

IMUNOLOGICKÁ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ PŘI PODEZŘENÍ NA CELIAKII

MUDr. Karin Malíčková^{1,2}, RNDr. Ivana Janatková^{1,2}, Ing. Petra Šandová¹, prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc.^{1,2}

¹Klinická imunologie a alergologie – laboratoř, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN

a 1. LF UK Praha

²Ústav imunologie a mikrobiologie VFN a 1. LF UK, Praha

Celiakie je autoimunitní enteropatie vyvolaná nesnášenlivostí gliadinu. V sérech neléčených pacientů s celiakií se mohou nacházet protilátky proti gliadinu (AGA), retikulinu (ARA), endomysiu (EMA) a tkáňové transglutamináze (anti-tTG). Cílem naší práce bylo vypracování racionálního algoritmu uvedených screeningových imunologických vyšetření. Za tímto účelem jsme provedli retrospektivní analýzu údajů o vyšetřeních se zaměřením na screening celiakie na našem pracovišti za rok 2004. Zjistili jsme 100% senzitivitu a specifitu anti-tTG v souvislosti s diagnózou celiakie a podstatně nižší hodnoty senzitivity i specifity AGA (senzitivita AGA IgA 60%, AGA IgG 70%, specifita AGA IgA 60%, AGA IgG 35%). Pozitivní AGA jsme kromě celiakie našli u řady jiných chorobných stavů (Crohnova nemoc, potravinové alergie, systémové a orgánové autoimunitní choroby, diabetes). Vzhledem k vysoké citlivosti a specifitě anti-tTG doporučujeme tento test jako první screeningové vyšetření při podezření na celiakii u dospělých osob.

Klíčová slova: celiakie, protilátky proti tkáňové transglutamináze, protilátky proti gliadinu, protilátky proti endomysiu, protilátky proti retikulinu.

IMUNOLOGICAL LABORATORY TESTS IN SUSPECT OF CELIAC DISEASE

Celiac disease is an autoimmune enteropathy induced by the gliadin intolerance. In the sera of untreated patients, antibodies against gliadin (AGA), reticulin (ARA), endomysium (EMA) and tissue transglutaminase (anti-tTG) may be found. The aim of this study was to develop optimal algorithm for screening laboratory tests. The retrospective analysis of our celiac laboratory test results from the year 2004 was done. Both sensitivity and specificity of anti-tTG for the diagnosis of celiac disease was excellent (100%). Sensitivity and specificity AGA was considerable lower (sensitivity AGA IgA 60%, AGA IgG 70%, specificity AGA IgA 60%, AGA IgG 35%). Except celiac disease, AGA positivity was detected in numerous other diseases (Crohn's disease, food allergies, systemic and organ specific autoimmune diseases, diabetes). According to the high anti-tTG sensitivity and specificity we recommend this test as a first screening test in adults with suspected celiac disease.

Key words: celiac disease, antibodies against tissue transglutaminase, anti-gliadin antibodies, anti-endomysium antibodies, anti-reticulin antibodies.

Úvod

Celiakie je autoimunitní enteropatie indukovaná nesnášenlivostí gliadinu a postihující primárně sliznici tenkého střeva. K typickým klinickým příznakům patří chronické průjmy, hubnutí, bolesti břicha, únava, slabost a aftózní stomatitida. Atypické (extraintestinální) příznaky zahrnují bolesti kostí, hyposplenismus, stagnaci růstu, opožděnou pubertu, infertilitu a opakované potraty, kožní projevy, anémii nebo osteopenii. V mnoha případech je onemocnění asymptomatické nebo se projevuje pouze mírnou únavou nebo nenápadnou anémií. U tiché (silent) formy bývá diagnóza celiakie stanovena při vyšetřování jiného základního onemocnění (diabetu, autoimunitní thyreoiditidy, juvenilní revmatoidní artritidy) nebo při vyšetření klinicky zdravých příbuzných pacienta s celiakií. Obávanými komplikacemi nemoci jsou gastrointestinální karcinomy a lymfomy (2, 18).

