



# Kaupallisten keliakian diagnostiikassa käytettyjen ELISA-testien vertailu

Alex Musikka

OPINNÄYTETYÖ  
Toukokuu 2019

Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboriotekniikka

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboratoriotekniikka

Musikka Alex:

Kaupallisten keliakian diagnostiikassa käytettyjen ELISA-testien vertailu

Opinnäytetyö 47 sivua, joista liitteitä 0 sivua  
Toukokuu 2019

---

Tämä opinnäytetyö tehtiin toimeksiantona Tampereen Keliakiatutkimuskeskukseen (CeliRes). Opinnäytetyön tavoitteena oli vertailla eri kaupallisten testien toimivuutta keliakian diagnostiikassa ja mahdollisesti tätä kautta saada tietoa, mikä testeistä toimisi parhaiten ensisijaisena seulontatestinä. Tarkoituksena oli vertailla neljän eri valmistajan kaupallista ELISA-menetelmään perustuvaa vasta-ainetestiä diagnostisten tunnuslukujen avulla. Testikohtaisesti määritetyt tunnusluvut olivat sensitiivisyys, spesifisyys, PPV eli positiivinen odotusarvo ja NPV eli negatiivinen odotusarvo. Tämän lisäksi määritettiin myös kullekin testille Youdenin indeksi sekä suoritettiin ROC-analyysi. Diagnostiset tunnusluvut määritettiin yhteensä noin 760 seeruminäytteen avulla.

AUC-arvot vaihtelivat välillä 0,954 – 0,992. Paras arvo (0,992) saavutettiin Phadia EliA™ Celikeyllä ja pienin arvo (0,954) saatiin Eurospital Eu-tTG® -testillä. Sensitiivisyyden osalta parhaiten pärjäsivät Inova QUANTA Flash® h-tTg IgA (97,8 %) ja spesifisyyden osalta Celikey (99,2 %). Suurin PPV (97,5 %) saavutettiin Celikeyllä ja suurin NPV (99,0 %) Inovalla. Muilla paitsi Inovalla laskennallinen viitearvo oli alempi kuin valmistajan ohjeistama viitearvo.

ROC-analyysien perusteella kaikki vertailut testit soveltuvat erinomaisesti käytettäväksi keliakian diagnostiikassa. Phadia Oy:n valmistama EliA™ Celikey suoriutui hyvin testien välisessä vertailussa. SPSS-ohjelman avulla tehdyn ROC-analyysin perusteella Celikey oli testeistä suorituskykyisin. Kaikkien testien kohdalla olisi mahdollisesti syytä harkita viitearvojen muuttamista paremman sensitiivisyyden ja spesifisyyden saavuttamiseksi.

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory engineering

MUSIKKA. ALEX:

Comparison of Commercial ELISA Tests Used in Diagnosis of Celiac Disease

Bachelor's thesis 47 pages, appendices 0 pages  
May 2019

---

This thesis was commissioned by the Celiac Disease Research Center (CeliRes) located in Tampere. The aim was to compare different commercial tests used in diagnosis of Celiac Disease and by that way to possibly authenticate a test which could be used as a primary test in the screening of Celiac Disease. The purpose of this thesis was to compare four different IgA-specific transglutaminase ELISA-tests from different manufacturers by calculating sensitivity, specificity, PPV and NPV with results from approximately 760 serum samples. In addition to above-mentioned, also Youden's Index was calculated for each test.

The AUC values varied from 0,955 to 0,992. The best value was obtained with Phadia's EliA™ Celikey and the least with Eurospital's Eu-tTG®. The best sensitivity was obtained with Inova QUANTA Flash® h-tTg IgA (97,8 %) and the best specificity with Phadia EliA™ Celikey IgA. Celikey and Inova also obtained the best PPV and NPV. All but Inova had the calculatory cut-off value below the one given by the manufacturer.

According to the ROC-analysis all the tests did well and could be used in diagnosis of Celiac Disease. Phadia's EliA™ Celikey had the best overall performance. The results calculated with Youden's Index suggest that the cut-off value of all of the participated tests should be modified. It is important to determine the laboratory's own cut-off values for each test as laboratory methods and populations vary all over the world.

---

Key words: ELISA, celiac disease, tissue transglutaminase, ROC curve

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	6
2	TAUSTA.....	7
2.1	Keliakia .....	7
2.1.1	Esiintyvyys.....	8
2.1.2	Oireet ja hoito .....	9
2.1.3	Diagnostiikka .....	9
2.1.4	Transglutaminaasi 2-vasta-aineet .....	11
3	ELISA-MENETELMÄ .....	12
3.1	Yleistä .....	12
3.1.1	Suora ELISA.....	12
3.1.2	Epäsuora ELISA.....	13
3.1.3	Sandwich-ELISA .....	15
3.1.4	Kompetitiivinen ELISA.....	16
4	OPINNÄYTETYÖSSÄ VERTAILLUT TESTIT .....	18
4.1	Phadia EliA™ Celikey IgA.....	18
4.2	Inova QUANTA Flash® h-tTg IgA ELISA.....	19
4.3	ORGENTEC Anti-Tissue-Transglutaminase IgA .....	19
4.4	Eurospital Eu-tTG® IgA .....	19
5	DIAGNOSTISET TUNNUSLUVUT JA TUTKIMUS.....	21
5.1	Diagnostiset tunnusluvut.....	21
5.2	Viitearvojen muuttaminen diagnostisten tunnuslukujen avulla.....	23
6	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	25
7	TULOKSET .....	27
8	POHDINTA .....	41
	LÄHTEET .....	44

## LYHENTEET JA TERMIT

Autovasta-aine	Elimistön omia proteiineja vastaan kohdistuva vasta-aine
ELISA	Entsyymivälitteinen immunologinen määrittämenetelmä
EMA	Endomysiumvasta-aine
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
Haplotyyppi	Yhden tai useamman alleelin ryhmä
HRP	Piparjuuriperoksidaasi
Ig	Immunoglobuliini eli vasta-aine
IgA	Immunoglobuliini A
IgG	Immunoglobuliini G
NPV	Negative Predictive Value eli negatiivinen odotusarvo
PPV	Positive Predictive Value eli positiivinen odotusarvo
TG2Ab	Transglutaminaasi 2-vasta-aine
TMB	3,3',5,5'-tetrametyyli-(1,1'-bifenyli)-4,4'-diamini
tTG	Kudostransglutaminaasi
ULN	Upper Limit of Normal eli viitealueen yläraja
Viitearvo	Raja-arvo, jonka ylittävät arvot tulkitaan positiivisiksi testituloksiksi ja alittavat negatiivisiksi testituloksiksi.

## 1 JOHDANTO

Keliakia on autoimmuunisairaus, jossa viljan valkuaisaine, gluteeni, aiheuttaa ohutsuolessa autoimmuunireaktion osalla henkilöistä, joilla on geneettinen alttius siihen. Gluteenin aikaansaamien suolisto-oireiden lisäksi potilailla voi esiintyä oireita myös muualla elimistössä, kuten iholla. Aina oireita ei kuitenkaan ilmene, mikä tekee keliakian diagnostiikasta hankalaa. (Salmi, Lindfors, Kurppa & Kaukinen 2017.)

Muiden autoimmuunisairauksien tapaan myös keliakian esiintyvyys on lisääntynyt viime vuosikymmenten aikana. Tähän ei ole syynä ainoastaan diagnostiikan paraneminen vaan myös taudin todellinen lisääntyminen väestössä. Suomessa keliakiaa sairastaa noin 2 prosenttia aikuisväestöstä. (Kaukinen, Collin & Mäki 2010.)

Hoitamattomana keliakikoille kehitty useimmiten IgA-luokan vasta-aineita kehon omaa proteiinia, transglutaminaasi 2:ta, vastaan. Keliakian ensisijaisena seulontatestinä käytetään juuri tämän autovasta-aineen mittaamiseen käytettäviä transglutaminaasi 2- sekä endomysiumvasta-ainetestejä. (Salmi ym. 2017.)

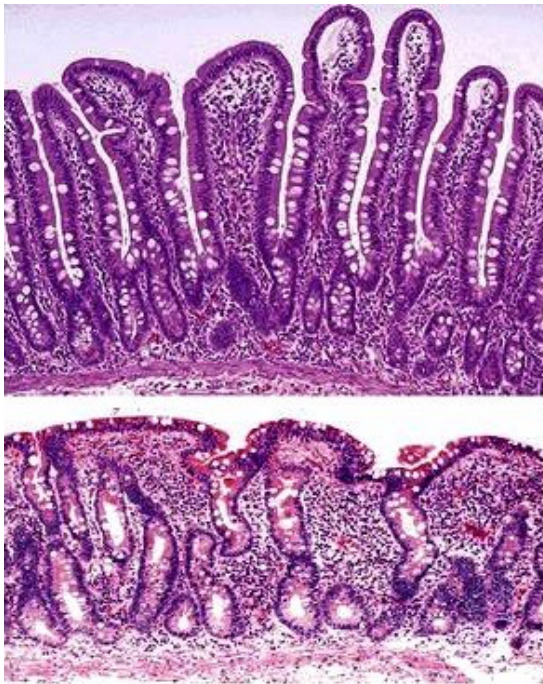
Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia kaupallisten transglutaminaasi 2-vasta-ainetestien toimivuutta keliakian diagnostiikassa diagnostisia tunnuslukuja hyväksi käyttäen. Keliakian diagnostiikan painottuminen yhä enemmän verestä mitattujen vasta-aineiden pitoisuuksien mittaamiseen on tehnyt aiheelliseksi vertailla näitä testejä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla neljää IgA-luokan kudostransglutaminaasin mittaamiseen käytettävää testiä potilasnäytteiden avulla. Työssä mukana olleet testit olivat Phadia EliA™ Celikey (tTG) -, Eurospitalin Eu-tTG® -, Inovon QUANTA Flash® h-tTg IgA ELISA- ja ORGENTECin Anti-Tissue-Transglutaminase IgA -testejä.

## 2 TAUSTA

### 2.1 Keliakia

Viljan gluteeni aiheuttaa keliakiaa sairastavilla limakalvolla tulehdusreaktion, vil-lusatrofian eli suolinukkakadon, kryptahyperplasian eli kuopakkeiden syvenemi-sen sekä mahdollisesti kliinisiä oireita (KUVA 1) (Salmi ym. 2017). Tämän lisäksi potilaille kehittyä autovasta-aineita kehon omaa transglutaminaasi 2-proteiinia vastaan. Keliakiaan sairastuminen vaatii gluteenin lisäksi myös geneettisen alt-tiuden, ja lähes kaikilla keliakikoilta löytyy perimästä HLA-DQ2 tai HLA-DQ8 haplotyytit. (Lindfors ym. 2019.)



KUVA 1. Yläpuolella terveen ihmisen ohutsuolen limakalvo ja alapuolella ke-liakiaa sairastavan ohutsuolen limakalvo (Celiac Disease Foundation 2015)

Gluteenin aiheuttaman limakalvovaurion seurauksena ravintoaineiden imeytymi-nen suolesta vereen häiriintyy, jolloin syntyy keliakikolle tyypillisiä oireita, kuten erilaisia vatsavaivoja. Keliakikoilla on myös suurempi todennäköisyys sairastua muihin autoimmuunisairauksiin, kuten tyypin 1 diabetekseen. (Mustajoki 2017.)

