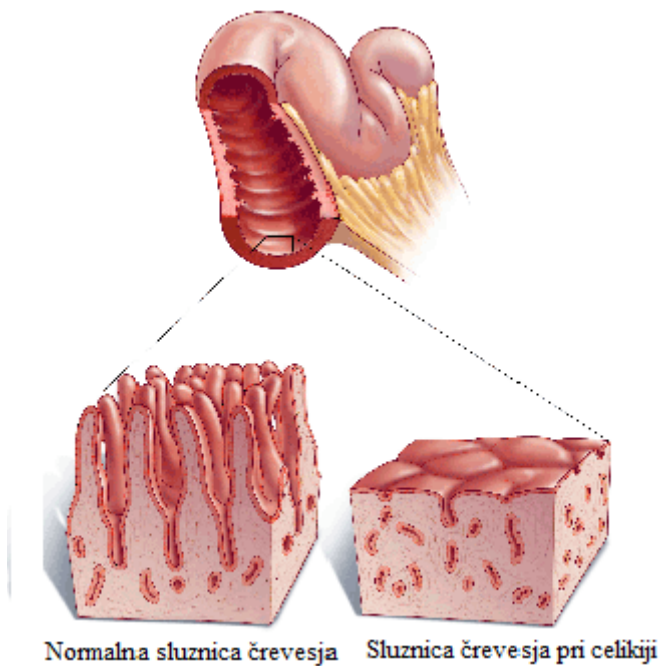
Patogenezo celiakije skušata pojasniti biokemijska in imunološka teorija. Biokemijska teorija govori o specifičnem encimskem deficitu, kar onemogoči popolno razgradnjo glutena in s tem neposredno poškodbo črevesne sluznice. Imunološka teorija predpostavlja, da je osnovni vzrok imunološka motnja. Številna opazovanja kažejo, da je glutenska enteropatija posledica spremenjenega oziroma prekomernega imunskega odziva. (5, 6, 7)

Normalno prehajajo makromolekule skozi epitelne celice črevesa in se v lizosomih razgradijo v manjše peptide, ki so neimunogeni. Pri celiakiji se toksična peptidna zaporedja ne razgradijo. Toksični peptid inducira sintezo in sproščanje IL-15 v enterocitih in dendritičnih celicah. IL-15 aktivira T celice ter inducira ekspresijo molekule HLA I (MICA) v enterocitih in receptorjev NKG2D na intraepitelijskih limfocitih. Pride do okvare tesnih stikov in povečana je propustnost in s tem prehod glutena skozi sluznice v lamino proprijo. Način prehoda med epitelnimi celicami in skozi njih še ni pojasnjen. V lamini propriji črevesa se nahaja tkivna transglutaminaza, katera deamidira toksične peptide – gliadine do glutaminske kisline, ki ima bolj negativen naboj. Z bolj negativnim nabojem deamidiranih produktov je zvišana afiniteta za vezavo s HLA DQ2 ali HLA DQ8 na antigen predstavitevni celici. Tako je udeležena pri tvorbi novih neoantigenov. Prihaja tudi do povezav gliadin-tTG, tTG-tTG. Tako predstavljen antigen prepoznajo limfociti T, ki aktivirajo limfocite B, kar povzroči humoralni imunski odziv s tvorbo IgA in IgG protiteles (AGA, EMA, tTG) in celični imunski odziv s tvorbo vnetnih citokinov (IFN gama, TNF alfa in interlevkinov). To vodi do poškodb enterocitov. (5, 6, 7, 8, 11) (Slika 1)



Slika 1: Prikaz imunskega mehanizma pri celiakiji

Prekomeren imunski odziv na gluten povzroči značilno spremembo imunskih celic v lamini propriji in morfološke spremembe v epitelnih celicah sluznice tankega črevesa. (Slika 2) Črevesne resice atrofirajo ali pa se skrajšajo, medtem ko kripte hipertrofirajo.(1) Aktivnosti membranskih encimov so znižane (vseh disaharidaz), kar ima za posledico malabsorbcijo. Epitelijske celice so vakuolizirane z vnetimi infiltrati - intraepitelijskimi limfociti, posledica tega je zmanjšana sposobnost presnove.(8) Ob uvedeni dieti (izogibanje glutena), pride do reverzibilnega procesa, okvarjena sluznica tankega črevesja se obnovi. (12)



Slika 2: Prikaz normalne in atrofirane sluznice črevesja

1.3. KLINIČNA SLIKA IN POJAVNE OBLIKE CELIAKIJE

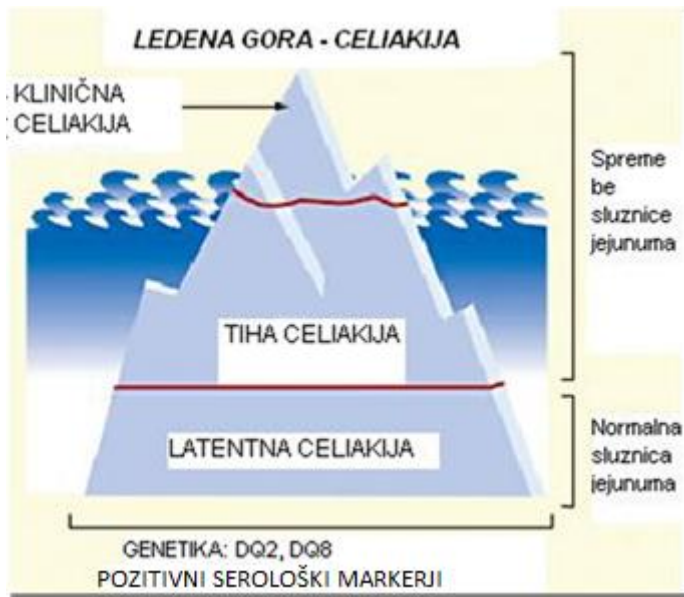
Celiakija je bolezen, ki se lahko pojavi v kateremkoli starostnem obdobju. Klinična slika je zelo raznolika in je odvisna od starosti bolnika, trajanja bolezni in obsega sprememb na črevesju. Tipični znaki so: pogosto, smrdeče, svetlo, penasto blato, pogosta utrujenost, bledica, anemija, izguba teže, napet trebuh, krči, zaprtost. V odrasli dobi ponavadi ne poteka z značilnimi kliničnimi znaki, pogosteje so prisotni zunajčrevesni znaki celiakije, kot so: hematološke motnje, anemije, nizka rast, osteoporoza,.. Celiakija se lahko pojavlja v različnih oblikah in sicer kot tipična celiakija, atipična celiakija in asimptomatska celiakija (tiha, latentna, potencialna, refraktorna).

Tipična celiakija (aktivna, simptomatska) se običajno razvije pri dojenčkih med 6 in 24 mesecem starosti, vedno nekaj tednov ali mesecev po tem, ko otrok začne uživati žitarice. Prisotne so značilne histološke spremembe sluznice tankega črevesa in serološki označevalci celiakije (12, 13). Tipični simptomi so: kronična driska, izguba telesne teže, anemija, velik in napet trebuh, dolge in suhe okončine, bledica kože in vidnih sluznic, bruhanje, slabo razpoloženje, utrujenost, pomanjkanje apetita, zaostanek v rasti, znaki sekundarne laktozne intolerance, blato je mehkejše, smrdeče, slabo prebavljeno in svetlo obarvano. (12)

Za atipično celiakijo so značilni atipični klinični znaki oz. izvenčrevesni simptomi, ki se pojavijo po drugem letu starosti. Bolniki imajo pogosto minimalne težave s prebavili, morda le napenjanje v trebuhu, namesto driske so lahko zaprti (13). Klinični znaki: pomanjkanje apetita, nizka rast, afte v ustih, okvare zobne sklenine (pri 10-40 % otrok), kronična utrujenost in glavobol, osteoporoza, bolezni jeter (povišani jetrni encimi, hepatitis), psihične motnje (depresija), nespecifične nevrološke motnje (ataksija, periferna nevropatija in miopatija), alopecija areata, dermatitis herpetiformis Duhring, težave s sklepi, neplodnost in spontani splav. (12, 13)

Asimptomatska celiakija se lahko pojavlja kot tiha celiakija, latentna celiakija, potencialna celiakija in refraktorna celiakija. Pri tihi celiakiji so odsotni klinični znaki celiakije, prisotne pa so značilne histološke spremembe sluznice tankega črevesa (atrofija), ki se normalizira po brezglutenski dieti. Prisotni so tudi značilni serološki označevalci bolezni. Je sedemkrat pogostejša od simptomatske celiakije. Za latentno celiakijo je značilno, da ni prisotnih sprememb na sluznici tankega črevesja, so pa pozitivni serološki označevalci bolezni. Prav tako ljudje nimajo simptomov bolezni, lahko pa imajo v anamnezi predhodno manifestno ali tiho obliko celiakije, ki se je po brezglutenski dieti pozdravila. Histološki pregled bioptov črevesne sluznice pokaže povečano število intraepitelijskih limfocitov. Za potencialno celiakijo velja enako kot pri latentni obliki razen tega, da bolnik še ni imel dokazane atrofije sluznice tankega črevesa. Pri refraktorni celiakiji se bolezen kljub brezglutenski dieti ne izboljša. (12)

Pojavnost celiakije se najpogosteje prikazuje s sliko ledene gore, kjer vrh ledene gore predstavlja klinična manifestna oblika celiakije, pod nivojem vode je tiha celiakija, nato sledi latentna oblika, ki predstavlja obsežen del gore. (13) (Slika 3)



Slika 3 : Pojavnost celiakije

Celiakiji so pogosto pridružene tudi druge bolezni. Najpogosteje so to avtoimunske bolezni (sladkorna bolezen tipa 1, avtoimuni tireoiditis, Sjörgenov sindrom, kolagenska vaskularna bolezen) ter različne druge bolezni, kot so selektivna IgA deficienca, Downov sindrom, IgA nefropatija. (8, 9, 12) Neustrezno zdravljena celiakija lahko prizadene številne organe in organske sisteme, pogost je razvoj drugih avtoimunskih bolezni, predvsem avtoimuni tireoiditis. Pogosteje se razvije limfom, rak požiralnika in žrela. (2)

1.4. DIAGNOSTIKA CELIAKIJE

Posledica nezdravljene celiakije so številni resni zapleti, zato je potrebno bolnike odkriti in zdraviti čim bolj zgodaj. V tipičnih primerih se diagnoza postavi hitro, medtem ko večji problem predstavljajo atipične in asimptomatske oblike celiakije, zato je pomembna izbira čim bolj zanesljivih diagnostičnih metod. Diagnostika bolezni temelji na merilih, ki jih je sprejelo Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN) in kot zlati standard predvidevajo dokaz reverzibilne okvare sluznice tankega črevesa, ki nastane kot posledica uživanja glutena.(2)

Diagnostika celiakije:

- postavitev suma (na podlagi klinične in krvne slike),
- presejalna diagnostika (analiza tipičnih znakov, D-ksilozni test sposobnosti absorpcije, določanje protiteles),

- potrditvena diagnostika (biokemični pregled biopta črevesne sluznice: določanje aktivnosti intestinalnih disaharidaz; histološki pregled biopta črevesne sluznice in analiza intraepitelijskih limfocitov). (8, 9, 12)

V pomoč diagnostiki pa so tudi: izsledki anamneze in telesnega pregleda, analize krvi (anemija, znižan nivo železa, folata, vitamina B₁₂, povišan ALT, AST pri 40% bolnikov...), analize fecesa (prisotnost maščob v blatu zaradi malabsorbcije), tolerančni testi (določanje malabsorbcije disaharidov: D-ksilozni test, laktozni tolerančni test, test črevesne permeabilnosti), dihalni testi. (8, 9)

1.4.1. BIOPSIJA SLUZNICE TANKEGA ČREVEESA

Histološki pregled biopta črevesne sluznice še vedno velja za najpomembnejši diagnostični postopek za potrditev diagnoze celiakije. Izvaja se pri bolnikih, pri katerih simptomi in laboratorijski izvidi kažejo na malabsorbcijo ali deficit nekaterih hranljivih snovi. Prav tako se izvaja pri bolnikih s pozitivnimi serološkimi označevalci celiakije kljub odsotnosti klinične slike. Biopsi se pregledajo pod svetlobnim mikroskopom, kjer se opazujejo značilne histološke spremembe: popolna ali delna atrofija črevesnih resic, podaljšanje Liberkühnovih kript, povečanje števila intraepitelijskih limfocitov (predvsem limfocitov z γ/δ T-celičnim receptorjem. Z biokemičnim pregledom biopta določamo aktivnost disaharidaz. (12)

Najnovejša merila NASPGHAN kot tudi revidirana merila ESPGHAN predvidevajo le eno biopsijo sluznice tankega črevesa, nato pa po brezglutenski dieti normalizacijo oziroma izboljšanje seroloških označevalcev celiakije. (12) Biopsijski odzem sluznice poteka večinoma iz distalnega dela dvanajstnika s ezofagogastro-duodenoskopijo.

1.4.2. SEROLOŠKI OZNAČEVALCI CELIAKIJE

Pri celiakiji pride do prekomernega oz. patološkega imunskega odziva. Pri tem nastajajo specifična protitelesa, ki jih lahko dokažemo v serumu bolnika. To so: antigliadinska protitelesa razreda IgA in IgG (AGA), antiendomizijska protitelesa razreda IgA (EMA), protitelesa proti tkivni transglutaminazi razreda IgA (IgG) (t-TG), antiretikulinska protitelesa (ARA), antičrevesna protitelesa (JAB). Antiretikulinska in antičrevesna protitelesa niso več v širši uporabi.

1.4.3. CELOKUPNI IMUNOGLOBULINI RAZREDA A

Celiakija se pogosteje pojavlja pri osebah s pomanjkanjem IgA. Določitev celokupnih imunoglobulinov IgA je pomembno pri sumu na celiakijo z IgA imunodeficienco, ko so serološki označevalci IgG razreda povišani, medtem ko so serološki označevalci IgA razreda normalni.

