

Usporedba dvije metode za određivanje autoantitijela na tkivnu transglutaminazu tipa IgA i autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide tipa IgG

Jurić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:291401>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Jurić

**USPOREDBA DVIJE METODE ZA ODREĐIVANJE
AUTOANTITIJELA NA TKIVNU TRANSGLUTAMINAZU
TIPA IgA I AUTOANTITIJELA NA DEAMIDIRANE
GLIJADINSKE PEPTIDE TIPA IgG**

Završni rad

Split, 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Jurić

**USPOREDBA DVIJE METODE ZA ODREĐIVANJE
AUTOANTITIJELA NA TKIVNU TRANSGLUTAMINAZU
TIPA IgA I AUTOANTITIJELA NA DEAMIDIRANE
GLIJADINSKE PEPTIDE TIPA IgG**

**COMPARISON OF TWO METHODS FOR
DETERMINING AUTOANTIBODIES TO TISSUE
TRANSGLUTAMINASE TYPE IgA AND
AUTOANTIBODIES ON DEAMIDATED GLIADIN
PEPTIDE TYPE IgG**

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Dr. sc. Leida Tandara, spec. med. biokemije

Split, 2017.

KRATICE

ALBIA	engl. addressable laser bead immunoassay
Anti- DGP	protutijela na deamidirane glijadinske peptide
Anti- tTG	protutijela na tkivnu transglutaminazu
CLIA	engl. chemiluminescence immunoassays
CV	engl. the coefficient of variation
DGP	deamidirani glijadinski peptidi
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	endomizijska protutijela
ESPGHAN	Europsko društvo za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu (engl. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition)
FEIA	engl. fluoro Enzyme Immuno Assay
HLA	humani leukocitni antigen
KV	koeficijent vjerojatnosti
Rht tTG	humana rekombinantna tkivna transglutaminaza
RLU	engl. Relative Light Units
TAT	engl. turn around time
Th1	T pomagačke stanice tipa 1 (engl. T helper type 1)
tTG	tkivna transglutaminaza

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Celijakija.....	1
1.2. Epidemiologija celijakije.....	2
1.3. Oblici celijakije.....	3
1.4. Gluten.....	4
1.5. Bezglutenska prehrana.....	5
1.6. Patogeneza celijakije.....	7
1.7. Dijagnostika celijakije.....	7
1.8. Autoantitijela na tkivnu transglutaminazu.....	13
1.9. Autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide.....	13
2. CILJEVI	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Ispitanici i metode.....	15
3.1.1. ELISA test za određivanje autoantitijela na tkivnu transglutaminazu.....	16
3.1.2. ELISA test za određivanje autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide.....	16
3.1.3. CLIA metoda za određivanje autoantitijela na tkivnu transglutaminazu.....	17
3.1.4. CLIA metoda za određivanje autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide.....	17
3.2. Verifikacija semikvantitativnih imunokemijskih metoda.....	18
3.2.1. Preciznost.....	18
3.2.2. Usporedba s drugom metodom.....	18
3.3. Instrumenti.....	19
3.3.1. ETI-MAX 3000.....	19
3.3.2. IDS.....	19
4. REZULTATI	20
4.1. Procjena preciznosti anti-tTG IgA - IDS.....	20
4.1.1. Preciznost u seriji.....	20
4.1.2. Preciznost iz dana u dan.....	21

4.2.	Procjena preciznosti anti-DPG IgG - IDS.....	22
4.2.1.	Preciznost u seriji	22
4.2.2.	Preciznost iz dana u dan	23
4.3.	Usporedba rezultata anti-tTG IgA ELISA (Inova) - CLIA (IDS).....	24
4.4.	Usporedba rezultata anti-DPG IgG ELISA (Inova) - CLIA (IDS)	26
5.	RASPRAVA	28
6.	ZAKLJUČCI	29
7.	LITERATURA	30
8.	SAŽETAK	32
9.	SUMMARY	34
10.	ŽIVOTOPIS	36

1. UVOD

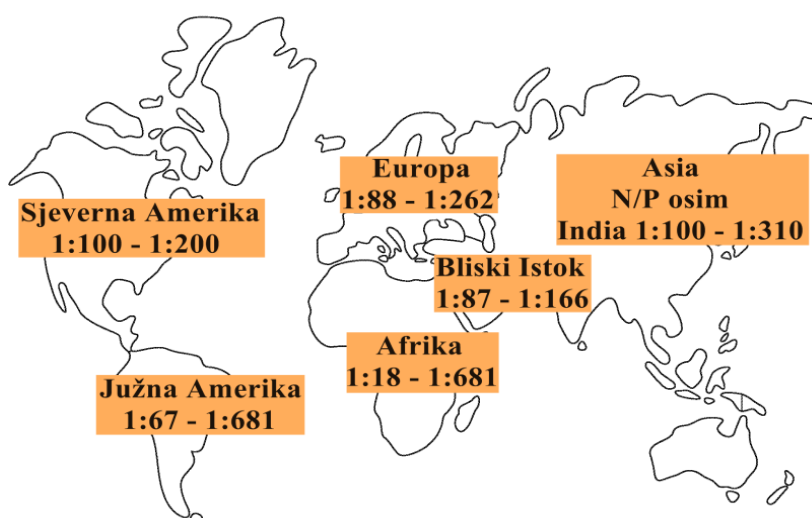
1.1. Celijakija

Celijakija (grč. κοιλιακός – trbušni) (1) ili glutenska enteropatija je autoimuna bolest crijeva tj. kronična upalna bolest tankog crijeva. Imunološka reakcija je potaknuta prisutnošću glutena u hrani u genetski predisponiranih osoba (2). Najstariji pronađeni opis celijakije potječe iz 2. stoljeća poslije Krista, a dao ga je grčki liječnik Aretej iz Kapadokije. Gluten tek 1950. godine postaje glavna karika patologije bolesti, a 1988. godine je u članku „On the coeliac affection“ Samuel Gee dao prvi klasični opis celijakije. Do spoznaje dolazi nizozemski pedijatar Wim Dicke koji u svojoj disertaciji opisuje kako isključenje žitarica iz prehrane kod djece rezultira poboljšanjem bolesti, ali i kako ponovno uzimanje brašna i proizvoda pripremljenih od brašna dovodi do recidiva. Pedijatrica Charlotte Anderson je laboratorijski potvrdila opažanja nizozemskog pedijatra (1). Upala rezultira poremećajem apsorpcije hranjivih tvari do koje dolazi zbog oštećenja i atrofije crijevnih resica. Gluten je mješavina proteina koja je prisutna samo u žitaricama (pšenica, ječam, raž). Dijeli se u dvije frakcije s obzirom na topljivost – glijadine topljive u alkoholu i glutenine topljive u vodi. Celijakija je autoimuna bolest probavnog trakta, a pogađa genetski predisponirane osobe. Povezana je s HLA (human leukocyte antigen) genima razreda II glavnog sustava tkivne podudarnosti. Velik broj oboljelih od celijakije, njih 90-95%, nosioci su DQ2 haplotipa, a ostalih 10% oboljelih nosioci su DQ8 haplotipa. Celijakija se najčešće pojavljuje u djetinjstvu (prije 6. godine) i između 30. – 40. godine. Homozigoti za DQ2 alele povezuju se s ranom ekspresijom klasičnog oblika bolesti. Simptomi mogu biti različiti. Klinička slika kao ni simptomi celijakije ne moraju biti specifični što može otežati njenu dijagnostiku (3)(4). Kod dojenčadi prestanak dojenja, tj. uvođenje žitarica u svakodnevnu prehranu djeteta dovodi do početnih simptoma celijakije. Klasični simptomi su abdominalne tegobe u koje spadaju proljev, gubitak tjelesne težine, izbočen i napet trbuh, povraćanje, nadutost i blijeda stolica neugodnog mirisa. Moguće je pojavljivanje generalizirane hipotonije i distenzije abdomena praćeno čestim, masnim i obilnim stolicama kao i opstipacija i rektalni prolaps. U predškolskoj i školskoj dobi najčešći simptomi su niski rast, sideropenična anemija i rahitis te je moguća pojava zakašnjelog puberteta (12). Atipične simptome češće uočavamo u kasnijoj životnoj dobi, a to su anemija, herpetiformni

dermatitis, niski rast, poremećaj funkcije štitnjače, zakašnjeni pubertet, kronični umor, hipoplazija zubne cakline i neplodnost. Nadalje, autoimuni tireoiditis, dijabetes tipa I, selektivni nedostatak IgA, autoimune bolesti jetre, Down sindrom, Turner sindrom i Williams sindrom česta su stanja pridružena celijakiji (3)(4).

