

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
Dottorato di ricerca in Gastro-Endocrinologia Pediatrica
Ciclo XXV

IL RUOLO DEGLI ANTICORPI ANTI
PEPTIDI DEAMIDATI DI GLIADINA
NELL'ITER DIAGNOSTICO DELLA
MALATTIA CELIACA

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Gian Luigi de' Angelis

Dottorando: Dott.ssa Francesca Guatelli

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	7
<i>Epidemiologia</i>	7
<i>Genetica della malattia celiaca</i>	8
<i>Sintesi del meccanismo immunopatogenetico nella malattia celiaca</i>	10
<i>Presentazione clinica in età pediatrica</i>	11
<i>La sierologia nella malattia celiaca</i>	12
<u><i>Anticorpi anti gliadina (AGA) di classe IgA e IgG</i></u>	<u>13</u>
<u><i>Anticorpi anti reticolina R1(R1-ARA)</i></u>	<u>13</u>
<u><i>Anticorpi anti endomisio (EMA)</i></u>	<u>14</u>
<u><i>Anticorpi antitransglutaminasi tissutale (tTG) di classe IgA e IgG</i></u>	<u>14</u>
<u><i>Dosaggio delle IgA totali sieriche</i></u>	<u>16</u>
<u><i>Anticorpi anti Peptidi Deamidati di Gliadina (DPG-AGA) di classe IgA e IgG</i></u>	<u>16</u>
<i>Iter diagnostico della malattia celiaca</i>	17
PAZIENTI E METODI	21
RISULTATI	25
DISCUSSIONE	28
IMMAGINI E TABELLE	32
BIBLIOGRAFIA	41

RIASSUNTO

La celiachia è una malattia sistemica immunomediata, indotta dal glutine e dalle prolamine correlate, in soggetti geneticamente predisposti. Si caratterizza per una variabile combinazione di manifestazioni cliniche glutine-dipendenti, anticorpi specifici come gli anticorpi antiendomio (EMA), gli anticorpi antitransglutaminasi di tipo 2 (tTG) e gli anticorpi antigliadina deamidata (DPG), alplotipi HLA DQ2 o DQ8 ed enteropatia. (Linee Guida ESPGHAN 2011)

La malattia celiaca è una patologia molto diffusa, si calcola che lo 0,5-1% della popolazione generale negli USA e nei paesi occidentali ne sia affetta, l'incidenza è in aumento anche in quei paesi, come l'Asia, dove fino a pochi anni fa si pensava che la malattia addirittura non esistesse.

La prevalenza della malattia celiaca aumenta in presenza di alcune condizioni di rischio quali familiarità per celiachia, malattie autoimmuni concomitanti e alcune sindromi genetiche.

Recenti studi hanno dimostrato che la deamidazione dei peptidi di gliadina ad opera della transglutaminasi tissutale (tTG) rende questi nuovi epitopi più immunogeni rispetto a quelli nativi. Sono stati quindi identificati gli anticorpi diretti contro i peptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA IgG e IgA) ricercati tramite ELISA.

Diversi lavori hanno riportato una sensibilità media di questi anticorpi per la celiachia pari al 92% per la classe IgA e al 91% per quella IgG e, dato ancor più interessante una specificità elevata (99%) per i DPG-AGA IgG.

Il nostro studio descrive l'esperienza della Gastroenterologia Pediatrica di Parma, confrontando questo nuovo anticorpo (DPG-AGA IgG e IgA) con i test tradizionali (tTG IgA, EMA, AGA IgA) in due gruppi di pazienti di età

compresa tra 0 e 18 anni.

Al primo gruppo appartengono 41 pazienti studiati per sospetta malattia celiaca, al secondo appartengono 12 pazienti in follow-up per malattia celiaca precedentemente diagnosticata. I nostri risultati dimostrano, in accordo con i dati della letteratura, che questo nuovo test (DPG-AGA) possiede un'accuratezza diagnostica maggiore rispetto agli anticorpi antigliadina tradizionali e che, nonostante abbia una sensibilità inferiore rispetto agli anticorpi antiendomizio (EMA) e alla antitransglutaminasi tissutale (tTG IgA), possiede una specificità significativamente elevata.

In particolare gli anticorpi antigliadina deamidata di classe IgG (DPG-AGA IgG) possono essere utilizzati come marcatori sierologici di malattia celiaca specialmente nei pazienti con età inferiore ai 2 anni e nei casi di malattia associata a deficit di IgA.

La ricerca associata di antitransglutaminasi tissutale (tTG IgA) e antipeptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA IgG) si è dimostrata significativa in fase di screening diagnostico di malattia per identificare correttamente gli affetti.

Infine gli anticorpi antipeptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA IgG) possono essere di aiuto nel follow-up della malattia celiaca, in quanto la persistenza di questo anticorpo nel siero di pazienti a dieta priva di glutine indica bassa compliance alla dieta stessa e mancato miglioramento delle lesioni della mucosa intestinale.

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is an immune-mediated enteropathy triggered by the ingestion of wheat gliadins and other correlated prolamines, in genetically susceptible individuals. CD is characterized for a variable combination of gluten-dependent clinical demonstrations, specific antibodies as IgA anti-endomysial antibodies (EMA), IgA antibodies to tissue transglutaminase (tTG) and the antibodies to deamidated gliadin peptides (DPG), genotypes HLA DQ2 or DQ8 and enteropathy. (Guidelines ESPGHAN 2011)

Until recently the geographical distribution of celiac disease was mostly restricted to Europe and other developed countries, such as the USA, Canada, Australia. New epidemiological studies have provided evidence that this disorder is also common in other parts of the world including the Asian continent.

CD prevalence is increased in at-risk conditions such as family history of celiac disease, autoimmune diseases, and some genetic syndromes.

Recent studies have demonstrated that deamidated gliadin peptides are more specific CD B-cell epitopes than native peptides; antibodies directed against deamidated peptides were identified and more recently a new ELISA for IgG and IgA antibodies to deamidated gliadin peptides (DPG-AGA) has been developed. Many studies described a middle sensibility of these antibodies for CD to 92% for IgA and to 91% for IgG and, more interesting an elevated (99%) specificity for DPG AGA IgG.

Our study describes the experience of Pediatric Gastroenterology of Parma, comparing this new antibodies with the traditional (tTG IgA, EMA, AGA IgA) tests in two groups of patients aged between 0 and 18 years. To the first group belong 41 patients studied for suspected celiac disease, the second group

includes 12 patients in follow-up to previously diagnosed with celiac disease. Our results demonstrate, in agreement with literature data, which this new test (DPG-AGA) has a diagnostic accuracy greater than traditional antibodies and that, despite having a lower sensitivity than the endomysial antibodies (EMA) and the anti-tissue transglutaminase (tTG IgA), has a significantly higher specificity. Particularly the deamidated gliadin antibodies IgG (AGA-IgG DPG) may be used as serological markers of celiac disease especially for patients with less than 2 years and in cases of disease associated with IgA deficiency.

The associated antitransglutaminase tissue research (tTG IgA) and anti-deamidated peptide of gliadin (DPG-AGA IgG) has proved significant in diagnostic screening phase of disease to correctly identify the affections.

Moreover deamidated gliadin peptides antibodies (DPG-AGA IgG) can be helpful in follow-up of celiac disease, since the persistence of this antibody in patients with gluten-free diet indicates low compliance to the diet itself and lack of improvement of intestinal mucosal injury.

IL RUOLO DEGLI ANTICORPI ANTI PEPTIDI DEAMIDATI DI GLIADINA NELL'ITER DIAGNOSTICO DELLA MALATTIA CELIACA

INTRODUZIONE

Epidemiologia

In Italia, la prevalenza della malattia celiaca si attesta intorno all'1% della popolazione generale (rapporto femmine: maschi pari a 2:1), analogamente a quanto si osserva in Europa e negli Stati Uniti ma si calcola che sei persone affette su sette rimangono ancora non riconosciute. Pertanto, da un punto di vista epidemiologico la celiachia può essere assimilata ad un iceberg, di cui solamente le forme sintomatiche, tipiche o atipiche, rappresentano la parte emersa.¹

La prevalenza della malattia celiaca aumenta in presenza di alcune condizioni di rischio quali familiarità per celiachia, malattie autoimmuni concomitanti (specialmente diabete mellito di tipo 1, tiroiditi, deficit di IgA) e alcune sindromi genetiche (Down, Turner e William).² Tabella 1

Ogni anno vengono diagnosticati all'incirca 20.000 nuovi celiaci italiani. Da malattia rara in età pediatrica, la dimensione epidemiologica della celiachia è cresciuta in maniera costante, tanto da essere riconosciuta oggi come una malattia sociale.

Recentemente, numerosi studi hanno evidenziato come la celiachia non riguardi esclusivamente i paesi occidentali e la razza caucasica ma rappresenti un problema globale: nei paesi in via di sviluppo, dove si utilizza il grano su larga

scala nell'alimentazione, il numero delle persone affette è decisamente sottostimato e la prevalenza della malattia è invece assimilabile a quella dei paesi occidentali. In maniera sorprendente, tra il popolo Saharawi, nella zona occidentale del deserto del Sahara, si osserva una prevalenza della malattia del 5-6%, la più alta nel mondo. Questo dato può essere spiegato sia dall'elevata prevalenza di aplotipi HLA predisponenti, determinata dall'alto livello di consanguineità sia dall'ampio consumo di alimenti contenenti glutine inviati come aiuti umanitari dalle nazioni europee.³

Nelle decadi passate, mancavano evidenze che sottolineassero l'importanza epidemiologica della malattia celiaca in America Latina, Medio Oriente e Nord Africa. Nel continente sudamericano, studi di screening hanno evidenziato una prevalenza della celiachia sovrapponibile a quella europea.⁴

Fino a qualche decennio fa, si riteneva che in Cina e nel Sud-est asiatico, la malattia celiaca addirittura non esistesse. Al contrario sono stati segnalati recentemente molti casi di celiachia in India, soprattutto nel nord del paese, dove si consumano grandi quantità di frumento.⁵ Anche in Cina sono stati identificati nuovi casi di celiachia in due popolazioni a rischio, diabetici di tipo 1 e pazienti con colon irritabile.⁶

La celiachia può essere quindi a tutti gli effetti considerata una delle malattie più comuni a livello globale.