1.4.4. GENETSKE PREISKAVE

Skupna značilnost vseh bolnikov s celiakijo je njihova genetska predispozicija za razvoj bolezni, v katero je verjetno vključenih več genov na različnih kromosomih. Najbolj je raziskana povezava z nekaterimi HLA aleli, kodiranimi na šestem kromosomu. Najpogostejša v Evropi sta HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 heterodimera. Genetske preiskave v diagnostiki celiakije imajo velik pomen, saj imajo visoko negativno napovedno vrednost, kar pomeni, če niso prisotne, potem preiskovanec ne bo zbolel oz. ne oboleva za celiakijo. (12)

1.5. ZDRAVLJENJE CELIAKIJE

Zdravljenje celiakije poteka z dieto brez glutena, ki mora biti stalna in doživljenjska. Mnogokrat je celiakiji pridružena še laktozna intoleranca, zato je velikokrat potrebna še izločitev laktoze iz prehrane. Zdravijo se spremljajoče bolezni ter se dodaja železo in vitaminski pripravki. Cilj zdravljenja je obnova okvarjene sluznice tankega črevesja in zmanjšanje tveganja zapletov, ki lahko nastanejo pri nezdravljeni celiakiji. (5, 8, 9, 12) V prihodnosti naj bi zdravljenje potekalo: z uporabo encimov prolinendopeptidaz, supresija imunskega sistema s cepljenjem, razvoj in uporaba genetsko spremenjenih žitaric, uporaba blokatorjev tTG, HLA-DQ in NKG2D. (11)

1.6. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA PROTITELES V SERUMU

Serološki testi so v diagnostiki celiakije zelo pomembni, saj omogočajo neinvazivno spremljanje bolezni ter odkrivanje atipičnih oblik celiakije.

1.6.1. Endomizijska protitelesa - EMA

Endomizijska protitelesa je prvi odkril Chorzelski leta 1983, ki jih je opisal kot novo tkivno protitelo razreda IgA, katero reagira z endomizijem gladkega mišičja, predvsem z opičjim požiralnikom.(14) Endomizijska protitelesa so usmerjena proti antigenom endomizija, ki predstavlja vlakna vezivnega tkiva okoli gladkega mišičja. Eden najpomembnejših antigenov endomizijskih protiteles je encim tkivna transglutaminaza.

Določanje protiteles poteka z metodo indirektno imunofluorescence – IIF. Kot substratni antigen se uporablja opičji požiralnik ali humana popkovnica, ki je cenejša in etično bolj sprejemljiva alternativa.(14) Še vedno so bolj v uporabi tkiva primatov, saj zaradi značilne razporejenosti endomizija omogočajo lažje in preglednejše zasledovanje pozitivnih vzorcev fluorescence.(15)

Diagnostična občutljivost EMA naj bi bila od 89 do 100%. Pri manjših otrocih je nekoliko nižja kot pri starejših otrocih. Diagnostična specifičnost EMA je od 90 do 100%. (14)

1.6.2. Antigliadinska protitelesa - AGA

Antigliadinska protitelesa so prva znana protitelesa pri bolnikih s celiakijo. Testi, ki se uporabljajo za določevanje teh protiteles, temeljijo na imunokemijski reakciji med gliadinom in proti njemu usmerjenim protitelesom. To so najpogosteje encimsko imunski testi na trdnem nosilcu (ELISA). Novejše, redkeje uporabljene so multipleks metode, ki združujejo principe ELISA in pretočne citometrije (Luminex tehnologija).

AGA IgA razreda so visoko diagnostično specifična, saj nastajajo kot imunski odziv na gliadin. Velikokrat pa celiakijo spremlja pomanjkanje celokupnih IgA protiteles, kar vodi do zmanjšane diagnostične občutljivosti teh protiteles. Za AGA IgG je značilno, da so slabo diagnostično specifična (lažno pozitivni rezultati). Povišane vrednosti lahko zasledimo pri boleznih kot so: IgA nefritis, juvenilni artritis, psoriza ter tudi pri zdravi populaciji.(15) Diagnostična občutljivost AGA-IgA je med 52 in 100%, diagnostična specifičnost pa med 68 in 100%. (14) Za AGA-IgG je diagnostična občutljivost med 69 in 100%, diagnostična specifičnost pa med 36 in 92%. (14) Diagnostična občutljivost AGA-IgA in AGA-IgG je večja pri otrocih mlajših od 2 let kot pri večjih otrocih in odraslih. (14) Merila NASPGAN ne priporočajo več uporabe protiteles AGA predvsem zaradi njihove slabe diagnostične specifičnosti, medtem ko se skupina ESPHAN ni tako jasno opredelila glede uporabe omenjenih seroloških testov. (2)

1.6.3. Protitelesa proti tkivni transglutaminazi - tTG

Leta 1997 sta Dietrich in Schuppan s sodelavci prvič objavila rezultate študije, ki dokazuje, da je tTG najpomembnejši in hkrati verjetno tudi edini antigen, proti kateremu so usmerjena endomizijska protitelesa. Tkivna transglutaminaza je od kalcija odvisen encim in katalizira prečno povezavo med glutaminskimi in lizinskimi ostanki v proteinih ter deamidira glutaminske ostanke. Je citoplazemski encim in se lahko iz celic izloči ob poškodbi, infekciji, stresu, apoptozi. Po poškodbi povezuje izvencelične komponente matriksa in tako pomaga pri stabilizaciji tkiva. Gliadin ima številne glutaminske ostanke in je zato med pomembnejšimi substrati za tTG. (11, 16)

V prvih oziroma začetnih ELISA metodah se je kot antigen tTG uporabljala tkivna transglutaminaza iz jeter gvinejske svinje. Diagnostična občutljivost, predvsem pa diagnostična specifičnost teh testov je bila nižja glede na EMA (IIF). Kmalu so razvili nove teste, kjer je kot antigen uporabljena rekombinantna humana tkivna transglutaminaza. Rezultati teh testov so pokazali boljšo diagnostično občutljivost in specifičnost, ki je primerljiva z EMA (IIF).

Protitelesa proti tTG določamo z ELISA ter multipleks testi (Luminex tehnologija). Številne izkušnje in študije nakazujejo, da so ta protitelesa analitsko in diagnostično zelo občutljiva in visoko specifična za celiakijo.

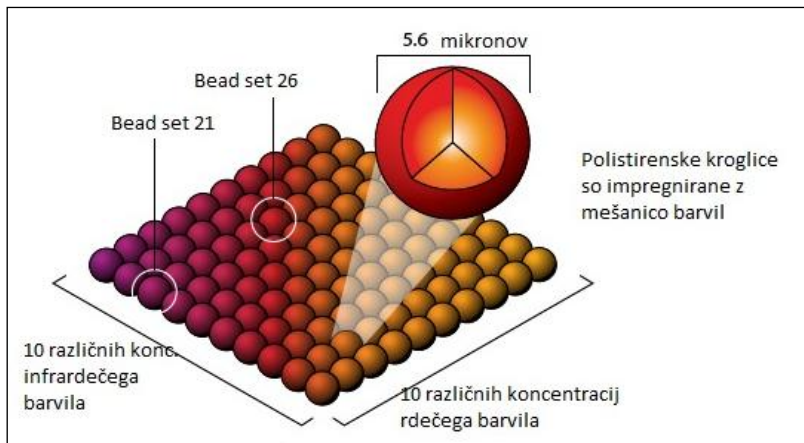
1.7. DOLOČANJE PROTITELES: PRINCIPI DOLOČANJA

1.7.1. ENCIMSKO IMUNSKI TEST NA TRDNEM NOSILCU – ELISA (ang.: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Za detekcijo specifičnih protiteles v vzorcu se uporablja metoda ELISA, kjer so na trdnem nosilcu – mikrotiterski plošči vezani znani antigeni (α -gliadin). Na te antigene se vežejo specifična protitelesa iz vzorca (npr. Pt iz seruma bolnika). Po ustrezni inkubaciji in spiranju nevezanih protiteles se dodajajo protitelesa, označena z encimom (hrenova peroksidaza), ki se vežejo na prej nastali kompleks antigen-protitelo, na Fc predel humanega protitelesa. Po dodatku substrata (TMB-tetrametilbenzidin), encim reagira z substratom, kar povzroči nastanek barve. Po ustrezni inkubaciji in dodatku raztopine za prekinitev reakcije, ki povzroči spremembo barve produkta, sledi merjenje absorbance pri ustrezni valovni dolžini (450 nm). Izmerjena absorbanca je premosorazmerna koncentraciji prisotnih protiteles v serumu.

1.7.2. PRINCIP MULTIPLEKS METODE / X MAP TEHNOLOGIJA

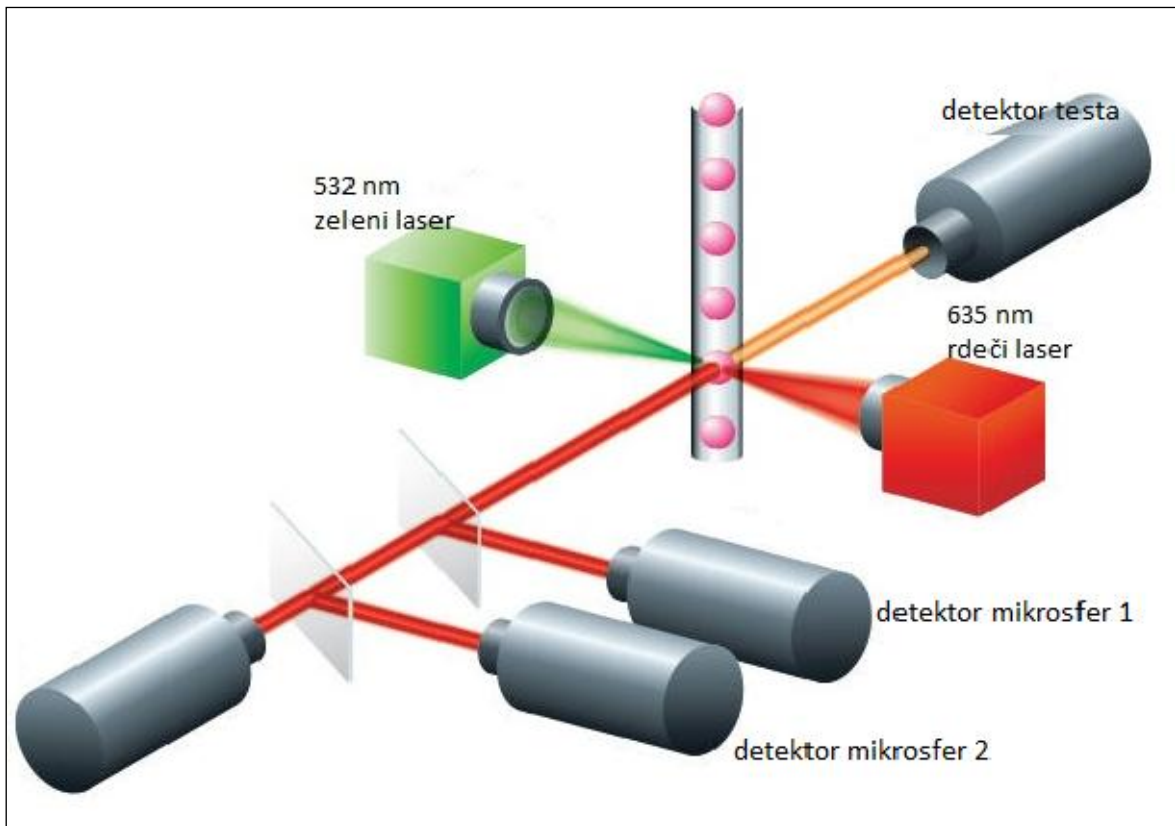
Metoda temelji na uporabi obarvanih polistirenskih kroglic (ang.:*beads*) imenovanih mikrosfere, na katere so vezani ustrezni antigeni. Za obarvanje polistirenskih kroglic se uporablja mešanica dveh barvil rdeče in infrardeče. Tako dobimo, odvisno od deleža vsebnosti obeh barvil, 100 različnih barvnih kombinacij oz. 100 različnih setov mikrosfer. (Slika 4)



Slika 4: Prikaz obarvanih polistirenskih kroglic pri multipleks metodi

Vsaka polistirenska kroglica ima svojo spektralno značilnost glede na vsebnost barvila (vsebnost rdeče in infrardeče). Na točno določeno obarvano kroglico oz. set enako obarvanih kroglic, je vezan ustrezen antigen. Tako lahko imamo kombinacije različnih polistirenskih kroglic z vezanimi različnimi antigeni (gliadin, tTG) suspendiranih v suspenziji, kar nam omogoča istočasno določevanje različnih protiteles (npr. tTG-IgA + AGA-IgA).

Na mikrotitersko filtracijsko ploščo se nanesejo polistirenske kroglice ter ustrezno razredčen serum. Po inkubaciji sledi filtracija in spiranje nevezanega materiala. Doda se konjugat–fluorescenčni označevalec, ki z vezavo na humano protitelo označi reakcijo (Ag – Pt) na površini kroglice. Po ustrezni inkubaciji sledi merjenje s pomočjo kompleksnega analizatorja. Analiza polistirenskih kroglic poteka s pomočjo pretočnega citometra s hitrostjo 20000 kroglic na sekundo. Posamezne polistirenske kroglice potujejo skozi pretočno celico in s pomočjo laserjev, od katerih eden meri vsebnost IR svetlobe in drugi jakost fluorescence na posamezni kroglici, zaznamo prisotnost protiteles v vzorcu.