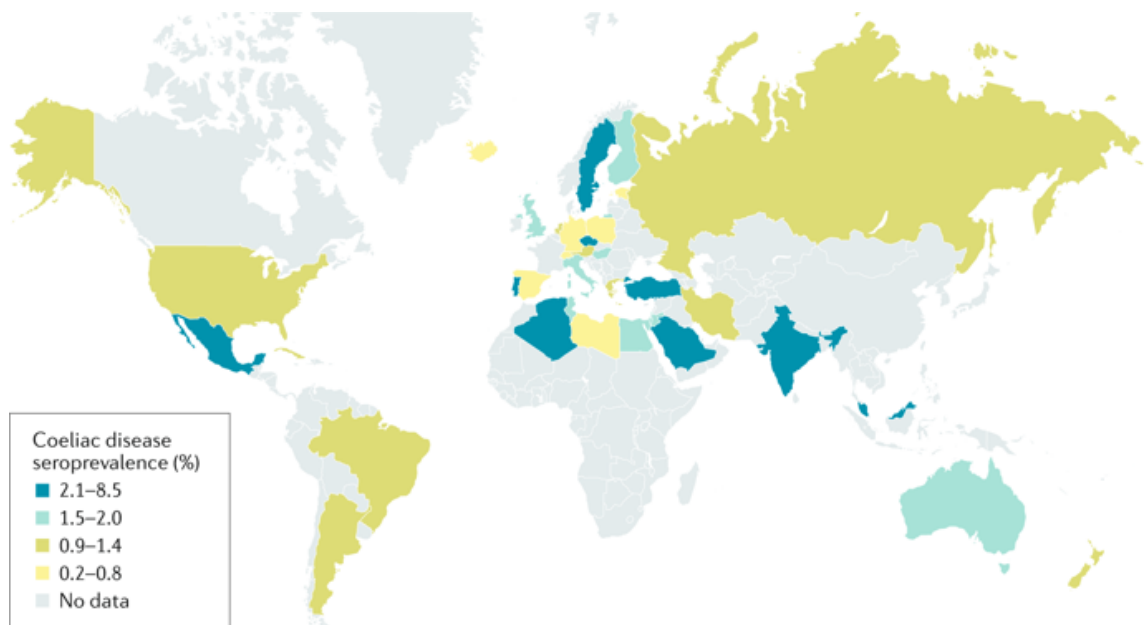
Ihokeliakia (dermatitis herpetiformis) on yksi keliakian muodoista ja se aiheuttaa rakkulaista ihottumaa taiteissa, pakaroissa sekä hiusrajassa. Ihokeliakikoilla

suolisto-oireet ovat vähäisiä tai niitä ei välttämättä esiinny lainkaan. Myös ihoke-  
liakiaa sairastavilta löytyy kuitenkin suolistosta limakalvovaurio. (Kaukinen ym.  
2010.)

### 2.1.1 Esiintyvyys

Ennen 1990-lukua keliakiaa pidettiin harvinaisena vaivana, joka koski ainoastaan  
lapsia ja länsieurooppalaisia. Nyt tiedetään, että keliakia on naisilla yleisempi kuin  
miehillä ja että se voi lauetta missä iässä tahansa gluteenille altistumisen jälkeen  
sekä koskea minkä tahansa etnisen ryhmän edustajaa. (Lindfors ym. 2019.)

Diagnostiikan kehittyminen sekä transglutaminaasi 2- sekä endomysiumvasta-  
ainetestien käyttöönotto on johtanut yhä useamman keliakiapotilaan diagno-  
soimiseen sekä mahdollistanut sairauden realistisemman esiintyvyyden arvioimi-  
sen väestössä. (Lindfors ym. 2019.)



KUVA 2. Keliakikkojen prosentuaalinen osuus maiden väestöstä serologisten  
vasta-ainetestien perusteella. (Lindfors ym. 2019)

Keliakiaa diagnosoidaan aikuisiällä yhä enemmän. Suomessa keliakiaa sairasta-  
via aikuisia epäillään olevan jopa 2-3 %. (Mustalahti ym. 2010; Catassi, Gatti &  
Fasano 2014 & Mustajoki 2017.) Tämä luku on huomattavasti suurempi kuin esi-  
merkiksi Saksassa, jossa tautia esiintyy vain noin 0,2 - 0,3 %:lla väestöstä, vaikka



gluteenisaanti ja geneettiset tekijät keliakian kannalta eivät merkittävästi eroa (Mustalahti ym. 2010; Catassi ym. 2014). Euroopassa keliakiaa esiintyy keskimäärin noin prosentilla väestöstä. Lapsilla keliakiaa tavataan aikuisia harvemmin, sillä kouluikäisistä suomalaislapsista noin prosentilla oletetaan olevan keliakia. (Mäki ym. 2003.)

### **2.1.2 Oireet ja hoito**

Keliakian taudinkuva voi olla kaikkea oireettoman ja vaikeiden, arkipäivää haittaavien oireiden väliltä. Keliakian oireet ovat useimmiten suolistoperäisiä ja näitä ovat muun muassa ripuli, ummetus ja erilaiset vatsavaivat. Myös erilaiset imeytymishäiriöt sekä laihtuminen voivat kieliä keliakiasta. Suoliston ulkopuolisiakin oireita on kuitenkin monia ja yksi yleisimmistä suoliston ulkopuolisista ilmenemis-  
muodoista on ihokeliakia. (Keliakia: Käypä hoito -suositus 2018.)

Keliakian ainoa hoitomuoto on gluteeniton ruokavalio, jota keliakikon tulee noudattaa elinikäisesti, jotta oireita ei ilmeneisi (Mustajoki 2017). Gluteenittomalla ruokavaliolla oireet pääosin häviävät ja ohutsuolen limakalvovaurio paranee. Joissakin harvoissa keliakiatapauksissa edes tiukka gluteeniton ruokavalio ei helpota potilaan oireita. Tällaista keliakiaa kutsutaan refraktaariseksi keliakiaksi. (Kaukinen, Ilus, Vornanen & Collin 2012.) Joissain tapauksissa diagnosoiduille keliakikoille voidaan tehdä seurantabiopsia, jonka tarkoituksena on seurata ohutsuolen limakalvon korjaantumista gluteenittomalla ruokavaliolla. Veren transglutaminaasi 2-vasta-ainepitoisuuksia mittaamalla voidaan varmistaa gluteenittoman ruokavalion tehokkuus, mutta nämä vasta-ainepitoisuudet voivat normalisoi-  
tua vasta parinkin vuoden päästä, mikäli diagnosointivaiheessa mitatut transglutaminaasi 2-vasta-ainepitoisuudet ovat korkeat. (Salmi ym. 2017.)

### **2.1.3 Diagnostiikka**

Keliakian diagnostiikassa ensisijaisena seulontana käytetään serologisia vasta-  
ainetestejä, joista käytetyimpiä ovat transglutaminaasi 2- sekä endomysium-

vasta-ainetestit. Uusien, 18.12.2018 voimaan astuneiden Käypä hoito -suositusten mukaan Suomessa keliakiadiagnosiin riittää positiivinen tulos endomysiumvasta-ainetestistä sekä korkea, yli 10 kertaa viitealueen ylärajan ylittävä transglutaminaasivasta-aine-arvo. Jos edes toinen mainituista kriteereistä ei täyty, niin diagnoosia ei voida todeta ilman ohutsuolesta otetusta koepalassa todettavaa suolinukkavauriota. HLA-määrittystä ei tarvita keliakiandiagnostiikassa perusterveydenhuollossa, vaan sitä käytetään ongelmatilanteissa. (Käypä hoito 2018.)

Käypä hoito -suositukset elävät jatkuvasti uusien tutkimusten ansiosta. Ennen uusimpia, vuonna 2012 laadittuja Käypä hoito -suosituksia, ESPGHANin kriteerien mukaan yli 10-kertainen vasta-ainearvo sekä positiivinen tulos endomysiumvasta-ainetestistä kelpasi ainoastaan lapsilla riittäväksi perusteeksi keliakiadiagnosiin toteamiseksi. Kaupallisten transglutaminaasi 2-testien mittausalueet ja viitearvot kuitenkin vaihtelevat testien välillä, mutta yli 10-kertainen vasta-ainearvo viitealueen ylärajaan nähden näyttää kuitenkin olevan luotettava kaikkien testien osalta. (Husby ym. 2012.)

Keliakiaa sairastavilla on muuta väestöä todennäköisemmin selektiivinen IgA-luokan vasta-aineiden puutostila, jolloin tällaiset henkilöt saavat negatiivisen tuloksen IgA-luokan vasta-ainetestistä. Negatiivinen testitulos näillä henkilöillä ei poissulje keliakiaa, jonka vuoksi tällaisissa tapauksissa on syytä mitata myös IgG-luokan transglutaminaasi 2-vasta-ainearvot. Mikäli potilas ei kuitenkaan kärsi IgA-luokan vasta-aineiden puutostilasta, niin ei ole syytä mitata IgG-luokan vasta-ainearvoja. (Käypä hoito 2018.)

Keliakian diagnostiikassa käytetään joskus myös peptidigliadiinivasta-ainetestejä, jotka ovat modifioituja versioita normaaleista gliadiinivasta-ainetesteistä. Peptidigliadiinivasta-ainetestit eivät kuitenkaan yllä sensitiivisyyden ja spesifisyyden osalta samalle tasolle transglutaminaasivasta-ainetestien kanssa, vaikka ero näiden testien välillä ei ole huomattavan suuri. (Lewis & Scott 2010.) Nämä testit eivät kuitenkaan ole Käypä hoito -suosituksessa mukana. (Käypä Hoito 2018.)

Markkinoilla on saatavilla myös transglutaminaasi 2- ja peptidigliadiinivasta-aineiden mittaamiseen perustuvia pikatestejä, joiden avulla voidaan nopeuttaa keliakiadiagnostiikkaa. Positiivinen tulos pikatestistä ei kuitenkaan automaattisesti

tarkoita keliakiaa, mutta sen avulla voidaan nopeuttaa potilaan varsinaisen diagnoosin selvittämistä lähettämällä tämä varsinaisiin laboratoriotesteihin diagnoosin varmistamiseksi. Lisäksi testiä voidaan käyttää keliakian poissulkemiseen epäillyllä potilaalla. Pikatestit eivät yllä sensitiivisyyden ja spesifisyyden kannalta samalle tasolle laboratoriotestien kanssa. (Bienvenu ym. 2014.)

Tehokas tapa poissulkea keliakiadiagnoosi on selvittää, kantaako potilas keliakiaan vahvasti yhdistettyjä HLA-DQ2 tai HLA-DQ8 -geenialueita. Noin 95 % keliakikoista kantaa HLA-DQ2- ja loput 5 % HLA-DQ8-heterodimeeriä. Näiden perintötekijöiden puuttumisella voidaan käytännössä pois sulkea keliakia. (Eisenberg 2016.) Mikäli keliakiadiagnoosi kuitenkin saavutetaan serologisin keinoin, niin geneettisellä testillä ei ole lisäarvoa ja sitä suositellaankin käyttämään vain erikoistapauksissa (Lindfors 2019.)

#### **2.1.4 Transglutaminaasi 2-vasta-aineet**

Transglutaminaasi 2-vasta-aineet ovat keliakialle tyypillisiä. Yleisesti ottaen vasta-aineet ovat veressä vaikuttavia proteiineja, jotka auttavat tekemään elimistölle vieraat tunkeutujat vaarattomiksi. Autoimmuunisairaudessa vasta-aineet aineet puolestaan kohdistuvat elimistön omia kudoksia tai proteiineja vastaan, mikä usein liittyy kohde-elimen solujen vaurioon ja tätä kautta haittaavat kohde-elimen normaalitoimintaa. Tällaisia vasta-aineita kutsutaan autovasta-aineiksi. Autovasta-aineet saavat elimen häiriintymään, mikä haittaa sen normaalitoimintaa. (Mustajoki 2018.)

Transglutaminaasi 2-proteiini on seerumin autovasta-aineiden kohdeantigeeni keliakiaa sairastavilla. Keliakiassa kudostransglutaminaasin eli transglutaminaasi 2:n keskeinen toiminto on gluteenin sisältämien gliadiinipeptidien glutamiinitähtien deamidointi ja muuttaminen glutamiinihapoksi. Tämä tekee gliadiinipeptidien varauksen negatiiviseksi, jolloin ne sitoutuvat tehokkaammin HLA-DQ2/DQ8 -molekyyleihin. Keliakikoilla tämä johtaa immuunireaktioon ja samanaikaiseen autoimmuunivasteeseen sekä vähittäiseen ohutsuolen limakalvovaurion kehittymiseen. (Lindfors 2019; Tonutti & Bizarro 2014.)