1.2. Epidemiologija celijakije

Celijakija se u početku smatrala bolešću osoba bijele rase te se čak nazivala bolešću Starog kontinenta, no otkriveno je da ipak nije nužno ograničena na Stari kontinent već je raširena po cijelom svijetu. Prvi epidemiološki podaci govore da se prevalencija kretala između 1:4000 - 1:8000 osoba. Međutim, to nije vjerodostojan pokazatelj jer se u navedenu statistiku ubrajali samo bolesnici s klasičnim kliničkim simptomima. Razvojem visoko osjetljivih i specifičnih seroloških testova povećan je broj različitih novootkrivenih vrsta simptomatskih, ali i asimptomatskih kliničkih slika celijakije. Nova saznanja epidemioloških studija nakon uvođenja kombinacije seroloških testova i patohistološke dijagnostike idu u prilog povećanju incidencije celijakije 1:96 -1:184. Dakle, prema najnovijim spoznajama prevalencija celijakije u svijetu iznosi približno 1% (12). Celijakija se dugo godina smatrala dječjom bolešću, ali je daljnjim istraživanjima dokazano da se može razviti u svakoj životnoj dobi. Razdoblje potrebno za prepoznavanje kliničkog stanja celijakije u odrasloj dobi iznosi u prosjeku 11-19 godina. Rizik od pojave bolesti za rođake u prvom koljenu iznosi 1:10, a u drugom koljenu 1:40 (1)(14).



Slika 1.

Prikaz prevalencije celijakije u svijetu

*N/P – nije prihvaćeno

Izvor:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3496881/>

1.3. Oblici celijakije

Tipična celijakija ima klasične simptome. Najčešće se pojavljuje u djece od 6. mjeseca do 2. godine života. Dijete može postepeno poprimiti karakterističan “žabljji izgled” kojeg opisuje veliki trbuh i mršavi ekstremiteti.

Tiha celijakija je asimptomatsko stanje s atrofičnom sluznicom tankog crijeva. Tiha celijakija se najčešće otkriva screeningom ili među rodbinom oboljelih od tipične celijakije

Latentna celijakija je stanje populacije koje zbog pozitivnog HLA nalaza ili pozitivne obiteljske anamneze ima sklonost razviti celijakiju u budućnosti, ali nije prisutna atrofija sluznice tankog crijeva. Okolišni čimbenici, druga bolest tankog crijeva ili izloženost glutenu mogu uzrokovati razvoj bolesti.

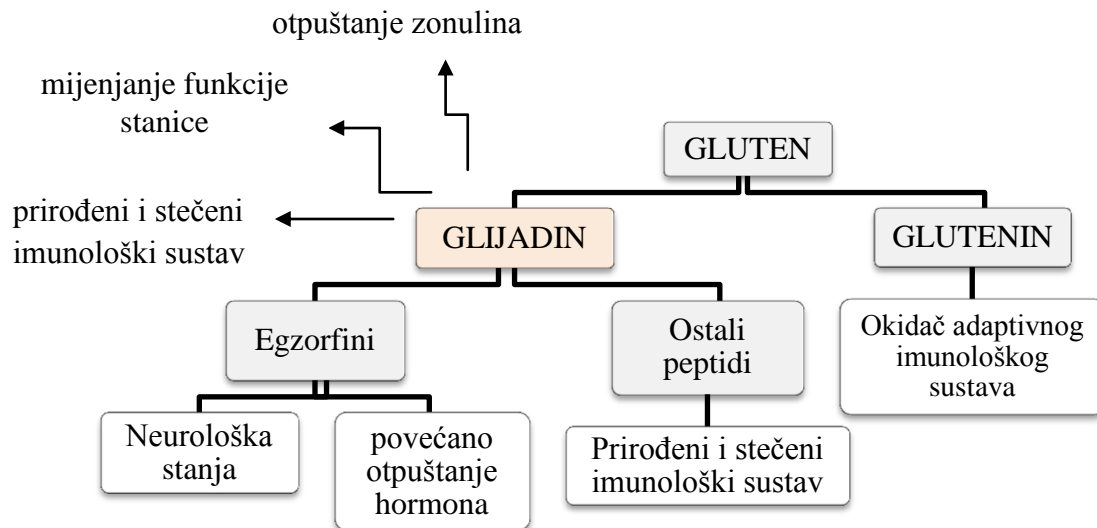
Refraktorna celijakija je stanje kada se i nakon dvije godine bezglutenske prehrane simptomi i klinička slika pacijenta ne poboljšavaju. Uglavnom je uzrokovana pogrešnom bezglutenskom prehranom, te je treba pratiti kako ne bi došlo do komplikacija. Najveći problem predstavlja neliječena celijakija koja može dovesti do razvoja malignih bolesti (3)(4)(12)(14).

Tablica 1. Tipične i atipične karakteristike kliničke slike celijakije (12)

Tipična klinička slika	Atipična klinička slika
Proljev	Anemija s nedostatkom željeza
Povraćanje	Oštećenje zubne cakline
Povećan trbuh	Herpetiformni dermatitis
Nenapredovanje/gubitak težine	Nizak rast
Bljedoća	Sterilitet
Gubitak apetita	Ponavljajući bolovi u kostima i trbuhu
Neuhranjenost	Ponavljajuće afte
Otok potkoljenica	Povišeni jetreni enzimi

1.4. Gluten

Pšenica se pojavila na području današnje Turske, Palestine, Libanona i sjevernog Iraka. Uzgoj žitarica nije bio organiziran već se mnogo vrsta divljih žitarica spontano pojavljivalo i širilo plodnim područjima. Potaknuti velikim pristupačnim količinama, ljudi su naučili obrađivati pšenicu i pripremljati jela te je tako započelo razdoblje povećanog unosa glutena, posebice prehranom temeljenoj na pšenici i ječmu. Na taj način su antigeni pšenice i ječma po prvi put došli do probavnog sustava čovjeka. Ključni korak u novoj prehrani je bio da se gastrointestinalni sustav čovjeka prilagodi tj. da se upozna s novom antigenom stimulacijom. Problemi su se pojavili u djelu populacije čija je genetska predispozicija razvila nepodnošljivost glutena (1). Gluten je zajednički naziv grupe proteina te se sastoji od glijadina i glutenina koji se nalaze u endospermu pšenice i srodnih žitarica. Glijadin se smatra glavnim uzročnikom celijakije dok glutenin nema nikakvih poveznica sa simptomima celijakije. Glijadin je topljiv u alkoholu te je bogat ostacima prolina i glutanina.



Slika 2. Građa glutena

Izvor: <http://www.nutritionqed.com/blog/2015/05/what-gluten-does-in-the-body/>

Na C terminalu glijadina nalaze se sekvence poliglutamina, a ponavljajuće regije glutamina i prolina su postavljeni centralno. Glijadin se dijeli se na četiri frakcije – alfa, beta, gama i delta. Alfa frakcija je najtoksičnija i ima najveći utjecaj u patogenezi celijakije, međutim i ostale tri frakcije sadrže toksične komponente (11). Alfa frakcija sastoji se od 33 aminokiseline koje želučane, pankreatične i crijevne proteaze ne mogu razgraditi. Zbog nemogućnosti razgradnje akumuliraju se u crijevnom lumenu. Stoga glijadin prolazi epitelnu barijeru crijeva i dolazi u interakciju s antigen – prezentirajućim stanicama u lamini proprijii crijeva (1).