Slika 5: Prikaz merjenja polistirenskih kroglic z laserji

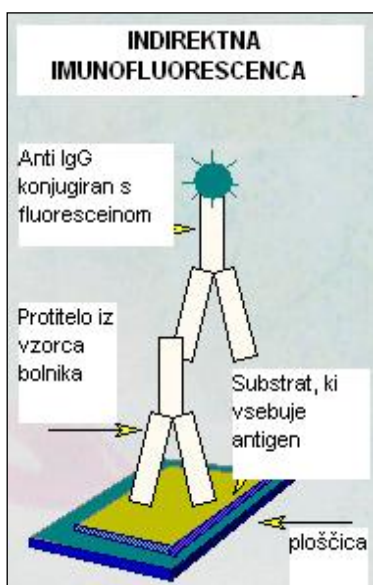
Zeleni laser izmeri intenziteto reakcije Ag - Pt na površini polistirenske kroglice, ki je premosorazmerna količini protiteles v serumu. Rdeč laser izmeri intenziteto infra rdeče barve polistirenske kroglice, na katero je vezan točno določen antigen in s tem definira vrsto protiteles v nekem vzorcu. (Slika 5) Za vsak set mikrosfer poteče večkratno analiziranje. Analizator nam poda rezultate v časovni enoti.

1.7.3. TEST INDIREKTNE IMUNOFLUORESCENCE

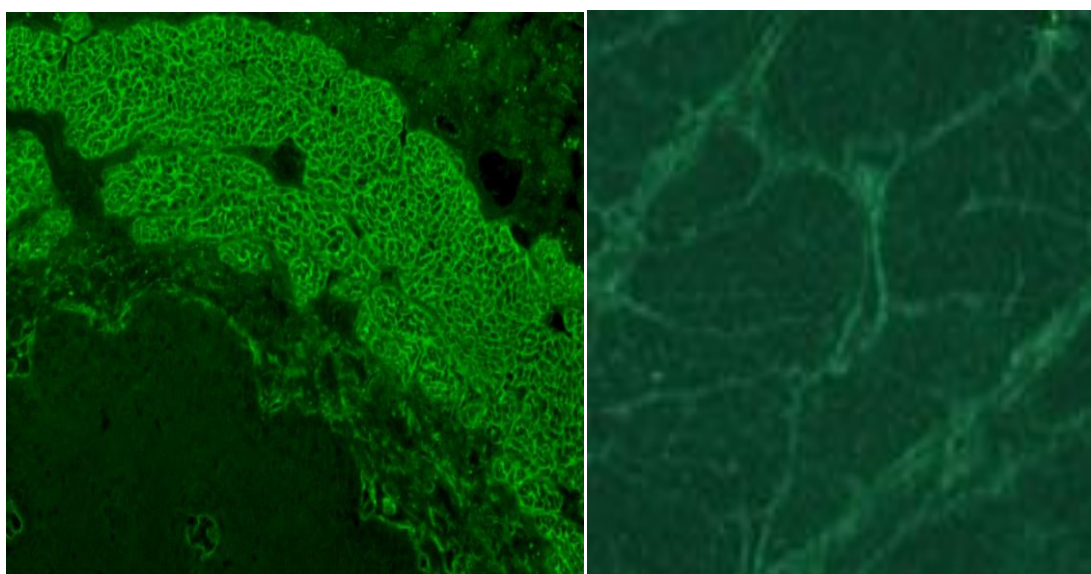
Indirektna imunofluorescenca je občutljiva metoda, s katero določamo prisotnost specifičnih protiteles (EMA) v serumu ali telesnih izločkih bolnika. Protitelesa iz seruma bolnika se vežejo z antigenom (na objektna stekla nanešena rezina opičjega požiralnika) in nastane stabilen antigen - protitelo kompleks. Po spiranju, s katerim odstranimo nevezana protitelesa, dodamo anti-humano protitelo živalskega izvora, označeno s fluoresceinom, ki se vežejo na imunski kompleks Ag – Pt. (Slika 6) Sledi inkubacija in vrednotenje vzorcev pod fluorescenčnim mikroskopom. V primeru pozitivnega rezultata nastane stabilni tridelni kompleks: antigen – humano protitelo iz seruma (IgA) – nehumano protitelo

označeno s fluoresceinom, kar je pod mikroskopom vidno kot mreža značilna zelena fluorescenca v predelu endomizija. Pri negativnih vzorcih te fluorescence ni. (Slika 7)

Fluorokrom v osnovnem energijskem stanju absorbira svetlobno energijo pri valovni dolžini 495 nm in preide v višje energijsko stanje pri 510 nm. Pri tem oddaja fotone z daljšo valovno dolžino, kot je valovna dolžina absorbirane svetlobe. Barvili, ki se najpogosteje uporabljata sta fluorescein izotiocianat in rodamin izotiocianat, ki se vežeta na Fc regijo protitelesa in pri tem ne spremenita njegove specifičnosti.



Slika 6: Princip indirektne imunofluorescence



Slika 7: Prikaz pozitivnega in negativnega rezultata EMA z metodo IIF

2. NAMEN DELA

Namen dela je primerjati novejšo metodo multipleks z v rutinski diagnostiki uveljavljeno metodo ELISA za določitev antigliadinskih protiteles in protiteles proti tkivni transglutaminazi, na osnovi primerjave dobljenih rezultatov določanja. Pri vseh vzorcih bomo z indirektno imunofluorescenco določili endomizijska protitelesa, ki veljajo za zlati serološki standard v laboratorijski diagnostiki celiakije. Metodi bomo primerjali na osnovi primerjave izračunanih diagnostičnih vrednostih protiteles AGA-IgA, AGA-IgG, tTG-IgA ter na osnovi ujemanja rezultatov z EMA v diagnostiki celiakije.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

V našo raziskavo smo testirali 79 vzorcev, od tega 47 vzorcev bolnikov s celiakijo, katerih diagnoza je bila jasno opredeljena na osnovi standardnih kriterijev (klinična slika, histološka potrditev) ter 32 serumov preiskovancev z gastroenterološkimi težavami brez prisotne celiakije. Starost preiskovancev je bila od 1 leta do 72 let. Povprečna starost je bila 17,2 let, mediana pa 11 let. 53 vzorcev od 79 je pripadalo preiskovancem starih do 18 let. Serumi preiskovancev so bili v naš laboratorij prinešeni v okviru rednih ambulantnih pregledov omenjenih preiskav v letih 2008 - 2010. Vsi zbrani vzorci serumov so se do opravljenih analiz shranjevali v zamrzovalniku na -20°C. Predhodno smo jih označili – kodirali, tako je bila zagotovljena anonimnost preiskovancev ter korektnost izvajanja analiz in interpretacija le teh. Vzorce za našo raziskavo smo pridobili iz ostankov serumov, ki so bili analizirani v okviru rednih rutinskih preiskav, zato zanje ni bilo potrebno pridobiti privoljenja preiskovancev in mnenja etične komisije.

V serumih smo določili prisotnost protiteles AGA in protiteles proti tTG. 67 vzorcev je bilo testiranih na prisotnost antigliadinskih protiteles (IgA, IgG) ter 76 vzorcev na prisotnost protiteles proti tkivni transglutaminazi. Vse vzorce smo testirali tudi na prisotnost endomizijskih protiteles z metodo indirektno imunofluorescence.

3.2. OPREMA IN MATERIALI

Oprema:

- pipete od 10-1000 µL
- pipete z možnostjo nastavitve volumnov 20 – 100 µL
- ura
- ELISA čitalec: TECAN Sunrise, Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica (nastavitev programa – valovna dolžina 450 nm)
- vakuumška črpalka,
- ultrazvočna kopel
- fluorescenčni mikroskop (Olympus BH2-RFL - Olympus Optical CO-LTD Tokyo, Japonska)

Materiali, ki smo jih potrebovali pri delu: steklene buče (1L), steklene čaše (250 mL), steklene posode za inkubacijo, epruvete za redčenje serumov, destilirana voda, staničevina, lateks rokavice.

3.2.1. Kompleta reagentov α - Gliatest[®] S IgA in α - Gliatest[®] S IgG (Eurospital, Trst, Italija)

Za določitev AGA-IgA in AGA-IgG z ELISA metodo smo uporabili diagnostična kompleta proizvajalca Eurospital.

Diagnostična kompleta sta vsebovala:

- testne posodice z nanešenim antigenom α -gliadinom,
- konjugat: anti-humana protitelesa živalskega izvora označena s hrenovo peroksidazo (IgA/IgG),
- kalibratorji: pozitivni humani serum, vrednosti kalibratorjev so bile označene na steklenički,
- pozitivna kontrola: pozitivni kontrolni serum,
- negativna kontrola: negativni kontrolni serum,
- raztopina za redčenje vzorcev,
- substrat TMB (3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidin),
- pufrna raztopina za spiranje (20x koncentrirana),
- ustavitveni reagent.

3.2.2. Komplet reagentov Eu-tTG[®] IgA umana (Eurospital, Trst, Italija)

Za določitev protiteles proti tkivni transglutaminazi z ELISA metodo smo uporabili diagnostični komplet Eu-tTG[®] IgA umana proizvajalca Eurospital. Izbira vzorcev in postopek določevanja sta bili enaki kot pri prej navedenih Eurospitalovih kompletih za določitev AGA. V testnih posodicah je bil kot antigen nanešena rekombinantna tkivna transglutaminaza, konjugat pa je vseboval anti-humani IgA, označen s hrenovo peroksidazo.

3.2.3. Kompleta reagentov Athena Multi-Lyte[®] Celiac IgA Plus Assay in Athena Multi-Lyte[®] Celiac IgG Plus Assay (Zeus Scientific, Raritan, Amerika)

Za določitev AGA-IgA in anti-tTg-IgA z multipleks metodo smo uporabili diagnostični komplet Athena Multi-Lyte[®] Celiac IgA Plus Assay, medtem ko smo za določitev AGA-

IgG uporabili diagnostični komplet Athena Multi-Lyte® Celiac IgG Plus Assay, proizvajalca Zeus Scientific.

Diagnostični komplet je vseboval:

- filtracijsko ploščo,
- polistirenske mikro kroglice (bidi) konjugirane s tTG in gliadinskimi antigeni,
- konjugat – nehumana kozja protitelesa označena z fikoeritriinom (IgA/IgG)
- pozitivna kontrola,
- negativna kontrola,
- raztopino za redčenje vzorcev,
- pufrno raztopino za spiranje (10x koncentrirana).

3.2.4. Komplet reagentov Antiendomysium® (Eurospital, Trst, Italija)

Za določitev anti-endomizijskih protiteles z metodo indirektno imunofluorescence smo uporabili diagnostični komplet proizvajalca Eurospital. Vse komponente v kompletu so bile pripravljene za uporabo razen pufru za spiranje, ki smo ga morali pred uporabo redčiti z destilirano oz. deionizirano vodo.

Komplet je vseboval:

- testne ploščice (nanešen opičji požiralnik),
- pozitivna kontrola,
- negativna kontrola,
- konjugat (anti-human IgA označen z fluorescein izotiocianatom),
- raztopina za redčenje vzorcev,
- pufrna raztopina za spiranje,
- raztopina za pokrivanje ploščic (glicerol v fosfatnem pufru),
- papirčki za pivnanje (po spiranju),
- krovna stekelca.

3.3. METODE DOLOČANJA

3.3.1. ELISA za določitev AGA razreda IgA in IgG ter anti-tTG razreda IgA

Postopek izvedbe

Vzorci smo redčili v razmerju 1:101 z raztopino za redčenje vzorcev. Napipetirali smo 100µL kalibratorjev (v dvojniku), pozitivno in negativno kontrolo (v dvojniku) in redčene

vzorci. Testne posodice smo inkubirali 45 minut na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo odlili tekočino in testne posodice osušili na staničevini. Testne posodice smo trikrat sprali s 300 μ L pufrne raztopine za spiranje. Napipetirali smo 100 μ L anti- IgA oz. IgG konjugata v vsako testno posodico in inkubirali 30 minut na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo odlili tekočino in testne posodice osušili na staničevini. Testne posodice smo trikrat sprali s 300 μ L pufrne raztopine za spiranje. Napipetirali smo 100 μ L substrata v vsako testno posodico in inkubirali 15 minut na sobni temperaturi zaščiteno pred direktno svetlobo. Nato smo napipetirali 100 μ L reagenta za ustavitev reakcije v vsako testno posodico v enakem vrstnem redu in hitrostjo kot smo pred tem nanašali kromogen substrat. Intenziteto nastale barvne reakcije smo izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 450 nm.

Vrednotenje rezultatov

Rezultate smo ovrednotili s pomočjo predvidenih referenčnih vrednosti s strani proizvajalca (Preglednica I) in s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo dobili iz vrednosti kalibratorjev (1-5) s pomočjo ELISA čitalca, ki je izmeril in izrisal krivuljo ter nam podal vrednosti vzorcev in kontrol. Vrednost kontrol je bila označena na steklenički.

Preglednica I: Prikaz referenčnih vrednosti za AGA-IgA in AGA-IgG ter anti-tTG-IgA proizvajalca Eurospital

<i>EUROSPITAL</i>	<i>AGA</i>		<i>Anti-tTG IgA</i>
	<i>IgA</i>	<i>IgG</i>	
<i>Negativno</i>	<i><8 U/mL</i>	<i>0-50 U/mL</i>	<i><9</i>
<i>Mejno pozitivno</i>	<i>8-15 U/mL</i>	<i>-----</i>	<i>9-16</i>
<i>Pozitivno</i>	<i>>15 U/mL</i>	<i>>50 U/mL</i>	<i>>16</i>

3.3.2. Multipleks metoda za določitev AGA razreda IgA in IgG ter anti-tTG razreda IgA

Postopek izvedbe

Vzorci in kontrole smo redčili v razmerju 1:21 z raztopino za redčenje vzorcev. V vsako testno posodico smo napipetirali 50 μ L mikro kroglic. Pred uporabo smo mikro kroglice dobro premešali in jih dali za eno minuto v ultrazvočno kopel. V ustrezne testne posodice

smo napipetirali 10 μ L redčene negativne in pozitivne kontrole, redčene vzorce ter dobro premešali. (Preglednica II)

Preglednica II: Shema pipetiranja pri multipleks metodi

	<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>A</i>	NK	7										
<i>B</i>	PK	8										
<i>C</i>	1	9										
<i>D</i>	2	10										
<i>E</i>	3	11										
<i>F</i>	4	.										
<i>G</i>	5	.										
<i>H</i>	6	.										