Genetica della malattia celiaca

La celiachia è una malattia multifattoriale con una forte componente genetica. Questo è dimostrato dalla elevata prevalenza della malattia nei parenti di primo grado degli affetti (il 10-12% circa dei familiari di primo grado dei soggetti celiaci risulta affetto da malattia) e dal tasso di concordanza tra gemelli

monozigoti che risulta superiore all'85%. Al contrario, il tasso di concordanza tra gemelli dizigoti (20%) non è significativamente diverso da quello riscontrato in fratelli non gemelli, questo suggerisce una moderata partecipazione di fattori ambientali (ad eccezione del glutine) nella genesi della malattia.⁷

I geni maggiormente coinvolti nel determinismo della malattia appartengono al sistema HLA. I loci HLA sono parte del complesso MHC (Major Histocompatibility Complex) mappato sul braccio corto del cromosoma 6, sistema complesso ed estremamente polimorfico.

Il sistema HLA comprende geni che producono eterodimeri definiti antigeni di istocompatibilità di classe I e II che sono essenziali per una corretta risposta immune.⁸ Immagine 1

Le molecole HLA di classe I (sono codificate dai geni HLA A,B,C) sono esposte sulla superficie di tutte le cellule nucleate. La loro funzione è quella di legare antigeni proteici di origine infettiva o tumorale o meglio parte di essi (dopo averli fagocitati e ridotti a piccoli frammenti peptidici) e presentarli ai linfociti T CD8+ che hanno attività citotossica in grado di uccidere le cellule infette.

Le molecole HLA di classe II (sono codificate dai geni HLA DR,DQ,DP) sono esposte sulla superficie di cellule immunocompetenti chiamate APC (Antigen Presenting Cells) e cioè linfociti B, macrofagi, cellule endoteliali e linfociti T attivati. La loro funzione è quella di legare patogeni extracellulari o meglio parte di essi (dopo averli fagocitati e ridotti a piccoli frammenti peptidici) e presentarli ai linfociti T helper CD4+ che così attivati sono in grado di produrre citochine che controllano sia la produzione di anticorpi che la risposta cellulare.

La suscettibilità alla celiachia è determinata in parte da una comune associazione HLA, in modo particolare dagli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II : DQA1*0501-DQB1*02 (denominato DQ2) e DQA1*0301-DQB1*0302 (denominato DQ8).

Questi geni (localizzati sul cromosoma 6p21) sono stati trovati nel 95% dei

pazienti e codificano per glicoproteine che si legano a peptidi della gliadina, deamidati dalla transglutaminasi tissutale, formando così un complesso antigene-HLA che viene riconosciuto dai recettori dei linfociti TCD4+ a livello della mucosa intestinale. Questo determina una attivazione dei linfociti con successivo rilascio di citochine proinfiammatorie responsabili delle lesioni istologiche prevalentemente della mucosa duodeno-digiunale, anche se il danno può riguardare organi diversi. ⁹

L'eterodimero DQ2 è presente nel 90-95% dei celiaci, numerosi studi hanno dimostrato che individui con due DQ2 hanno un rischio più elevato di sviluppare la malattia in quanto viene raddoppiata la capacità dell'HLA di riconoscere peptidi specifici della gliadina e di stimolare cellule T gliadina-specifiche.¹⁰ Quasi tutti i pazienti, circa il 5% non portatori del DQ2 presentano l'eterodimero DQ8. Infine un 2-3% di celiaci non esprime né il DQ2 né il DQ8. ¹¹

La tipizzazione dell'HLA ha un valore predittivo negativo assoluto mentre ha un basso valore predittivo positivo. Se infatti sia DQ2 che DQ8 sono assenti non si ha nessuna possibilità di sviluppare la malattia, viceversa se sono presenti, la malattia è possibile anche se il 30-35% della popolazione generale e il 60-70% dei familiari di primo grado presenta questi aplotipi senza sviluppare la malattia.

Sintesi del meccanismo immunopatogenetico nella malattia celiaca

In seguito al verificarsi di alcuni fenomeni non ancora perfettamente chiariti (infezioni virali, tossicità dei frammenti di glutine..) che sono determinanti per l'attivazione dell'immunità innata con conseguente infiammazione ed attivazione dei macrofagi e linfociti NK e conseguente produzione da parte di queste cellule di IL-15, IL-12 e INF γ , si produce una rottura della barriera intestinale ed un aumento della permeabilità della mucosa stessa.

La conseguenza della produzione di citochine quali IL-15 e IL-12 è l'avvio

della successiva risposta immune specifica con aumento dell'infiltrato di linfociti CD4+ nella lamina propria e passaggio dei frammenti gliadinici immunogenici attraverso gli spazi creatisi tra gli enterociti. I frammenti gliadinici vengono deamidati per opera della transglutaminasi tissutale di tipo 2 (tTG) in presenza di Ca⁺⁺.¹² Questi frammenti gliadinici deamidati sono capaci di legarsi ad alta affinità con gli eterodimeri HLA DQ2/DQ8, presenti sulla superficie delle cellule APC. Si forma così un complesso APC-HLA-antigene che può essere riconosciuto dai recettori dei linfociti T CD4+ nella mucosa intestinale con successiva polarizzazione dei linfociti T nativi verso Th1-CD4+ produttori citochine Th-1. Il successivo rilascio di citochine pro-infiammatorie di tipo Th1 (IL-6, IL-5, IL-18 e INF γ) determina le lesioni istologiche della mucosa duodeno-digiunale. In particolare la presenza di INF γ determina la produzione di metalloproteasi responsabili della atrofia dei villi e della apoptosi enterocitaria.^{13,14}

I linfociti T CD4+ nella mucosa intestinale, sono in grado di fungere da cellule helper nei confronti dei linfociti B, i quali producono anticorpi sia verso la gliadina, sia verso la tTG.¹⁵ Gli anticorpi diretti contro la gliadina e contro la transglutaminasi tissutale sono rilevabili nel siero dei pazienti celiaci.

Immagine 2

Presentazione clinica in età pediatrica

Lo spettro di manifestazioni cliniche della malattia celiaca è estremamente variabile. Tabella 2

La forma tipica o intestinale si manifesta in genere tra i 6 mesi e i 2 anni, dopo l'introduzione del glutine nella dieta e si caratterizza per diarrea cronica, scarso accrescimento ponderale, distensione addominale, astenia, ipotonia muscolare, inappetenza e irritabilità. Negli ultimi anni si è assistito ad un progressivo

ritardo nell'esordio delle manifestazioni cliniche della celiachia con un aumento dei sintomi intestinali atipici come stipsi e dolori addominali ricorrenti oppure delle vere e proprie forme atipiche o extraintestinali quali bassa statura, ritardo puberale, anemia sideropenica, alopecia, stomatite aftosa, osteoporosi, ipoplasia dello smalto dentario, aumento delle transaminasi. La dermatite erpetiforme, una malattia vescicolare della pelle, è una variante clinica della celiachia ed ha una incidenza in età pediatrica di circa 1% delle diagnosi.

Esiste poi una forma di celiachia silente definita tale quando la tipica enteropatia viene riscontrata in pazienti apparentemente sani riconosciuti celiaci perché appartenenti a gruppi a rischio (parenti di primo grado di celiaci o diabetici di tipo 1) o identificati nella popolazione generale dopo esecuzione di test di screening.

Una ulteriore presentazione clinica della malattia celiaca è la cosiddetta forma latente diagnosticata in quei pazienti che presentano positività agli anticorpi antiendomisio (EMA) o antitransglutaminasi (tTG IgA) ma mucosa intestinale con architettura normale.^{16,17}

La malattia celiaca presenta quindi una clinica estremamente pleiomorfa, i cui meccanismi non sono ancora oggi completamente conosciuti. Una presentazione clinica così eterogenea impone una riflessione e una rivalutazione continua dei criteri diagnostici.

La sierologia nella malattia celiaca

La storia della malattia celiaca è strettamente legata alla disponibilità di test sierologici sempre più sensibili e specifici che hanno consentito negli anni di raggiungere una maggiore accuratezza diagnostica ma anche di attuare test di screening su pazienti a rischio, incrementando in modo significativo il numero

di nuove diagnosi. Si può affermare che la sierologia rappresenti oggi, insieme all'istologia della mucosa duodenale, uno dei pilastri su cui si fonda la certezza diagnostica della enteropatia da glutine.¹⁸

I primi test diagnostici per la celiachia si sono resi disponibili a partire dagli anni '70, per poi subire una continua evoluzione che è tutt'ora in corso.

Anticorpi anti gliadina (AGA) di classe IgA e IgG

Gli AGA IgA sono stati i primi autoanticorpi ad essere utilizzati a scopo diagnostico e i primi utilizzati per studi epidemiologici su vasta scala.¹⁹ Vengono ricercati sia in immunofluorescenza indiretta (IFI) che in ELISA e mostrano una sensibilità del 73% ed una specificità dell'87%. Falsi positivi vengono ritrovati in elevata percentuale in pazienti con malattie gastrointestinali (gastroenteriti, allergie, malattie infiammatorie croniche intestinali..) e anche in controlli sani.

La loro importanza diagnostica è sensibilmente diminuita dopo l'introduzione di anticorpi antiendomisio (EMA) e antitransglutaminasi tissutale (tTG). L'unica indicazione all'esecuzione di questo test era rappresentata dalla presenza di bambini di età inferiore ai 2 anni, ove la sensibilità degli AGA (97%) sovrastava quella degli EMA e delle tTG (83%).²⁰ Secondo le ultime linee guida ESPGHAN, con l'introduzione degli anticorpi antipeptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA IgG) che presentano elevata sensibilità e specificità anche in questa fascia d'età, l'utilizzo degli AGA è ormai considerato obsoleto.²¹

Anticorpi anti reticolina RI(RI-ARA)

Oggi sono considerati obsoleti e non più utilizzati nella pratica corrente. Si ricercano con immunofluorescenza indiretta (IFI) su tessuto di topo o di ratto.