Celiakie byla poprvé v historii zdokumentována Galénem (řecky *koiliakos*, „trpící bolestmi střev“) (19). Soudobá medicína zaznamenala celiakii poprvé v roce 1888, kdy S. Gee popsal klinické příznaky nemoci a zároveň způsob terapie, kterým je dieta. V roce 1952

zjistil W. K. Dicke, že celiakie souvisí s obsahem pšeničných bílkovin v potravě. Na jeho výzkumy navázala v roce 1953 C. Anderson, která potvrdila, že příčinou celiakie je intolerance glutenu – směsi zásobních proteinů obilných zrn (2). V roce 1971 Seah a spoluautoři poprvé popsali sérové protilátky proti gliadinu – etanol-solubilnímu glutenu bohatému na glutamin a prolin. Konec 20. století patřil objevům, prokazujícím další imunopatologie v souvislosti s celiakií: Chorzelski objevil protilátky proti retikulinu, Ladinser protilátky proti endomysiu a v roce 1997 zjistil Dieterich, že primárním autoantigenem protilátek proti endomysiu je tkáňová transglutamináza, enzym sloužící k deamidaci glutaminu v gliadinu (1, 3, 4, 6, 9, 11, 16, 17).

Imunologické diagnostické metody významným dílem přispěly ke zdokonalení diagnostiky celiakie. V současné době patří k nejčastěji indikovaným testům protilátky AGA a anti-tTG. Legitimní otázkou však je, zda uvedené autoprotilátky přispívají stejným dílem ke stanovení diagnózy a k monitorování průběhu onemocnění. Jinými slovy: má smysl provádět všechny laboratorní analýzy součas-

ně? Který z dostupných testů zvolit v konkrétní klinické situaci?

Soubor pacientů a metodika

Provedli jsme retrospektivní analýzu údajů o screeningových imunologických laboratorních vyšetřeních celiakie, uskutečněných v laboratoři klinické imunologie a alergologie ÚIM VFN a 1. LF UK (nyní Klinická imunologie a alergologie – laboratoř ÚKBLD VFN a 1. LF UK) v roce 2004. V tomto roce jsme vyšetřili 1988 vzorků na přítomnost protilátek proti gliadinu (AGA), 1789 vzorků na přítomnost protilátek proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG), dále bylo provedeno 1365 vyšetření protilátek proti endomysiu (EMA) a 658 stanovení protilátek proti retikulinu (ARA).

V této studii jsme dále pracovali pouze s údaji o vzorcích, u kterých bylo jako první screeningové vyšetření se zaměřením na celiakii u dospělého pacienta ordinováno současné stanovení AGA a anti-tTG. Takových případů bylo 304, přičemž 67 vzorků z tohoto celkového počtu vykázalo pozitivitu alespoň jednoho sledovaného parametru (AGA a/nebo anti-tTG).

Tabulka 1. Senzitivita a specifická vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze a protilátek proti gliadinu

		Anti-tTG IgA	AGA IgA	AGA IgG
naše pozorování	senzitivita	100%	60%	70%
	specifita	100%	60%	35%
Henker J: Immune reactivities in celiac disease. In: Autoantigens and Antibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst 2000	senzitivita	95–100%	30–100%	60–70%
	specifita	90–97%	80–100%	40–65%
AGA Technical review on Celiac Sprue. Gastroenterology 2001	senzitivita	95%	100%	89%
	specifita	94%	95%	85%
Nelsen D: Gluten-Sensitive Enteropathy (Celiac Disease): More Common Than You Think. Am Fam Phys 2002	senzitivita	95%	53–100%	57–80%
	specifita	100%	63–100%	42–98%

AGA IgG a IgA byly vyšetřovány ELISA metodou (BL-Diagnostika, Německo), hranice pozitivita byla v testu definována koncentrací > 10 IU/ml. Anti-tTG byly detekovány rovněž ELISA metodou (BioSystems, USA), hranice pozitivita testu byla > 12 IU/ml.

Výsledky

Anti-tTG pozitivní vzorky (Obrázek 1)

Z celkového počtu 67 vzorků s pozitivitou alespoň jednoho sledovaného parametru byla nalezena pozitivní hodnota anti-tTG IgA v 10 případech. Průměrná hodnota koncentrace anti-tTG IgA v tomto souboru byla 83,7 IU/ml. Všichni nemocní z tohoto souboru byli vyšetřeni endoskopicky a u všech byla biopsicky potvrzena celiakie. V 6 vzorcích těchto pacientů s potvrzenou celiakií byly pozitivní AGA IgA (průměrná koncentrace AGA IgA 41,03 IU/ml) a v 7 vzorcích byla nalezena pozitivita AGA IgG (průměrná koncentrace AGA IgG 34,54 IU/ml).

