RIMeL / IJLaM 2008; 4 (Suppl.)

La diagnosi di celiachia: non solo anti-transglutaminasi

E. Tonutti

Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Maria della Misericordia, Udine

Riassunto

La malattia celiaca è una condizione clinica, che si manifesta in soggetti geneticamente predisposti, caratterizzata da un danno reversibile alla mucosa del piccolo intestino causata dal glutine del frumento, orzo e avena. I test di laboratorio di recente introduzione sono mezzi diagnostici efficaci per l'identificazione dei soggetti affetti da questa condizione. L'articolo prende in considerazione le caratteristiche dei metodi per la ricerca degli anticorpi anti-transglutaminasi, anti-endomisio e anti-gliadina proponendo un loro razionale utilizzo; particolare attenzione viene posta ai test che permettono la identificazione della malattia celiaca nei soggetti con deficit di IgA e ai test per la determinazione dell'aplotipo HLA DQ2/DQ8. Viene inoltre valutato l'utilizzo di test di ultima generazione per la ricerca di anticorpi anti-actina e per la identificazione degli anticorpi anti-transglutaminasi e anti-endomisio in medium di cultura da biopsia duodenale.

Summary

Diagnosis of celiac disease: not only anti-transglutaminase

Celiac disease is a syndrome characterized by damage of the small intestinal mucosa caused by the gliadin fraction of wheat, barley and rye in genetically susceptible subjects. Serologic tests developed in the last decade provide a non invasive tool to screen individuals at risk for the disease. The diagnostic role of assays to identify anti-transglutaminase, anti-endomysium and anti-gliadin antibodies was discussed. Particular attention was pointed to the IgA deficiency and to the utilization of tests for the determination of HLA DQ2/DQ8 haplotypes. Technical and diagnostic performances of anti-actin, anti-transglutaminase and anti-endomysium antibody assay in culture medium from duodenal mucosa were analyzed.

Key words: celiac disease, anti-transglutaminase, anti-gliadin, anti-endomysium, IgA deficiency, anti-actin.

Introduzione

I test di laboratorio sono fondamentali per l'inquadramento della malattia celiaca (MC) e spesso sono in grado di individuare soggetti celiaci con segni clinici subdoli e di non facile interpretazione; permettono inoltre il monitoraggio dei pazienti in dieta priva di glutine. Studi epidemiologici eseguiti su vasta scala hanno dimostrato che solo il 10-20% dei casi di celiachia sono identificati sulla base dei dati clinici; negli ultimi anni le conoscenze di fisiopatologia e l'introduzione di nuovi marcatori hanno notevolmente migliorato le possibilità diagnostiche.

L'utilizzo appropriato dei test di laboratorio, sia nella fase della richiesta che in quella interpretativa dei risultati, permette al medico di orientarsi correttamente nella quasi totalità dei casi di celiachia.

Anticorpi anti-transglutaminasi e anti-endomisio

La positività degli anticorpi anti-endomisio (EMA) in IFI su sezioni criostatiche di esofago di scimmia è caratterizzata dal classico pattern reticolare a nido d'ape identificabile nella *muscolaris mucosae*. L'interpretazione del quadro di fluorescenza è semplice in presenza di una positività classica ad alto titolo, ma può non essere facile quando gli EMA sono presenti a basso titolo o con pattern atipico.

La specificità del test EMA IgA è molto elevata (~100%) con una sensibilità oscillante tra 93 e 96%. Tuttavia, il test può essere, in alcuni casi, erroneamente valutato positivo o negativo se l'esame viene interpretato da personale non esperto[1].

Nel 1997, il target antigenico degli EMA fu identificato nell'enzima transglutaminasi (tTG)[2]. La gliadina, il fattore

Ricevuto: 02-09-2008 Pubblicato on-line: 19-09-2008

Corrispondenza a: Dott. Elio Tonutti, SOS di Dpt. di Immunopatologia e Allergologia, Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria "S. Maria della Misericordia", Piazzale S. Maria della Misericordia n.15, 33100 Udine. Tel. 0432-552403, fax 0432-552333, email: tonutti.elio@aoud.sanita.fvg.it

dietetico incriminato nell'innesco della MC, è un eccellente substrato per la tTG che agisce deamidando i residui di glutammina della gliadina e trasformandoli in acido glutammico; tale modifica rende la gliadina carica negativamente permettendone il legame agli antigeni HLA-DQ2/DQ8 e di conseguenza esponendo i neopeptidi al riconoscimento delle cellule T. Il complesso HLA-DQ/gliadina/tTG induce una risposta delle cellule immunocompetenti con produzione di anticorpi anti-gliadina e anti-tTG[3].