### 3 ELISA-MENETELMÄ

#### 3.1 Yleistä

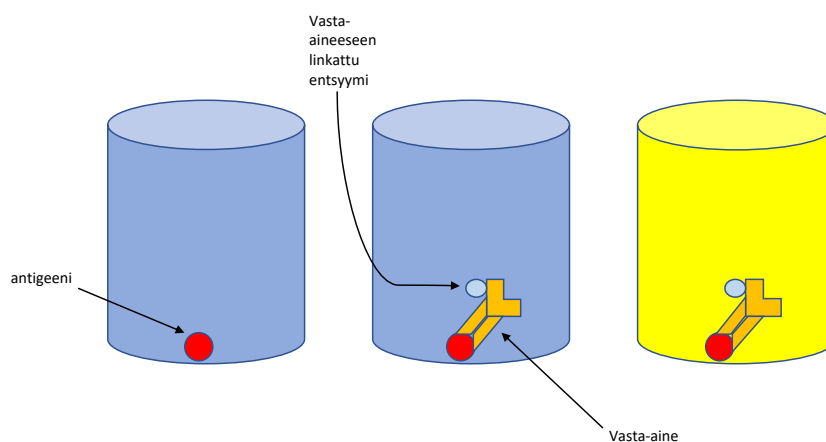
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) on immunologinen määrittäminen menetelmä. Entsyymi-immunomäärityksissä entsyymi on kiinnitetty yhteen reagensseista, mikä mahdollistaa kvantitatiivisen määrittämisen värikehityksen avulla. Tyypillisimpiä ELISA-menetelmiä ovat suora, epäsuora sekä sandwich-menetelmä. Lisäksi kaikkiin edellä mainittuihin menetelmiin voidaan soveltaa inhiboivaa ja kompetitiivista ELISAA. (Crowther 2009, 9-11.)

ELISA-menetelmissä on käytettävissä useita erilaisia sovelluksia ja menetelmillä voidaankin määrittää sekä antigeeni- että vasta-ainepitoisuuksia. ELISAssa voidaan käyttää esimerkiksi fotometrisesti mitattavia, fluoresoivia, tai kemiluminesenssiominaisuuksia hyväksi käytettäviä leimoja. (Halonen, T. 2004, 94.) Yksi sovellus on myös biotiini-avidini välitteinen ELISA (Thermo Scientific 2010).

##### 3.1.1 Suora ELISA

Suorassa ELISA-menetelmässä antigeeni sidotaan kiinteään faasiin käsittelemällä kiinteää pintaa antigeenillä. Antigeenin ja kiinteän pinnan välillä tapahtuu inkubaation aikana passiivista sitoutumista, jonka jälkeen sitoutumattomat antigeenit pestään pois. Sitoutuneita antigeenejä käsitellään tämän jälkeen entsyymileimatuilla, antigeenille spesifisillä vasta-aineilla, jotka tarttuvat kiinni antigeeniin. Inkubaation jälkeen sitoutumaton entsyymikonjugaatti pestään pois, jonka jälkeen lisätään substraattiliuos, jolloin entsyymi ja substraatin välinen reaktio aiheuttaa värimuutoksen. Värimuutos keskeytetään lyhyen inkuboinnin jälkeen pysäytysliuoksella (stop solution), jolloin substraatin ja entsyymin välinen reaktio keskeytyy. Tulos voidaan lukea spektrofotometrillä tämän jälkeen. (Crowther 2009, 12.) Suora ELISA-menetelmä soveltuu parhaiten antigeenin kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen detektioon, vasta-aineseulontaan ja epitooppien kartoitukseen (Lin 2015).

Kuviosta 1 nähdään, että kuoppaan sidottu antigeeni sitoutuu vasta-aine-entsyymikompleksiin, jolloin havaitaan värimuutos. Värimuutoksen avulla voidaan mitata määritettävän yhdisteen konsentraatio.



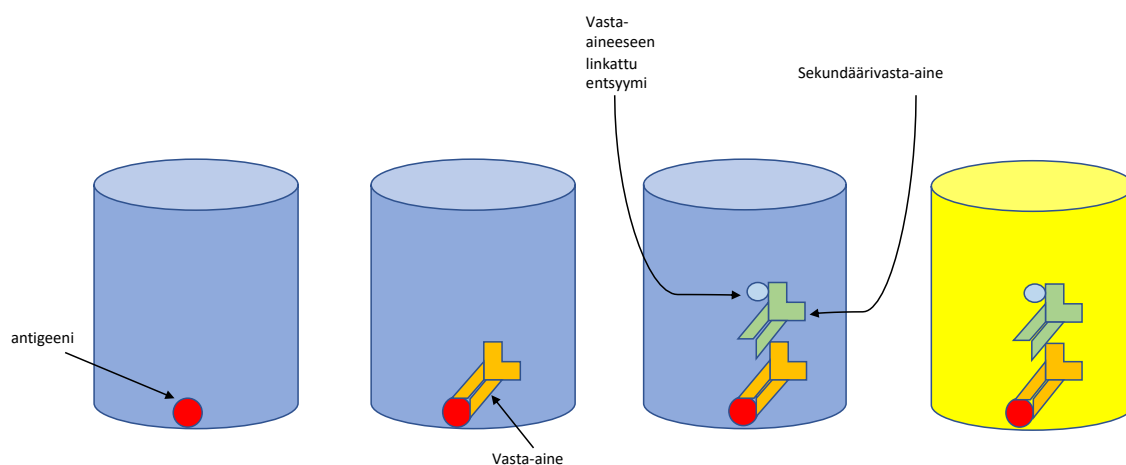
KUVIO 1. Kuvasarjassa esiteltynä suoran ELISA-menetelmän periaate. Ensimmäisessä kuvassa vasemmalta kiinteään faasiin on sidottu antigeeniä passiivisen diffuusion avulla. Toisessa kuvassa entsyymileimatun vasta-aineen lisäyksen jälkeen vasta-aine kiinnittyy kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Viimeisessä kuvassa joukkoon on lisätty sopivaa substraattia, jolloin muodostuu värireaktio substraatin sitoutuessa entsyymiin.

Koska menetelmässä käytetään vain yhtä vasta-ainetta, niin ristireaktiivisuutta ei voi tapahtua sekundäärivasta-aineen kanssa. Suora menetelmä on myös muita ELISA-menetelmiä sujuvampi, sillä työvaiheita on vain vähän. (Lin 2015, 62.) Vähäisen reagenssimäärän ja menetelmän yksinkertaisuuden vuoksi menetelmä ei myöskään ole kovin altis virheille. Menetelmässä on kuitenkin huonotkin puolensa, sillä vasta-aineen kiinnittyminen antigeeniin ei ole täysin spesifistä, sillä muutkin epäpuhtauksina tulevat proteiinit voivat tarttua antigeeniin, jolloin syntyy taustahäiriötä. (Bio-rad 2018.) Suora menetelmä sellaisenaan ei ole kovin tehokas, mutta sitä sovelletaan kompetitiivisessa ja inhiboivassa menetelmässä (Crowther 2009, 14).

### 3.1.2 Epäsuora ELISA

Samoin kuin suorassa ELISA-menetelmässä, myös epäsuorassa menetelmässä kiinteää faasia käsitellään antigeenillä, jolloin antigeeni passiivisesti sitoutuu tähän. Sitoutumisen jälkeen lisätään tyypillisesti näytettä, esimerkiksi seerumia,

joka sisältää erilaisia vasta-aineita, joista antigeenille spesifiset vasta-aineet sitoutuvat antigeeniin inkuboinnin jälkeen. Sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois, jonka jälkeen lisätään entsyymikonjugaattia eli sekundääristä vasta-ainetta, joka sitoutuu spesifisesti primääriseen vasta-aineeseen. Jälleen sitoutumattomat sekundääriset vasta-aineet pestään pois inkuboinnin jälkeen, jonka jälkeen lisätään substraatti, jolloin tapahtuu samanlainen värireaktio kuin suorassa menetelmässä. Reaktio lopetetaan samalla tavalla kuin suorassa menetelmässä eli pysäytysliuoksella, jonka jälkeen vasta-ainepitoisuus voidaan lukea spektrofotometrillä. (Crowther 2009, 16.) Epäsuora ELISA-menetelmä soveltuu parhaiten vasta-aineiden määrittämiseen, epitooppien kartoitukseen sekä proteiinien kvantitoimiseen (Lin 2015, 52). Kuviossa 2 havainnollistetaan epäsuoraa menetelmää.



KUVIO 2. Epäsuoran ELISA-menetelmän periaate. Vasemmalta katsottuna ensimmäisessä kuvassa antigeeni on sidottu kiinteään faasiin. Toisessa kuvassa primäärisen vasta-aineen lisäämisen jälkeen vasta-aine ja antigeeni sitoutuvat. Kolmannessa kuvassa lisätty sekundäärinen entsyymileimattu vasta-aine sitoutuu primääriseen vasta-aineeseen. Viimeisessä kuvassa havaitaan värimuutos, kun substraatti ja entsyymileima sitoutuvat.

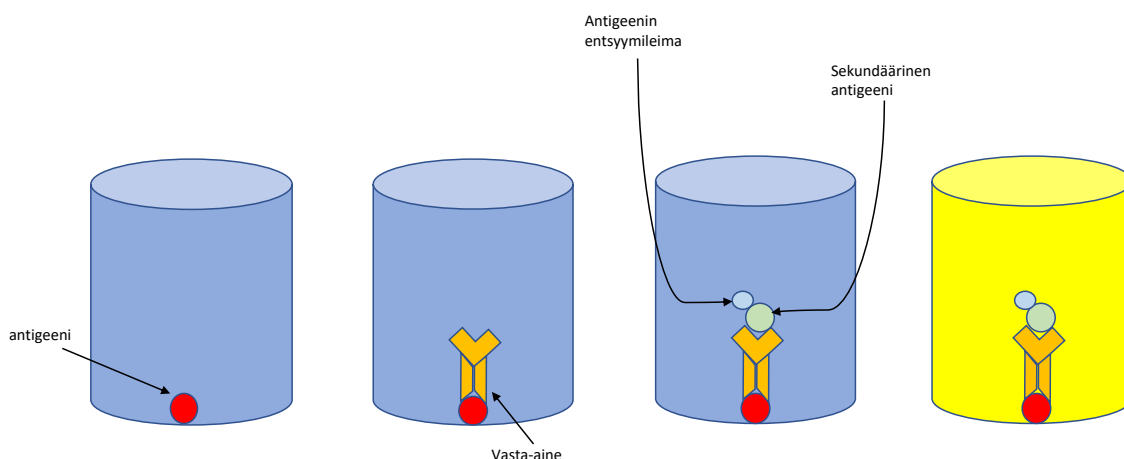
Epäsuora ELISA-menetelmä on työläämpi kuin suora menetelmä, ja menetelmässä käytetty sekundäärinen vasta-aine ja sen sitoutuminen primääriseen vasta-aineeseen voi aiheuttaa ristireaktiivisuutta, jolloin syntyy taustahäiriötä (Thermo Scientific 2010). Sekundäärinen vasta-aine kuitenkin parantaa primäärisen vasta-aineen signaalia tehden menetelmästä sensitiivisemmän verrattuna suoraan ELISA-menetelmään. (Lin 2015, 52)

### 3.1.3 Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISA-menetelmä voidaan jakaa suoraan sandwich-menetelmään sekä epäsuoraan sandwich-menetelmään. Nämä menetelmät muistuttavat aikaisemmin esiteltyjä suoraa ja epäsuoraa ELISA-menetelmää. (Crowther 2009, 16.)

Kaksoisvasta-ainetekniikaksikin kutsuttua suoraa sandwich-menetelmässä vasta-aine on sidottu kiinteään faasiin pintaan, esimerkiksi kuoppalevyn kuopan pintaan. Antigeeniä sisältävän näytteen kuoppaan lisäämisen jälkeen antigeeni sitoutuu kiinteässä faasissa olevaan vasta-aineeseen. Pesun jälkeen lisätään entsyymileimattu sekundäärivasta-aine, joka kiinnittyy antigeeniin muodostaen kaksoisvasta-ainekompleksin. Tämän jälkeen sitoutumattomat sekundäärivasta-aineet pestään pois ja lisätään substraatti. Substraatin ja entsyymin välinen reaktio voidaan havaita tämän jälkeen mitattavana yhdisteenä. (Halonen 2004, 94-95.)