A1:redčena neg. kontrola
 B1:redčena pozit. kontrola
 1...: redčeni vzorci (enojnik)

Testne posodice smo inkubirali 30 \pm 10 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo odfiltrirali tekočino in testne posodice trikrat sprali z 200 μ L pufrne raztopine za spiranje. Po spiranju smo testne posodice pustili stati 3-5 minut. Napipetirali smo 150 μ L anti- IgA oz. IgG konjugata v vsako testno posodico in inkubirali 30 \pm 10 minut na sobni temperaturi na stresalniku. Nato smo izvedli meritev na analizatorju LUMINEX 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, Amerika). Vrednotenje rezultatov je potekalo s pomočjo referenčnih vrednosti, ki so bile podane s strani proizvajalca. (Preglednica III)

Preglednica III: Referenčne vrednosti pri multipleks metodi proizvajalca Zeus Scientific

	AGA(AU/mL)		Anti-tTG(AU/mL)
	IgA	IgG	IgA
Negativno	<100	<100	<100
Mejno pozitivno	100 - 120	100 - 120	100 - 120
Pozitivno	>120	>120	>120

Testi uporabljajo tudi kalibracijo znotraj posameznega vzorca (Intra-Well Calibration Technology®), ki vključuje več točkovno standardno krivuljo znotraj suspenzije

polistirenskih kroglic. Vrednosti kalibratorjev so specifične, kodirane in različne za vsako kalibracijo, odvisno od samega kompleta reagentov in se nahajajo na priloženi zgoščenki.

3.3.3. Indirektna imunofluorescenca za določitev anti-endomizijskih protiteles

Postopek izvedbe

Vzorci smo redčili v razmerju 1:5 z raztopino za redčenje vzorcev (20µL seruma + 80µL raztopine za redčenje vzorcev). Na ustrezna polja ploščic smo nanесли 40µL pozitivne, negativne kontrole in redčene vzorce. Ploščice smo položili v vlažno komoro in jih inkubirali 30 min na sobni temperaturi (15°C -30°C). Po inkubaciji smo iz komore vzeli ploščice in jih sprali z pufrno raztopino za spiranje. Sprane ploščice smo položili za 5 minut v posodico z pufrno raztopino za spiranje. Po 5 minutah smo postopek ponovili. Po končanem spiranju smo ploščice osušili s priloženimi papirčki. Na vsako ploščico smo nanесли 40µL konjugata in inkubirali 30 minut na sobni temperaturi (15-30°C) zaščitenо pred direktno svetlobo. Ponovili smo fazo spiranja ploščic. Na vsako polje na ploščici smo nato nanесли kapljico raztopine za pokrivanje in ploščice pokrili s krovnim stekelcem. Tako pripravljene testne ploščice smo ovrednotili pod fluorescenčnim mikroskopom.

3.4. STATISTIČNE METODE

VREDNOTENJE POSAMEZNIH DIAGNOSTIČNIH METOD

Diagnostične metode smo ovrednotili na podlagi ujemanja rezultatov, diagnostične občutljivosti (DO), diagnostične specifičnosti (DS), diagnostične učinkovitosti (DU).

Diagnostična občutljivost (ang. sensitivity) predstavlja delež bolnikov s specifično boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven. Predstavlja verjetnost pozitivnega rezultata testa, kadar je bolezen prisotna. Manj kot je lažno negativnih rezultatov, večja je diagnostična občutljivost testa.

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

Diagnostična specifičnost (ang. specificity) predstavlja delež oseb, ki nimajo specifične bolezni, in je rezultat testa negativen. Predstavlja delež resnično negativnih dogodkov, ki smo jih pravilno ugotovili.

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

Kot resnično pozitivne vrednosti smo ovrednotili rezultate preiskav, ki so bili skladni s postavljeno diagnozo »celiakija« oziroma smo rezultate preiskav ovrednotili kot resnično negativne, kadar so bili rezultati negativni in pri teh vzorcih ni bila postavljena diagnoza celiakija. Rezultate preiskav smo ovrednotili kot lažne vrednosti, kadar se le-ti niso skladali s postavljeno diagnozo.

Diagnostična učinkovitost (ang. efficiency) predstavlja razmerje med resnično pravilnimi rezultati testa glede na vse rezultate testa. Odvisna je od diagnostične občutljivosti in specifičnosti testa ter prevalence bolezni. (22,23, 24)

$$\text{Diagnostična učinkovitost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni} + \text{resnično negativni}}{\text{vsi rezultati}} \times 100$$

STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Dobljene rezultate smo statistično obdelali s programom SPSS 17. Izvedli smo ROC analizo, s katero smo želeli grafično ponazoriti zmogljivost testov za diskriminacijo vzorcev glede na prisotnost oziroma odsotnost celiakije.

4. REZULTATI

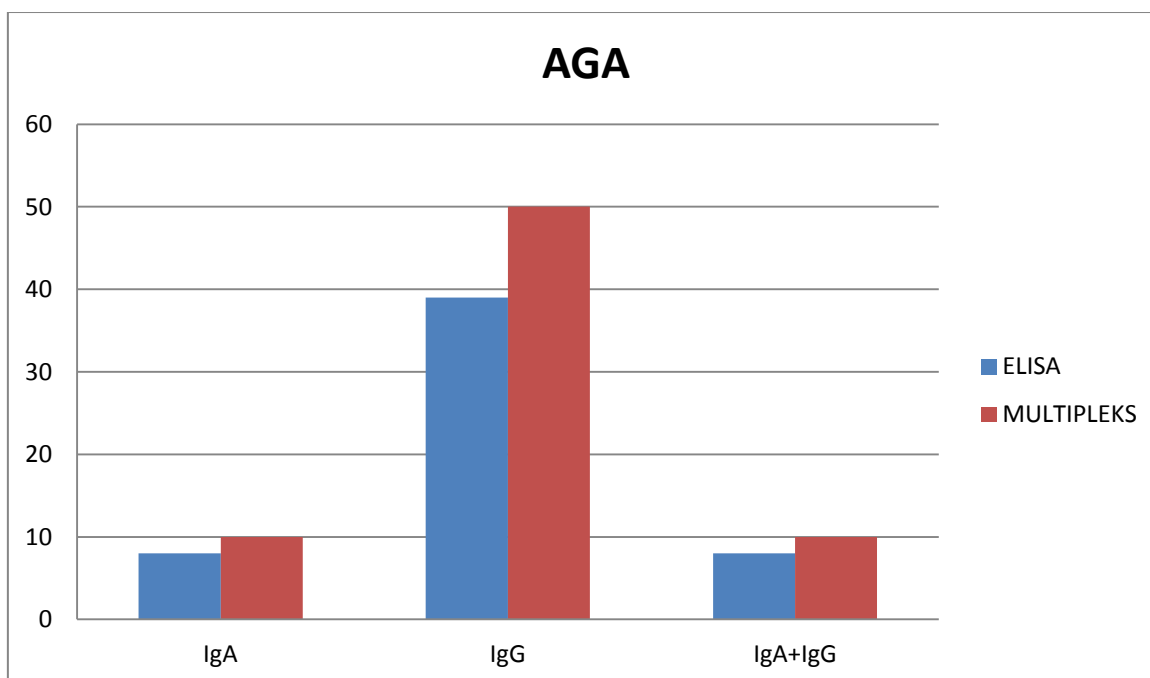
4.1. REZULTATI DOLOČITVE AGA (IgA, IgG)

4.1.1. Prisotnost AGA glede na razrede Ig pri različnih metodah določanja

Od 67 testiranih vzorcev smo prisotnost AGA-IgA določili pri 8 vzorcih z metodo ELISA in pri 10 vzorcih z MULTIPLEKS metodo. Pri določitvi AGA-IgG smo dobili 39 pozitivnih vzorcev z ELISA metodo in 50 pozitivnih z MULTIPLEKS metodo. Z obema metodama smo pri vseh pozitivnih vzorcih AGA-IgA določili prisotnost AGA-IgG. (Preglednica V, Slika 8).

Preglednica IV: Primerjava metod glede na prisotnost AGA v vzorcu

AGA	ELISA	MULTIPLEKS
IgA	8/67	10/67
IgG	39/67	50/67
IgA + IgG	8/67	10/67



Slika 8: Prisotnost AGA glede na razrede Ig pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

Ko smo primerjali rezultate AGA obeh metod smo ugotovili:

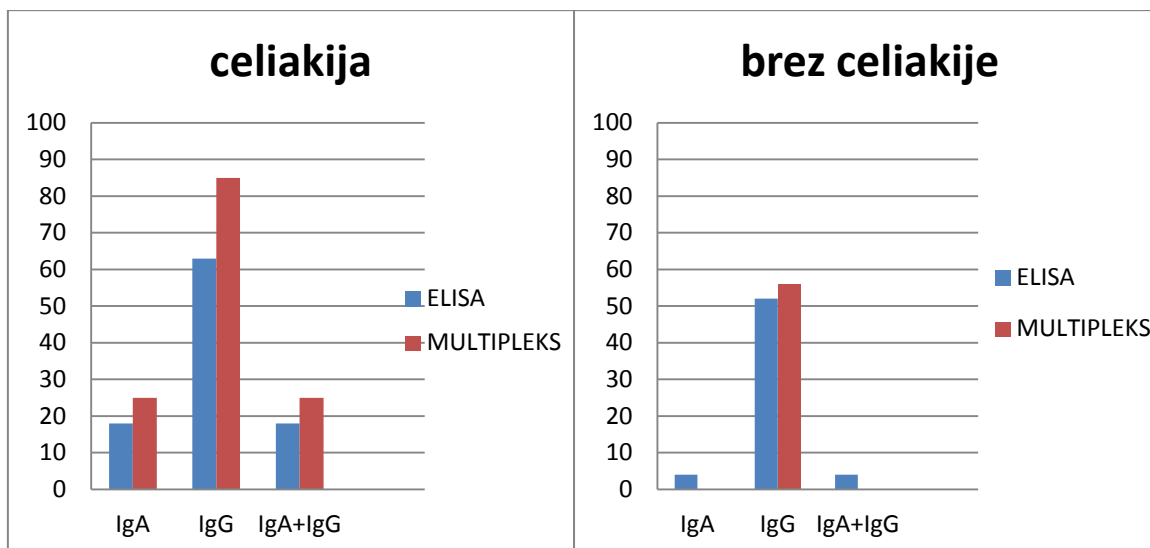
- IgA: rezultati so se ujemali v 93 % (62/67)
- IgG: rezultati so se ujemali v 79% (53/67)

4.1.2. Prisotnost AGA pri bolnikih s celiakijo in pri preiskovancih brez celiakije

Pri določitvi AGA-IgA z ELISA metodo smo dobili pozitiven rezultat le pri 18% bolnikov s celiakijo in pri 4% preiskovancev brez celiakije, medtem ko smo z MULTIPLEKS metodo dobili pozitiven rezultat pri 25% bolnikov s celiakijo in pri nobenem preiskovancu brez celiakije. Pri določitvi AGA-IgG z ELISA metodo smo dobili pozitiven rezultat pri 63% bolnikov z celiakijo in pri 52% preiskovancev brez celiakije, pri MULTIPLEKS metodi pa smo dobili pozitiven rezultat pri 85% bolnikov s celiakijo in pri 56% preiskovancev brez celiakije. (Preglednica V, Slika 9)

Preglednica V: Prisotnost AGA pri preiskovancih s celiakijo in brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

AGA	CELIAKIJA		BREZ CELIAKIJE	
	ELISA	MULTIPLEKS	ELISA	MULTIPLEKS
IgA	(7/40) 18%	(10/40) 25%	(1/27) 4%	(0/27) 0%
IgG	(25/40) 63%	(34/40) 85%	(14/27) 52%	(15/27) 56%
IgA + IgG	(7/40) 18%	(34/40) 25%	(1/27) 4%	(0/27) 0%



Slika 9: Prisotnost AGA pri preiskovancih s celiakijo in brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

4.2. REZULTATI DOLOČITVE PROTITELES PROTI TKIVNI TRANSGLUTAMINAZI

4.2.1. Prisotnost protiteles proti tTG glede na metodo določanja

Od 76 testiranih vzorcev smo dobili 42 pozitivnih vzorcev z metodo ELISA in 44 pozitivnih vzorcev z MULTIPLEKS metodo. Rezultati, ki smo jih dobili z obema metodama, so se ujemali v 95%. (Preglednica VI)