1.5. Bezglutenska prehrana

Današnje rješenje za celijakiju je cjeloživotna bezglutenska prehrana. Međutim, ona je izrazito skupa te često negativno utječe na psihološko stanje pacijenta. Isključivanje pšenice, ječma i raži prvi je korak u borbi protiv celijakije (12). Na području Europske zajednice, određene su smjernice po kojima se testirani proizvodi razvrstavaju po prisustvu glutena u proizvodima na proizvode s *niskom razinom glutena* ili *bezglutenske* proizvode (13). Prekriženi klas je međunarodni simbol bezglutenske namirnice čije je odsustvo glutena potvrđeno testiranjem (Slika 3) (12).

Tablica 2. Podjela proizvoda po prisustvu glutena (13)

Niska razina glutena	Bez glutena
< 100mg/kg	Do 20 mg/kg
Gluten odstranjen tehnološkim postupkom	Proizvodi prirodno ne sadrže gluten



Slika 3. Međunarodni simbol bezglutenske namirnice

Bjelančevine, zasićene i nezasićene masne kiseline, kalcij i vitamini veoma su bitni za funkcioniranje ljudskog organizma, a mogu se pronaći u mlijeku i mliječnim proizvodima. Upravo zbog takvog sastava, u bezglutenskoj prehrani mlijeko i mliječni proizvodi veoma su bitni. Međutim, zbog postojanja i najmanje mogućnosti da se čak i u mliječnim proizvodima nalaze tragovi glutena, podijeljeni su u tri grupe po stupnju vjerojatnosti pronalaska glutena (13).

Tablica 3. Podjela proizvoda po stupnju vjerojatnosti pronalaska glutena (13)

DOPUŠTENO	RIZIČNO	ZABRANJENO
Prirodni jogurt	Voćni jogurt	Jogurt sa slalom
Svježe mlijeko	Napitci na bazi mlijeka	Jogurt sa žitaricama
Mlijeko u tetrapaku	Sirni namazi	Jogurt sa keksima
Svježe vrhnje	Tučeno vrhnje	
Vrhnje*	Sladoled	
Svježi sirevi	Sirevi s plijesni	
	Kreme	
	Pudinzi	
	Aromatizirano vrhnje za kuhanje*	

* Obrađeno na visokoj temperaturi

Nakon godine dana stroge bezglutenske prehrane serološki nalazi bi se trebali normalizirati, dok je za potpunu obnovu sluznice potrebno osam godina. Nova istraživanja stavljaju naglasak na pronalazak terapije koja ne uključuje striktnu bezglutensku prehranu. Peroralna enzimska terapija bi omogućila povećanu razgradnju i podnošljivost glutena te njegovo povremeno konzumiranje, dok imunomodulatorski lijekovi omogućavaju blokiranje crijevne transglutaminaze, lučenje upalnih citokina te aktivaciju T-limfocita. U slučajevima refraktorne celijakije moguće je uzeti u obzir terapiju kortikosteroidima ili imunosupresivima (12).

1.6. Patogeneza celijakije

Patogeneza celijakije započinje unošenjem glutena u genetski predisponiranih osoba u kojih je došlo do imunskog odgovora. Unošenje glutena inicira upalu nakon koje dolazi do atrofije crijevne sluznice, a posljedično tome smanjuje se sposobnost apsorpcije hranjivih tvari. Glutenska intolerancija je rezultat mehanizma prirođene imunosti koja je posredovana intraepitelnim limfocitima i stečene specifične Th1 (engl. *T helper type 1*) reakcije na gluten. Stečeni specifični odgovor stvara protutijela na autoantigen tkivnu transglutaminazu (tTG). tTG je enzim koji se nalazi u crijevu s kojim reagiraju endomizijska protutijela (1). Ovaj enzim katalizira transaminaciju specifičnih glutaminskih bočnih lanaca u glutamat. Tako dobiveni glutamat ima veći afinitet prema HLA-DQ2 molekulama, a T i B limfociti bivaju stimulirani te zbog toga sintetiziraju više proupalnih citokina: INF- γ , TNF- α i IL-15 (12). Glavna uloga tTG-a je kontroliranje oštećenja tkiva. tTG deamidira i mijenja strukturu glijadina te se s promijenjenim glijadinom veže u stabilni kompleks (1). Imunosni odgovor i kronične upale potiču apoptozu enterocita i slabljenje spojeva između enterocita, a to povećava propusnost crijevne sluznice i razvoj bolesti (12).

1.7. Dijagnostika celijakije

Do pedesetih godina 20. stoljeća, dijagnostika celijakije se temeljila na uočavanju problema s malapsorpcijom. Usporedno s povećanjem incidencije celijakije u svijetu, povećana je osviještenost o navedenoj kroničnoj upali, što je rezultiralo usavršavanjem i napretkom dijagnostike. Šezdesetih godina 20. stoljeća prve odrednice za dijagnostiku celijakije izdalo je Europsko društvo za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu (engl. European society for pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition, ESPGHAN). Odrednice su sadržavale četiri ključne točke. Pojavom prvih simptoma bolesti bilo je potrebno kao dokaz pronaći promjene na sluznici tankog crijeva kod osoba koje uzimaju hranu bogatu glutenom. Zatim je bilo potrebno pratiti klinički odgovor na bezglutensku prehranu. Treći korak je ponavljanje histološkog nalaza i usporedba sluznice tijekom glutenske i bezglutenske prehrane. Konačni korak bio je uočiti oštećenje sluznice i ponovnu pojavu simptoma bolesti tijekom ponovnog

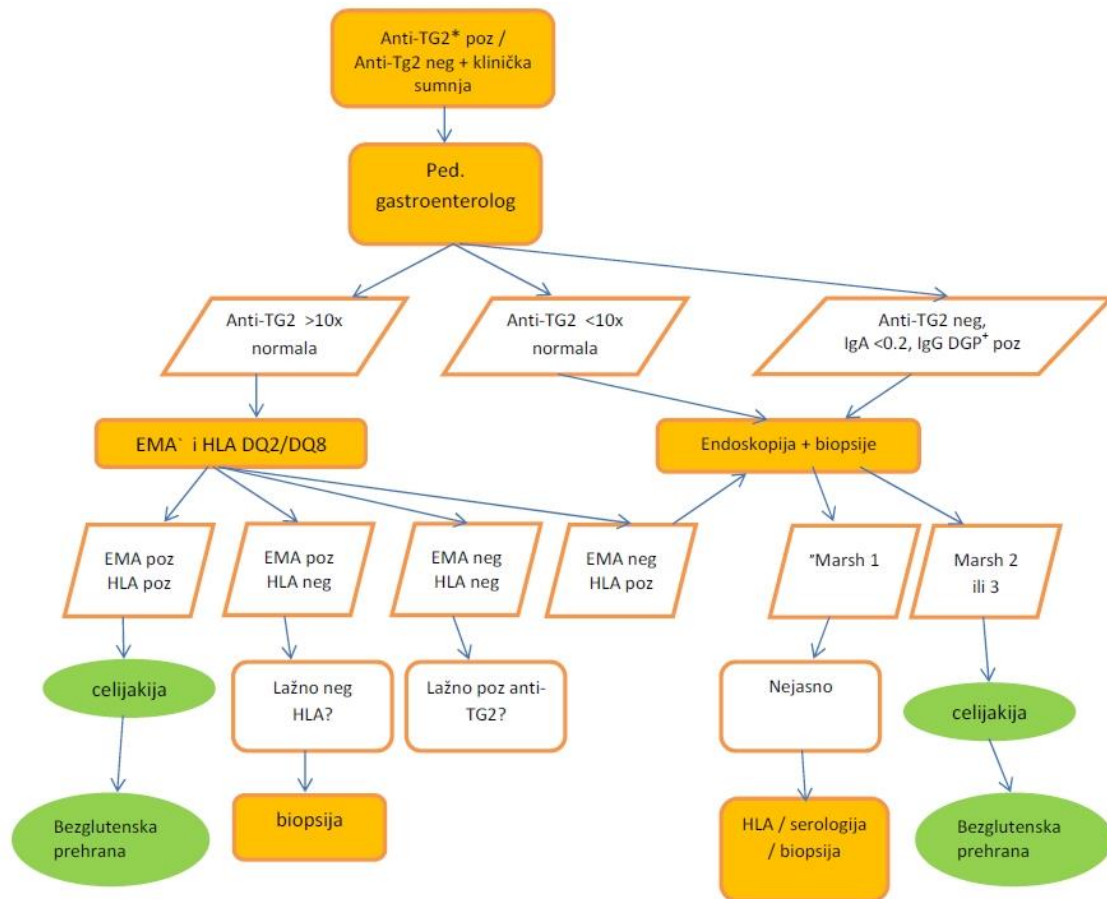
uvođenja prehrane bogate glutenom. Ponavljanje histološkog nalaza te nesigurna i nevjerodostojna metoda zahtijevala je unaprjeđenje pristupa u dijagnostici celijakije. Osamdesetih godina 20. stoljeća, uvode se osjetljivi i specifični serološki testovi. Osobe koje u svojoj anamnezi imaju diabetes mellitus I, autoimuni tioriditis, bolesti jetre ili Downov sindrom, podvrgavaju se screening testiranju zbog povećane mogućnosti da budu asimptomatski oboljeli od celijakije ili imaju subkliničke simptome.