Epäsuora sandwich-menetelmä on ensimmäisten vaiheiden osalta täsmälleen identtinen kuin suora sandwich-menetelmä. Epäsuorassa sandwich-versiossa kuitenkin entsyymileimatun vasta-aineen sijasta antigeeniin kiinnittyy normaali, entsyymileimaamaton vasta-aine. Vasta pesun ja inkuboinnin jälkeen lisätään entsyymileimattu vasta-aine, joka tarttuu sekundääriseen vasta-aineeseen. Tästä eteenpäin menetelmä muistuttaa täysin epäsuoraa ELISA-menetelmää. (Crowther 2009, 20.) Sandwich-ELISA soveltuu parhaiten antigeenien määrittämiseen (Lin 2015, 69). Kuviossa 3 antigeenin sijaan määritetään kuitenkin vasta-ainetta suoralla sandwich-menetelmällä.



KUVIO 3. Kuvasarjassa esitettyä sandwich ELISA-menetelmää. Ensimmäisessä kuvassa vasemmalta kiinteä faasiin on sidottu primääristä antigeeniä, johon vasta-aine sitoutuu kuvasarjan toisessa kuvassa. Kolmannessa kuvassa antigeeni-vasta-ainekompleksiin sitoutuu sekundäärinen entsyymileimattu antigeeni. Viimeisessä kuvassa sopivan substraattisäyksen jälkeen voidaan havaita värimuutos, kun entsyymi ja substraatti reagoivat.

Koska suorassa sandwich-menetelmässä käytetään yhtä leimattua entsyymiä, se pystyy sitoutumaan vain yhteen antigeeniin, mikä rajoittaa menetelmän monipuolisuutta. Tästä johtuen jokaista antigeeniä varten tarvitsee optimoida spesifinen entsyymileimattu vasta-aine. Menetelmä myös vaatii antigeeniltä kahta sitoutumisaluetta eli epitooppia, jotta sekä kaappaajavasta-aine että detektiovasta-aine pystyvät sitoutumaan antigeeniin. Menetelmä soveltuu kompleksisten näytteiden analysointiin, sillä ne sisältävät useita epitooppeja. (Crowther 2009, 18-19.)

Epäsuoran sandwich-menetelmän etuihin lukeutuu se, että antigeeniin sitoutuva vasta-aine voi olla mistä tahansa paitsi samasta eläinlajista kuin kaappaajavasta-aine. Tällöin entsyymikonjugaatti ei reagoi kaappaajavasta-aineen kanssa eikä synny taustahäiriötä. On kuitenkin myös mahdollista käyttää saman lajin vasta-aineita, mutta niiden optimoinnin kanssa on oltava tarkkoja. (Crowther 2009, 20.) Sandwich-menetelmää helpottaa huomattavasti se, että näytettä ei tarvitse puhdistaa ennen analyysiä (Lin 2015, 70). Vasta-aineiden optimointi menetelmää varten voi kuitenkin olla vaikeaa, jonka vuoksi voi tapahtua ristireaktiivisuutta, jossa kaappaajavasta-aine sekä detektiovasta-aine sitoutuvat toisiinsa (Bio-Rad 2018; Lin 2015, 70).

#### **3.1.4 Kompetitiivinen ELISA**

Kompetitiivinen ELISA, joka tunnetaan myös nimellä inhiboiva ELISA, on menetelmä, jossa näytteessä oleva vasta-aine kilpailee entsyymileimattun vasta-aineen kanssa. Ensimmäisessä vaiheessa näytettä, joka sisältää vasta-ainetta, lisätään kuoppaan yhdessä entsyymikonjugaatin kanssa. Tällaisessa tilanteessa sekä näytteen sisältämä vasta-aine, että entsyymikonjugaatti kilpailevat samoista sitoutumiskohdista kuoppalevyn pohjaan ”coutatun” antigeenin kanssa. Inkubaation jälkeen sitoutumattomat partikkelit pestään pois, minkä jälkeen lisätään



substraatti. Substraatti pystyy sitoutumaan ainoastaan entsyymikonjugaatteihin, jotka ovat sitoutuneet kiinteässä faasissa olevaan antigeeniin. Näin ollen mitä voimakkaampi värimuutos havaitaan, sitä pienempi on näytteen vasta-ainepitoisuus. Näytteen pitoisuus on siis kääntäen verrannollinen vastesignaaliin nähden. (Crowther 2009, 25)

Menetelmän päähyöty on se, että näytettä ei tarvitse puhdistaa ja tämän vuoksi voidaankin käyttää myös epäpuhtaita näytteitä. Lisäksi menetelmää voidaan soveltaa suoraan, epäsuoraan ja Sandwich-menetelmään. Kompetitiivista ja inhiboivaa ELISAA voidaan käyttää, kun käytössä on vain yksi vasta-aine tai silloin, kun tutkitaan antigeeniä, johon pystyy sitoutumaan vain yksi vasta-aine (Bio-Rad 2018.)

## 4 OPINNÄYTETYÖSSÄ VERTAILLUT TESTIT

Opinnäytetyössä vertailtiin yhteensä neljän eri valmistajan IgA-luokan kudostransglutaminaasivasta-ainetestiä. Testit valittiin Tampereen Keliakiatukimuskuskuksen toimesta. Vertailut testit olivat Phadia Oy:n EliA™ Celikey IgA-, Eurospitalin Eu-tTG® IgA-, Inovon QUANTA Flash® h-tTg IgA ELISA- ja ORGENTECin Anti-Tissue-Transglutaminase IgA -vasta-ainetestit. Kaikki testit perustuvat epäsuoraan ELISA-menetelmään. Testien vertailussa on syytä muistaa, että mitään absoluuttista viitestandardiarvoa ei ole, jonka vuoksi onkin tärkeää tietää, millä testillä vasta-aineet on mitattu ja mikä kyseisen testin viitearvo on (Käypä Hoito 2018).

### 4.1 Phadia EliA™ Celikey IgA

EliA™ Celikey™ IgA -vasta-ainetestit on Phadian valmistama testi. Testissä käytetään antigeeninä ihmisen rekombinanttikudostransglutaminaasia, jota on tuotettu bakulovirus- tai hyönteissolujärjestelmässä. (Pharmacia Diagnostics 2006.)

Testikitti sisältää yhteensä kuusi standardia, joiden konsentraatiot ovat 0, 3, 7, 16, 40 ja 100 U/ml. Standardeissa ja kontrolleissa on molemmissa käytetty ihmisen seerumia. Vasta-aineessa on käytetty HRP-entsyymileimaa ja substraattina on TMB:tä. Pysäytysliuoksena käytetään 0,5 M rikkihappoa. (Pharmacia Diagnostics 2004.)

Testin määrittäjäraja on 0,1 U/ml ja maksimiarvo on 100 U/ml. Negatiivisiksi tuloksiksi tulkitaan valmistajan ohjeiden mukaan kaikki alle 5 U/ml tulokset, epäselviksi 5 – 8 U/ml tulokset sekä positiiviksi kaikki yli 8 U/ml tulokset. Valmistajan mukaan kyseiset arvot ovat kuitenkin vain ohjearvoja, jonka vuoksi on tärkeää, että jokainen laboratorio vahvistaa viitearvojen pitävyyden. Inkubaatiot ovat kestoltaan yhteensä 70 minuuttia ja substraatin lisäyksen jälkeinen, viimeinen inkubaatio on suoritettava pimeässä. Varsinaiset määrittäjätulokset lasketaan standardikuvaajan avulla. (Pharmacia Diagnostics 2004.)

## 4.2 Inova QUANTA Flash® h-tTg IgA ELISA

Inova QUANTA Flash® h-tTg IgA ELISA -vasta-ainetesti on Inova Diagnosticsin valmistama testi. Testiä voidaan käyttää semikvantitatiiviseen IgA-luokan transglutaminaasivasta-aineiden detektioon. Entsyymikonjugaattina käytetään vuohesta eristettyjä IgA-luokan vasta-aineita ja kromogeeninä TMB:tä. Pysäytysliuoksena käytetään 0,344 M rikkihappoa. (Inova Diagnostic 2005.)

Testi ei sisällä muista kiteistä poiketen normaaleja standardeja, vaan testissä varsinaisia tuloksia verrataan heikkoon positiiviseen näytteeseen, jonka pitoisuus on noin 25 U/ml. Alle 20 U/ml tulokset tulkitaan negatiivisiksi ja 20 U/ml ja tämän yli menevät vasta-ainearvot tulkitaan positiivisiksi testituloksiksi. Testin valmistaja kehottaa jokaista laboratoriota määrittämään omat katkaisuraja-arvonsa, sillä populaatioiden ja työskentelytapojen välillä on vaihtelua. Inkubaatiot kestävät yhteensä 90 minuuttia ja viimeinen, substraatin lisäyksen jälkeen suoritettava 30 minuuttia kestävä inkubaatio on suoritettava pimeässä. (Inova Diagnostic 2005.)

## 4.3 ORGENTEC Anti-Tissue-Transglutaminase IgA

ORGENTEC Anti-Tissue-Transglutaminase IgA -vasta-ainetesti on ORGENTEC Diagnosticaka CmbH:n valmistama testi. Kaivojen pintaan sidottuna antigeeninä käytetään ihmisen rekombinanttia kudostransglutaminaasia. Testikitti sisältää yhteensä kuutta standardia, jotka olivat pitoisuudeltaan 0, 5, 10, 25, 75 ja 100 U/ml. Testissä käytettävä entsyymikonjugaatti on HRP -leimattu ja substraattina käytetään TMB:tä. Pysäytysliuoksena käytetään happoa. (ORGENTEC Diagnostika 2018.)

Testin mittausalue on 0 – 200 U/ml ja valmistajan ohjeistama viitearvo on 10 U/ml. 10 U/ml ja tätä suuremmat vasta-ainearvot tulkitaan positiivisiksi ja pienemmät negatiivisiksi testituloksiksi. Testin yhteenlasketut inkubaatioajat ovat kestoaltaan 65 minuuttia. Tulokset määritetään standardikuvaajan avulla. (ORGENTEC Diagnostika 2018.)

## 4.4 Eurospital Eu-tTG® IgA

Eurospital Eu-tTG® IgA -vasta-ainetesti on Eurospitalin Diagnostic Divisionin valmistama tuote. Testissä kiinteään faasiin ollaan sidottu antigeeniksi ihmisen rekombinanttia transglutaminaasia, jota ollaan tuotettu prokaryoottisolussa (*E.coli*). Tällä pyritään välttämään ristireaktiivisuutta eukaryoottiantigeenien kanssa. (Eurospital 2019.)

Standardeja testipakkaus sisältää yhteensä 5 kappaletta ja ne sisältävät ihmisen transglutaminaasivasta-aineita. Positiivinen ja negatiivinen kontrolli on kontrollista riippuen valmistettu käyttämällä joko positiivista tai negatiivista kontrolliseerumia. Testikitissä käytettävä entsyymikonjugaatti sen sijaan on valmistettu vuohen vasta-aineista, jotka on leimattu HRP:llä. Myös tässä testissä käytetään TMB:tä substraattina. Pysäytysliuoksena käytetään 0,5 M rikkihappoa. (Eurospital 2013.)

Valmistajan suosittelemat viitearvot ovat seuraavat: alle 9 U/ml tulkitaan negatiiviseksi, 9-16 U/ml alueella olevien tulosten tulkitaan olevan epäselviä ja 16 U/ml sekä tätä suuremmat tulkitaan positiivisiksi testituloksiksi. Valmistajan mukaan on kuitenkin suositeltavaa, että jokainen laboratorio määrittää omat viitearvonsa testille. Inkubaatioiden kesto on yhteensä 90 minuuttia. Tulokset lasketaan standardikuvaajan avulla. (Eurospital 2013.)