Preglednica VI: Primerjava metod glede na prisotnost Pt proti tTG v vzorcu

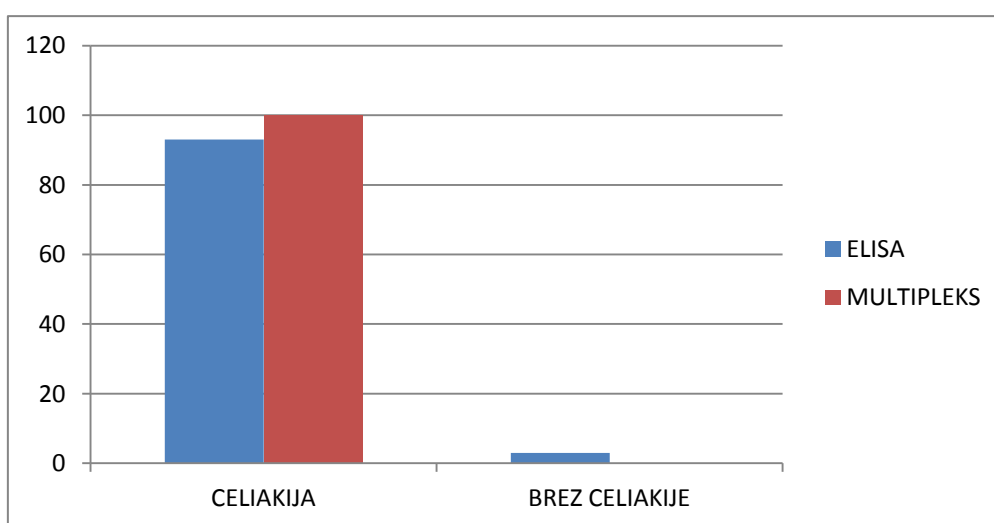
tTG	ELISA	MULTIPLEKS
IgA	42/76	44/76

4.2.2. Prisotnost protiteles proti tTG-IgA pri bolnikih s celiakijo in pri preiskovancih brez celiakije

Pri ELISA metodi smo dobili pozitiven rezultat na prisotnost anti-tTG pri 93% bolnikov s celiakijo ter pri 3% preiskovancev brez celiakije. Pri MULTIPLEKS metodi smo dobili pozitiven rezultat kar pri vseh bolnikih s celiakijo ter nobenega pozitivnega pri preiskovancih brez celiakije. (Preglednica VII, Slika 10)

Preglednica VII: Prisotnost Pt proti tTG pri preiskovancih s celiakijo brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

tTG-IgA	CELIAKIJA	BREZ CELIAKIJE
ELISA	(41/44) 93%	(1/32) 3%
MULTIPLEKS	(44/44) 100%	(0/32) 0%



Slika 10 : Prisotnost Pt proti tTG-IgA pri preiskovancih s celiakijo in brez celiakije pri ELISA in MULTIPLEKS metodi

4.3. REZULTATI DOLOČITVE EMA PRI BOLNIKI S CELIAKIJO IN PRI PREISKOVANCIH BREZ CELIAKIJE

V preiskovanih serumih smo določili tudi prisotnost EMA z metodo IIF. Pozitiven rezultat določitve EMA smo dobili v 98% pri bolnikih s celiakijo in pri 3% preiskovancev brez celiakije. Negativen rezultat smo dobili le pri 2% bolnikov s celiakijo in pri 97% preiskovancev brez celiakije. (Preglednica VIII)

Preglednica VIII: Rezultati določitve EMA pri bolnikih s celiakijo in preiskovancih brez celiakije

EMA	CELIAKIJA	BREZ CELIAKIJE
Pozitivno	(46/47) 98%	(1/32) 3%
Negativno	(1/47) 2%	(31/32) 97%

4.4. REZULTATI UJEMANJA DOLOČITVE AGA IN ANTI-tTG Z EMA GLEDE NA UPORABLJENO METODO

Vse dobljene rezultate smo primerjali tudi z rezultati EMA. Rezultati AGA-IgA ELISA so se ujemali z rezultati EMA le pri 33 vzorcih od 67. Ujemanje zasledimo pri 7 pozitivnih vzorcih in pri 26 negativnih vzorcih. Rezultati AGA-IgA MULTIPLEKS in EMA se ujemajo pri 37 vzorcih od 67, pri 10 pozitivnih in 27 negativnih vzorcih. Rezultati AGA-IgG ELISA so se ujemali z EMA pri 38 vzorcih od 67, pri 25 pozitivnih vzorcih in 13 negativnih vzorcih. Boljše ujemanje AGA-IgG glede na EMA smo zaznali pri MULTIPLEKS metodi. Ujemanje je bilo pri 45 vzorcih od 67 in sicer pri 34 pozitivnih vzorcih in pri 11 negativnih vzorcih. Rezultati anti-tTG ELISA so se ujemali z EMA pri 72 vzorcih od 76, pri 41 pozitivnih vzorcih in pri 31 negativnih vzorcih. V primeru anti-tTG MULTIPLEKS so se rezultati ujemali z EMA pri 74 vzorcih od 76, pri 43 pozitivnih vzorcih in pri 31 negativnih vzorcih. (Preglednica IX)

Preglednica IX: Rezultati ujemanja določitve AGA in anti-tTG z EMA glede na uporabljeno metodo

		EMA		EMA (+ in – skupaj)
		+	-	
AGA-IgA ELISA	+	7	1	33/67
	-	33	26	
AGA-IgA MULTIPLEKS	+	10	0	37/67
	-	30	27	
AGA-IgG ELISA	+	25	14	38/67
	-	15	13	
AGA-IgG MULTIPLEKS	+	34	16	45/67
	-	6	11	
tTG-IgA ELISA	+	41	1	72/76
	-	3	31	
tTG-IgA MULTIPLEKS	+	43	1	74/76
	-	1	31	

4.5. DIAGNOSTIČNA VREDNOST POSAMEZNIH PROTITELES NA OSNOVI DOBLJENIH REZULTATOV

Na podlagi resnično pozitivnih in resnično negativnih ter lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov smo izračunali diagnostično vrednost posameznih protiteles glede na metodo določanja.

4.5.1. Diagnostična vrednost AGA-IgA

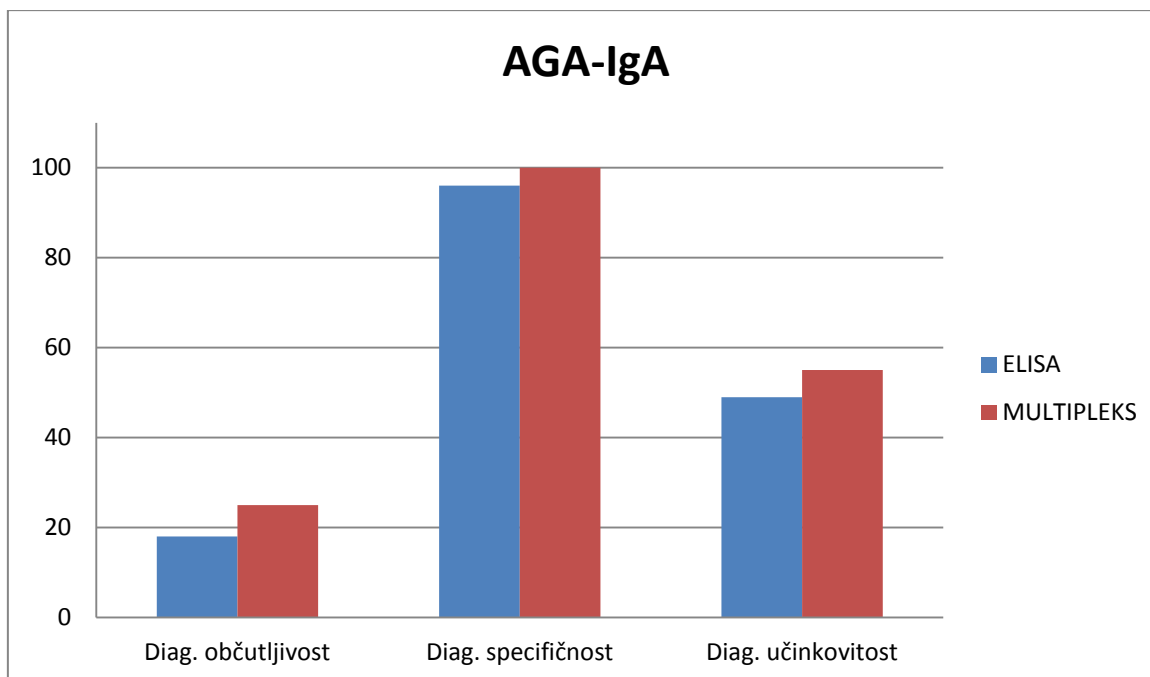
Iz parametrov, navedenih v preglednici X, smo izračunali diagnostično vrednost AGA-IgA glede na uporabljeno metodo. (Preglednica XI) Diagnostična občutljivost je bila pri obeh metodah nizka (18% pri ELISA ter 25% pri MULTIPLEKS metodi), medtem ko pri obeh metodah dobimo za ta serološki označevalec visoke vrednosti diagnostične specifičnosti (ELISA 96%, MULTIPLEKS 100%). Diagnostična učinkovitost AGA-IgA pri MULTIPLEKS metodi je tako 55%, pri ELISA metodi pa 49%.

Preglednica X: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje AGA-IgA

AGA-IgA	ELISA	MULTIPLEKS
RP=resnično pozitivni	7	10
RN=resnično negativni	26	27
LP= lažno pozitivni	1	0
LN=lažno negativni	33	30

Preglednica XI: Diagnostična vrednost AGA-IgA glede na metodo

AGA-IgA	ELISA	MULTIPLEKS
Diagnostična občutljivost	18%	25%
Diagnostična specifičnost	96%	100%
Diagnostična učinkovitost	49%	55%



Slika 11: Prikaz diagnostičnih vrednosti AGA-IgA glede na metodo

4.5.2. Diagnostična vrednost AGA-IgG

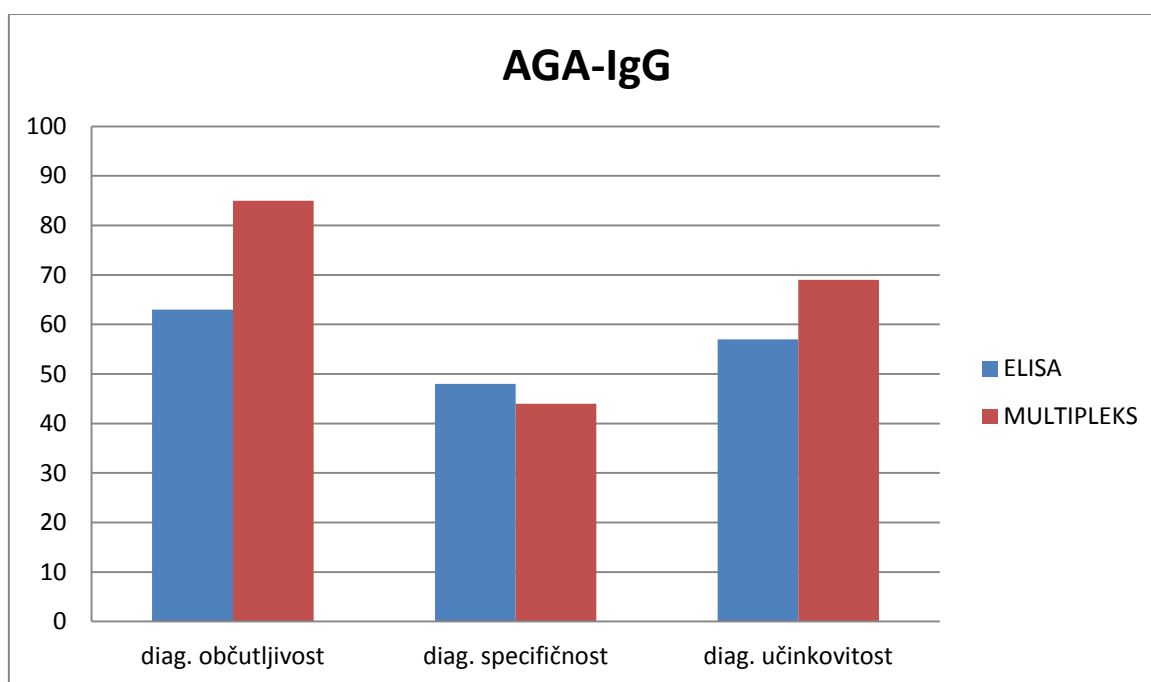
Iz parametrov, navedenih v preglednici XII, smo izračunali diagnostično vrednost AGA-IgG glede na uporabljeno metodo. (Preglednica XIII) Diagnostična občutljivost je bila pri MULTIPLEKS metodi višja (85%) kot pri ELISA metodi (63%), medtem ko pri obeh metodah dobimo nizke vrednosti diagnostične specifičnosti (ELISA 48%, MULTIPLEKS 44%). Diagnostična učinkovitost AGA-IgG pri MULTIPLEKS metodi je tako 69%, pri ELISA metodi pa 57%. (Slika 12)

Preglednica XII: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje AGA-IgG testa

AGA-IgG	ELISA	MULTIPLEKS
RP=resnično pozitivni	25	34
RN=resnično negativni	13	12
LP= lažno pozitivni	14	15
LN=lažno negativni	15	6

Preglednica XIII: Diagnostična vrednost AGA-IgG glede na metodo

AGA-IgG	ELISA	MULTIPLEKS
Diagnostična občutljivost	63%	85%
Diagnostična specifičnost	48%	44%
Diagnostična učinkovitost	57%	69%