Klinički simptomi, serološki biljezi i histološki nalaz lezija u bioptatu tankog crijeva ključni su koraci u dijagnostici celijakije. Kriteriji ESPGHAN uzimaju u obzir visoku vjerojatnost atrofije crijevnih resica u simptomatske djece sa visokom razinom antitijela na tkivnu transglutaminazu, anti- tTG IgA (10 puta veća od gornje granice referentnog raspona) te se smatra da za ovu skupinu simptomatskih osoba nije potrebna biopsija već dijagnozu potvrđuju pozitivna antiendomizijska antitijelima (EMA) i prisutnost HLA DQ8/DQ2 haplotipa.

Dostupno je više različitih seroloških testova za određivanje protutijela karakterističnih za celijakiju, a kombinacijom istovremeno više različitih testova, probir i dijagnostika se unaprjeđuju i postaju sve vjerodostojniji (12). Ako je serološki nalaz negativan, a postoje simptomi koji nedvojbeno upućuju na celijakiju, potrebno je učiniti biopsiju tankog crijeva. U odraslih osoba oboljelih od celijakije osjetljivost na anti-tTG IgA i antitijela na deamidirane glijadinske peptide (anti-DPG IgG) manja je nego u djece, titar antitijela je niži kao i stupanj atrofije crijevnih resica stoga će nalaz visoke razine tTG-IgA biti rjeđi (3)(4). EMA-IgA antitijela imaju visoku specifičnost za celijakiju. Klinička točnost ove metode je 99%. EMA se određuje metodom indirektno imunofluorescencije koja zahtjeva više vremena, educirano i iskusno osoblje. Uz to EMA metoda je kvalitativna (semikvantitativna) pa se EMA ne preporuča za prvu liniju probira.

Preporuke prije i tijekom dijagnostičke obrade bolesnika sa sumnjom na celijakiju:

- Konzumiranje glutenske prehrane minimalno 6-8 tjedana prije početka dijagnosticiranja
- Potrebno završiti dijagnostički postupak i potvrditi ili isključiti celijakiju prije preporuke o započinjanju bezglutenske dijeta
- Potrebno je na početku dijagnostičkog postupka odrediti ukupni IgA u krvi radi izbjegavanja “lažno negativnog” nalaza testiranjem tTG IgA u bolesnika s deficijencijom IgA u serumu
- Pri kliničkoj sumnji u slučaju negativnih nalaza inicijalne obrade potrebno je ponovo evaluirati negativan serološki i/ili patohistološki nalaz
- Genski test (određivanje DQ2DQ8-heterodimera) služi kao isključni test, a ne potvrdni jer oko 40% populacije ima promjene DQ2DQ8-heterodimera. Pozitivan nalaz potvrđuje gensku podlogu za razvoj celijakije, a ne dijagnozu bolesti
- U provođenju endoskopske procedure potrebno je pridržavati se pravila endoskopske dijagnostike s obzirom na mjesto uzimanja uzoraka (dvanaesnik), broj uzoraka (4-6) i pravilo o orijentaciji (fiksiranje uzorka na filtrirni papir uz asistenciju medicinske sestre ili tehničara)(1)



* Anti-TG2 – antitijelo na tkivu transglutaminazu

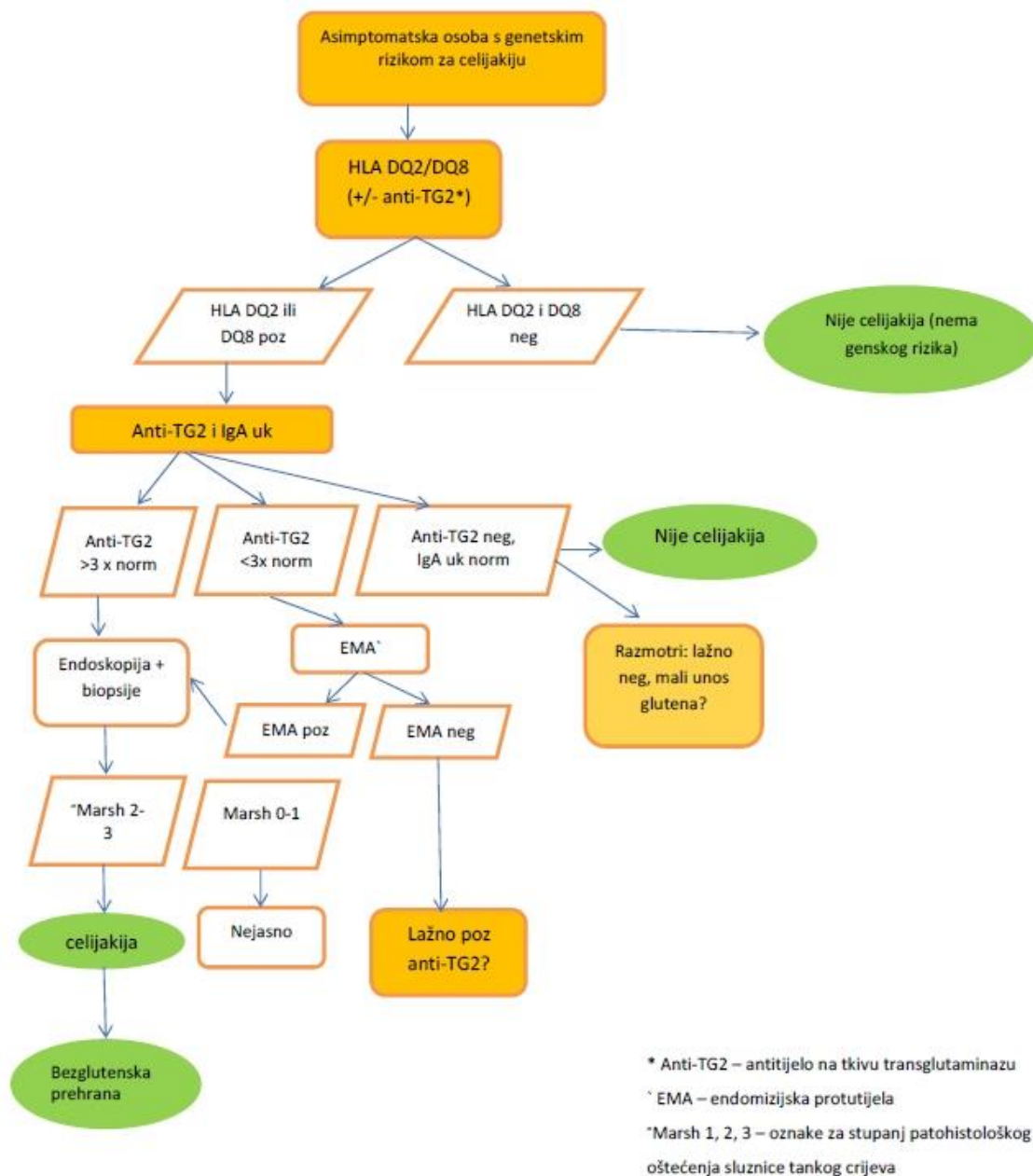
* IgG DGP – antitijelo na deaminirani protein glijadina

EMA – endomizijska protutijela

* Marsh 1, 2, 3 – oznake za stupanj patohistološkog oštećenja sluznice tankog crijeva