Meritano un cenno in quanto pur mostrando una specificità del 100% per la celiachia, sono positivi in meno del 50% dei celiaci, pertanto il loro riscontro casuale durante una ricerca per autoanticorpi non organo specifici consente di identificare casi inaspettati di celiachia.²²

Anticorpi anti endomisio (EMA)

Vengono ricercati con tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFI), utilizzando preparati ottenuti dal terzo distale di esofago di scimmia e meno frequentemente dal cordone ombelicale umano.

Sono stati scoperti nel 1983 e hanno presto sostituito gli AGA IgA nella diagnosi di malattia celiaca in virtù della loro maggiore sensibilità (94%) e soprattutto della specificità praticamente assoluta (100%) per l'intolleranza al glutine.²³ Gli unici limiti nell'impiego degli EMA sono rappresentati dal costo elevato e dalla interpretazione del test che è operatore dipendente legato quindi alle capacità dell'operatore nella lettura dell'IFI indiretta. Gli EMA sono considerati il "gold standard" sierologico nella diagnosi della celiachia nei laboratori di riferimento mentre possibili errori di valutazione sono frequenti in laboratori senza esperienza.²⁴

Attualmente vengono utilizzati come test di conferma di fronte ad un esito dubbio o positivo di anti-tTG. IgA.

Anticorpi antitransglutaminasi tissutale (tTG) di classe IgA e IgG

Nel 1997 Dietrich identificò nella transglutaminasi tissutale l'antigene degli EMA.²⁵ Da allora, i test per la determinazione degli anticorpi anti transglutaminasi (tTG IgA) sono progressivamente divenuti il miglior test di

screening per la malattia celiaca in virtù della loro elevata sensibilità (97%) e specificità (91%), il basso costo e la possibilità di essere ricercati utilizzando strumenti automatizzati con vantaggi di standardizzazione e riproducibilità.²⁶ Oggi viene raccomandato ai laboratori l'utilizzo di kit di origine umana, ottenuto preferibilmente con tecnica ricombinante, che ormai ha sostituito l'antigene purificato da fegato di guinea pig, utilizzato nei primi kit commerciali. Le anti-tTG IgA sono determinabili con varie tecniche di dosaggio: tecnica immunoenzimatica (ELISA), immunofluorometrica (FEIA), chemiluminescenza e in blot.

La sensibilità delle anti-tTG di classe IgA ricercati in ELISA, è più elevata rispetto a quella degli EMA (97 vs 94%) mentre la specificità è inferiore (91 vs 100%). Falsi positivi per anti-tTG IgA vengono ritrovati in pazienti con allergie alimentari, giardiasi, infezioni intestinali virali e batteriche, morbo di Crohn, rettocolite ulcerosa, patologia epatica cronica.²⁷

Le anti-tTG di classe IgG non hanno le stesse caratteristiche del corrispondente test IgA, presentando un'ottima specificità ma sensibilità inferiore: il loro utilizzo è limitato esclusivamente ai soggetti con deficit assoluto di IgA, nei quali anti-tTG IgA ed EMA risultano falsamente negativi.²⁸

Il confronto tra EMA e anti-tTG IgA mostra che sebbene il primo test sia più specifico, il secondo deve essere utilizzato come test di prima scelta per lo screening della celiachia per la più elevata sensibilità, riproducibilità e disponibilità di substrato. Nella maggior parte dei laboratori, gli EMA vengono utilizzati come test di conferma dopo riscontro di anti-tTG IgA positive.

Dosaggio delle IgA totali sieriche

Il dosaggio delle IgA totali deve essere eseguito nello screening iniziale di malattia celiaca in quanto il deficit assoluto di IgA è 10-20 volte più frequente nei celiaci, determinando un risultato falsamente negativo di tTG IgA e causando mancata diagnosi di malattia.

Gli anticorpi presenti nel siero dei celiaci appartengono infatti alla classe IgA ed IgG ma in generale solo gli anticorpi IgA possono essere considerati markers sensibili e specifici per l'intolleranza al glutine. L'impiego di markers IgG è spesso fuorviante a causa dell'elevata percentuale di falsi positivi e il loro uso dovrebbe essere limitato a pazienti con deficit di IgA.²⁹

Anticorpi anti Peptidi Deamidati di Gliadina (DPG-AGA) di classe IgA e IgG

Negli ultimi anni, la diagnostica sierologica della malattia celiaca si è arricchita di questo nuovo marcatore, gli anticorpi diretti contro i peptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA IgG e IgA).³⁰

Diversi lavori riportano una sensibilità media di questi anticorpi per la celiachia del 92% per la classe IgA e del 91% per la classe IgG e una specificità quanto mai elevata per i DPG-AGA di classe IgG (99%).

Dal punto di vista patogenetico, la deamidazione dei peptidi di gliadina da parte della tTG, ossia la sostituzione di una molecola di glutammina con una di acido glutammico, determina la comparsa di un nuovo epitopo antigenico capace di evocare una risposta immune più specifica rispetto ai peptidi nativi. I linfociti T specifici per la gliadina riconoscono più attivamente i peptidi deamidati, potenziando così la stimolazione dei linfociti B con il risultato di una sintesi specifica anticorpale diretta verso i peptidi così modificati (deamidati).

Il potenziamento della risposta immune ha inoltre un ruolo centrale nello sviluppo delle lesioni intestinali.³¹

Recenti studi hanno dimostrato che DPG-AGA hanno un'accuratezza diagnostica marcatamente più elevata rispetto a quella degli AGA tradizionali; inoltre sebbene i DPG-AGA mostrino una sensibilità inferiore rispetto agli EMA e alle anti-tTG IgA, la loro specificità in particolare per la classe IgG risulta essere molto elevata e assai vicina a quella assoluta del EMA, ma soprattutto significativamente più elevata rispetto a quella delle anti-tTG IgA (99% vs 91%).^{32,33}

In altri studi vengono identificati come migliori test nella diagnosi di malattia celiaca nei primi anni di vita, in virtù della possibilità di eliminare falsi positivi dovuti alla presenza di altre condizioni cliniche.³⁴

Iter diagnostico della malattia celiaca

Negli anni 50 la diagnosi di malattia celiaca avveniva in maniera empirica: di fronte al sospetto di malattia, venivano effettuati i pochi test a disposizione (il più avanzato era il test di assorbimento dello D-xilosio), veniva tolto il glutine dalla dieta e il successivo miglioramento clinico confermava la diagnosi di malattia.

Negli anni 60, grazie al diffondersi della biopsia intestinale con capsula, si riuscì a documentare la lesione intestinale alla base della malattia, l'atrofia della mucosa.

Nel 1969 un gruppo di lavoro dell'ESPGHAN a Interlaken stabilì i criteri diagnostici necessari per arrivare alla diagnosi di malattia celiaca: alterazione della mucosa digiunale a dieta contenente glutine, evidente miglioramento a dieta priva di glutine, deterioramento della mucosa dopo challenge con glutine.

Per arrivare ad una diagnosi di celiachia erano dunque necessarie tre biopsie intestinali successive.³⁵

Già a partire dagli anni 80, la diffusione degli anticorpi antigliadina e l'individuazione di alcuni HLA di predisposizione, hanno reso evidente che in certi casi sarebbe stato possibile concludere la diagnosi di celiachia con una sola biopsia intestinale.³⁶

Nel 1990 vengono stilati nuovi criteri ESPGHAN per la diagnosi di malattia celiaca: vengono individuati criteri obbligatori (istologia compatibile ossia presenza di atrofia dei villi e iperplasia delle cripte e inequivocabile risposta clinica e sierologica alla dieta priva di glutine) e criteri "di supporto" (anamnesi e presentazione clinica compatibile con celiachia e sierologia associata a celiachia). L'ESPGHAN stabilisce in pratica che la diagnosi può essere conclusa nella maggior parte dei casi e con l'aiuto della sierologia, dopo una singola biopsia che mostri l'atrofia della mucosa intestinale.³⁷

Dagli anni 90 ad oggi, le incalzanti conoscenze fisiopatologiche sulla malattia e la disponibilità di markers sierologici sempre più affidabili, hanno messo in discussione il ruolo dell'istologia come gold standard nella diagnosi di malattia celiaca.^{38,39}

Nel 2011, ESPGHAN E NASPGHAN hanno diffuso le nuove linee guida, basate sull'evidenza, per la diagnosi di malattia celiaca. Si tratta di un passaggio rivoluzionario, si stabilisce infatti che in determinati casi è possibile fare diagnosi di malattia celiaca senza ricorrere alla biopsia duodenale per dimostrare il danno mucosale.

Questa affermazione è resa possibile da un'enorme quantità di acquisizioni scientifiche e di risorse diagnostiche che oggi sono disponibili e che hanno permesso di modificare la definizione di malattia celiaca che non è più semplicemente una malattia dell'intestino ma una malattia sistemica immunomediata, scatenata dal glutine e dalle prolamine correlate, in individui

geneticamente predisposti. La malattia si caratterizza per una variabile combinazione di sintomi glutine dipendenti, anticorpi anti endomisio (EMA), anticorpi anti transglutaminasi di tipo 2 (tTG) e antigliadina deamidata (DPG), alplotipi HLA DQ2 e DQ8 ed enteropatia. In sostanza l'evidenza di una lesione mucosale diventa uno dei possibili elementi per formulare la diagnosi, non necessariamente il più importante. Le nuove linee guida suddividono i soggetti da indagare in due gruppi: bambini e adolescenti con segni e sintomi di celiachia e non altrimenti spiegati e bambini e adolescenti appartenenti a gruppi a rischio. L'appartenenza a uno dei due gruppi determina un iter diagnostico completamente diverso. Tabelle 3 e 4

Le nuove linee guida dell'ESPGHAN individuano inoltre negli anticorpi antitransglutaminasi tissutale di tipo 2 (tTG) di classe IgA, il test di primo impiego nella diagnosi di celiachia, infatti valori di anti-tTG IgA superiori a 10 volte il valore normale, si associano con elevata probabilità ad una atrofia mucosale e sono pertanto altamente indicativi di malattia celiaca.