## 5 DIAGNOSTISET TUNNUSLUVUT JA TUTKIMUS

### 5.1 Diagnostiset tunnusluvut

Diagnostisten testien kykyä erotella terveet ja sairaat kuvataan usein termeillä sensitiivisyys, spesifisyys, positiivinen odotusarvo sekä negatiivinen odotusarvo. Nämä tunnusluvut voidaan laskea, kun tiedetään testitulokset sekä lopullinen diagnoosi. Tunnusluvut lasketaan tavallisesti edellä esitettyyn taulukkoon (taulukko 1). (Akobeng 2007.)

TAULUKKO 1. Diagnostisten testien tulosten esittämisessä käytetty taulukko

	Sairaat	Terveet	
Testiposiitivinen	a	b	Kaikki testiposiitiiviset (a+b)
Testinegatiivinen	c	d	Kaikki testinegatiiviset (c+d)
	Kaikki sairaaksi diagnosoidut (a+c)	Kaikki terveeksi diagnosoidut (b+d)	

Testin sensitiivisyydellä kuvataan kaikkia niitä, jotka ovat sekä sairaita että testiposiitiivisia. Sensitiivisyys lasketaan siis sairaiden testiposiitiivisten osuudesta kaikkiin sairaisiin nähden. Testin sensitiivisyys näin ollen kuvaa, kuinka hyvä testi on tunnistamaan sairaat, kun tutkitaan ainoastaan sairaita. Terveet, testiposiitiivisen tuloksen saaneet eivät siis liity sensitiivisyyteen millään tapaa. (Akobeng 2007.) Sensitiivisyys lasketaan taulukon 1 termejä käyttäen seuraavasti.

$$\text{Sensitiivisyys} = \frac{a}{a + c} \quad (1)$$

Spesifisyydellä kuvataan testin kykyä tunnistaa terve terveeksi. Toisin sanoen testin spesifisyys kuvaa kaikkia terveitä testinegatiivisia. Spesifisyydessä ollaan siis kiinnostuneista henkilöistä, joilla ei ole sairautta. Henkilöt, jotka ovat sairaita,

mutta saavat testinegatiivisen tuloksen eivät liity spesifisyyteen. Spesifisyys lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti. (Akobeng 2007.)

$$\text{Spesifisyys} = \frac{d}{b + d} \quad (2)$$

Korkean sensitiivisyyden omaava testi poissulkee sairauden mahdollisuuden, kun testi on negatiivinen. Tällainen testi siis tunnistaa tarkasti terveiden keskuudesta. Sensitiivisyys ja spesifisyys ovat usein kääntäen verrannollisia, eli sensitiivisyyden arvon noustessa spesifisyyden arvo laskee. (Akobeng 2007.)

Koska diagnostisten testituloksien on tarkoitus johtaa diagnoosin tekemiseen, on syytä tietää todennäköisyys, jolla testitulos tuottaa oikean diagnoosin. PPV eli Positive Predictive Value ja NPV eli Negative Predictive Value ilmaisevat todennäköisyyttä, jolla voidaan ennustaa potilaan olevan tietyllä todennäköisyydellä sairas. Ennustearvojen ennustamat todennäköisyydet kuitenkin vaihtelevat taudin esiintyvyyden mukaan. (Akobeng 2007.)

PPV kuvaa prosenttiosuutta potilaista, jotka ovat testiposiitivisuuden lisäksi myös oikeasti sairaita. Toisin sanoen positiivinen ennustearvo ilmaisee, kuinka hyvin diagnostinen testi tunnistaa positiivisen testituloksen saaneen potilaan sairaaksi. Se lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti käyttäen taulukon 1 termejä hyväksi.

$$PPV = \frac{a}{a + b} \quad (3)$$

NPV puolestaan voidaan laskea käytännössä samalla kaavalla, mutta NPV:n kohdalla positiiviset testitulokset on korvattu negatiivisilla testituloksilla. Toisin ilmaistuna negatiivinen odotusarvo kuvaa, miten hyvin testi tunnistaa negatiivisen testituloksen saaneen potilaan terveeksi. Kaava esitetään seuraavasti.

$$NPV = \frac{d}{c + d} \quad (4)$$

Diagnostisten testien vertailussa käytetään apuna useasti myös ROC-käyriä eli Receiver Operator Characteristic -käyriä. ROC-kuvajassa y-akselilla on testin sensitiivisyys ja x-akselilla 1-spesifisyys tai FPR eli False Positive Rate. ROC-käyriä käytetään, koska ne kuvaavat paremmin testin diagnostista suorituskkyä kuin sensitiivisyys ja spesifisyys. (Park, Goo & Jo 2004.)

Yksi tärkeimmistä ROC-kuvaajista havaittavista tiedoista on AUC eli Area Under Curve. AUC kuvaa testin kokonaissuorituskkyä ja se tulkitaan sensitiivisyyden keskiarvon ja jokaisen spesifisyysarvon välisenä suureena. AUC voi saada arvoja ainoastaan 0:n ja 1:n väliltä, sillä molemmilla, x- ja y-akselilla, suurin lukuarvo on 1. Mitä lähempänä yhtä AUC:in lukuarvo on, sitä parempi diagnostinen testi on kyseessä. Jos jonkun testin AUC = 1, niin kyseessä olisi täydellisen tarkka testi. (Park ym. 2004.)

Diagnostisten testien vertailussa käytetään joskus myös apuna Youdenin indeksä. Youdenin indeksi on ROC-käyrän liittyvä suure, jota voidaan käyttää matemaattisesti optimaalisen viitearvon löytämiseksi sensitiivisyyden ja spesifisyyden avulla. Youdenin indeksin arvo on kompromissiarvo sensitiivisyyden ja spesifisyyden välillä, kun kumpaakaan niistä ei painoteta toista enemmän. (Shan 2015.) Toisin sanoen Youdenin indeksin avulla määritettävä optimaalinen viitearvo on pisteessä, jossa spesifisyys ja sensitiivisyyden summa on suurimmillaan. Indeksi voidaan laskea seuraavalla kaavalla. (Hajian-Tilaki 2013.)

$$J = \text{Sensitiivisyys} + \text{Spesifisyys} - 1 \quad (5)$$

## 5.2 Viitearvojen muuttaminen diagnostisten tunnuslukujen avulla

Tutkimusten mukaan testin sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä voidaan parantaa ROC-analyysin ja Youdenin indeksin avulla määritetyillä viitearvoilla.

Kuutta kaupallista IgA-luokan kudostransglutaminaasivasta-ainetestä vertaillessa tutkimuksessa ROC-analyysiin avulla määritetyt uudet viitearvot paransi-

vat kaikkien paitsi yhden testin sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä. Tutkimuksessa viitearvoja muutettiin jopa 50 %:lla ROC-analyysin perustuen. (Fernandez ym. 2005.)

Toisessa tutkimuksessa vertailtiin yhteensä neljää kaupallista keliakian diagnostiikassa käytettyä transglutaminaasi 2-vasta-ainetestiä. Tutkimuksessa selvitetiin ROC-analyysin avulla viitearvo, jossa testin sensitiivisyys ja spesifisyys ovat korkeimmillaan. Celikeyllä tämä viitearvo oli tutkimuksen mukaan 2,3 U/ml (sensitiivisyys 97 % ja spesifisyys 98%) ja Eurospitalilla 9,9 U/ml (sensitiivisyys 94 ja spesifisyys 98%). ROC-analyysin avulla määritetyt käyrän alle jääneet alat (AUC) olivat Celikeyllä 0,969 ja Eurospitalilla 0,965. (Martini ym. 2001.)



## 6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työssä käytettiin seeruminäytteitä kahdesta eri kohortista, jotka käsiteltiin tässä työssä yhtenä kokonaisuutena. Kohortit koostuivat kliinisessä tutkimuksessa olleista potilaista sekä perhetutkimukseen osallistuneista henkilöistä. Yhteensä analysoitavia näytteitä oli 759 kappaletta.

Potilaista 195 kappaletta oli biopsiatodistettuja keliakikkoja. Keliakikoista 132 oli naisia ja 63 miehiä. Kontrolleista naisia oli 314 ja miehiä 250 kappaletta. Endomysiumvasta-ainepositiivisia potilaita oli yhteensä 185 kappaletta ja näistä 180 oli keliakikkoja. Kaikkien määritettävien keski-ikä oli 47 vuotta. Yksikään potilaista ei kärsinyt IgA-luokan vasta-ainepuutoksesta, joten IgG-luokan vasta-ainemäärityksiä ei tarvittu.

Työssä käytettiin tausta-aineistona Phadia EliA™ Celikey (tTG)- sekä endomysiumvasta-ainetestillä aikaisemmin mitattuja tuloksia. Lisäksi myös Inova QUANTA Flash® h-tTg IgA ELISA-testillä mitattuja tuloksia perhetutkimuskohortin potilaista käytettiin tausta-aineistona. Kaikkia näytteitä ei voitu analysoida jokaisella testillä, sillä osaa seerumeista oli liian vähän, eikä niitä siten riittänyt vasta-ainepitoisuuksien mittaamiseen kaikilla testeillä. Tästä johtuen testeillä määritetyt potilasnäytteiden määrät vaihtelevat testistä riippuen.

Testejä vertailtiin keskenään aikaisemmin esiteltyjä diagnostisia tunnuslukuja apuna käyttäen. Jokaiselle testille määritettiin sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV valmistajien viitearvojen perusteella. Edellisten lisäksi jokaisen testin avulla mitattujen tulosten perusteella piirrettiin SPSS-ohjelmaa hyväksikäyttäen ROC-käyrät kullekin testille Heini Huhtalan toimesta. ROC-analyysin avulla voitiin myös määrittää luottamusvälit, keskivirhe sekä Youdenin indeksi.

Kaikki testit suoritettiin valmistajien ohjeiden mukaisesti eli niin kuin kappaleissa 4.1 – 4.4 on kuvattu. Näytteet sulatettiin ja sekoitettiin huolella ennen niiden analysointia. Näytteet, standardit ja kontrollit pipetoitiin duplikaatteina kuoppalevyille. Testitulosten laskentaan käytettiin Tampereen BioMediTechin laboratoriossa sijaitsevaa Thermo Scientificin Multiskan FC -lukijaa. Absorbanssit luettiin 450 nm

aallonpituudella. Kaikkien standardikäyrien piirtämiseen käytettiin ”cubic spline”-sovituskäyrää. Testikittien mukana tulneiden valmistajien kontrollien lisäksi kaikissa ajoissa oli mukana myös oma kontrolli, jonka avulla seurattiin tulosten luotettavuutta.

Testien viitearvot listattiin selvyuden vuoksi taulukkoon 2. Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA -testin valmistajan ohjeistaa käyttämään viitearvona 7 tai 10 U/ml. Tässä työssä kuitenkin viitearvona käytettiin 5 U/ml, sillä Keliakiatutkimuksessa on koettu tämän olevan parempi viitearvo. Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -testin viitearvona käytetään valmistajan ilmoittamaa 20 U/ml, jota pienemmät luettiin negatiiviseksi ja suuremmat positiiviseksi. ORGENTEC h-tTG IgA -vasta-ainetestin viitearvona käytettiin 10 U/ml, joka on myös samalla valmistajan ohjeistama arvo. Eurospital Eu-tTG® -testin kohdalla luettiin harmaalla alueella olevat tulokset joko positiiviseksi tai negatiiviseksi. Näin ollen tuloksia siis tarkasteltiin kahdesta eri näkökulmasta. Negatiiviseksi testituloksiksi tulkittiin kuitenkin kaikki alle 10 U/ml arvot ja positiiviseksi kaikki yli 16 U/ml vasta-ainearvot.

TAULUKKO 2. Opinnäytetyössä vertailtujen testien valmistajien ilmoittamat viitearvot. Eurospital Eu-tTG® -testin perässä (+) -merkillä tarkoitetaan sitä, että harmaalle alueelle osuneet tulokset tulkittiin positiiviseksi ja (-) -merkillä sitä, että ne tulkittiin negatiiviseksi.