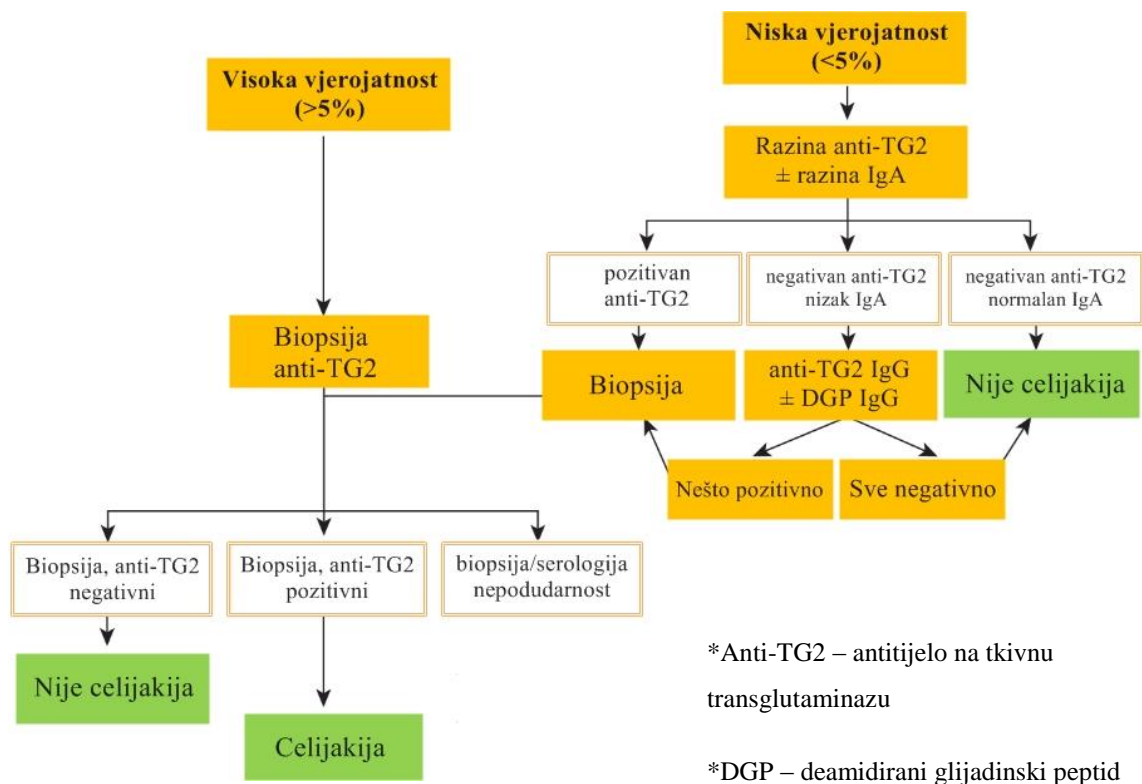
Slika 4. Dijagnostički postupnik kod djeteta sa simptomima celijakije

Izvor: Postupnik za dijagnostiku celijakije u djece; Hrvatsko društvo za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu



Slika 5. Dijagnostički postupnik kod asimptomatskog djeteta

Izvor: Postupnik za dijagnostiku celijakije u djece; Hrvatsko društvo za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu



Slika 6. Dijagnostički postupnik kod odraslih

Izvor: Rubio-Tapia A., Hill I. D., Kelly C. P., Calderwood A. H., MD, Murray J. A.,: Am J Gastroenterol 2013; 108:656–676: ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease

1.8. Autoantitijela na tkivnu transglutaminazu

Anti-tTG su zbog svoje visoke osjetljivosti prvi korak u dijagnostici celijakije. Specifičnost je veća od 94%, a osjetljivost veća od 92%. Specifičnost i osjetljivost testa povećane su uvođenjem native pročišćene tTG iz humanih eritrocita i rekombinantne humane tTG (rhtTG). Ako nije moguće izmjeriti antitijela tipa IgA ili je njihova razina znatno snižena, određuju se IgG antitijela. Anti-tTG IgA se koristi i kao biljeg u kontroliranju bezglutenske dijeta. Razina anti-tTG IgA se normalizira nakon 6-12 mjeseci u oko 80% osoba koje se pridržavaju dijeta.

Za određivanje anti-tTG antitijela koriste se ELISA (The enzyme-linked immunosorbent assay), FEIA (fluoroenzimski imunotest - engl. Fluoro Enzyme Immuno Assay), CLIA (Chemiluminescence Immunoassays) i multipleks tehnologija, ALBIA (engl. addressable laser bead immunoassay) metode kao i brza kvalitativna imunokromatografska metoda koju je moguće koristiti u liječničkim ordinacijama (3).

1.9. Autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide

Anti-DPG mogu biti IgA i IgG klase. IgG dijagnostički je točniji biljeg, međutim smatra se da najbolju dijagnostičku točnost ima određivanje kombiniranog mjerenja obiju klasa antitijela. Dvostruka reaktivnost i visoki titar uvelike povećavaju vjerojatnost za dijagnozu. Također, titar oba antitijela u korelaciji je s histološkim nalazom oštećenja crijevne sluznice.

Kod pacijenata sa selektivnim nedostatkom IgA u svrhu dijagnostike određuju se anti-DPG IgG i/ili anti-tTG IgG antitijela. Budući da je osjetljivost EMA IgA i anti-tTG IgA u djece mlađe od 2 godine nešto slabija jer se puna ekspresija ovih antitijela razvija tek nakon dvije do tri godine, za tu populaciju preporučuje se kombinirano određivanje anti-tTG IgA i anti-DPG IgG izotipa kako bi se postigla optimalna osjetljivost i specifičnost. Za određivanje anti-DGP antitijela koriste se ELISA, FEIA, CLIA, ALBIA i brza kvalitativna imunokromatografska metoda predviđena za korištenje u liječničkim ambulantama (3).

2. CILJEVI

- Usporediti rezultate dobivene dvjema različitim metodama za određivanje anti-tTG IgA i anti-DPG IgG
- Utvrditi postoji li značajna razlika među dobivenim rezultatima

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i metode

U ovom istraživanju provedena je usporedba metoda u svrhu uvođenja novih potpuno automatiziranih kemiluminiscentnih testova za određivanje anti-tTg IgA i anti-DPG IgG antitijela (ZENIT RA t-TG IgA i ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG, Menarini Diagnostics). Na analizatoru IDS ISYS provedena je verifikacija metoda koja je obuhvatila procjenu preciznosti u seriji, procjenu međupreciznosti i usporedbu s drugim metodama (kvalitativnim ELISA testovima QUANTA Lite tTG IgA i QUANTA Lite Gliadin IgG II; INOVA, San Diego, CA). Korišteni su rutinski uzorci pacijenata koji su analizirani radi standardne dijagnostičke obrade u bolnici zbog sumnje na celijakiju.

Preciznost u seriji je provedena analiziranjem tri slabo pozitivna i četiri jako pozitivna uzorka u triplicatu. Međupreciznost je određena analiziranjem jednog slabo pozitivnog i dva jako pozitivna uzorka tijekom tri dana.

Trideset uzoraka pacijenata za anti-tTg IgA i dvadeset i osam uzorka za anti-DPG IgG analizirano je u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.

3.1.1. ELISA test za određivanje autoantitijela na tkivnu transglutaminazu

Tkivna transglutaminaza dobiva se izolacijom iz svježih eritrocita, kojim se oblažu jažice u uvjetima koji omogućavaju stabilnost antigena. U jažice obložene antigenima, dodaje se kontrolni uzorak i razrijeđni uzorak bolesnika. Tijekom inkubacije dolazi do vezanja imobiliziranih antigena s potencijalnim anti-tTG antitijelima. Nevezani uzorak se ispiri, a enzimom označena anti humana IgA antitijela dodaju se u svaku jažicu. U drugoj inkubaciji postoji mogućnost da enzim označeni anti humani IgA veže bilo koje pacijentovo antitijelo koje ostaje vezano. Nakon drugog ispiranja, ispiri se sav nevezani enzim, a preostala enzimska aktivnost mjeri se dodavanjem kromogenog supstrata i spektrofotometrijski se mjeri intenzitet nastale boje.

Mogući su lažno pozitivni rezultati ako dođe do vezanja nespecifičnih imunoglobulina i imuno kompleksa (5).