Gli anti-tTG sono autoanticorpi di classe IgA e IgG sintetizzati da linfociti B presenti nella mucosa intestinale dei soggetti con MC in dieta libera.

Gli anti-tTG IgA sono considerati marcatori specifici per MC in quanto non si riscontrano in altre patologie. Gli anti-tTG IgG sono presenti nel sangue e nella mucosa intestinale dei pazienti con MC, ma non sono specifici dal momento che si possono riscontrare, prevalentemente a basso titolo, anche in soggetti sani o con altre patologie. Gli anti-tTG IgG sono impiegati come marcatore specifico nei soggetti con deficit di IgA nei quali il rischio di sviluppare MC è 10-20 volte superiore alla popolazione normale.

La presenza di anti-tTG con diversi target epitopici della molecola di tTG può spiegare il comportamento non concordante di alcuni sieri ai test anti-tTG in ELISA ed EMA in IFI. In alcuni casi infatti ad una positività per anti-tTG IgA non corrisponde una consensuale positività degli EMA. Questo aspetto si osserva in molti casi di falsa positività per anti-tTG a basso titolo (epatiti autoimmuni, cirrosi, parassitosi e infezioni virali), ma anche in alcuni casi di MC. Questo dato suggerisce che il test EMA in IFI è in grado di evidenziare selettivamente anticorpi anti-tTG che riconoscono epitopi conformazionali più strettamente correlati alla MC.

Studi su popolazione adulta stimano sensibilità e specificità dei test per anti-tTG IgA con antigene umano del 98.% e 97%, mentre studi in età pediatrica rispettivamente del 95.7% e del 99%. Per quanto riguarda anti-tTG IgG in soggetti con deficit di IgA viene stimata una sensibilità del 90% e una specificità del 100%[4].

La ricerca con metodo EIA degli anticorpi anti-tTG di classe IgA e il dosaggio delle IgA totali sieriche rappresentano la prima indagine per la diagnosi di malattia celiaca. In caso di negatività per anti-tTG IgA e normali IgA sieriche vi è un'elevata probabilità che il paziente non sia affetto da MC. In caso di positività per anti-tTG IgA è consigliabile eseguire la ricerca degli EMA IgA. Qualora gli EMA risultino positivi, la diagnosi di celiachia è praticamente certa e al paziente deve essere proposta la biopsia duodenale.

In tutti i casi di positività degli anti-tTG IgA e negatività degli EMA IgA è utile eseguire la determinazione dell'aplotipo HLA per la identificazione degli alleli DQ2 e DQ8. Nei soggetti che risultano DQ2 e/o DQ8 positivi, è consigliata l'esecuzione della biopsia duodenale. E' sconsigliata invece l'esecuzione della biopsia duodenale nei soggetti anti-tTG IgA positivi, ma EMA IgA e HLA DQ2/DQ8 negativi.

Test rapidi per la identificazione di anticorpi anti-transglutaminasi

Recentemente sono stati introdotti test rapidi per l'identificazione in termini qualitativi di anti-tTG IgA e IgG. Questi test hanno il vantaggio di poter essere utilizzati anche per un singolo paziente e su sangue intero. Possono essere eseguiti in pochi minuti in "point of care" al letto del malato o in ambulatorio medico. Il test su sangue intero è caratterizzato dal fatto che utilizza come antigene la tTG presente negli eritrociti del paziente stesso. Sensibilità e specificità di questi test sono ancora da valutare; recenti studi epidemiologici hanno dimostrato che la sensibilità di questi test, qualora valutata "sul campo", sembra essere significativamente inferiore (70-75%) ai test classici di laboratorio. Esistono anche test rapidi su saliva caratterizzati tuttavia da bassa sensibilità. D'altra parte gli epitopi della tTG identificati dagli anticorpi presenti nella saliva non sembrano essere gli stessi epitopi riconosciuti dagli anti-tTG del siero.