Testi	Positiivinen (U/ml)	Negatiivinen (U/ml)
Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA	≥ 5	< 5
Inova QUANTA Flash h-tTG IgA	≥ 20	< 20
Orgentec h-tTG IgA	≥ 10	< 10
Eurospital Eu-tTG® (+)	≥ 10	< 10
Eurospital Eu-tTG® (-)	≥ 16	< 16

## 7 TULOKSET

Testien avulla mitatut tulokset kirjattiin työssä käytettyjen viitearvojen mukaisesti taulukkoon 3. Yksittäisten testien kohdalla mahdollisesti havaittavat eri näytemäärät johtuvat siitä, että näytteitä ei riittänyt kaikille testeille tai sitten testejä ei ollut tarpeeksi kaikkien näytteiden määrittämiseksi.

TAULUKKO 3. Työssä käytettyjen testien testikohtaiset tulokset.

	Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA	Inova QUANTA Flash h-tTG IgA	Orgentec h-tTG IgA	Eurospital Eu-tTG® (Epäselvät (+))	Eurospital Eu-tTG® (Epäselvät (-))
Oikeat positiiviset	157	186	174	181	170
Väärät positiiviset	4	148	15	44	18
Oikeat negatiiviset	560	416	549	518	544
Väärät negatiiviset	38	4	21	14	25
<b>Yhteensä</b>	<b>759</b>	<b>754</b>	<b>759</b>	<b>757</b>	<b>757</b>

Taulukosta 3 poimittiin vielä tulokset jokaisen testin osalta omaan taulukkoon, johon laskettiin viitearvojen mukaan sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV. Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA vasta-ainetestillä mitattujen tuloksien avulla laskettiin tunnusluvut taulukkoon 4.

TAULUKKO 4. Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA-vasta-ainetestin avulla mitattujen tulosten perusteella laskettu sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV.

<b>Sairas</b>	<b>Terve</b>	
Oikeat positiiviset  157	Väärät positiiviset  4	<b>PPV</b>  $157/(157+4)$ =0,975
Väärät negatiiviset  38	Oikeat negatiiviset  560	<b>NPV</b>  $560/(560+38)$ =0,938
<b>Sensitiivisyys</b>  $157/(157+38)$ =0,809	<b>Spesifisyys</b>  $560/(560+4)$ =0,992	

Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -sarakeesta kopioitiin tulokset taulukkoon 5, johon laskettiin testin sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV.

TAULUKKO 5. Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -vasta-ainetestin avulla mitattujen tulosten perusteella laskettu sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV.

<b>Sairas</b>	<b>Terve</b>	
Oikeat positiiviset  186	Väärät positiiviset  148	<b>PPV</b>  $186/(186+148)$ =0,556
Väärät negatiiviset  4	Oikeat negatiiviset  416	<b>NPV</b>  $416/(4+416)$ =0,990
<b>Sensitiivisyys</b>  $186/(186+4)$ =0,978	<b>Spesifisyys</b>  $416/(148+416)$ =0,737	

ORGENTEC h-tTG IgA -vasta-ainetestillä mitatut tulokset listattiin aikaisempien testien tapaan taulukkoon 6, johon laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV.

TAULUKKO 6. ORGENTEC h-tTG IgA -vasta-ainetestin avulla mitattujen tulosten perusteella laskettu sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV.

<b>Sairas</b>	<b>Terve</b>	
Oikeat positiiviset  174	Väärät positiiviset  15	<b>PPV</b>  $174/(174+15)$ =0,920
Väärät negatiiviset  21	Oikeat negatiiviset  549	<b>NPV</b>  $549/(549+21)$ =0,963
<b>Sensitiivisyys</b>  $174/(174+21)$ =0,892	<b>Spesifisyys</b>  $549/(549+15)$ =0,973	

Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestillä mitatut tulokset kirjattiin kahteen erilliseen taulukkoon. Taulukkoon 7 kirjattiin tulokset, jossa oletettiin epäselvien tulosten olevan positiivisia testituloksia.

TAULUKKO 7. Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestin avulla mitattujen tulosten perusteella laskettu sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV. Tässä taulukossa harmaalle alueelle osuneet tulokset on tulkittu positiivisiksi.

<b>Sairas</b>	<b>Terve</b>	
Oikeat positiiviset  181	Väärät positiiviset  44	<b>PPV</b>  $181/(181+44)$ =0,804
Väärät negatiiviset  14	Oikeat negatiiviset  518	<b>NPV</b>  $518/(518+14)$ =0,973
<b>Sensitiivisyys</b>  $181/(181+14)$ =0,928	<b>Spesifisyys</b>  $518/(518+44)$ =0,921	

Taulukkoon 8 kirjattiin Eurospital Eu-tTG® -testin tulokset, kun epäselvien tulosten tulkittiin olevan negatiivisia.

TAULUKKO 8. Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestin avulla mitattujen tulosten perusteella laskettu sensitiivisyys, spesifisyys, PPV ja NPV. Tässä taulukossa harmaan alueen tulokset on tulkittu negatiivisiksi.

<b>Sairas</b>	<b>Terve</b>	
Oikeat positiiviset  170	Väärät positiiviset  18	<b>PPV</b>  $170/(170+18)$ =0,904
Väärät negatiiviset  25	Oikeat negatiiviset  544	<b>NPV</b>  $544/(544+25)$ =0,956
<b>Sensitiivisyys</b>  $170/(170+25)$ =0,871	<b>Spesifisyys</b>  $544/(544+18)$ =0,967	

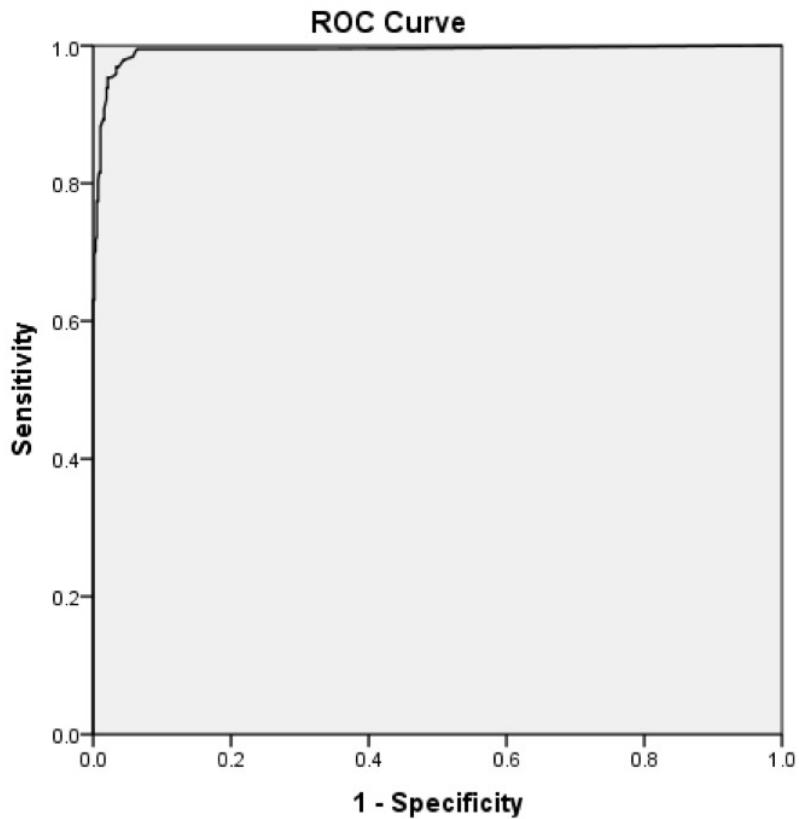
Testikohtaisiin taulukoihin kirjatut tulokset vielä koottiin taulukkoon 9, jossa mainitaan testi, ja jokaisen määritetyn tunnusluvun prosenttiarvo.



TAULUKKO 9. Taulukossa testien nimet ja määritetyt tunnusluvut. Eurospital Eu-tTG® kohdalla (+) tarkoittaa, että epäselvät tulkittiin positiivisiksi ja (-) sitä, että epäselvät tulkittiin negatiivisiksi.

Testi	Sensiivisyys (%)	Spesifisyys (%)	PPV (%)	NPV (%)
PD EliA™ Celikey h-tTG IgA	80,5	99,2	97,5	93,6
Inova QUANTA Flash h-tTG IgA	97,8	73,7	55,6	99,0
ORGENTEC h-tTG IgA	89,2	97,3	92,0	96,3
Eurospital Eu-tTG® (+)	92,8	92,1	80,4	97,3
Eurospital Eu-tTG® (-)	87,1	96,7	90,4	95,6

SPSS-ohjelmalla piirrettiin ROC-käyrät kustakin diagnostisesta testistä. Ohjelmalla piirretyt käyrät liitettiin suoraan tähän opinnäytetyöhön. Kuvioiden y-akselilla on sensitiivisyys ja x-akselilla 1-spesifisyys.



KUVIO 4. Ohjelman piirtämä ROC-käyrä Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA-vasta-ainetestille.

ROC-käyrän piirtämisen jälkeen ohjelma laski automaattisesti käyrän alle jääneen pinta-alan ja keskivirheen kuvioon 5. Tämän lisäksi taulukosta voidaan myös nähdä, että 95 %:n luottamusvälillä AUC osuu 0,985 ja 0,999 väliin.

**Area Under the Curve**

Test Result Variable(s): Celikey

Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.992	.004	.000	.985	.999

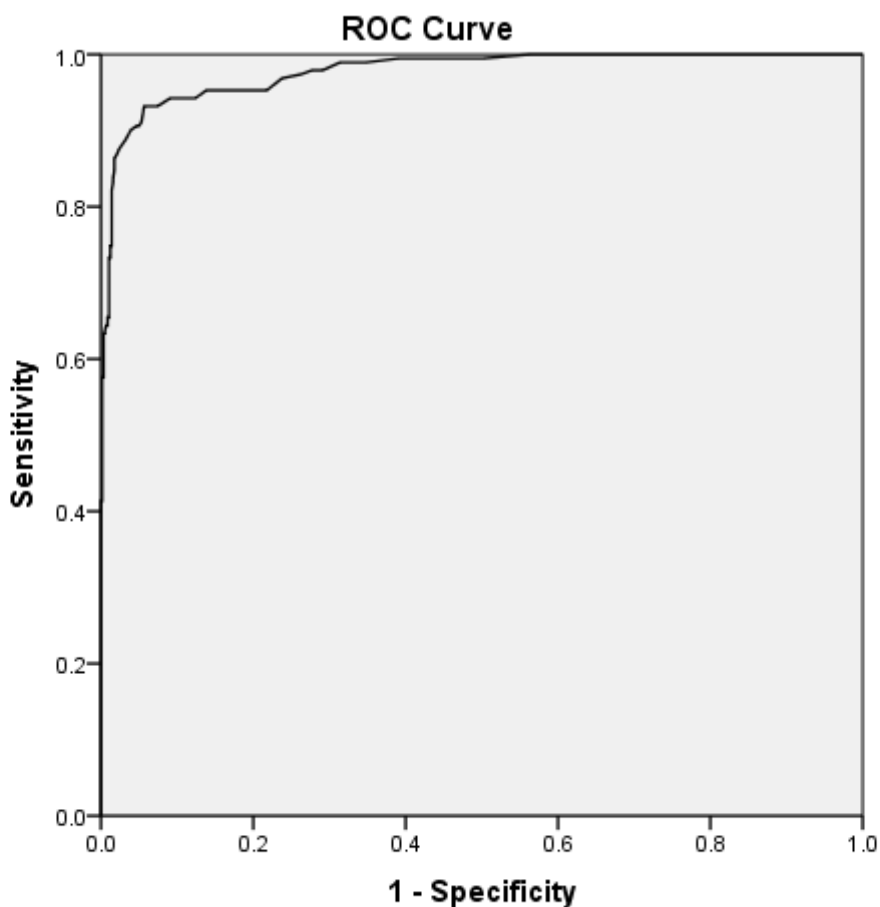
KUVIO 5. Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA-vasta-ainetestin käyrän alle jäävä ala, luottamusvälit sekä keskivirhe.

Excelissä laskettiin SPSS-ohjelman avulla saatujen tietojen jälkeen (1-spesifisyyden) avulla spesifisyys ja Youdenin indeksi kuvioon 6. Youdenin indeksin perusteella paras viitearvo on se arvo, jossa positiivisuusraja-arvo on maalattu keltaisella.