3.1.2. ELISA test za određivanje autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide

Pročišćeni glijadinski peptidi vezani su za jažice u uvjetima koji omogućavaju stabilnost antigena. Kontrolni uzorak i razrijeđeni uzorak bolesnika dodaje se u jažice. Tijekom inkubacije dolazi do vezanja imobiliziranih antigena s potencijalnim antitijelima na glijadinske peptide za imobilizirane antigene. Nevezani uzorak se ispiri, a enzimom označeni anti humani IgG konjugat se dodaje u svaku jažicu. U drugoj inkubaciji postoji mogućnost da enzimom označeni anti human IgG veže bilo koje bolesnikovo antitijelo koje je vezano za jažice. Tijekom drugog ispiranja, ispiri se svaki nevezani enzim, a preostala enzimska aktivnost mjeri se dodavanjem kromogenog supstrata i spektrofotometrijski se mjeri intenzitet nastale boje koji je proporcionalan titru prisutnih antitijela (6).

3.1.3. CLIA metoda za određivanje autoantitijela na tkivnu transglutaminazu

CLIA (Chemiluminescence) metoda je indirektna metoda koja se sastoji od dva koraka. Humano anti-IgA protutijelo je povezano s konjugatom (akridinij ester derivat), dok je specifični antigen vezan za magnetne čestice tj. čvrstu fazu. Tijekom prve inkubacije specifična antitijela vežu se za antigen vezan na čvrstu fazu, a tijekom druge inkubacije, konjugat reagira s vezanim anti-tTG IgA antitijelima. Nakon svake inkubacije, čestice koje se nisu povezale s čvrstom fazom usisavaju se i ispiru. Kemiluminiscentna reakcija i izmjerena jačina signala mjera je prisutnih anti-tTG antitijela. Generirani signal mjeri se u RLU (Relative Light Units).

U uzorcima koji ne sadrže anti-tTG IgA antitijela dodavanjem specifične čvrste faze omogućeno je određivanje ukupnog IgA koristeći sendvič imunometrijsku tehniku. Tijekom prve inkubacije IgA iz uzorka veže se na anti humana antitijela vezana na čvrstu fazu. Tijekom druge inkubacije, konjugat reagira s IgA antitijelima uhvaćenim na čvrstoj fazi. Nakon svake inkubacije nevezane čestice se usisavaju i ponavljano ispiru. Nadalje, signal se također mjeri u RLU te je pokazatelj koncentracije IgA prisutne u uzorcima koji ne sadrže anti-tTG IgA antitijela (7).

3.1.4. CLIA metoda za određivanje autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide

ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG koristi se za određivanje anti-DGP IgG antitijela. Metoda je indirektna te se sastoji od dva koraka. U prvoj inkubaciji, specifična antitijela prisutna u uzorcima vežu se na antigen fiksiran na čvrstoj fazi. U drugoj inkubaciji, konjugat reagira s anti-DPG IgG antitijelima uhvaćenima na čvrstoj fazi. Nakon svake inkubacije, nevezane čestice uklanjaju se usisavanjem i ponovljenim ispiranjem. Kemiluminiscentna reakcija i izmjerena jačina signala mjera je kvantificiranja označenog konjugata povezanog s čvrstom fazom. Generiran signal mjeri se u RLU te je pokazatelj prisutnosti antitijela (8).

3.2. Verifikacija semikvantitativnih imunokemijskih metoda

Verifikacija je obuhvatila ispitivanje preciznosti i usporedbu metoda. Kriteriji prihvatljivosti su vrijednosti unutar deklariranih vrijednosti proizvođača.

3.2.1. Preciznost

Preciznost u seriji (ponovljivost): analizirati 1 pozitivnu i 1 slabo pozitivnu graničnu vrijednost u triplikatu u jednom mjerenju

Preciznost iz dana u dan (međupreciznost): Analizirati 1 pozitivnu i 1 slabo pozitivnu graničnu vrijednost tijekom 3 različita dana (9)

3.2.2. Usporedba s drugom metodom

Ako je u laboratoriju korištena druga analitička metoda, potrebno je usporediti novu metodu s postojećom. Analizirati najmanje 20 uzoraka bolesnika s pozitivnim [n=7], negativnim [n=7] i graničnim [n=6] vrijednostima i rezultate izraziti kao postotak slaganja. Metoda je prihvatljiva ako je postotak slaganja ≥ 90 (9).

3.3. Instrumenti

3.3.1. ETI-MAX 3000

ETI-MAX 3000 je potpuno automatizirani analizator mikrotirarskih pločica za izvođenje automatiziranog određivanja ELISA testova. Osim fotometrijskih mjerenja, u potpunosti izvodi uzorkovanje što uključuje prethodno razrjeđivanje uzoraka, pipetiranje uzoraka i reagensa, inkubaciju i ispiranja.

3.3.2. IDS

IDS (Immunodiagnostic systems) je imunokemijski analizator koji koristi kemiluminiscentnu metodu. Kemiluminiscentne metode mogu biti kompetitivne ili sendvić metode. Kemiluminiscencija je emisija svjetlosti uzrokovana kemijskom reakcijom antigen-antitijelo i obilježivača koji emitira svjetlost. Test kvantificira prisutnost analita u uzorku. Tijekom kemiluminiscentne reakcije sekvencijsko dodavanje vodikova peroksida (H_2O_2) i natrijevog hidoksida (NaOH) rezultira oksidacijom i eksitacijom akridinij estera. Povratak u stabilno stanje niže energije uzrokuje emisiju svjetla. Intenzitet svjetla se naglo povećava, doseže maksimum te se zatim smanjuje i nestaje u sekundama. Očitavanje rezultata se odvija u luminometru. Dobiveni signal je prikazan u RLU. Koncentracija analita proporcionalna je intenzitetu kemiluminiscencije (10).

4. REZULTATI

4.1. Procjena preciznosti anti-tTG IgA - IDS

4.1.1. Preciznost u seriji

Preciznost u seriji određena je analiziranjem tri slabo pozitivna i četiri jako pozitivna uzorka u triplikatu.

D = 1 dan; n = 3 (triplikat)	1. mjerjenje	2. mjerjenje	3. mjerjenje	\bar{x}	SD	KV%
<i>Uzorak 1</i>	3.7	3.4	3.3	3.47	0.21	6.05
<i>Uzorak 2</i>	10.6	12.0	11.7	11.43	0.74	6.47
<i>Uzorak 3</i>	16.5	17.5	17.0	17.00	0.50	2.94
<i>Uzorak 4</i>	35.1	34.7	34.9	34.90	0.20	0.57
<i>Uzorak 5</i>	70.4	64.9	68.1	67.80	2.76	4.07
<i>Uzorak 6</i>	84.9	87.7	85.6	86.07	1.46	1.68
<i>Uzorak 7</i>	194.9	187.3	185.4	189.20	5.03	2.66

KV za preciznost u seriji za anti-tTG IgA kretao se od 0,57 do 6,47%.

4.1.2. Preciznost iz dana u dan

Preciznost iz dana u dan određena je analiziranjem jednog slabo pozitivnog i dva jako pozitivna uzorka tijekom tri dana.

D = 3 dana; n = 1	1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje	\bar{x}	SD	KV%
<i>Uzorak 1</i>	11.43	12.4	11.9	11.91	0.49	4.11
<i>Uzorak 2</i>	64.6	67.80	61.5	64.63	3.15	4.87
<i>Uzorak 3</i>	191.3	189.2	195.0	191.83	2.94	1.53

KV za preciznost za međupreciznost bio je 1,53 do 4,87%.

4.2. Procjena preciznosti anti-DPG IgG - IDS

4.2.1. Preciznost u seriji

Preciznost u seriji određena je analiziranjem tri slabo pozitivna i četiri jako pozitivna uzorka u triplikatu.