Anticorpi anti-gliadina

Gli AGA sono anticorpi di classe IgA e IgG che, pur presenti nel siero di soggetti con MC, non sono del tutto specifici poichè si possono riscontrare anche in soggetti sani o con altre patologie del tratto enterico. I test commerciali per la determinazione di AGA che utilizzano gliadina estrattiva presentano livelli di sensibilità e specificità non elevati e producono dati estremamente diversi e difficilmente comparabili. Con la scoperta degli EMA e successivamente degli anti-tTG il ruolo degli AGA nella diagnosi sierologica della MC è stato ridimensionato. La recente identificazione dei siti antigenici immunodominanti della gliadina e la conseguente messa a punto di test specifici per questi epitopi, ha riproposto all'attenzione della comunità scientifica la possibilità di un loro utilizzo in situazioni cliniche particolari[5].

Test ELISA con un coating costituito esclusivamente da peptidi sintetici della gliadina hanno fornito infatti risultati eccellenti sia in termini di sensibilità che specificità; recenti lavori hanno riportato una sensibilità e specificità di questi test rispettivamente del 94% e 92% con un odds ratio (OR) di 191, nettamente superiore a quello ottenuto con i classici antigeni estrattivi (OR di 21).

Questi nuovi test per gli AGA possono rivestire un ruolo diagnostico importante in pazienti pediatrici nei quali la presenza di anti-tTG può non essere ancora dimostrabile o, per quanto riguarda la sola classe IgG, nei soggetti con deficit di IgA.

IgA totali

I soggetti con deficit di IgA hanno un rischio relativo di sviluppare la MC 10-20 volte superiore ai soggetti normali[6]. E' perciò doveroso escludere la presenza di un deficit assoluto di IgA in tutti i soggetti per i quali viene richiesta la determinazione degli anti-tTG IgA o EMA IgA; è ovvio infatti che nei soggetti celiaci con deficit di IgA i due test sopra indicati risultano negativi mentre possono essere positivi gli anti-tTG IgG e gli AGA IgG. Il laboratorio ha due possibilità per identificare i soggetti con deficit di IgA: la prima è quella di dosare le IgA totali sieriche (con metodo nefelometrico o turbidimetrico) in tutti i pazienti con richiesta di anti-tTG IgA; la seconda è quella di utilizzare il livello del segnale ottenuto dal test per anti-tTG IgA per individuare i probabili soggetti con deficit di IgA (da con-

fermare poi con il dosaggio nefelometrico); i sieri con deficit di IgA hanno infatti un segnale ridottissimo ai test ELISA o fluorimetrici per anti-tTG IgA.

Anticorpi anti-actina di classe IgA

La ricerca degli anticorpi anti-actina IgA sembra essere utile non come marcatore per la diagnosi della MC, ma come indicatore di danno istologico severo della mucosa intestinale, in quanto, la presenza e il titolo di tali anticorpi correlano positivamente con il grado di atrofia dei villi[7] . Questi anticorpi sono evidenziabili in IFI su linee di enterociti in coltura; è inoltre disponibile un test ELISA quantitativo che permette la identificazione e la titolazione degli anticorpi anti-actina IgA. Qualora la metodica risultasse applicabile su scala sufficientemente ampia e i primi dati di letteratura venissero confermati, sarebbe opportuno considerare un suo posizionamento come marcatore di lesione d'organo in particolare nei soggetti anti-tTG/EMA positivi nei quali la biopsia duodenale venga rifiutata o non sia indicata.

Anticorpi anti-transglutaminasi e anti-emdomisio su terreno di coltura di frammenti bioptici di mucosa duodenale

In soggetti con forte sospetto clinico di MC e negatività per i marcatori sierologici può essere estremamente utile eseguire il test di produzione in vitro di anticorpi anti-tTG e EMA mettendo in coltura per circa 60 ore alcuni frammenti bioptici prelevati in corso di duodenoscopia; alcuni lavori recenti hanno dimostrato che soggetti con quadro istologico suggestivo per MC (prevalentemente con aumento dei linfociti intraepiteliali e iperplasia delle cripte) sono in grado di produrre anti-tTG IgA a livello intestinale senza una positività del marcatore nel sangue periferico[8].

Questo test deve essere utilizzando in casi selezionati e il risultato deve essere correlato ai dati clinici, istologici e genetici. Risulta inoltre evidente che un paziente al quale viene posta diagnosi di MC sulla base di questo test dovrà sottoporsi ad una o più biopsie di controllo, dopo un periodo appropriato di dieta priva di glutine, in modo da confermare la normalizzazione del quadro istologico.