Gli anticorpi antiendomiso (EMA) hanno valore di conferma in caso di anti-tTG IgA positive e rappresentano ancora il test di riferimento.

Gli anticorpi anti-peptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA) devono ancora trovare una loro precisa collocazione d'uso, in quanto hanno performance un po' inferiori alle anti-tTG IgA e agli EMA ma sono utili in caso di deficit di IgA e probabilmente nei bambini di età inferiore o uguale ai 2 anni.

Il documento sancisce infine la scomparsa dalle possibilità diagnostiche dei vecchi anticorpi antigliadina, considerati poco affidabili e ormai obsoleti.²¹

Con il nostro studio ci proponiamo di presentare l'esperienza della Gastroenterologia Pediatrica di Parma, in merito all'utilizzo degli anticorpi anti-peptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA) nella diagnostica della malattia celiaca. Anche dal nostro studio emerge che specialmente i DPG-AGA IgG

possono confermare la specificità della positività delle anti-tTG IgA (che presentano circa un 9% di falsi positivi) ed essere markers di elezione nei pazienti con deficit di IgA.

Inoltre i DPG-AGA di classe IgG possono essere proposti come valido marcatore anticorpale per identificare i celiaci con età inferiore ai 2 anni, ove la sensibilità delle anti- tTG IgA è particolarmente bassa.

Ci proponiamo inoltre di valutare l'efficacia della associazione DPG-AGA IgG e anti-tTG IgA nella fase iniziale della diagnostica sierologica della malattia celiaca e nel follow-up.

PAZIENTI E METODI

Sono stati studiati in totale 53 pazienti (25 maschi e 28 femmine) afferiti alla Gastroenterologia Pediatrica di Parma nel periodo tra maggio e ottobre 2012.

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: al primo gruppo (41 pazienti) appartenevano pazienti giunti alla nostra attenzione per sospetta malattia celiaca, al secondo gruppo (12 pazienti) appartenevano pazienti in dieta priva di glutine che eseguivano follow-up per malattia celiaca precedentemente diagnosticata. Tutti i pazienti avevano un'età compresa tra 0 e 18 anni e in particolare dei 41 pazienti studiati per sospetta malattia celiaca 16 avevano un'età inferiore o uguale a 2 anni e 25 un'età compresa tra 3 e 18 anni mentre i pazienti in follow-up avevano tutti un'età compresa tra 3 e 18 anni.

E' stato preso in considerazione l'intervallo di tempo maggio-ottobre 2012 in quanto in tale periodo sui pazienti afferiti presso la Gastroenterologia Pediatrica è stato possibile eseguire il dosaggio sia degli anticorpi antigliadina IgG e IgA sia la nuova metodica per la ricerca degli anticorpi anti-peptidi deamidati di gliadina, al fine di valutare le performance diagnostiche del nuovo test.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a prelievo venoso con dosaggio di anticorpi anti-transglutaminasi (tTG IgA), anticorpi anti-endomisio (EMA), anticorpi antigliadina di classe IgA e IgG (AGA IgA e IgG), IgA totali, anticorpi antigliadina deamidata di classe IgG e IgA (DPG-AGA IgG e IgA).

Il dosaggio degli anticorpi è stato effettuato presso il Laboratorio di Autoimmunità della U.O.C. di Diagnostica Ematochimica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma.

Per il dosaggio degli anticorpi antitransglutaminasi (tTG IgA) è stato utilizzato un saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di autoanticorpi IgA diretti contro l'antigene antitransglutaminasi.

La metodologia è la seguente: gli autoanticorpi presenti nei campioni diluiti reagiscono con l'autoantigene umano immobilizzato in fase solida su micropiastre. Il test garantisce il legame specifico degli autoanticorpi mediante immunofluorescenza su antigeni endomisio.

Dopo un periodo di incubazione, i componenti del siero non legati vengono rimossi attraverso una fase di lavaggio. Durante un periodo di incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, vengono aggiunte immunoglobuline anti immunoglobuline umane, marcate con perossidasi di rafano che reagiscono con gli autoanticorpi legati.

La perossidasi di rafano converte la soluzione da substrato incolore in un prodotto blu. Questa reazione enzimatica viene bloccata aggiungendo una soluzione acida nei pozzetti in modo da ottenere il viraggio della soluzione da blu a giallo. In questo test, l'intensità del colore formatosi è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi presenti.

Viene considerata positiva dal nostro laboratorio una concentrazione di tTG uguale o superiore a 20 U/mL.

Il dosaggio degli anticorpi antiendomiso (EMA) è stato effettuato tramite test di immunofluorescenza per la ricerca di anticorpi antiendomiso nel siero del paziente. Il principio del test è il seguente: la reazione primaria implica la circolazione nel siero del paziente di anticorpi che si legano ai loro antigeni omologhi, ciò si verifica durante il periodo di incubazione quando il siero ricopre la superficie dell'antigene. Successivamente ad un risciacquo necessario per la rimozione degli anticorpi umani non legati, avviene la reazione secondaria: il reagente utilizzato in questa reazione è un coniugato anti-globulina umana marcato con fluoresceina. La superficie dell'antigene viene successivamente lavata per eliminare il coniugato non legato e osservata con idoneo microscopio a fluorescenza.

Il dosaggio viene poi espresso come positivo o negativo.

Per effettuare il dosaggio di anticorpi anti-gliadina deamidata IgG e IgA (DPG-AGA IgG e IgA) è stato utilizzato un test immunologico enzimatico in fase solida che impiega peptidi sintetici, derivati dalla gliadina deamidata per la determinazione quantitativa e qualitativa degli anticorpi IgG e IgA anti-peptidi di gliadina deamidati nel siero umano.

La metodologia di questo test è la seguente: i campioni di siero diluiti vengono incubati nei pozzetti sensibilizzati con l'antigene specifico.

Gli anticorpi specifici nel siero del paziente quando presenti si legano all'antigene legato alla fase solida, i componenti del siero non legati vengono separati nella successiva fase di lavaggio. Vengono quindi aggiunte immunoglobuline anti-immunoglobuline umane, marcate con perossidasi di rafano che, durante l'incubazione, si legano al complesso antigene-anticorpo formatosi in precedenza. L'aggiunta di un cromogeno provoca la formazione di un complesso colorato in blu, la successiva aggiunta di una soluzione acida provoca il blocco della reazione enzimatica e il viraggio del colore dal blu a giallo.

L'intensità del colore formato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-antigene.

Viene considerata positiva dal nostro laboratorio una concentrazione di DPG-AGA IgG e IgA uguale o superiore a 15 U/mL.

Per il dosaggio degli anticorpi antigliadina AGA IgG e IgA è stato utilizzato un analogo test ELISA che prevede l'utilizzo come antigene della gliadina non deamidata IgG e IgA.

Tutti i pazienti studiati per sospetta malattia celiaca erano sintomatici e sono

stati pertanto sottoposti a esofagogastroduodenoscopia con biopsia duodenale presso l'U.O.C. di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva dell'Ospedale di Parma. Lo studio istologico delle biopsie perendoscopiche è stato effettuato presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma.

I pazienti in follow-up erano pazienti diagnosticati celiaci nel corso dell'anno 2012 che eseguivano regolari controlli ematochimici ogni 3 mesi.

In base all'esito delle biopsie perendoscopiche, i pazienti sono stati suddivisi in celiaci e non celiaci. Sono stati quindi confrontati i dosaggi di anticorpi antitransglutaminasi (tTG IgA), anticorpi anti-gliadina deamidata IgG e IgA (DPG-AGA IgG e IgA), anticorpi antigliadina IgG e IgA (AGA IgG e IgA) nei pazienti celiaci (valutati complessivamente e suddivisi per età: ≤ 2 anni vs >2 anni), nei pazienti non celiaci e nei pazienti in dieta. Tabelle 5 e 6

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante tabelle di concordanza 2x2.

RISULTATI

Nel periodo di reclutamento, compreso tra maggio e ottobre 2012, sono stati arruolati in totale 53 pazienti, di cui 41 per sospetta malattia celiaca e 12 in follow-up di malattia celiaca precedentemente diagnosticata.

Tutti i 41 pazienti valutati per sospetta malattia celiaca erano sintomatici (28 presentavano sintomi tipici di celiachia, 13 sintomi atipici) e sono stati sottoposti per la definizione diagnostica a esofagogastroduodenoscopia con biopsia duodenale: 17 pazienti sono risultati celiaci (con biopsia duodenale patologica) mentre 24 sono risultati non celiaci.

I risultati sono stati valutati in termini di sensibilità e specificità diagnostica dei marcatori immunologici (anticorpi anti tTG IgA, anti DPG-AGA IgG, anti DPG-AGA IgA, antigliadina AGA IgA e antigliadina AGA IgG) sulla casistica pediatrica complessiva e suddivisa per età.

Sull'intera casistica valutata, i valori di sensibilità e specificità offerti dal test anti-tTG IgA sono risultati rispettivamente 76,5% e 95,8%, mentre per il test anti-DPG IgG sono risultati 82,4% e 87,5%. Tabella 7

La distribuzione della percentuale di positività per i due markers, anti-tTG IgA e anti.DPG IgG, nei bambini affetti da celiachia e nei controlli non affetti valutata con il test χ^2 è risultata statisticamente significativa per entrambi ($p < 0.01$).