D = 1 dan; n = 3 (triplikat)	1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje	\bar{x}	SD	KV%
<i>Uzorak 1</i>	10.1	9.5	9.8	9.80	0.30	3.06
<i>Uzorak 2</i>	13.3	15.0	14.7	14.33	0.91	6.35
<i>Uzorak 3</i>	14.1	15.5	15.3	14.97	0.76	5.08
<i>Uzorak 4</i>	20.7	22.1	22.7	21.83	1.03	4.72
<i>Uzorak 5</i>	34.6	36.6	36.0	35.73	1.03	2.88
<i>Uzorak 6</i>	79.5	80.0	79.7	79.73	0.25	0.31
<i>Uzorak 7</i>	129.3	124.5	125.5	126.43	2.53	2.00

KV za preciznost u seriji za anti-DPG IgG bio je 0,31 do 6,35%.

4.2.2. Preciznost iz dana u dan

Preciznost iz dana u dan određena je analiziranjem jednog slabo pozitivnog i dva jako pozitivna uzorka tijekom tri dana.

D = 3 dana; n = 1	1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje	\bar{x}	SD	KV%
<i>Uzorak 1</i>	9.8	9.3	9.4	9.50	0.26	2.74
<i>Uzorak 2</i>	79.7	81.9	80.8	80.80	1.10	1.36
<i>Uzorak 3</i>	126.4	119.5	120.6	122.17	3.71	3.04

KV za međupreciznost bio je od 1,36 do 3,04%.

4.3. Usporedba rezultata anti-tTG IgA ELISA (Inova) - CLIA (IDS)

Usporedba metoda provedena je paralelnim određivanjem anti-tTG IgA u 30 uzoraka bolesnika.

Tablica 4. Rezultati određivanja anti-tTG IgA ELISA metodom i metodom kemiluminiscencije

br. uzorka	Inova ELISA		IDS	
	< 20 negativno	20-30 slabo pozitivno	< 9,9 U/ml negativno	> pozitivno
1	76/7.8.	8 -	2,1	-
2	5015/12.8.	14 -	2,3	-
3	5334/2.9.	4 -	1,7	-
4	105/7.9.	7 -	2,2	-
5	98/22.9.	18 -	3,8	-
6	117/25.9.	6 -	2,1	-
7	960/24.5.	10 -	6,3	-
8	564/25.5.	4 -	1,8	-
9	251/31.5.	3 -	3,7	-
10	480/25.5.	14 -	4,9	-
11	418/27.5.	14 -	6	-
12	667/23.5.	5 -	2	-
13	706/23.5.	3 -	2	-
14	999/25.5.	4 -	2,3	-
15	661/23.5.	3 -	2,2	-
16	294/30.5.	20 -	8,9	-
17	386/23.9.	26 +	7,4	-
18	65/2.10.	> 80 +	36,2	+
19	5314/19.8.	74 +	22,6	+
20	5026/21.8.	> 80 +	200 >	+
21	5030/28.8.	> 80 +	382,2	+
22	5078/31.8.	> 80 +	191,3	+
23	104/23.9.	> 80 +	399,2	+
24	206/29.9	> 80 +	284,4	+
25	5056/30.9.	> 80 +	200 >	+
26	243/2.10.	> 80 +	83,9	+
27	5272/29.7	> 80 +	31,7	+

28	5292/30.7.	> 80	+	64,9	+
29	578/23.5.	> 80	+	> 200	+
30	630/30.5.	3	-	15,1	+

Usporednim određivanjem anti-tTG IgA dvjema metodama do odstupanja je došlo samo kod dva uzorka (u tablici označeno crvenim sjenčanjem redova).

Odstupanje je 6,67% (2/30) što je prihvatljivo (prihvatljivo odstupanje < 10%).

4.4. Usporedba rezultata anti-DPG IgG ELISA (Inova) - CLIA (IDS)

Usporedba metoda provedena je paralelnim određivanjem anti-DPG IgG u 28 uzoraka bolesnika.

Tablica 5. Rezultati određivanja anti-DPG IgG ELISA metodom i metodom kemiluminiscencije

br. uzorka	Inova ELISA		IDS	
	< 20 negativno	20-30 slabo pozitivno > pozitivno	< 9,9 U/ml negativno	
1	385/3.9.	6 -	1,8	-
2	153/11.9.	5 -	<	-
3	5033/22.9.	3 -	<	-
4	49/29.9.	3 -	<	-
5	431/30.9.	6 -	2,8	-
6	5087/1.10.	4 -	0	-
7	5150/1.10.	5 -	0	-
8	63/2.10.	4 -	0	-
9	162/2.10.	4 -	1,3	-
10	249/2.10.	4 -	0	-
11	449/7.10.	7 -	2,6	-
12	294/6.11.	3 -	0	-
13	5161/26.11. (1:7)	12 -	8,9	-
14	214/8.9.	6 -	0,3	-
15	352/27.8.	37 +	47,5	+
16	5093/22.9.	4 -	2,6	-
17	79/2.10.	21 +	3,4	-
18	307/5.11.	2 -	0,1	-
19	454/5.11.	3 -	0,9	-
20	155/9.11.	6 -	0	-
21	240/9.11.	5 -	1,5	-
22	349/12.11.	12 -	0,6	-
23	5250/30.11.	11 -	2,9	-
24	211/4.12.	76 +	180,7	+
25	389/25.11. (1:4)	> 80 +	>	+
26	5416/6.11. (1:4)	47 +	52,9	+
27	344/11.11. (1:4)	38 +	43,4	+
28	5068/9.11.	47 +	32,9	+

Usporednim određivanjem anti-DPG IgG dvjema metodama do odstupanja je došlo samo u jednom uzorku (u tablici označeno crvenim sjenčanjem reda).

Odstupanje je 3,57 % (1/28) što je prihvatljivo (prihvatljivo odstupanje < 10%).

5. RASPRAVA

Celijakija je autoimuna bolest crijeva čija je imunološka reakcija potaknuta unosom glutena u organizam genetski predisponirane osobe. Autoimuna reakcija potiče nastanak i povećanje razine autoantitijela, a posljedično tome i oštećenje crijevnih resica što rezultira malapsorpcijom. Pojavljivanje visoko specifičnih i osjetljivih seroloških testova u kombinaciji s patohistološkom dijagnostikom uvelike je olakšalo i unaprijedilo postavljanje dijagnoze celijakije. Nadalje, osim poznate klasične kliničke slike, otkriven je veliki broj atipičnih oblika bolesti.

U ovom istraživanju uspoređivane su dvije različite metode (CLIA i ELISA) za određivanje anti-tTG IgA i anti-DPG IgG. Anti-tTG IgA su početni korak u dijagnostici celijakije zbog visoke specifičnosti i osjetljivosti. Kod djece i osoba s nedostatkom IgA preporučuje se odrediti i anti-DPG IgG tipa.

Kemiluminiscentna metoda je za oba antitijela pokazala zadovoljavajuću preciznost (<10% odstupanja). Razlike u rezultatima usporedne analize zabilježene su samo kod granično pozitivnih vrijednosti. Usporedba metoda zadovoljila je definirani kriterij prihvatljivosti (<10% odstupanja). Kemiluminiscentna metoda ima široki mjerni raspon (>10 puta iznad gornje granice referentnog intervala) čime je izbjegnuta potreba za razrjeđivanjem uzoraka s visokim vrijednostima. Reagens za određivanje anti-tTG IgA omogućava istovremenu kvantifikaciju specifičnog i ukupnog IgA što olakšava prepoznavanje onih pacijenata kojima je nužno odrediti specifično antitijelo IgG klase. Stabilnost testa i reakcijskih uvjeta omogućava korištenje pohranjene kalibracijske krivulje.

Uz zadovoljavajuće rezultate verifikacije, uvođenje nove kemiluminiscentne metode za određivanje anti-tTG i anti-DPG IgG skraćuje vrijeme do izdavanja nalaza budući da se antitijela, za razliku od ELISA metode, mogu određivati pojedinačno.

6. ZAKLJUČCI

- Ispitivani testovi pokazali su zadovoljavajuću preciznost
- Usporednim određivanjem pokazalo se da postoje minimalna odstupanja između dvije metode kod uzoraka s graničnim vrijednostima
- Usporedba zadovoljava definirani kriterij prihvatljivosti (<10% odstupanja)

7. LITERATURA

1. Čuković-Čavka S., Crnčević Urek M., Brinar M., Turk N. (2012). Celijakija u odrasloj dobi. *Medicus*, 21(2_Gastroenterologija), 179-186.