Positiivisuusraja-arvo	Sensitiivisyys	1 - Spesifisyys	Spesifisyys	Youdenin indeksi
2,05	,974	,041	0,959	0,933
2,15	,969	,037	0,963	0,931
2,30	,969	,034	0,966	0,935
2,45	,958	,034	0,966	0,924
2,55	,953	,027	0,973	0,926

KUVIO 6. Phadia EliA™ Celikey h-tTG IgA-vasta-ainetestin tulosten perusteella laskettu Youdenin indeksi.

Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -testin SPSS-ohjelmalla piirretty ROC-käyrä liitettiin alapuolelle.



KUVIO 7. Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -testillä mitattujen tulosten perusteella piirretty ROC-käyrä.

Ohjelmalla laskettiin käyrää koskevat tiedot kuvioon 8.

#### Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Inova

Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.977	.005	.000	.967	.988

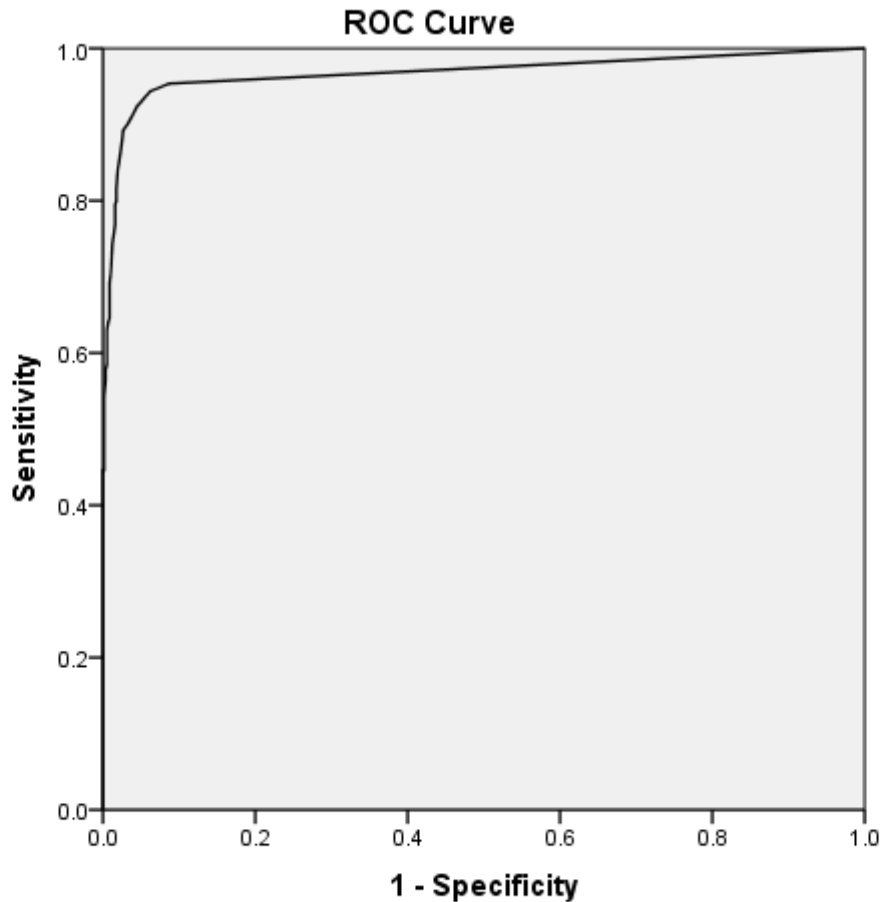
KUVIO 8. Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -vasta-ainetestin käyrän alle jäänyt ala, luottamusvälit sekä keskivirhe.

Youdenin indeksi voitiin laskea Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -vasta-ainetestille SPSS-ohjelmalla saatujen tietojen perusteella kuvioon 9. Youdenin indeksin perusteella optimaalisin lukema maalattu keltaisella.

Positiivisuus- raja-arvo	Sensitiivisyys	1 - Spesifisyys	Spesifisyys	Youdenin indeksi
29,50	,932	,075	0,925	0,857
30,50	,932	,068	0,932	0,864
31,50	,932	,057	0,943	0,875
32,50	,911	,053	0,947	0,858
33,50	,906	,050	0,950	0,856

KUVIO 9. Inova QUANTA Flash h-tTG IgA -vasta-ainetestillä saatujen tulosten perusteella laskettu Youdenin indeksi.

Orgentec h-tTG IgA -vasta-ainetestillä saaduilla tuloksilla piirretty ROC-käyrä liitettiin alapuolelle.



KUVIO 10. ORGENTEC h-tTG IgA -vasta-ainetestin ROC-käyrä

**Area Under the Curve**

Test Result Variable(s): Orgentec

Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.968	.009	.000	.949	.986

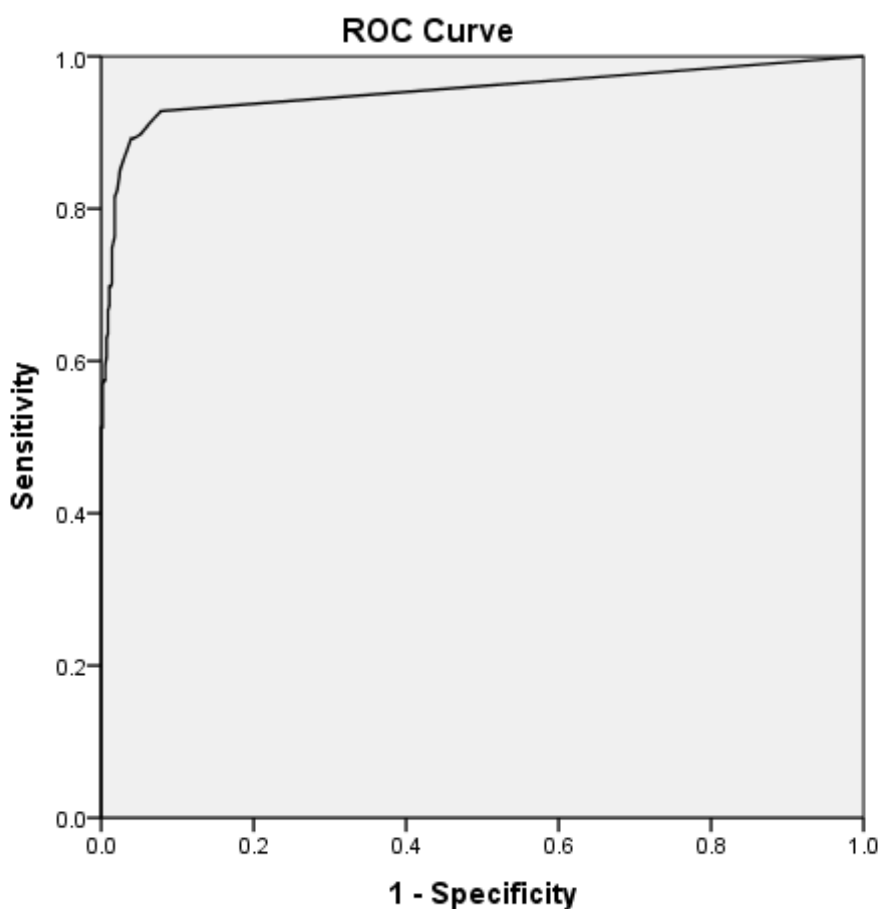
KUVIO 11. ORGENTEC h-tTG IgA -vasta-ainetestin käyrän alle jäänyt pinta-ala, luottamusvälit sekä keskiarvo.

Excelissä määritettiin vielä Youdenin indeksi ORGENTEC h-tTG IgA -vasta-ainetestille kuvioon 12. Keltaisella maalattu solu positiivisuusraja-arvo -sarakeessa kuvaa Youdenin indeksin avulla laskettua viitearvoa.

Positiivisuus- raja-arvo	Sensitiivisyys	1 - Spesifisyys	Spesifisyys	Youdenin indeksi
4,00	1,000	1,000	0,000	0,000
5,50	,953	,085	0,915	0,867
6,50	,942	,060	0,940	0,882
7,50	,921	,044	0,956	0,877
8,50	,901	,034	0,966	0,867

KUVIO 12. ORGENTEC h-tTG IgA -vasta-ainetestillä mitattujen tulosten avulla määritetty Youdenin indeksi.

Viimeisenä piirrettiin vielä Eurospital Eu-tTG® -testillä saatujen tulosten perusteella ROC-käyrä.



KUVIO 13. Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestin ROC-käyrä.

Ja niin kuin aiempienkin käyrien kohdalla, niin myös tämän testin osalta ohjelma taulukoi käyrän alle jääneen alan, luottamusvälit sekä keskirheen kuvioon 14.

## Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Eurospital

Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.954	.011	.000	.932	.976

KUVIO 14. Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestin AUC, luottamusvälit sekä keskivirhe.

Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestin tulosten avulla laskettiin vielä Youdenin indeksi Excelissä ja tulokset nähdään kuviosta 15.

Positiivisuus- raja-arvo	Sensitiivisyys	1 - Spesifisyys	Spesifisyys	Youdenin indeksi
11,50	,895	,052	0,948	0,844
12,50	,890	,043	0,957	0,847
13,50	,890	,039	0,961	0,851
14,50	,874	,034	0,966	0,841
15,50	,869	,032	0,968	0,837

KUVIO 15. Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestin Youdenin indeksi.

Kaikkien vertailtujen testien ROC-käyrän alle jääneiden pinta-alojen arvot koottiin taulukkoon 10.

TAULUKKO 10. Opinnäytetyössä vertailtujen testien AUCit.

Testi	AUC
PD EliA™ Celikey h-tTG IgA	0,992
Inova QUANTA Flash h-tTG IgA	0,977
ORGENTEC h- tTG IgA	0,968
Eurospital Eu- tTG®	0,954

Testipakkauksien sisältämien kontrollien sekä testeissä käytetyn oman kontrollin tulokset kirjattiin taulukkoon 11.

TAULUKKO 11. Kontrollien vaihteluvälit kaikilla testeillä

Testi	Pos. kontrolli (U/ml)	Neg. kontrolli (U/ml)	Oma kontrolli (U/ml)
Inova QUANTA Flash h-tTG IgA	-	-	60 – 100
ORGENTEC h- tTG IgA	33 - 50	0	25 - 39
Eurospital Eu- tTG®	36 - 46	0	19 - 28



## 8 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli vertailla eri kaupallisten testien toimivuutta keliakian diagnostiikassa ja tätä kautta saada tieto, mikä testeistä palvelisi parhaiten ensisijaisena seulontatestinä. Tarkoituksena oli vertailla yhteensä neljää eri valmistajan kehittämää kaupallista transglutaminaasi 2-vasta-ainetestä yhteensä noin 760 seeruminäytteen avulla.

Kaikki opinnäytetyössä vertailut testit suoriutuivat kiitettävästi. Lisäksi tuloksia voidaan pitää uskottavina, sillä testien sisäiset kontrolliarvot sijoittuvat niille ennalta määritelyihin rajoihin. Testien sensitiivisyys vaihteli välillä 80,5 - 97,8 %. Inovon sensitiivisyydeksi saatiin 97,8 % eli käytännössä testillä voidaan tunnistaa 97,8 prosenttisesti sairaat sairaiden joukosta. Spesifisyys vaihteli välillä 73,7 - 99,2 %. Celikeyllä saavutettiin paras spesifisyys, eli kyseinen testi tunnistaa parhaiten terveet terveiden joukosta. Yksittäin joko sensitiivisyyttä tai spesifisyyttä ei voida kuitenkaan pitää riittävän hyvänä vertailuparametrina testien vertailussa. Esimerkiksi Inovon korkea sensitiivisyys tarkoittaa sitä, että testi tunnistaa 97,8 %:sesti sairaat sairaiden joukosta. Toisaalta opinnäytetyössä määritetty spesifisyys Inovalla on vain 73,7 %, joka tarkoittaa sitä, että testi kykenee erottamaan vain noin kolme neljästä terveestä terveeksi.