Di interesse e in accordo con i dati di letteratura, sono i risultati derivati dall'analisi effettuata stratificando i pazienti per età (≤ 2 anni; > 2 anni): infatti nei bambini con età ≤ 2 anni (5 pazienti), i test anti-tTG IgA e anti DPG IgG mostrano valori di sensibilità rispettivamente di 40 % e 100%, mentre gli stessi valori nei pazienti con età > 2 anni (12 pazienti) risultano 91,7% per il test anti-tTG IgA e 75% per il test anti DPG IgG. Tabella 7

Per quanto riguarda i valori di specificità mostrato dai test anti-tTG IgA e anti

DPG IgG, i valori non mostrano differenze così importanti nelle due fasce di età. Infatti nei bambini con età ≤ 2 anni, la specificità di anti-tTG IgA e anti DPG IgG sono risultate rispettivamente 100% e 90,9%; nei bambini con età > 2 anni la specificità dei due test è risultata rispettivamente 92,3% per anti-tTG IgA e 84,6% per anti DPG IgG. Tabella 7

Le performance diagnostiche offerte dal test anti DPG IgA sono risultate assolutamente insoddisfacenti in termini di sensibilità (35,3%) pur offrendo questo test una buona specificità (95,8%), senza sostanziali differenze correlate all'età dei pazienti. La distribuzione della percentuale di positività per il test anti DPG IgA nei bambini celiaci e nei bambini non celiaci, valutata con il test χ^2 , è risultata scarsamente significativa ($p= 0,05\%$). Tabella 7

Performance diagnostiche molto scarse sia in termini di sensibilità che di specificità sono state rilevate nella nostra casistica, come già rilevato in letteratura, per i test anti-gliadina AGA IgG e IgA. Precisamente per quanto riguarda il test anti-gliadina IgG, la sensibilità e la specificità sono risultate rispettivamente 70,6% e 41,7%, mentre per il test antigliadina IgA si è rilevata una sensibilità di 64,7% e si è confermata la specificità osservata per la gliadina IgG di 41,7%. Tabella 8

Confrontando pazienti affetti e controlli, sia per il test anti-gliadina AGA IgG che anti-gliadina AGA IgA con il test χ^2 non sono state rilevate differenze statisticamente significative ($p = n.s.$).

Per quanto riguarda la valutazione comparativa dei test anti-tTG IgA e anti DPG IgG nel monitoraggio dei pazienti in dieta senza glutine, assumendo che la compliance richiesta fosse effettiva, la specificità del marker anti-tTG IgA è risultata del 66,7% (4 deboli positivi su 12) mentre quella del marker anti DPG IgG è risultata migliore 91,7% (1 positivo su 12). Questo dato è probabilmente da mettere in relazione al fatto che le anti-tTG IgA si negativizzano più lentamente a livello ematico essendo l'antigene da esse riconosciuto di origine

endogena.

Infine, ci sembra interessante segnalare come valutando il profilo sierologico di ricerca per anticorpi anti-tTG IgA associata alla ricerca per anticorpi anti DPG-AGA IgG, la sensibilità diagnostica nei 17 bambini celiaci da noi reclutati sia risultata del 100%, mostrandosi tutti i bambini positivi almeno ad uno dei due marcatori. Questo dato è significativo per avvalorare l'importanza della ricerca associata dei due test nello screening iniziale per la malattia celiaca.

DISCUSSIONE

La malattia celiaca è un modello eziopatogenetico complesso di malattia in quanto è determinata dall'interazione di fattori ambientali (il glutine), fattori genetici e fattori immunologici rappresentati da una perdita di tolleranza verso antigeni sia esogeni (il glutine) che endogeni (l'enzima transglutaminasi) e dalla presenza di una risposta infiammatoria che risulta essere mediata da linfociti T e da citochine Th-1.

Indubbiamente negli ultimi dieci anni, l'importanza della sierologia nella diagnosi della malattia celiaca è notevolmente aumentata, infatti la disponibilità di test immunologici sempre più affidabili ha cambiato radicalmente l'algoritmo diagnostico della malattia celiaca.⁴⁰

Al momento attuale, la maggior parte degli Autori^{41,42} è concorde nell'affermare che la migliore strategia per lo screening della malattia celiaca sia inizialmente la ricerca di anti-tTG IgA e successivamente, l'esecuzione degli EMA come test di conferma sui pazienti risultati positivi. Questo protocollo sierologico si è dimostrato particolarmente valido tuttavia anch'esso non è privo di problemi legati, soprattutto, alla presenza di falsi positivi per le anti-tTG IgA⁴³ e alla riproducibilità del test per gli EMA⁴⁴. Come già detto, i falsi positivi per le anti-tTG IgA possono andare dal 3 al 12% in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali, allergie alimentari, colon irritabile, parassitosi ed altre infezioni intestinali e malattie autoimmuni.⁴⁵

I falsi negativi invece, sono riconducibili a immunodeficienza selettiva per la classe immunoglobulinica IgA, particolarmente frequente nella fascia d'età pediatrica inferiore ai 2 anni.

Il problema dei falsi positivi, inoltre, non può essere agevolmente risolto attraverso il dosaggio degli EMA, perché l'affidabilità di questo test è elevata

solo in alcuni laboratori specializzati poiché il riconoscimento degli EMA è reso particolarmente difficile dalla loro somiglianza in alcuni casi con gli anticorpi anti muscolo liscio.⁴⁶

In questo scenario, si inseriscono i peptidi deamidati di gliadina (DPG-AGA) che da un punto di vista patogenetico sono in grado di evocare una risposta immune più specifica dei peptidi nativi e che vengono riconosciuti da anticorpi specifici nel siero di pazienti celiaci e non nel siero dei controlli.⁴⁷

Con il nostro lavoro abbiamo ritrovato una sensibilità di questo test pari al 82,4% per DPG-AGA IgG e al 35,3% per DPG-AGA IgA, in accordo con i dati di letteratura che consigliano l'utilizzo dei soli DPG-AGA IgG, ma il dato più interessante è l'elevata specificità: 87,5% per DPG-AGA IgG.

Il confronto tra questo nuovo anticorpo e i test tradizionali ha mostrato che i DPG-AGA hanno un'accuratezza diagnostica marcatamente più elevata dei tradizionali AGA sia in termini di sensibilità che di specificità, quindi anche i nostri risultati hanno rafforzato l'indicazione a dismettere gli AGA dai profili sierologici per la diagnostica della malattia celiaca.

Sebbene DPG-AGA mostrino una sensibilità inferiore rispetto agli EMA e alle anti-tTG IgA, la loro specificità risulta essere molto elevata. Pertanto soprattutto i DPG-AGA IgG possono confermare la specificità della positività delle anti-tTG IgA. Non risulta invece di interesse inserire nel profilo diagnostico il test DPG-AGA IgA in quanto le scarse performance in termini di sensibilità (35,3%) non lo rendono eleggibile per un utilizzo in screening.

Può essere infine prospettata una strategia anticorpale basata sulla determinazione combinata di anti-tTG IgA e DPG-AGA IgG: in questo modo i DPG-AGA IgG consentirebbero non solo di confermare la specificità delle anti-tTG IgA ma anche di identificare la presenza di celiachia in pazienti con deficit di IgA.

Le performance diagnostiche in fase di prima diagnosi offerte dai test anti-tTG

IgA e DPG-AGA IgG, sono fortemente condizionate dall'età dei pazienti (≤ 2 anni; > 2 anni) e come si evince anche dai nostri risultati, i DPG-AGA IgG si sono dimostrati eccellenti marcatori per identificare i celiaci al di sotto dei due anni d'età.

Questa osservazione, unitamente al riscontro di un valore del 100% di sensibilità osservata sull'intera nostra casistica utilizzando il profilo combinato anti-tTG IgA e DPG-AGA IgG, suffraga l'ipotesi di utilizzo in fase di screening diagnostico della associazione dei due marcatori, come suggerito anche da numerosi Autori.^{20,34}

Le differenti sensibilità osservate per i due test nei bambini con età ≤ 2 anni e > 2 anni, trovano una spiegazione probabilmente in una espressione di anticorpi verso i due differenti antigeni (tTG e DPG-AGA) che varia in funzione dell'età, in quanto come già evidenziato in altri lavori, la DPG-AGA viene precocemente riconosciuta come antigene in quanto antigene esogeno.⁴⁸

Infine, in corso di monitoraggio di malattia celiaca per valutare la compliance alla dieta senza glutine, abbiamo riscontrato differenze tra i test anti-tTG IgA e i DPG-AGA IgG, legate ai tempi di ritorno a valori negativi: la nostra impressione è che le anti-tTG IgA impieghino più tempo a negativizzarsi completamente.

La persistenza di DPG-AGA IgG e anti-tTG IgA in corso di dieta priva di glutine è espressione di bassa compliance alla dieta e presumibilmente di mancato miglioramento della mucosa intestinale, di conseguenza la loro scomparsa è espressione di recupero della funzionalità della mucosa duodenale stessa.^{49,50} I DPG-AGA IgG si sono dimostrati quindi validi marcatori anticorpali anche nel follow-up della malattia celiaca.

Il nostro lavoro ha premesso di confermare come DPG-AGA IgG sembrano essere un promettente mezzo diagnostico per lo screening anticorpale della malattia celiaca, in quanto sono in grado di confermare la specificità delle anti-tTG IgA, di identificare la celiachia nei bambini con età inferiore ai due anni e

di identificare casi di celiachia associati a deficit di IgA.

La determinazione contemporanea di DPG-AGA IgG e anti-tTG IgA consente non solo di migliorare l'accuratezza diagnostica sierologica nella diagnosi di malattia celiaca ma anche di ottenere un risparmio in termini di costi con la riduzione del numero di test da utilizzare rispetto al precedente algoritmo diagnostico che spesso comportava l'esecuzione di più test (anti-tTG IgA, anti-gliadina IgA e IgG e antiendomisio), configurandosi come intervento di appropriatezza prescrittiva.