Preuzeto s <http://hrcak.srce.hr/101973>

2. Parzanese I., Qehajaj D., Patrinicola F., Aralica M., Chiriva-Internati M., Stifter S. et al. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017 May 15;8(2):27-38.

Preuzeto s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437500/>

3. Topić E., Primorac D., Janković S. Medicinsko biokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. 1. Izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
4. Kelly C. P., Bai J. C., Liu E., Leffler D. A.,. Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2015; 148(6): 1175-1186.
5. Instructions for use - QUANTA Lite™ h-tTG IgA ELISA
6. Instructions for use - QUANTA Lite™ Gliadin IgG II
7. Instructions for use - ZENIT RA t-TG IgA
8. Instructions for use - ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG
9. H.F. Rabenau et al. : *Journal of Clinical Virology* 40 (2007) 93–98
10. Instructions for use – IDS
11. Bascuñán K. A., Vespa M. C., Araya M. Celiac disease: understanding the gluten-free diet

Preuzeto s

http://www.coacel.cl/sites/default/files/25._2016_bascunan_gfd_ejcn_0.pdf

12. Barbarić I.: Celijakija – pregled i predviđanja. *Medicina* 2008, Vol. 44, No. 3-4, p. 229-234

Preuzeto s

https://pdfs.semanticscholar.org/69ca/8f8313c4663828b3fcf07809aaffa4e17867.pdf?_ga=2.130986892.267085796.1499364763-1172127437.1499364763

13. Pollak L., Antunović B., Poljak V., Panjkota Krbavčić I., Njari B., Baban M., Mijić P., Gantner V., Bogdanović V. (2010). Kvalitativna procjena rizika od glutena u mliječnim proizvodima za populaciju oboljelu od celijakije. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 60(2), 94-103.

Preuzeto s <http://hrcak.srce.hr/55148>

14. Tomašić V., Lerotić I.: Celijakija

Preuzeto s http://www.hdod.net/rad_drustva/Celijakija_2013.pdf

8. SAŽETAK

CILJ:

Cilj rada je usporediti ELISA i CLIA metodu za određivanje autoantitijela na tkivnu transglutaminazu tipa IgA (anti-tTG IgA) i autoantitijela na deamidirane glijadinske peptide tipa IgG (anti-DPG IgG) te usporedbom dobivenih rezultata utvrditi postoje li značajne razlike u rezultatima.

METODE:

U svrhu uvođenja novih, potpuno automatiziranih kemiluminiscentnih testova za određivanje anti-tTG IgA i anti-DPG IgG antitijela (ZENIT RA t-TG IgA i ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG, A. Menarini Diagnostics) na analizatoru IDS ISYS provedena je verifikacija metoda koja je obuhvatila procjenu preciznosti u seriji, procjenu međupreciznosti i usporedbu s drugim metodama (kvalitativnim ELISA testovima QUANTA Lite anti-tTG IgA i QUANTA Lite Gliadin IgG II; INOVA, San Diego, CA). Preciznost u seriji određena je analiziranjem tri slabo pozitivna i četiri jako pozitivna uzorka u triplikatu. Međupreciznost je određena analiziranjem jednog slabo pozitivnog i dva jako pozitivna uzorka tijekom tri dana. Usporedba metoda provedena je na 30 uzoraka pacijenata za anti-tTG IgA i 28 uzorka za anti-DPG IgG.

REZULTATI:

KV za preciznost u seriji za anti-tTG IgA kretao se od 0,57 do 6,47%, a za međupreciznost 1,53 do 4,87%. KV za preciznost u seriji za anti-DPG IgG bio je 0,31 do 6,35%, a za međupreciznost od 1,36 do 3,04%. Usporedba metoda pokazala je zadovoljavajuće slaganje rezultata za anti-tTG IgA (2/30; odstupanje 6,67%) i anti-DPG IgG (1/28; odstupanje 3,57%).

ZAKLJUČAK:

Ispitivani testovi su pokazali zadovoljavajuću preciznost. Razlike u rezultatima usporedne analize zabilježene su kod graničnih vrijednosti. Usporedba metoda zadovoljila je definirani kriterij prihvatljivosti (<10% odstupanja). Reagens za određivanje anti-tTG IgA omogućava istovremenu kvantifikaciju specifičnog i ukupnog

IgA što omogućava prepoznavanje onih pacijenata kojima je nužno odrediti specifično antitijelo IgG klase. Stabilnost testa i reakcijskih uvjeta omogućava korištenje pohranjene kalibracijske krivulje. Uz zadovoljavajuće rezultate verifikacije, uvođenje nove kemiluminiscentne metode za određivanje anti-tTG IgA i anti-DPG IgG skraćuje vrijeme do izdavanja nalaza budući da se antitijela, za razliku od ELISA metode, mogu određivati pojedinačno.

9. SUMMARY

THE AIM:

The aim of this thesis is to compare ELISA and CLIA method for the determination of autoantibodies to tissue transglutaminase type IgA (anti-tTG IgA) and autoantibodies to deamidated gliadine peptide type IgG (anti-DPG IgG) and with the comparison of the obtained results determine whether there are significant differences in the results.

METHODS:

For the purpose of introducing new, fully automated chemiluminescence assays for the determination of anti-tTG IgA and anti-DPG IgG antibodies (ZENIT RA t-TG IgA and ZENIT RA Deamidated Gliadin IgG, A. Menarini Diagnostics) on the IDS ISYS analyzer was conducted a verification of the methods which included series precision estimation, inter assay precision estimation and comparison with other methods (qualitative ELISA assays QUANTA Lite anti-tTG IgA and QUANTA Lite GliadinIgG II, INOVA, San Diego, CA). Precision in the series was determined by analyzing three poorly positive and four highly positive samples in triplicate. Inter assay precision was determined by analyzing one poorly positive and two highly positive samples during three days. The comparison of methods was conducted on 30 patient samples of anti-tTG IgA and 28 samples for anti-DPG IgG.

RESULTS:

The coefficient of variation (CV) for precision in the anti-tTG IgA series ranged from 0.57 to 6.47%, and for inter assay precision from 1.53 to 4.87%. CV for precision in the anti-DPG IgG series was from 0.31 to 6.35% and for a median of 1.36 to 3.04%. Comparison of the methods showed concordant results for anti-tTG IgA (2/30, deviation 6.67%) and anti-DPG IgG (1/28; 3.57% deviation)

CONCLUSION:

The tested assays showed satisfying precision. Differences in the results of the parallel analysis were noted at the limit values. The comparison of the methods met the defined eligibility criteria (<10% deviations). The anti-tTG IgA antibody reagent provides

parallel specific and total IgA quantification, which allows the recognition of those patients to whom specific anti-IgG classes must be determined. The stability of the test and the reaction conditions allows the use of saved calibration curve. With satisfying verification results, the introduction of new chemiluminescence methods for the determination of anti-tTG IgA and anti-DPG IgG shortens TAT since antibodies, unlike ELISA method, can be determined individually.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Ana Jurić
Adresa	Krešimirova 8, 21211 Vranjic, Hrvatska
Telefonski broj	098 526 375
E-mail	ana55juric@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	28. listopada 1995.
Spol	Ž

OBRAZOVANJE

Fakultet	2014. - 2017.	Sveučilišni odjel zdravstvenih studija - Split Preddiplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika
Srednja škola	2010. - 2014.	V. Gimnazija "Vladimir Nazor" – Split (opća gimnazija)
Osnovna škola	2002. - 2010.	Osnovna škola "Vjekoslav Parać" – Solin
Glazbena škola	2008. - 2010.	Glazbena škola "Josip Hatze"

OSOBNNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinski jezik	hrvatski
Drugi jezici	
Engleski	C1
Talijanski	B1
Njemački	A1
Računalne vještine i kompetencije	Microsoft Office paket, Internet
Vozačka dozvola	B kategorija
Nagrada i priznanje	Izniman angažman u izvannastavnim aktivnostima Aktivnost sudjelovanja na 3. Kongresu hrvatske komore zdravstvenih radnika Medicinsko laboratorijska dijagnostika u praksi i medicinsko pravo (s međunarodnim sudjelovanjem) s prezentacijom na temu Laboratorijska dijagnostika neonatalne sepse