Marcatori genetici

La MC è una patologia a forte predisposizione genetica: nei gemelli omozigoti la concordanza per la malattia è del 75%, mentre il 5-10% dei familiari di primo grado ne è affetto. La MC è strettamente associata alla presenza dell'antigene HLA di classe II DQ2 e più del 90% dei soggetti celiaci esprime questo marcatore; i pochi pazienti DQ2 negativi sono DQ8 positivi[9]. La predisposizione genetica legata al sistema HLA spiega solo parzialmente il modo di estrinsecazione di questa patologia; infatti, benché la prevalenza dell'antigene DQ2 nella popolazione generale europea sia compresa tra il 20% e il 30%, solo una piccola parte di questi individui è affetta da MC. Il valore predittivo positivo di DQ2, considerando una prevalenza della malattia nella popolazione generale dell'1%, sarebbe quindi compreso tra il 3.0% e il 4.5%, mentre il valore predittivo negativo con DQ8, sarebbe vicino al 100%. La stretta associazione aplotipica permette tuttavia di utilizzare la determinazione degli antigeni HLA di classe II per scopi diagnostici o per la identificazione dei soggetti a rischio

La determinazione degli antigeni HLA attraverso l'identificazione degli alleli specifici, viene oggi effettuata con metodiche di biologia molecolare, rese disponibili da più fonti commerciali, con riduzione dei tempi e dei costi di esecuzione.

L'identificazione dell'aplotipo associato a celiachia, proprio per la sua elevata diffusione nella popolazione generale, non deve essere considerato un test di conferma ma piuttosto un esame a completamento del quadro diagnostico e deve essere utilizzato con le caratteristiche del marcatore di esclusione di malattia. I risultati degli studi sul rischio relativo di HLA-DQ per la MC, hanno recentemente dimostrato che, considerando i genotipi suscettibili di intolleranza al glutine, vi è massimo rischio per i soggetti omozigoti DQ2/DQ2 ed eterozigoti DQ2 ma che presentano un secondo allele DQB1*02, medio rischio per gli individui DQ2/non DQ2 (DQ2 eterozigoti) e basso rischio per i non DQ2/non DQ2[10].

È bene infine sottolineare che, ai fini diagnostici, è sufficiente richiedere al laboratorio la sola identificazione degli alleli DQ per la determinazione degli antigeni DQ2 e DQ8 e non la mappatura completa dell'aplotipo HLA di classe I e II.

Il referto interpretativo

L'insieme delle procedure diagnostiche per la MC, che in molti casi vengono svolte in maniera autonoma in laboratorio, porta alla produzione di dati che necessitano di un referto interpretativo, ed in particolare in tutti quei casi in cui i risultati non sono univoci. Il patologo deve fornire indicazioni precise sui test eseguiti, sulle indagini supplementari da eseguire, sulla eventuale ripetizione dei test di laboratorio e, ove necessario deve porre l'indicazione per la esecuzione della biopsia duodenale come approccio diagnostico definitivo. Un interessante lavoro ha recentemente dimostrato come la mancanza di un referto interpretativo ai test di laboratorio per intolleranza al glutine porta una percentuale molto elevata di casi ad una non-diagnosi.

Bibliografia

1. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al. The role of antitissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: a French-Italian multicentre study. J Clin Pathol 2003; 56:389-93.
2. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med 1997; 3:797-801.
3. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. J Immunol 2005; 175:254-61.
4. Rostom A, Catherine D, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, et al. The diagnostic accuracy of serological tests for celiac disease: a systematic review. Gastroenterology 2005; 128: S38-46.
5. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, Richter T, Stern M, Conrad K, et al. Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. Clin Chem 2004; 50:2370-5.
6. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR, and the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepato-

logy (SIGEP), and "Club del Tenue" Working groups on Coeliac disease. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Gut 1998; 42:362-5.
7. Clemente MG, Musu MP, Troncone R, Volta U, Congia M, Ciacci C, et al. Enterocyte actin autoantibody detection: a new diagnostic tool in celiac disease diagnosis: results of a multicentre study. Am J Gastroenterol 2004; 99:1551-6.
8. Carroccio A, Di Prima L, Pirrone G, Scalici C, Floreana AM, Gasparini M, et al. Anti-transglutaminase antibody assay of the culture medium of intestinal biopsy specimens can improve the accuracy of celiac disease diagnosis. Clin Chem 2006; 52:1175-80.
9. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. Gastroenterology 1993; 105:910-22.
10. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, et al. HLA-DQ relative risk for celiac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. Tissue Antigens 2004; 63:562-7.