Slika 12: Prikaz diagnostičnih vrednosti AGA-IgG glede na metodo

4.5.3. Diagnostična vrednost anti-tTG-IgA

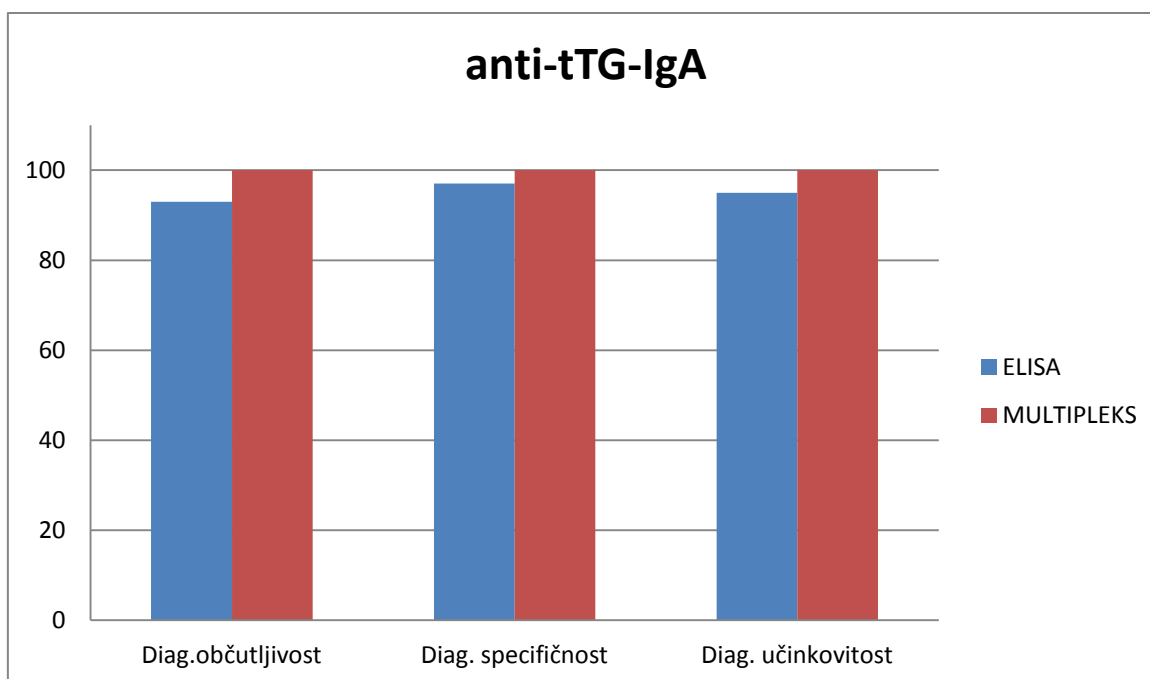
Iz parametrov, navedenih v preglednici XIV, smo izračunali diagnostično vrednost anti-tTG-IgA glede na uporabljeno metodo. (Preglednica XV) Diagnostična vrednost je zelo visoka, predvsem pri multipleks metodi, saj vsi izračunani parametri dajejo 100% rezultat. (Slika 13)

Preglednica XIV: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje anti-tTG-IgA glede na metodo

tTG-IgA	ELISA	MULTIPLEKS
RP=resnično pozitivni	41	44
RN=resnično negativni	31	32
LP= lažno pozitivni	1	0
LN=lažno negativni	3	0

Preglednica XV: Diagnostična vrednost anti-tTG-IgA glede na metodo

tTG-IgA	ELISA	MULTIPLEKS
Diagnostična občutljivost	93%	100%
Diagnostična specifičnost	97%	100%
Diagnostična učinkovitost	95%	100%



Slika 13: Prikaz diagnostičnih vrednosti anti-tTG-IgA glede na metodo

4.5.4. Diagnostična vrednost EMA

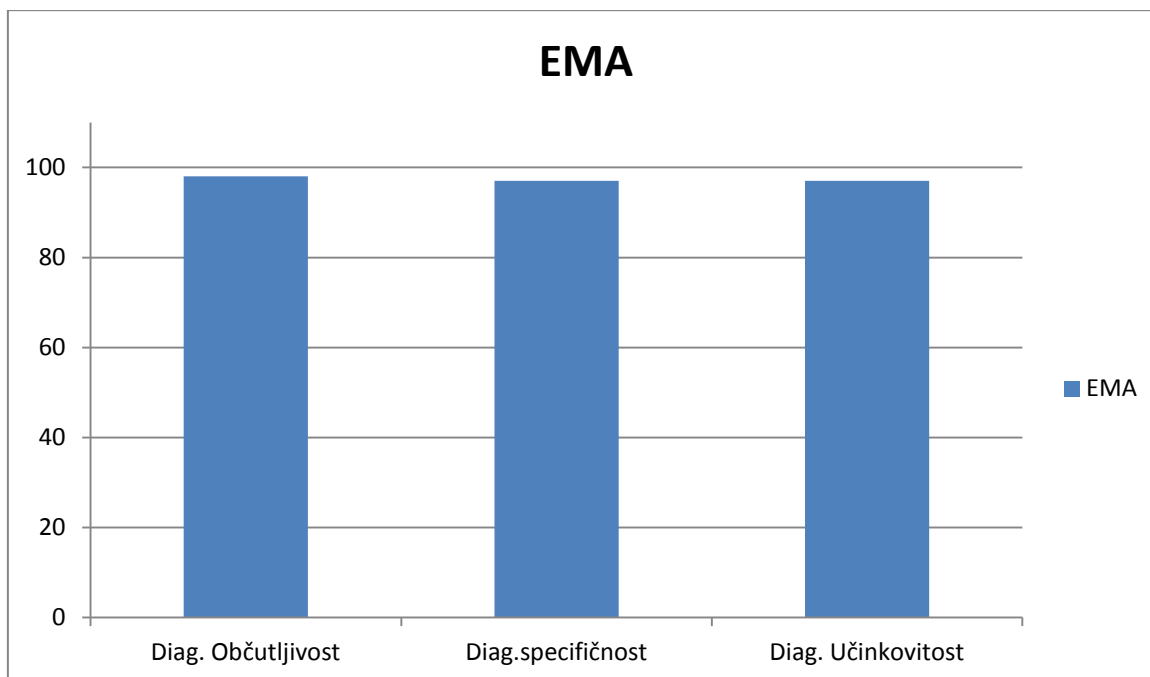
Iz parametrov, navedenih v preglednici XVI, smo izračunali diagnostično vrednost EMA. (Preglednica XVII) Diagnostična občutljivost je bila 98%, diagnostična specifičnost 97% in diagnostična učinkovitost 97%. (Slika 14)

Preglednica XVI: Posamezni parametri za diagnostično ovrednotenje EMA

EMA	IIF
RP=resnično pozitivni	46
RN=resnično negativni	31
LP= lažno pozitivni	1
LN=lažno negativni	1

Preglednica XVII: Diagnostična vrednost EMA

EMA	IIF
Diagnostična občutljivost	98%
Diagnostična specifičnost	97%
Diagnostična učinkovitost	97%

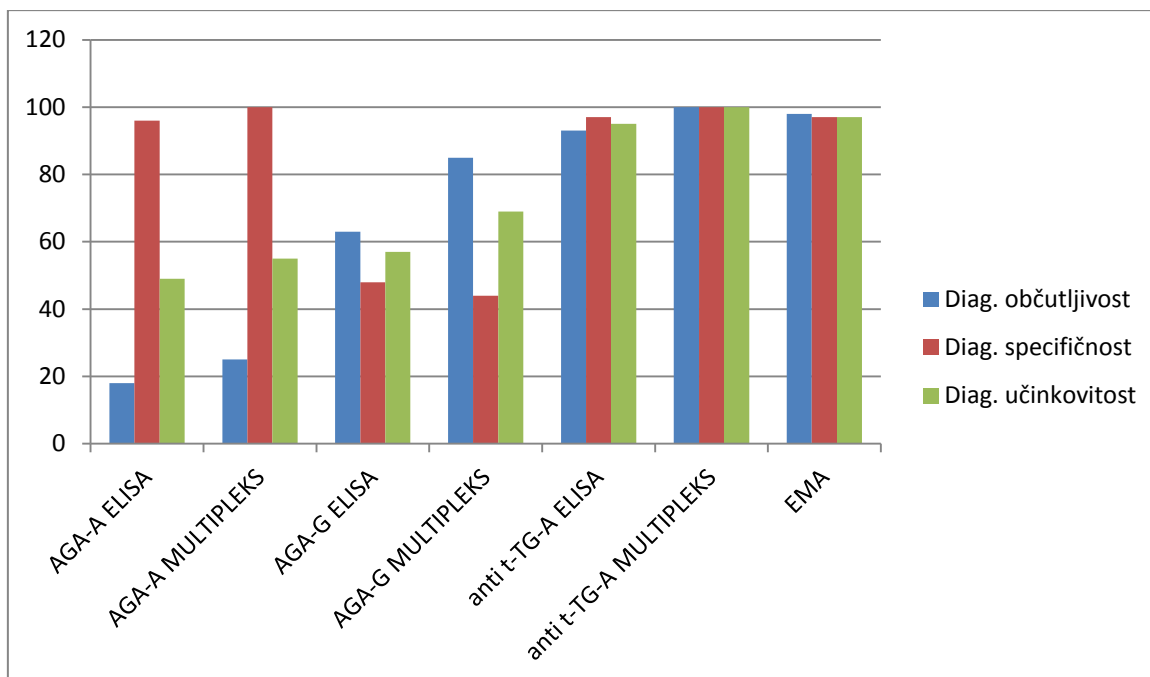


Slika 14: Prikaz diagnostične vrednosti EMA

Če torej primerjamo diagnostične vrednosti posameznih protiteles med seboj (Preglednica XVIII), vidimo, da je najbolj diagnostično občutljiv in diagnostično specifičen in s tem najbolj diagnostično učinkovit serološki označevalec anti-tTG IgA ob uporabi multipleks metode. Enako diagnostično specifičnost smo dobili tudi pri določitvi AGA IgA z multipleks metodo, vendar z zelo slabo diagnostično občutljivostjo, zato je njihova diagnostična učinkovitost zelo majhna. (Slika 15)

Preglednica XVIII: Diagnostična vrednost posameznih protiteles glede na uporabljeno metodo

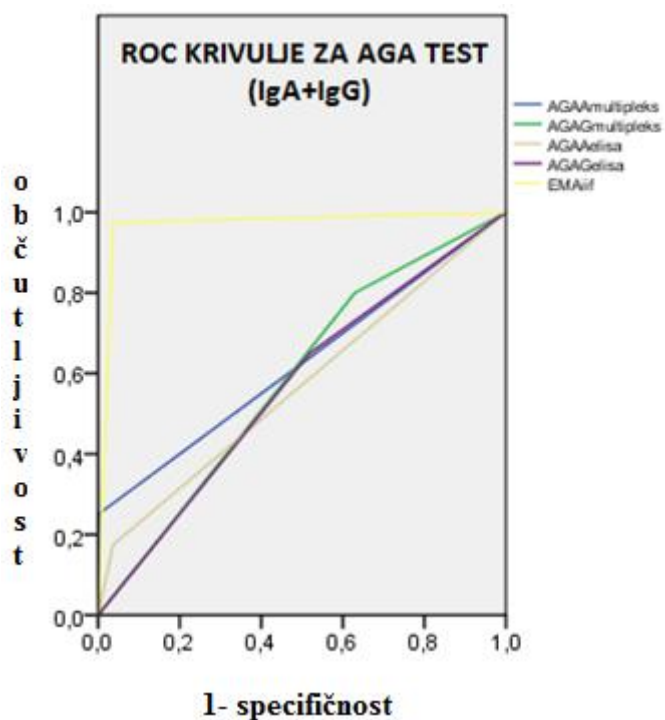
%	AGA-A <i>elisa</i>	AGA-A <i>multipleks</i>	AGA-G <i>elisa</i>	AGA-G <i>multipleks</i>	tTg-A <i>elisa</i>	tTg-A <i>multipleks</i>	EMA <i>IIF</i>
Diagnostična občutljivost	18	25	63	85	93	100	98
Diagnostična specifičnost	96	100	48	44	97	100	97
Diagnostična učinkovitost	49	55	57	69	95	100	97



Slika 15: Prikaz diagnostičnih vrednosti seroloških označevalcev glede na metodo

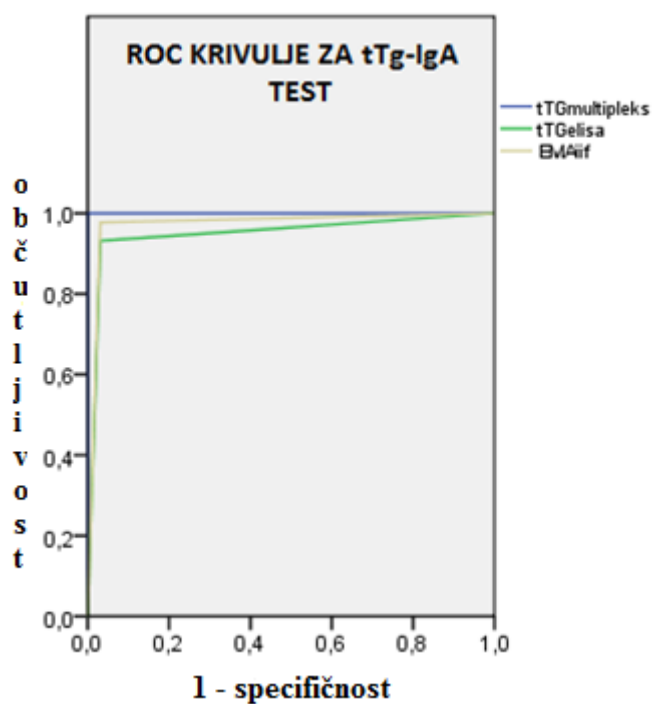
4.6. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

ROC krivulja ponazarja odnos specifičnosti in občutljivosti pri posameznem testu oz. metodi v obliki krivulje znotraj x/y sistema. Na y osi se tako nahaja občutljivost oz. resnično pozitivni rezultati, na x osi pa lažno pozitivni rezultati oz. 1-specifičnost. Test z dobro klinično zmogljivostjo dosega visoko občutljivost (veliko resnično pozitivnih rezultatov) in ima majhno število lažno pozitivnih rezultatov (visoka specifičnost). Pri testih z visoko diagnostično točnostjo se krivulja približa levemu gornjemu kotu, kjer imamo veliko število resnično pozitivnih rezultatov in majhno število lažno pozitivnih rezultatov. Bližje kot je krivulja zgornjemu levemu kotu, večja je diskriminacijska zmogljivost testa. Tako lahko vizualno ocenimo diagnostično točnost testa in primerjamo različne teste med seboj. (28)



Slika 16: ROC krivulje za AGA-IgA, AGA-IgG ter EMA

Iz slike 16 je razvidno, da se krivulja le pri EMA testu približa levemu gornjemu kotu in tako izkazuje večjo diskriminacijsko vrednost testa.