IMMAGINI E TABELLE

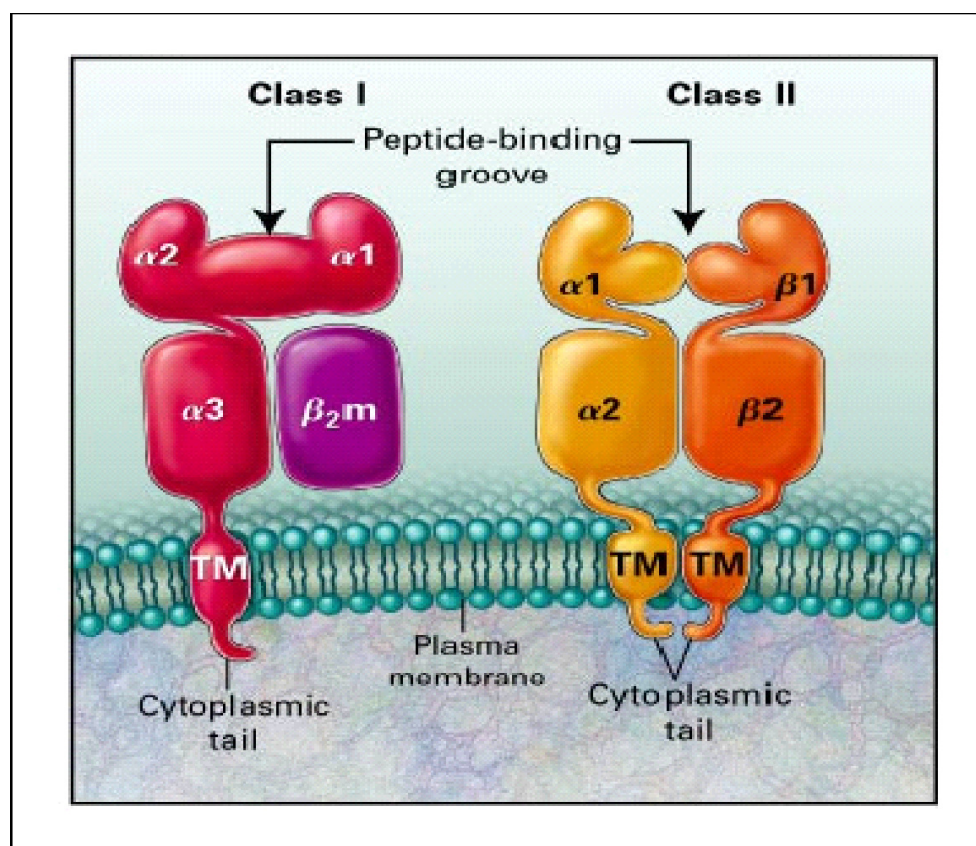


Immagine 1: Sistema HLA e malattia celiaca: antigeni di Istocompatibilità di Classe I e di Classe II, differente struttura sulla superficie cellulare.

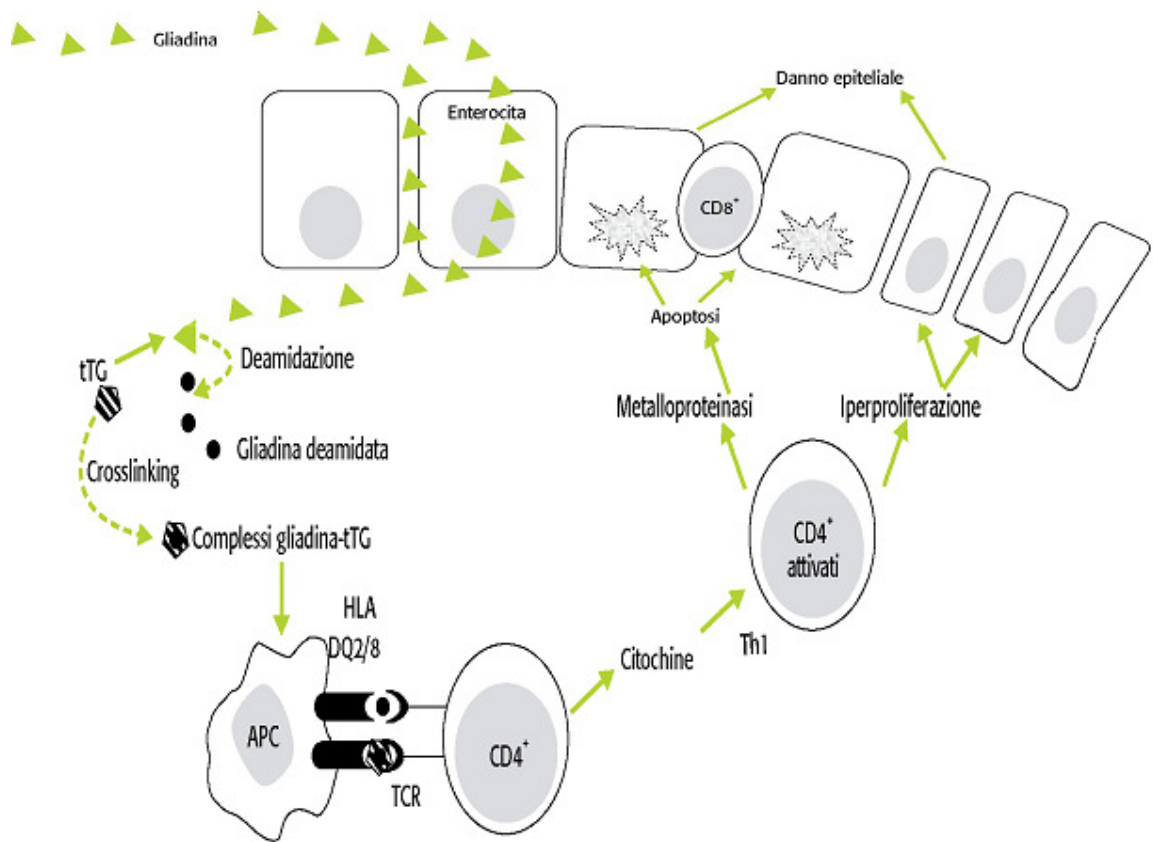


Immagine 2: Fasi del meccanismo immunopatogenico della malattia celiachia.

Diabete mellito di tipo 1	Sindrome di Down
Tiroidite autoimmune	Sindrome di Turner
Sindrome di Williams	Deficit di IgA
Epatopatia autoimmune	Parenti di primo grado con celiachia

Tabella 1: Condizioni di rischio per malattia celiaca.

Dolore addominale cronico	Addome globoso
Diarrea cronica o intermittente	Scarso accrescimento
Anemia da carenza do ferro	Nausea o vomito
Stipsi cronica non responsiva al trattamento	Perdita di peso
Affaticamento cronico	Bassa statura
Ritardo puberale	Amenorrea
Stomatite aftosa ricorrente	Dermatite erpetiforme
Osteopenia, osteoporosi, fratture recidivanti	Incremento inspiegato delle transaminasi

Tabella 2: Presentazioni cliniche della malattia celiaca.

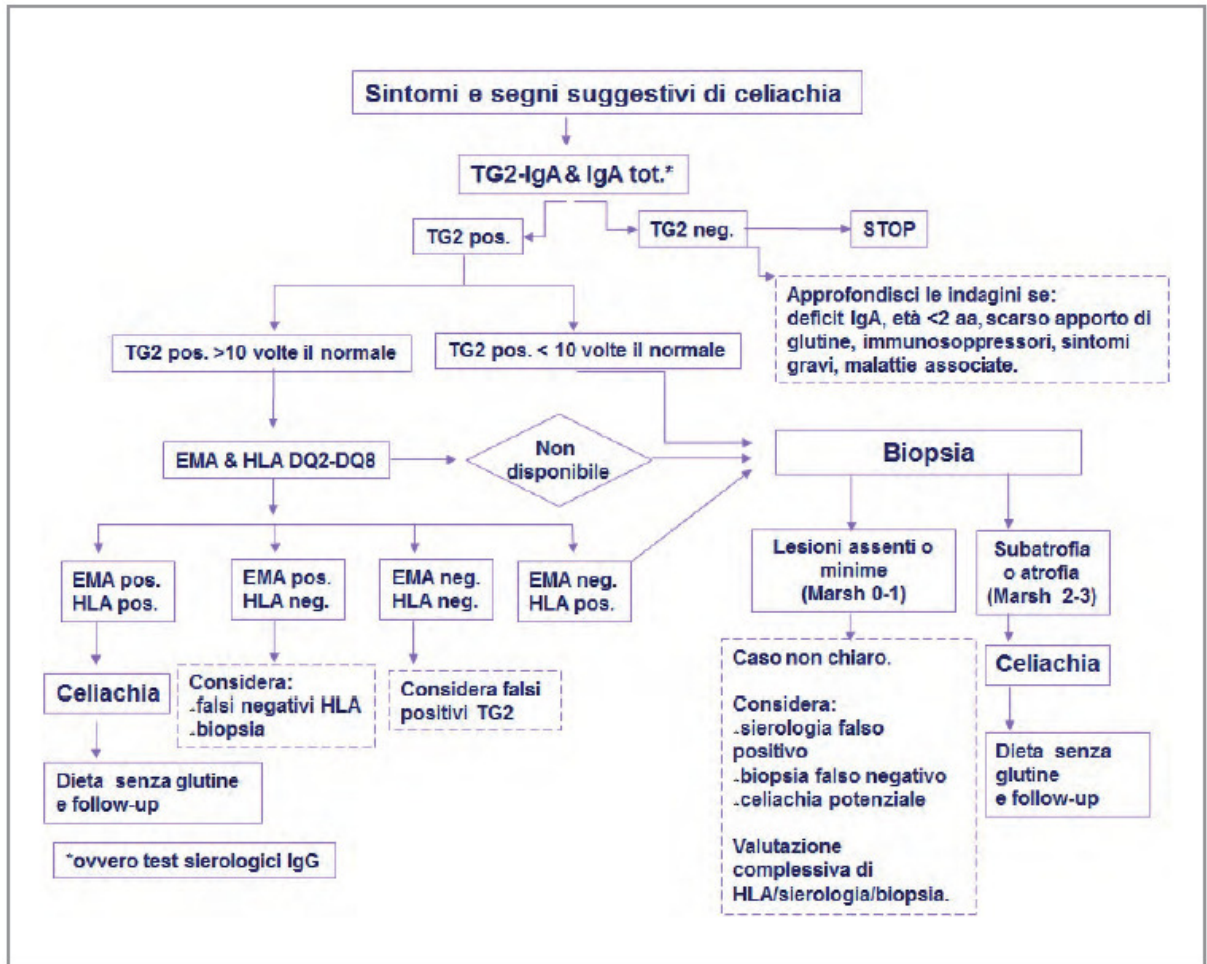


Tabella 3: Iter diagnostico in presenza di sintomi e segni suggestivi di malattia celiaca. Linee Guida ESPGHAN 2011.