PPV vaihteli välillä 55,6 – 97,5 %. Käytännössä Celikeyllä saatu 97,5 % PPV tarkoittaa sitä, että testi tunnistaa 97,5 %:sesti positiivisen testituloksen saaneen sairaaksi. Myös Orgentecilla ja Eurospitalilla saatiin yli 90 %:n PPVt, kun epäselvät tulkittiin negatiivisiksi Eurospital -testillä. Inovon PPV sen sijaan oli vain 55,6 %, eli vain hieman yli puolet positiivisen testituloksen saaneista on oikeasti keliakikkoja. NPV-arvot olivat jokaisella testillä yli 90 %, joten kaikki vertailussa mukana olleet testit tunnistavat hyvin negatiiviset testitulokset myös oikeasti terveiksi.

Kaikkien testien ROC-analyysissä määritetyt käyrän alle jääneet pinta-alat olivat vähintään 0,954, luottamusvälit huomioon ottaen pienin ala oli 0,932 Eurospital Eu-tTG® -vasta-ainetestillä. Celikeyn AUC oli jopa 0,992, eli testillä pystytään erottelemaan tehokkaasti terveet ja sairaat toisistaan.

Tässä opinnäytetyössä päästiin samanlaisiin tuloksiin kuin Fernández ym. (2005) tutkimuksessa, jossa vertailtiin kuutta eri transglutaminaasi 2-vasta-ainetestiä. Viitearvojen muuttaminen vähintään 50 %:lla parantaisi tässäkin opinnäytetyössä Celikeyn ja Inovan diagnostista tarkkuutta sensitiivisyyden ja spesifisyyden osalta Youdenin indeksin avulla laskettujen viitearvojen perusteella. Opinnäytetyö puoltaa Fernández ym. (2005) tutkimuksen tavoin myös sitä, että on tärkeää määrittää valmistajien ohjeiden mukaisesti laboratoriokohtaisesti sopivat viiterajat, sillä laboratoriomenetelmät ja populaatiot eroavat keskenään.

Martinin ym. (2001) tutkimuksessa Celikeyn ja Eurospitalin viitearvot määritettiin ROC-analyysin avulla. Tutkimuksessa saadut tulokset olivat hyvin samanlaisia kuin tässäkin opinnäytetyössä määritetyt viitearvot kyseisille testeille. Tässä opinnäytetyössä Celikey-testille saavutettiin täsmälleen sama viitearvo (2,30 U/ml) kuin Martinin ym. (2001) tutkimuksessa. Opinnäytetyössä määritetty viitearvo Eurospitalille sen sijaan poikkeaa hieman tutkimuksessa määritetystä viitearvosta. Tässä työssä Eurospitalin viitearvoksi saatiin 13,5 U/ml, kun tutkimuksessa arvoksi saatiin 9,9 U/ml. Tutkimuksessa määritetyt käyrän alle jääneet alat olivat Celikeyllä 0,969 ja Eurospitalilla 0,965, jotka ovat hyvin samanlaisia kuin tässä työssä määritetyt AUCit kyseisillä testeillä.

Viitearvojen muuttaminen ROC-analyysin avulla mahdollisesti vähentäisi diagnoosin tekemisen yhteydessä tehtävien ohutsuolibiopsioiden määrää. Fuchsin ym. (2018) mukaan aikuiset, jotka täyttävät ”triplakiteerit” eli saavat suuremmat kuin 10 x ULN transglutaminaasi 2-vasta-ainearvot, ovat endomysiumvasta-ainepositiivisia sekä omaavat keliakialle tyypilliset perintötekijät, vähentäisi aikuisilla keliakian diagnosoimisen yhteydessä tehtävien biopsioiden määrää jopa kolmanneksella. Tällöin seulonnassa käytetyn transglutaminaasi 2-vasta-ainetestin viitearvolla on väliä, jotta triplakriteeri täytyisi. Esimerkiksi Celikey-testin viitearvon muuttaminen tämän opinnäytetyön avulla laskettuun arvoon saattaisi vähentäisi ohutsuolibiopsioiden määrää, sillä 10 x ULN olisi tällöin huomattavasti pienempi, joka saattaisi mahdollisesti helpottaa triplakriteerin täyttymisen. On kuitenkin syytä muistaa, että diagnoosin tekemiseen liittyy myös endomysiumvasta-ainepositiivisuus, joten vaikka viitearvoa muutettaisiinkin, niin se ei pelkästään vaikuta biopsioiden määrään.

Matemaattisten työkalujen avulla määritetyt viitearvot voivat siis olla parempia kuin valmistajien ohjeistamat viitearvot, mikäli tavoitellaan maksimaalista spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä. Diagnostisen testin kannalta on myös tärkeää miettiä, onko kannattavampaa priorisoida sensitiivisyyttä tai spesifisyyttä epäillyn taudin luonteen kannalta. Korkean sensitiivisyyden testi on parempi vaihtoehto niissä tilanteissa, kun on tärkeää tunnistaa sairas tutkittavien joukosta esimerkiksi jatkohoidon kannalta. Korkean spesifisyyden omaava testi puolestaan tunnistaa terveet tutkittavien joukosta, joka on tärkeää esimerkiksi niissä tilanteissa, kun jatkohoito on kustantavaa. Keliakian kannalta olisikin suotavaa käyttää korkean sensitiivisyyden testejä, sillä ohutsuolibiopsia on toimenpiteenä hankala ja kustantava.

Vastaavia tutkimuksia olisi syytä tehdä lisää. Vasta-ainetesteillä on todella merkittävä osuus keliakian diagnostiikassa, sillä keliakian diagnostiikka perustuu pitkälti keliakiassa esiintyvien vasta-aineiden mittaamiseen. Keliakiaan diagnostiikkaan tarkoitettuja kaupallisia ELISA-testejä on kymmenittäin, joten jatkossakin on tarpeellista vertailla näitä testejä keskenään.

Lisäksi on syytä muistaa, että populaatioiden välillä on eroja. Jossakin populaatiossa määritetyt viitearvot eivät tämän vuoksi ole toisessa populaatiossa optimaaliset. Tulevaisuudessa myös samankaltaiset tutkimukset olisi hyvä tehdä yhden henkilön toimesta, jotta erilaisten työskentelytapojen aiheuttama virhe olisi mahdollisimman pieni.

## LÄHTEET

Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. Luettu 05.03.2019. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x>

Bienvenu, F., Anghel, S. I., Besson Duvanel, C., Guillemaud, J., Garnier, L., Renosi, F., Lachaux, A. & Bienvenu, J. 2014. Early diagnosis of celiac disease in IgA deficient children: contribution of a point-of-care test. PubMed. Luettu 22.2.2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376178>

Bio-Rad. 2018. Types of ELISA. Luettu 5.3.2019. <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>

Catassi, C., Gatti, S. & Fasano, A. 2014. The New Epidemiology of Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 59 (1), 7-9.

Eisenberg, J.M. 2016. Diagnosis of Celiac Disease: Current State of the Evidence. Luettu 04.03.2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379842/>

Eurospital. 2013. Eu-tTG® IgA. Käyttöohje. PFD-tiedosto. Tulostettu 06.03.2019.

Eurospital Diagnostic Division. 2019. ELISA: Eu-tTG. Luettu 06.03.2019. <http://diagnostici.eurospital.it/en/132/OUR-PRODUCTS/Celiac-Disease/Elisa/Eu-tTG>

Fernández, E., Riestra, S., Rodrigo, L., Blanco, C., López-Vázquez, A., Fuentes, D., Moreno, M. & López-Larrea, C. 2005. Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population. *World journal of gastroenterology* 11 (24), 3762-3766.

Fuchs, V., Kurppa, K., Huhtala, H., Laurila, K., Mäki, M., Collin, P., Salmi, T., Luostarinen, L., Saavalainen, P. & Kaukinen, K. 2019. Serology-based criteria for adult coeliac disease have excellent accuracy across the range of pre-test probabilities. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 49 (3), 277-284.

Hajian-Tilaki, K. 2013. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of internal medicine* 4(2), 627-635.

Halonen, T. (toim.) 2004. *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. 1. painos. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö. 94-95.

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.R., Mearin, M.L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A. & Zimmer, K.P. 2012. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 54 (4), 136-160.

Inova Diagnostic. 2005. QUANTA Flash™ h-tTG IgA. Käyttöohje.

Kaukinen, K., Collin, P & Mäki, M. 2010. Keliakia – diagnostinen ja hoidollinen haaste. *Duodecim*. Luettu 20.01.2019. <https://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98589.pdf>

Kaukinen, K., Ilus, T., Vornanen, M. & Collin, P. 2012. Kun gluteeniton keliakia ei korjaa keliakiaa. *Duodecim*. Luettu 01.02.2019. <https://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo10240.pdf>

Keliakia. 2018. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Gastroenterologiyhdistys ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2018. Luettu 10.1.2018. <http://www.kaypahoito.fi>

Lewis, N. R. & Scott B. B. 2009. Meta-analysis: deamidated gliadin peptide and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. Luettu 17.2.2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664074>

Lin, A.V. (toim.) 2015. *Direct ELISA*. Julkaisussa: *ELISA. Methods in Molecular Biology*, 1318. New York: Humana Press. 52-70.

Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E. A., Makharia, G. K., Mearin, M. L., Murray, J. A., Verdu, E. F. & Kaukinen, K. 2019. Coeliac Disease. Nature Reviews Disease Primers 3/2019.

Martini, S., Mengozzi, G., Aimo, G., Pagni, R. & Sategna-Guidetti, C. 2001. Diagnostic Accuracies for Celiac Disease of Four Tissue Transglutaminase Autoantibody Tests Using Human Antigen. Clinical Chemistry 47 (9), 1722-1725.

Mustajoki, P. 2017. Keliakia. Duodecim. Luettu 13.01.2019. [https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00026](https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=dlk00026)

Mustajoki, P. 2018. Autoimmuunisairaudet. Duodecim. Luettu 05.03.2019. [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00010](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00010)

Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M. H., Gasparin, M., Bravi, E. & Mäki, M. 2010. The prevalence of Celiac Disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. Annals of Medicine 42, 587-595. Luettu 28.2.2019. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07853890.2010.505931?journalCode=iann20>

ORGENTEC Diagnostika GmbH. 2018. ORG 540A Anti-Tissue-Transglutaminase IgA. Luettu 6.3.2019. [https://products.orgentec.com/pdfs/ifu/ORG%20540A\\_IFU\\_EN\\_QM113174\\_2018-01-02\\_4.pdf](https://products.orgentec.com/pdfs/ifu/ORG%20540A_IFU_EN_QM113174_2018-01-02_4.pdf)

Park, S. H., Goo, J. M. & Jo, C. H. 2004. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve: Practical Review for Radiologists. Luettu 5.3.2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2698108/>

Pharmacia Diagnostics. 2004. Celikey©: Tissue Transglutaminase (human, recombinant) IgA Antibody Assay. Käyttöohje.

Phadia. 2006. EliA™ Celikey (anti-tTG) Gliadin. Käyttöohje. Luettu 7.3.2019. [http://www.phadia.com/Global/A%20Document%20Library/Autoimmunity/Promotion%20Material/Product%20-%20Performance%20-%20Detailer%20Info/Performance\\_Characteristics\\_EliA\\_Celikey\\_Gliadin.pdf](http://www.phadia.com/Global/A%20Document%20Library/Autoimmunity/Promotion%20Material/Product%20-%20Performance%20-%20Detailer%20Info/Performance_Characteristics_EliA_Celikey_Gliadin.pdf)

Salmi, T., Lindfors, K., Kurppa, K. & Kaukinen, K. 2017. Keliakia. Duodecim. Luettu 15.01.2019. <https://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo13911.pdf>

Shan, G. 2015. Improved Confidence Intervals for the Youden Index. PLoS one 10(7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4488538/>

Thermo Scientific. 2010. ELISA technical guide and protocols. Tech Tip #65. Luettu 05.03.2019. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>

Tonutti, E. & Bizarro, N. 2014. Antitissue Transglutaminase and Antiendomysial Antibodies. Autoantibodies. 3. painos. 463-470. Luettu 05.03.2019. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044456378100054X>