Slika 17: ROC krivulje za anti-tTG-IgA ter EMA

Na sliki 17 lahko vidimo, da se vse krivulje približajo levemu gornjemu kotu in tako izkazujejo veliko diskriminacijsko vrednost testov.

Točnost testa smo izrazili tudi kvantitativno in sicer s površino pod ROC krivuljo. Rezultate smo interpretirali glede na dane kriterije (0,90 - 1= izvrsten test, 0,80 - 0,90= dober test, 0,70 – 0,80= srednji test, 0,60 – 0,70= slabši test, 0,50 – 0,60= test brez uspeha). (29) Iz preglednice XIX je razvidno, da največjo površino pod ROC krivuljo zavzameta oba anti-tTG testa ter EMA test.

Preglednica XIX: Površine pod ROC krivuljo za posamezne serološke označevalce ob uporabi različnih metod

TESTI	POVRŠINA POD ROC KRIVULJO
AGA-IgA MULTIPLEKS	0,63
AGA-IgA ELISA	0,57
AGA-IgG MULTIPLEKS	0,59
AGA- IgG ELISA	0,57
EMA IIF	0,97
Anti-tTG-IgA MULTIPLEKS	1,00
Anti-tTG-IgA ELISA	0,95

5. RAZPRAVA

Celiakija je imunološko posredovana kronična bolezen tankega črevesja, ki nastane kot posledica uživanja glutena pri genetsko predisponiranih osebah. Pogostost bolezni se ocenjuje okrog 1% prebivalstva in prizadene ljudi vse starosti (2, 30, 31, 32). Tako visoka prevalenca je posledica vse večjega zavedanja in poznavanja te bolezni, prepoznavanja obolelih, ki imajo netipično obliko bolezni, dostopnost sodobnih diagnostičnih testov in presejevanje med rizičnimi skupinami. Pri bolnikih z netipično celiakijo je zelo težko postaviti diagnozo in zato je potrebno kombinirati več seroloških testov s histološkim pregledom biopsije sluznice tankega črevesja. Zlati standard pri postavljanju diagnoze celiakije je še vedno histološki pregled biopta sluznice tankega črevesja, čeprav so sodobni serološki testi visoko diagnostično specifični in občutljivi in predstavljajo temelj v diagnostičnem postopku celiakije (25, 26, 31, 32, 34).

V raziskavi smo nameravali preveriti, ali je novejša multipleks metoda za določitev seroloških označevalcev AGA in anti-tTG učinkovitejša od že uveljavljene encimsko imunske metode, saj ima kar nekaj tehničnih prednosti. Prednost multipleks metode je multipleksnost, kar pomeni istočasno merjenje različnih protiteles iz istega vzorca in s tem prihranek časa, vzorca ter stroškov, kar so ugotovitve tudi drugih raziskovalcev (35). Prav tako pri multipleks metodi poteka kalibracija znotraj posameznega vzorca, kar naj bi pripomoglo k bolj natančnemu in točnemu merjenju. Velika prednost je tudi v računalniškem prenosu rezultatov iz analizatorja v laboratorijski informacijski sistem, kar pa pri ročni (manualni) ELISA metodi ni možno in je potrebno rezultate ročno vpisovati v sistem, s tem pa se poveča možnost napake.

V nalogi smo posredno preko evaluacije rezultatov prisotnih protiteles v vzorcih, izračunanih diagnostičnih vrednosti posameznih protiteles, ki smo jih dobili preko določitve z različnimi metodami, primerjali uporabljene diagnostične teste in posredno metode med seboj.

Pri primerjavi rezultatov AGA-IgA dobljenih z ELISA in multipleks metodo smo dobili dobro ujemanje rezultatov. Rezultati so se ujemali v 93%, torej v 7% oz. v 5 primerih ni bilo ujemanja. V vseh teh petih primerih je bila potrjena celiakija. Multipleks metoda nam je dala pozitiven rezultat v 4 primerih, medtem ko smo z ELISA metodo dobili samo en pozitiven rezultat. Rezultati kažejo na večjo diagnostično občutljivost določitve AGA-IgA z multipleks metodo, saj smo z le to določili večjo število pozitivnih bolnikov z celiakijo in

nobenega preiskovanca AGA-IgA lažno pozitivnega med populacijo zdravih oz. brez celiakije. Medtem, ko je v primeru ELISA delež pravilno ugotovljenih pozitivnih rezultatov AGA-IgA manjši in je v enem primeru ugotovljen tudi lažno pozitiven vzorec. Pri primerjavi rezultatov AGA- IgG z metodama ELISA in multipleks nismo dobili tako primerljivih rezultatov kot pri AGA-IgA. Rezultati so se ujemali v 79%, v 21 % oziroma v 14 primerih se niso ujemali. Večinoma (v 13 primerih) je šlo za pozitivne rezultate pri multipleks metodi. Rezultati nakazujejo tudi v primeru AGA-IgG večjo diagnostično občutljivost določitve z multipleks metodo, kjer je bil odstotek pozitivnih vzorcev, pri preiskovancih s celiakijo, v primerjavi z ELISA prav tako večji. Diagnostična specifičnost določitve AGA-IgG z obema metodama pa je primerljiva. Razlike v določanju istega analita lahko nastanejo zaradi različnih metod določanja ter zaradi samega antigena, kjer problem predstavlja izolacija in očiščenje ustreznega antigena ter fiksacija le-tega na reakcijsko površino.

Najboljše ujemanje rezultatov obeh metod pa smo zasledili pri serološkem označevalcu anti-tTG-IgA in sicer so se rezultati ujemali kar v 95%, le v 5 % oziroma v 4 primerih je prišlo do neujemanja. Ko smo primerjali vzorce glede na skupne preiskave oziroma diagnozo smo ugotovili, da v vseh 4 primerih odstopajo rezultati pri ELISA testu: pri 3 vzorcih s potrjeno celiakijo smo dobili negativen rezultat in pri enem vzorcu pozitiven rezultat, čeprav ni bilo potrjene celiakije. Tudi rezultati določitve anti-tTG kažejo na večjo diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost določitve protiteles z multipleks metodo, saj smo tudi v tem primeru dobili večje število pravilno pozitivnih vzorcev pri bolnikih s celiakijo in nobenega lažno pozitivnega vzorca med preiskovanci brez celiakije. Rezultati določitve EMA z IIF so nakazali visoko diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost teh protiteles ob uporabljeni metodi IIF, ki je v serološki diagnostiki celiakije uveljavljena kot zlati standard (32, 36, 37). Le v enem primeru smo ugotovili prisotnost EMA pri preiskovancih brez celiakije in prav tako v le enem primeru nismo ugotovili prisotnosti EMA pri bolnikih s celiakijo.

Glede na postavljeno diagnozo smo na osnovi dobljenih rezultatov z obema metodama izračunali tudi diagnostično občutljivost, diagnostično specifičnost in diagnostično učinkovitost AGA-IgA, AGA-IgG in anti-tTG-IgA. Tako smo pri AGA-IgA potrdili v predhodnih rezultatih nakazano nizko diagnostično občutljivost teh protiteles pri obeh metodah (18% ELISA, 25% multipleks); pri čemer zasledimo višjo vrednost pri multipleks metodi. Ugotovljena nizka diagnostična občutljivost AGA-IgA je v naši raziskavi nekoliko

nižja od rezultatov že potrjenih študij, kjer je bila ugotovljena diagnostična občutljivost od 45 do 68% (38, 39). Nizka občutljivost teh protiteles je lahko posledica tudi IgA imunskega deficita, ki je zelo pogost pri celiakiji (40). Vendar bi to morali preveriti z določitvijo celokupnega IgA. Za AGA- IgA je značilno, da so visoko diagnostično specifična, saj nastajajo kot posledica imunskega odziva v sluznici. Pri ELISA metodi smo za AGA-IgA tako dobili 97% diagnostično specifičnost in pri multipleks metodi 100%, kar pa se ujema z rezultati drugih študij (38, 39). Na račun slabe diagnostične občutljivosti AGA-IgA je slaba tudi njena diagnostična učinkovitost, tako je 49% za ELISA in 55% za multipleks metodo. V vseh pogledih dobimo pri primerjavi rezultatov določitve AGA-IgA obeh metod boljše rezultate pri multipleks metodi.

Izračunane diagnostične vrednosti za AGA-IgG nakazujejo na boljšo diagnostično občutljivost AGA-IgG določenih z multipleks metodo in sicer je diagnostična občutljivost znašala 85%, pri ELISA metodi pa 63%. Diagnostična specifičnost AGA-IgG je bila pri ELISA metodi nekoliko boljša (48%) kot pa pri multipleks metodi (44%), vendar je na splošno pri obeh metodah slaba. Dobljeni rezultati se ujemajo z vrednostmi navedenimi v različnih literaturah (38, 39). Zaradi slabe diagnostične specifičnosti AGA-IgG se njihova uporaba omejuje (15, 41). Slaba diagnostična specifičnost je posledica prisotnosti teh protiteles tudi pri drugih obolenjih kot so: psoriza, hepatološke bolezni, juvenilni artritis in celo pri zdravi populaciji (15, 39, 42). Zaradi tako slabe diagnostične specifičnosti je slaba tudi diagnostična učinkovitost, ki je pri ELISA metodi 57% ter pri multipleks metodi 69%. Tudi v primeru določitve AGA-IgG se je nekoliko bolje odrezala multipleks metoda, predvsem kar se tiče diagnostične občutljivosti.

Rezultati izračunanih diagnostičnih vrednosti (diagnostična občutljivost in specifičnost) nam kažejo na visoko diagnostično učinkovitost anti-tTG v primeru obeh metod in s tem tudi njuno odlično primerljivost, kar pa lahko zasledimo tudi pri drugih študijah (27, 35). Pri čemer smo v naši študiji dobili celo 100% diagnostično učinkovitost v primeru določitve anti-tTG z multipleks metodo. Diagnostična občutljivost anti-tTG pri ELISA metodi je tako 93%, zaradi 3 lažno negativnih rezultatov. Gre za paciente s potrjeno celiakijo, ki so bili na dieti. Diagnostična specifičnost anti-tTG pri ELISA metodi je zelo dobra (97%), saj smo dobili le en lažno pozitiven rezultat in tako je diagnostična učinkovitost 95%. Pri določitvi anti-tTG z multipleks metodo pa nismo dobili nobenega lažnega rezultata, zato so vsi izračunani parametri 100%. Ti rezultati nakazujejo, da je multipleks metoda res zelo analitsko občutljiva metoda in da zelo hitro zazna prisotnost

analita. To pa je pomembno pri sledenju pacientov s celiakijo, saj nam ta rezultat pove ali se pacient drži stroge diete. Kajti značilnost protiteles kot seroloških označevalcev je, da z uvedbo diete in s tem odstranitvijo povzročitelja imunskih reakcij ter s tem nastanka protiteles, se le ta postopno prenehajo tvoriti in jih pri bolnikih z ustrezno dieto s časom več ne zaznamo.

Prav tako smo diagnostično ovrednotili tudi EMA glede na postavljeno diagnozo. Dobili smo en lažno pozitiven in en lažno negativen rezultat. Gre za pacienta s celiakijo na dieti, kjer nismo zaznali prisotnosti EMA ter za bolnika s KVČB, kjer je bila EMA pozitivna. Diagnostična občutljivost rezultatov EMA je tako 98%, specifičnost 97%, in učinkovitost 97%. Ti rezultati potrjujejo v literaturi in v praksi že potrjeno visoko diagnostično vrednost EMA za odkrivanje celiakije (43, 44). Prav tako smo primerjali ujemanje rezultatov EMA z rezultati ostalih seroloških označevalcev. Rezultati ujemanja z EMA kot pomembnim serološkim testom v diagnostiki celiakije so pokazali večje ujemanje določitve protiteles z multipleks metodo glede na ELISA v primeru vseh treh protiteles; v primeru AGA-IgA (37:33), v primeru AGA-IgG (45:38) in v primeru tTG-IgA (74:72). Primerljivost rezultatov je v primeru AGA, tako IgA kot IgG zelo slaba in zelo dobra v primeru anti-tTG. Rezultati določitve anti-tTG z ELISA metodo so se ujemali z rezultati EMA v 95%, v 4 primerih smo zasledili neujemanje. To neujemanje zasledimo pri mejno pozitivnih rezultatih EMA, kjer pa nam je anti-tTG z ELISA metodo dal negativne vrednosti. Na osnovi izkušenj v rutinski diagnostiki in po pregledu primerov opazimo, da so to vrstni primeri pogosti pri bolnikih s celiakijo, ki so na dieti. Pri multipleks metodi določitve anti-tTG se rezultati ujemajo z EMA kar v 97%, le v dveh primerih opazimo neujemanje. V enem primeru gre za pacienta s celiakijo na dieti in s to metodo dobimo pozitivno vrednost, medtem ko pa nam EMA da negativen rezultat. V drugem primeru gre za bolnika s KVČB, pri katerem protiteles proti tTG z multipleks metodo nismo določili, ugotovili pa smo prisotna EMA. Zelo dobra primerljivost določitve anti-tTG izhaja iz dejstva sorodnosti antigenih determinant tTG in EMA. Kajti tTG je eden najpomembnejših, če ne edini antigen endomizija, ki služi kot antigen v primeru antigenih substratov določitve EMA (45).