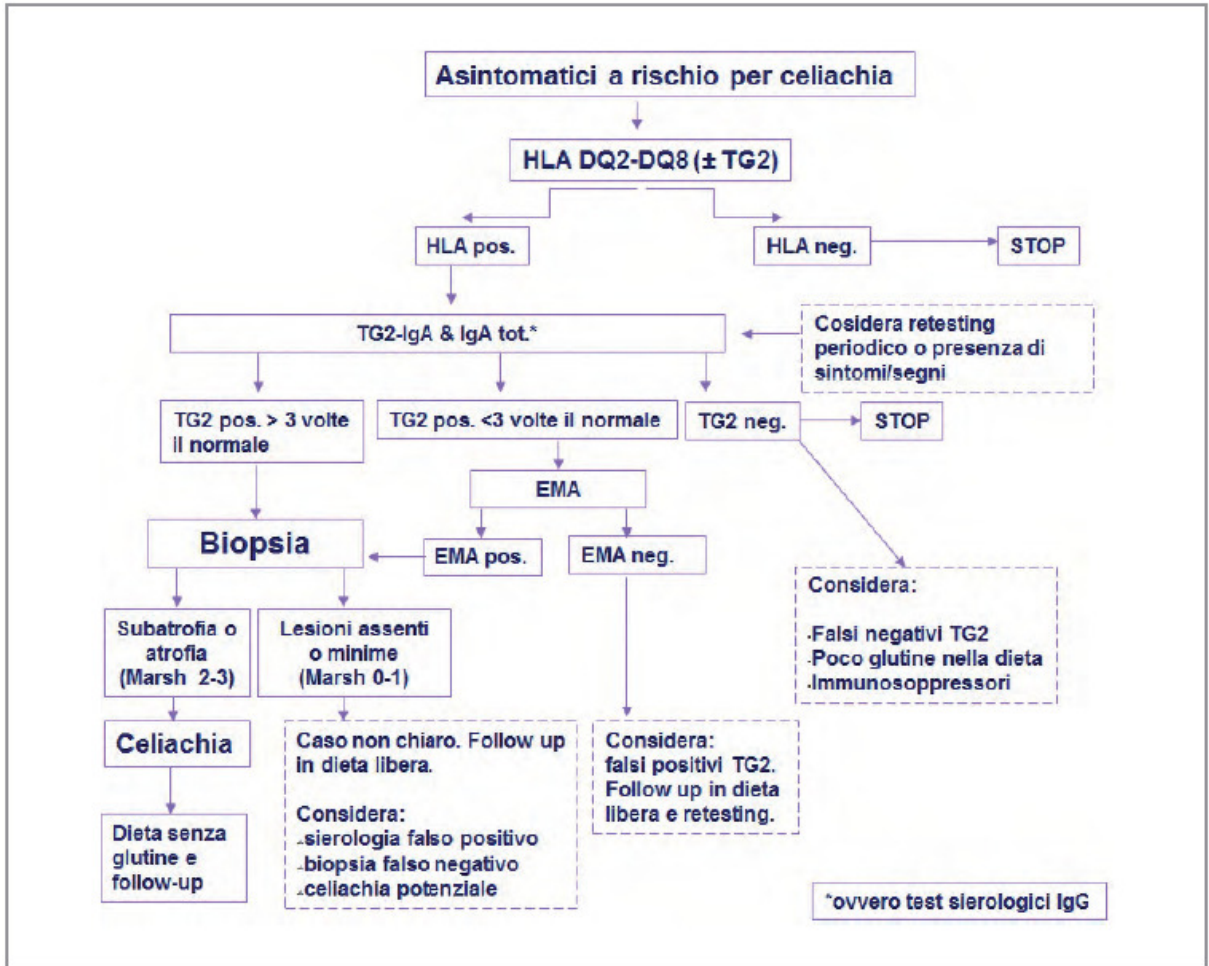


Tabella 4: Iter diagnostico in presenza di pazienti asintomatici ma con fattori di rischio per malattia celiaca. Linee Guida ESPGHAN 2011.

	Età	N° pazienti
Pazienti celiaci (n°17)	≤2aa	5
	>2aa	12
Pazienti non celiaci (n°24)	≤2aa	11
	>2aa	13
Pazienti in dieta (n°12)	≤2aa	0
	>2aa	12

Tabella 5: Descrizione della casistica.

Nome	Età	Esito biopsia	tTG	EMA	AGA IgG	AGA IgG DGP	AGA IgA	AGA IgA DGP
			>20		>25	>15	>10	>15
P. F.	11aa	celiaco in dieta	24,8	neg	9,1	8,4	172	300
T. D.	13aa	celiaco in dieta	26,5	pos 20	50,2	18	3,1	3,4
P. S.	16aa	celiaca in dieta	3	neg	9,8	0,8	3,4	2,3
B. V.	18aa	celiaco in dieta	11	neg	4,3	2,1	2,3	5
T. A.	8aa	celiaco in dieta	12	neg	19,8	3,2	4	4
M. R.	6aa	celiaco in dieta	2,8	neg	12,6	1,8	3,2	0,7
A. C.	18aa	celiaco in dieta	4,1	neg	16,4	1,6	9,3	2,8
R. S.	17aa	celiaco in dieta	1,8	neg	23,4	1,6	4,8	1,7
B. V.	12aa	celiaco in dieta	21,7	pos 10	17,8	8,3	6,3	8,38
G. M.	6aa	celiaco in dieta	23,7	pos 5	22,7	7,6	8,2	0,5
L. D.	5aa	celiaco in dieta	2	neg	3,75	2,6	1,4	0,1
A. C.	6aa	celiaco in dieta	16,2	pos 5	12,8	5,57	1,8	0,7

Tabella 6a: Descrizione dei pazienti celiaci in dieta.

Nome	Età	Esito biopsia	Sintomi	tTG	EMA	AGA IgG	AGA IgG DGP	AGA IgA	AGA IgA DGP
				>20		>25	>15	>10	>15
C. M.	5aa	celiaca	scarso accrescimento	14,7	pos 10	110	15,8	5,7	0,4
K. Y.	8aa	celiaco	anemia ferropriva	52,8	neg	7,5	7,4	300	4,7
S. S.	9aa	celiaca	fam e astenia	300	neg	48,8	10,7	300	296
K. P.	2aa	celiaco	scarso accrescimento	2,17	neg	94,9	17,6	39,1	0,7
T. M.	3aa	celiaco	dist add e alvo diarroico	190	pos 160	91,8	300	20,3	31,6
O. T.	9aa	celiaco	artralgie	45,3	pos 40	17,8	4,2	5,21	0,4
B. E.	15aa	celiaca	anemia ferropriva	64,7	pos 80	18,6	19,2	5,3	2,9
E. M.	1aa	celiaco	crisi celiaca	11,5	pos 10	65,8	103	2,99	0,8
G. L.	5aa	celiaco	diabete	300	pos 160	66	300	26,4	8,8
T. C.	6aa	celiaco	dermatiti ric	300	pos 160	77,7	217	10,1	15,2
F. S.	5aa	celiaco	alopecia	78,1	pos 40	73,6	300	5,78	300
N. A.	2aa	celiaco	scarso accrescimento	300	pos 160	80,2	300	242	300
B. M.	1aa	celiaco	alvo diarroico	300	pos 320	100	300	54,7	300
D. M.	18aa	celiaco	addominalgia	33,3	neg	10	27,3	20	12,4
S. R.	18aa	celiaca	anemia ferropriva	300	pos 320	49,4	74,3	10,1	7,7
C. G.	2aa	celiaca	dist add e alvo diarroico	8,9	pos 5	24,8	35,3	1,6	0,3
B. G.	4aa	celiaca	addominalgia	141	pos 320	43,2	53,1	11,5	6

Tabella 6b: Descrizione dei pazienti celiaci.

Nome	Età	Esito biopsia	Sintomi	tTG	EMA	AGA IgG	AGA IgG DGP	AGA IgA	AGA IgA DGP
				>20		>25	>15	>10	>15
T. L.	18aa	normale	addominalgia	7,4	neg	8,9	1,9	29,4	4,4
R. M.	6aa	normale	addominalgia	2,2	neg	136	14,9	5,26	4,4
P. I.	16aa	normale	artralgie	11,6	neg	3,4	4,7	54,5	9,8
P. G.	18aa	normale	alvo diarroico	18,2	neg	23,8	5,8	49	32,7
G. G.	2aa	normale	scarso accrescimento	1,7	neg	94,7	1,8	96	0,1
O. U.	1aa	normale	alvo diarroico	2,29	neg	101	4,1	38,4	0,2
S. V.	10aa	normale	addominalgia	19,9	pos 5	25,1	33,7	4,3	5,8
M. A.	2aa	normale	scarso accrescimento	10	neg	30,1	1,1	46,8	2,9
B. M.	16aa	normale	alvo diarroico	1,9	neg	93	0,9	16,2	2,1
V. E.	6aa	normale	dermatiti ricorrenti	12,6	neg	10,3	5,6	12,4	5,7
B. F.	4aa	normale	addominalgia	9,6	neg	1,5	4,3	4,7	1,3
P. V.	10aa	normale	alvo diarroico	2,5	neg	52,6	0,7	4,2	1
M. F.	1aa	normale	scarso accrescimento	2,75	neg	9,7	4,5	4,9	0,3
C. A.	18aa	normale	meteorismo	5,2	neg	3,8	6,1	30,3	1,5
B. S.	2aa	normale	fam e scarso accre	3,83	neg	16,2	3,1	3	0,77
P. B.	3aa	normale	scarso accrescimento	55,3	neg	11,9	3,2	124	8,4
L. F.	17aa	normale	addominalgia	3,2	neg	44,8	15,4	24,6	0,8
M. F.	1aa	normale	scarso accrescimento	5,89	neg	87,6	223	37,6	1,7
S. A.	1aa	normale	scarso accrescimento	1,69	neg	43,8	7,2	11,9	0,2
Y. J.	1aa	normale	scarso accrescimento	2,33	neg	32,3	3,5	4,4	0,2
F. N.	1aa	normale	addominalgia	1,4	neg	87,2	2,2	1,9	0,1
E. R.	2aa	normale	alvo diarroico	1,2	neg	2,7	0,9	1,2	0,1
L. F.	11aa	normale	artralgie	12,4	neg	30,5	7,4	3,1	0,5
B. T.	2aa	normale	alvo diarroico	3,1	neg	81,8	2,6	38,1	0,1

Tabella 6c: Descrizione dei pazienti non celiaci.