Pri pregledu izračunanih diagnostičnih vrednosti posameznih protiteles, ki smo jih določili z tremi različnimi metodami, smo opazili, da je najvišja diagnostična vrednost bila izračunana v primeru določitve anti-tTG-IgA z multipleks metodo. Njena diagnostična občutljivost, diagnostična specifičnost in učinkovitost je bila 100% in tako celo boljša od

diagnostične učinkovitosti EMA IIF, kot v serološki diagnostiki uveljavljenega serološkega testa izbora za opredelitev celiakije. 100% diagnostično specifičnost smo dobili tudi pri določitvi AGA-IgA z multipleks metodo, vendar smo v tem primeru dobili zelo slabo diagnostično občutljivost, kar pa ima za posledico slabo diagnostično učinkovitost. Glede na dobljene rezultate je diagnostična učinkovitost antigliadinskih protiteles dosti slabša od diagnostične učinkovitosti anti-tTG in EMA, zato se uporaba AGA omejuje zgolj na določene primere (15, 39, 42, 46). Antigliadinska protitelesa razreda IgG je smiselno določevati pri osebah z IgA imunodeficienco. Določamo pa lahko tudi anti-tTG-IgG, ki so prav tako namenjeni odkrivanju bolnikov s celiakijo, ki imajo IgA imunodeficienco. Najnovejša merila NASPGHAN ne priporočajo več uporabe protiteles AGA in dajejo prednost protitelesom tTG in EMA, medtem ko pa se pri merilih ESPGHAN niso tako jasno opredelili glede uporabe testov.(2)

Tudi rezultati statistične obdelave dobljenih podatkov, na osnovi ROC krivulj in izračunanih površin pod ROC krivuljo nam dokazujejo, da so izračunane vrednosti površin pod ROC krivuljo primerljive, vendar višje v primeru določitve primerljivih protiteles z multipleks metodo glede na ELISA metodo. Najvišje vrednosti površin pod ROC krivuljo zasledimo v primeru določitve anti-tTG-IgA z multipleks metodo (1,00) in EMA (0,97), kar nakazuje, da imajo ti diagnostični testi visoko diagnostično točnost in zelo dobro razlikujejo med bolniki s celiakijo in med osebami, ki nimajo celiakije. Pri statistični obdelavi AGA z obema metodama pa smo glede na obliko ROC krivulje in površine pod ROC krivuljo (0,57-0,63) opazili, da je diskriminacijska zmogljivost teh diagnostičnih testov zelo slaba in zato slabo razlikujejo med osebami s celiakijo in brez celiakije.

Dobljeni rezultati v naši študiji dokazujejo, da so rezultati določitve AGA-IgA, AGA-IgG in anti-tTG-IgA, ki smo jih določili z metodo ELISA in metodo multipleks, primerljivi. Pri čemer je tako diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost ter s tem diagnostična učinkovitost v primeru AGA-IgA in anti-tTG z multipleks metodo celo višja. Presenetljive rezultate smo dobili tudi ob primerjavi seroloških označevalcev določenih z omenjenima metodama z EMA ob uporabi metode IIF, ki predstavlja kot že omenjeno zlati standard v serološki diagnostiki celiakije. V primerjavi z rezultati EMA smo v primeru anti-tTG- IgA z multipleks metodo dobili celo višje diagnostične vrednosti (diagnostična občutljivost, diagnostična specifičnost, diagnostična učinkovitost) in sicer 100%. Tako lahko zaključimo, da je nova multipleks metoda za določitev AGA, anti-tTG-IgA lahko odlična

zamenjava za obstoječo ELISA metodo ter primerna in uporabna v rutinski serološki diagnostiki celiakije.

Pri pregledu literature smo zasledili malo študij, ki opisujejo primerjavo rezultatov seroloških markerjev v diagnostiki celiakije določenih z metodama ELISA in multipleks. Primerjali so rezultate določitve protiteles proti tkivni transglutaminazi ter protiteles proti deamidiranemu gliadinskemu peptidu (27, 35), medtem ko primerjave določitve antigliadinskih protiteles z omenjenima metodama nismo zasledili. V obeh primerih so prav tako kot mi prišli do zaključkov, da je multipleks metoda učinkovitejša pri določevanju omenjenih seroloških markerjev v diagnostiki celiakije in je dobra zamenjava za ELISA.

6. SKLEPI

- Glede na dobljene rezultate primerjave izračunanih diagnostičnih vrednosti protiteles AGA in tTG ter na podlagi ujemanja rezultatov sklepamo, da je metoda MULTIPLEKS primerljiva z ELISA metodo, saj dobimo podobne rezultate. Ujemanje rezultatov je tako pri AGA-IgA 93%, pri AGA-IgG 79% ter pri anti-tTG 95%.
- Multipleks metoda se je pri vseh testih izkazala kot diagnostično občutljivejša, bolj diagnostično specifična ter bolj učinkovita kot ELISA metoda (tudi EMA). Predvsem zasledimo boljšo diagnostično občutljivost (AGA-IgA: 25/18, AGA-IgG: 85/63, anti-tTG-IgA: 100/93), kar pa poveča diagnostično učinkovitost testa.
- Primerljivost ujemanja rezultatov z EMA je bila z obema metodama podobna oziroma pri multipleks metodi dobimo nekoliko boljše rezultate. Tako je ujemanje z AGA-IgA pri multipleks metodi 55%, pri ELISA metodi 49%, AGA-IgG: multipleks 67%, ELISA 57%, tTG-IgA: multipleks 97%, ELISA 95%.
- Protitelesa proti tTG določena z ELISA in multipleks metodo in EMA imajo visoko diagnostično točnost, kar lahko razberemo iz površine pod ROC krivuljo (0,95 – 1,00) in zato zelo dobro razlikujejo med bolniki s celiakijo in med osebami, ki nimajo celiakije.
- Pri AGA smo z obema metodama ugotovili, da je diskriminacijska zmogljivost teh protiteles z uporabljenima metodama slaba, saj je bila površina pod ROC krivuljo od 0,57 do 0,63.
- Rezultati potrjujejo, da je nova multipleks metoda za določitev AGA in anti-tTG-IgA lahko odlična zamenjava za ELISA metodo ter primerna in uporabna v rutinski serološki diagnostiki celiakije.

7. LITERATURA

1. Markovič S: Bolezni požiralnika, želodca in črevesa. V: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, Littera picta, Ljubljana, 2005: 510-512
2. Dolinšek J, Urlep Žužej D, Mičetić Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije. Zdravniški vestnik, 2006; 75, 2: 89-97
3. Tušek Bunc K: Celiakija v ambulanti zdravnika družinske medicine. V: Celiakija: glasilo slovenskega društva za celiakijo, 2006: 5
4. Mičetić-Turk D.: Celiakija nekoč in danes. V: Celiakija danes: zbornik prispevkov 1. Slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji, Slovensko društvo za celiakijo, Maribor, 2002 : 8-12
5. Rijavec B: Celiakija (glutenska enteropatija) - najpogosteje zanemarjena malabsorpcijska bolezen človeka s prikazom dveh primerov. V: Zbornik srečanja združenja pnevmologov Slovenije, 90 let bolnišnice Topolšica, Velenje 2009
6. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR: The immune recognition of gluten in coeliac disease. Clin Exp Immunol 2005; 140: 408-416
7. Koning F: Toxicity of prolamins in celiac disease. International Coeliac Disease Meeting, Maribor, University Medical Center, 2007: 49-54
8. Helms SND: Celiac disease and Gluten–Associated Diseases. Alternative Medicine Review Volume 10, Number 3, Copyright© 2005 Thorne Research: 172-186
9. Izzivi družinske medicine : učno gradivo : Zbornik seminarjev študentov Medicinske fakultete Univerze v Mariboru, Ljubljana : Zavod za razvoj družinske medicine, 2007. - (Družinska medicina ; 2007, 5. Supplement ; 6);53-62
10. Češnovar T: Prehranski vnos pri otrocih s celiakijo (glutensko enteropatijo). Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta - diplomsko delo, Ljubljana 2008

11. Sollid LM, Khosla C: Future therapeutic options for celiac disease. Nature clinical practice: Gastroenterology & hepatology, Nature Publishing Group 2005; 140-147
12. Dolinšek J, Urlep D, Mičetić-Turk D: Diagnostična merila za celiakijo. V: Celiakija danes: zbornik prispevkov 1. Slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji, Slovensko društvo za celiakijo, Maribor, 2002: 60-67
13. Sedmak M.: Atipična celiakija. V: Celiakija danes: : zbornik prispevkov 1. Slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji, Slovensko društvo za celiakijo, Maribor, 2002: 13-18
14. Simell S: Natural history of celiac disease-associated antibodies and progression to overt disease in children at increased genetic risk, University of Turku, Turku 2010 (<http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/66231/AnnalesD936Simell.pdf?sequence=1>) datum zadnjega ogleda strani: 06.12.2011
15. Homšak E, Gorenjak M: Pojav protiteles pri celiakiji - Osnova sodobne laboratorijske diagnostike. V: Celiakija danes: : zbornik prispevkov 1. Slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji, Slovensko društvo za celiakijo, Maribor, 2002: 54-59
16. Sulkanen S, Halltunen T, Laurila K, Kolho KL, Karponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M: Tissue transglutaminase Autoantibody Enzyme-Linked Immunosorbent in detecting Celiac Disease. Gastroenterology 1998; 115:1322-1328
17. Priložena navodila reagentom α - Gliatest[®] S IgA, Eurospital SpA, Trst, 2008-2009
18. Priložena navodila reagentom α - Gliatest[®] S IgG Eurospital SpA, Trst, 2008-2009
19. Priložena navodila reagentom Eu-tTG[®] IgA umana, Eurospital SpA Trst, 2008-2009
20. Priložena navodila Athena Multi-Lyte[®] Celiac IgA Plus Assay, Zeus Scientific, USA 2010-2011
21. Priložena navodila Athena Multi-Lyte[®] Celiac IgG Plus Assay, Zeus Scientific, USA 2010-2011

22. Homšak E, Gorenjak M: Diagnostična vrednost avtoprotiteles posamično in v panelu V: Merjenje imunosti od molekule do bolnika : enodnevno podiplomsko izobraževanje iz laboratorijske biomedicine, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007; 71 – 76
23. Lothar T: Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results, 1st ed, TH- Books, Frankfurt, 1998: 1457-1463
24. Adamič Š: Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani-Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1995:116-120
25. Barbarić I: Diagnostički testovi za celiakiju. Medicina, 2009, 45: 44-48
26. Potočnik A: Uporabnost hitrega testa za dokazovanje protiteles proti tkivni transglutaminazi v diagnostiki celiakije. Študentska raziskovalna naloga, Medicinska fakulteta Maribor, Maribor 2010
27. Lochman, I, Martis P, Burlingame, R. W. and Lochmanová A: Multiplex Assays to Diagnose Celiac Disease. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007, 1109: 330–337
28. NCCLS: Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots; Approved Guideline. NCCLS document GP10-A (ISBN 1-56238-285-3). NCCLS,940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, 1995
29. Kujundžić Tiljak M: Znamo li protumačiti najčešće statističke pokazatelje, Medical Information Conference Croatia (MICC) 2006 (<http://smk.mef.unizg.hr/micc/06kujun.ppt>) datum zadnjega ogleda: 03.10.2011
30. Mcl Mowat A: Coeliac disease – a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry: rapid review. Lancet 2003; 361: 1290-92
31. Ludvigsson JF, Green PH: Clinical management of coeliac disease. J Intern Med. 2011; 269(6):560-71
32. Green PH, Cellier C: Celiac disease. N Engl J Med. 2007; 357(17):1731-43

33. Setty M, Hormaza L, Guandalini S: Celiac disease: risk assessment, diagnosis, and monitoring. *Mol Diagn Ther.* 2008; 12(5):289-98
34. Lindfors K, Koskinen O, Kaukinen K: An update on the diagnostics of celiac disease. *Int Rev Immunol.* 2011; 30(4):185-96
35. Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA: Combination testing for antibodies in the diagnosis of coeliac disease: comparison of multiplex immunoassay and ELISA methods. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 28(6):805-13
36. Chan AW, Butzner JD, McKenna R, Fritzler MJ. Tissue transglutaminase enzyme-linked immunosorbent assay as a screening test for celiac disease in pediatric patients. *Pediatrics.* 2001; 107(1):E8
37. Samaşca G, Iancu M, Farcău D, Butnariu A, Pop T, Pîrvan A, Andreica M, Miu N, Cristea V, Dejica D. IgA anti-tissue transglutaminase antibodies, first line in the diagnosis of celiac disease. *Clin Lab.* 2011; 57(9-10):695-701
38. Murray J, Herlein J, Mitros F, Goeken J: Serologic Testing for Celiac Disease in the United States: Results of a Multilaboratory Comparison Study. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(4): 584–587
39. Reeves GE, Squance ML, Duggan AE, Murugasu RR, Wilson RJ, Wong RC, Gibson RA, Steele RH, Pollock WK: Diagnostic accuracy of coeliac serological tests: a prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 18(5):493-501
40. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Cataldo F, Bottaro G, Corazza G: Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut.* 1998; 42(3): 362–365
41. Bottaro G, Volta U, Spina M, Rotolo N, Sciacca A, Musumeci S: Antibody pattern in Childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 559-62
42. Hopper AD, Hadjivassiliou M, Hurlstone DP, Lobo AJ, McAlindon ME, Egner W, Wild G, Sanders DS: What is the role of serologic testing in celiac disease? A prospective, biopsy-confirmed study with economic analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008; 6(3):314-20

43. Carroccio A, Vitale G, Di Prima L, Chifari N, Napoli S, La Russa C et al.: Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: a prospective study. *Clin Chem.* 2002; 48(9):1546-50
44. Corrao G, Corazza G R, Andreani M L, Torchio P, Valentini R A, Galatola G et al: Serological screening of coeliac disease: choosing the optimal procedure according to various prevalence values. *Gut.* 1994; 35(6): 771–775
45. Dietrich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Ricken E O, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine.* 1997; 3(7): 797-801
46. Rostom A, Dube C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, et al: The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128: S38-46