	TUTTI		≤2 anni		>2 anni	
	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci
	tTG IgA	13 76,5%	1 4,2%	2 40,0%	0 0,0%	11 91,7%
	4 23,5%	23 95,8%	3 60,0%	11 100,0%	1 8,3%	12 92,3%
	Sensibilità 76,5%		Sensibilità 40,0%		Sensibilità 91,7%	
	Specificità 95,8%		Specificità 100,0%		Specificità 92,3%	

	TUTTI		≤2 anni		>2 anni	
	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci
	AGA DPG IgG	14 82,4%	3 12,5%	5 100,0%	1 9,1%	9 75,0%
	3 17,6%	21 87,5%	0 0,0%	10 90,9%	3 25,0%	11 84,6%
	Sensibilità 82,4%		Sensibilità 100,0%		Sensibilità 75,0%	
	Specificità 87,5%		Specificità 90,9%		Specificità 84,6%	

	TUTTI		≤2 anni		>2 anni	
	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci
	AGA DPG IgA	6 35,3%	1 4,2%	2 40,0%	0 0,0%	4 33,3%
	11 64,7%	23 95,8%	3 0,0%	11 100,0%	8 66,7%	12 92,3%
	Sensibilità 35,3%		Sensibilità 40,0%		Sensibilità 33,3%	
	Specificità 95,8%		Specificità 100,0%		Specificità 92,3%	

Tabella 7: Tabelle di concordanza 2x2: tTG IgA, AGA-DPG IgG, AGA-DPG IgA.

AGA IgG	TUTTI		≤2 anni		>2 anni		
	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci	
	+	12 70,6%	14 58,3%	4 80,0%	8 72,7%	8 66,7%	6 46,2%
-	5 29,4%	10 41,7%	1 20,0%	3 27,3%	4 33,3%	7 53,8%	
		Sensibilità 70,6%		Sensibilità 80,0%		Sensibilità 66,7%	
		Specificità 41,7%		Specificità 27,3%		Specificità 53,8%	

AGA IgA	TUTTI		≤2 anni		>2 anni		
	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci	celiaci	non celiaci	
	+	11 64,7%	14 58,3%	3 60,0%	6 54,5%	8 66,7%	8 61,5%
-	6 35,3%	10 41,7%	2 40,0%	5 45,5%	4 33,3%	5 38,5%	
		Sensibilità 64,7%		Sensibilità 60,0%		Sensibilità 66,7%	
		Specificità 41,7%		Specificità 45,5%		Specificità 38,5%	

Tabella 8: Tabelle di concordanza 2x2: AGA IgG e AGA IgA.

BIBLIOGRAFIA

1. Catassi C, Fasano A. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 687-91
2. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet* 2009; 113:1672-76
3. Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of thw Sahara? *Lancet* 1999; 354: 647-8
4. Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2700-4
5. Sodd A, Midha V, Sood N, et al. Increasing incidence of celiac disease in India. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2804-5
6. Wu J, Xia B, von Blomberg BM, et al. Coeliac disease: emerging in China? *Gut* 2010; 59: 418-9
7. Greco L, Romino R, Coto I, et al. The first large population-based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 624-8
8. van Heel DA, Hunt K, Greco L, et al. Genetics in coeliac disease. *Best Pract Rs Clin Gastroenterol* 2005; 19: 323-39
9. Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implication. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 190-196
10. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European genetics cluster on celiac disease. *Hum Immunol* 2003; 64: 469-77
11. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol* 2009; 70: 55-9
12. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Ara C, Biagi F, Perilli M, Amicosante G, Cifone MG, Corazza GR (2003) Gliadin and tissue transglutaminase complexes in normal and coeliac duodenal mucosa. *Clin Exp Immunol* 134: 516-524
13. Molberg O, mcAdam S, Korner R, Quarsten H, kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjostrom H, Sollid LM (1998) Tissue Transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cell in celiac disease. *Nat Med* 4: 713-717
14. van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Pena S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F (1998) Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 161: 1585-1588

15. Osman AA, Gunnel T, Dietl A, Uhlig HH, Amin M, Fleckenstein B, Richeter T, Mothes T (2000) B cell epitopes of gliadin. *Clin Exp Immunol* 121: 248-254
16. Alaedini A, Green PHR (2005) Narrative review Coeliac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Int Med* 142: 289-298
17. Presutti RG, Cangemi JR, Cassidy HD. Celiac disease. *Am Fam Phys* 2007; 76: 1795-1802
18. Volta U. Autoanticorpi nella celiachia: marcatori di malattia e di patologia autoimmune associate. *Ligand Assay* 2003; 8: 89-97
19. Catassi C, Fabiani F, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PI, et al The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antibodies screening for coeliac disease in school age subjects. *Acta Pediatr* 1996; 412 (Suppl): 29-35
20. Lagerqvist C, Dahlbom I, Hansson T et al. Antigliadin immunoglobulin A best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 428-35
21. Husby S et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54: 136-60.
22. Lock RJ, Gilmour JE, Unsworth DJ Anti tissue transglutaminase, anti- α -endomysium and anti R1-reticulin autoantibodies-the antibodies trinity of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 258-62
23. Tonutti E, Visentini D, Bizzarro N et al. Linee Guida per la diagnosi di laboratorio e istologica della malattia celiaca. *Rime/IJLaM* 2005, 2: 110-22
24. Tonutti E, Visentini D, Bizzarro N et al. The role of antitissue transglutaminase assay for diagnosis and monitoring of coeliac disease: a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56: 389-93
25. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801
26. Carroccio A, Di Prima L, Pirrone G 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(69): 1175-80
27. Lewis NR, Scott BB Systematic review: the use of serology to exclude or diagnose celiac disease (a comparison of endomysial and tissue transglutaminase antibody test) *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24(1): 47-54

28. Korponay-Szabo IR, Dahlbom I, Laurila K et al. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut* 2003; 52: 1567-71
29. Cataldo F, Marino V, Ventura A and The Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP), and Club del Tenue Working Group on Coeliac disease. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in celiac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 1998; 42: 362-5
30. Volta U, Granito A, Fiorini E et al. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1582-8
31. Molberg O, Mcadam S, Korner R et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut derived T cells in celiac disease. *Nat med* 1998; 4: 713-17
32. Liu E, Li M, Emery I, Taki I et al. Natural history of antibodies to deaminated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. *J. Ped Gastro Nutr* 2007; 45: 293-300
33. Price HE Evaluation of the INOVA diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay kit for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deaminated gliadin peptides. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 150-151
34. Basso D, Guarisio G, Fogar p, Meneghel A et al. Antibodies against synthetic deaminated gliadin peptides for celiac disease diagnosis and follow up in children. *Clin Chem* 2009; 55: 150-7
35. Meuwisse GW. Round table discussion. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand* 1970; 59: 461-3.
36. Guandalini S et al. Diagnosis of coeliac disease: time for a change? *Arch Dis Child* 1989; 64: 1320-5.
37. Walker-Smith JA et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-11.
38. Auricchio R et al. Italian Paediatricians' approach to coeliac disease diagnosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 374-6.
39. Ribes-Koninckx C et al. Coeliac disease diagnosis ESPGHAN 1990 Criteria or need for a change? Results of a questionnaire. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54: 15-9.
40. Fasano A, Catassi C (2001) Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 120: 636-651
41. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O et al. (2007) Detection of celiac disease in primary care : a multicenter case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol* 102: 1-7

42. Murray JA, Herlein J, Mitros F, Goeken JA (2000) Serologic testing for celiac disease in the United States: results of a multilaboratory comparison study. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7: 584-587
43. Bizzarro N, Tampoia M, Villalta D et al. (2006) Low specificità of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with primary biliary cirrosi. *J Clin Lab Anal* 20: 184-189
44. Stern (2000) Comparative evaluation of serologic tests for celiac disease: a European initiative towards standardization. *J Ped Gastroenterol Nutr* 31: 513-519
45. Sardy M, Csikos M, Geisen C et al. (2007) Tissue transglutaminase ELISA positivity in autoimmune disease independent of gluten-sensitive disease. *Clin Chim Acta* 376: 126-135
46. Volta U, Molinaro N, De Franceschi I et al. (1995) IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease: save both money and monkeys. *Dig Dis Sci* 40: 1902-1905
47. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C et al. (2001) Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem* 47: 2023-2028
48. Sugai E, Vazquez H, nachman F, Moreno ML et al. Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-related peptides in celiac disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4: 1112-1117, 2006
49. Gruppo di Lavoro Celiachia: Documento di inquadramento per la diagnosi ed il monitoraggio della malattia celiaca e relative complicanze. *Suppl. G.U.* pag 19-29, 7 febbraio 2008
50. Volta U, Granito A, Fiorini E, Parisi C et al. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptidea in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1582-1588