Anti-tTG negativní AGA pozitivní vzorky (Obrázek 2)

V souboru 57 vzorků s negativitou anti-tTG a s pozitivitou AGA v jednom nebo v obou izotypech nebyla u žádného nemocného zjištěna celiakie. Je však třeba uvést, že enterobiopsie byla provedena pouze u 28 z těchto nemocných, u zbylých pacientů bylo verifikováno jiné onemocnění a v diagnostických krocích směrem k celiakii se již nepokračovalo. Konečnými diagnózami u těchto osob byla potravinová alergie, Crohnova nemoc, dermatitida nebo systémové či orgánové autoimunitní onemocnění (revmatoidní artritida, chronická lymfocytární tyreoiditida). V 15 vzorcích byly nalezeny orgánově nespecifické nebo specifické autoprotilátky (antinukleární protilátky, revmatoidní faktor, antiendoteliální protilátky, protilátky proti tyreoperoxidáze, protilátky proti tyreoglobulinu). Průměrná koncentrace AGA IgA v těchto vzorcích byla 26,49 IU/ml, AGA IgG 25,17 IU/ml.

Statistickou analýzou dat (t-test, statistický software VassarStats) byly u pacientů s prokázanou celiakií potvrzeny statisticky významně vyšší koncentrace AGA IgA ($p = 0,0001$) i AGA

IgG ($p < 0,0001$) ve srovnání s pacienty bez celiakie a současnou pozitivitou AGA.

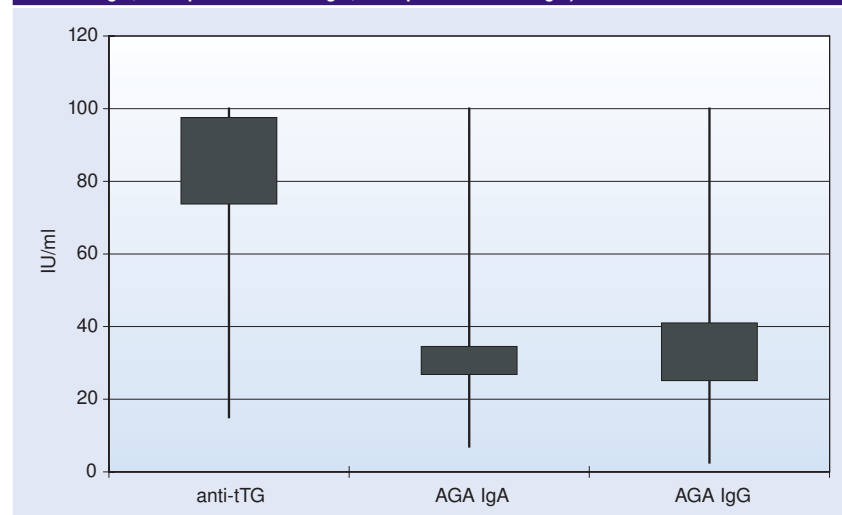
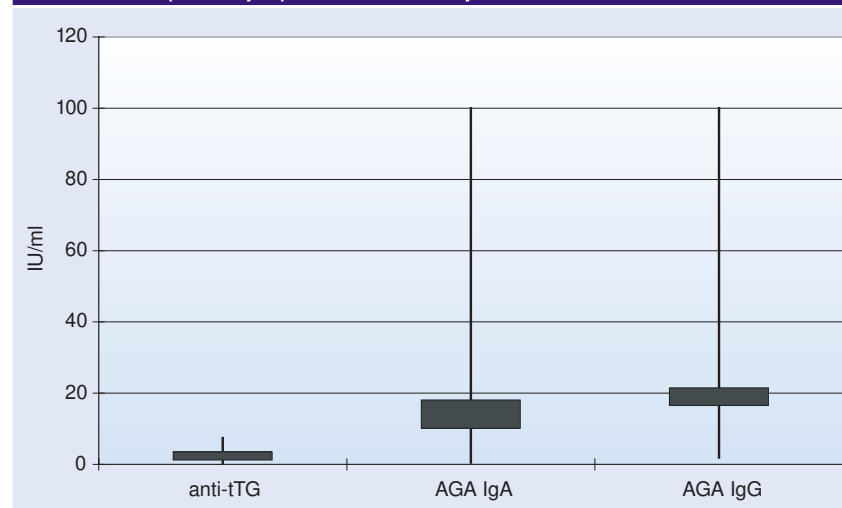
Jinými slovy:

- 1) diagnóza celiakie byla potvrzena pouze u nemocných s pozitivitou anti-tTG. U těchto nemocných byla zároveň ve většině případů nalezena i elevace AGA IgA a IgG, a to ve vyšších titrech než u osob bez průkazu celiakie;
- 2) nemocní s izolovanou pozitivitou AGA trpěli v řadě případů jinými imunopatologickými chorobnými stavy.

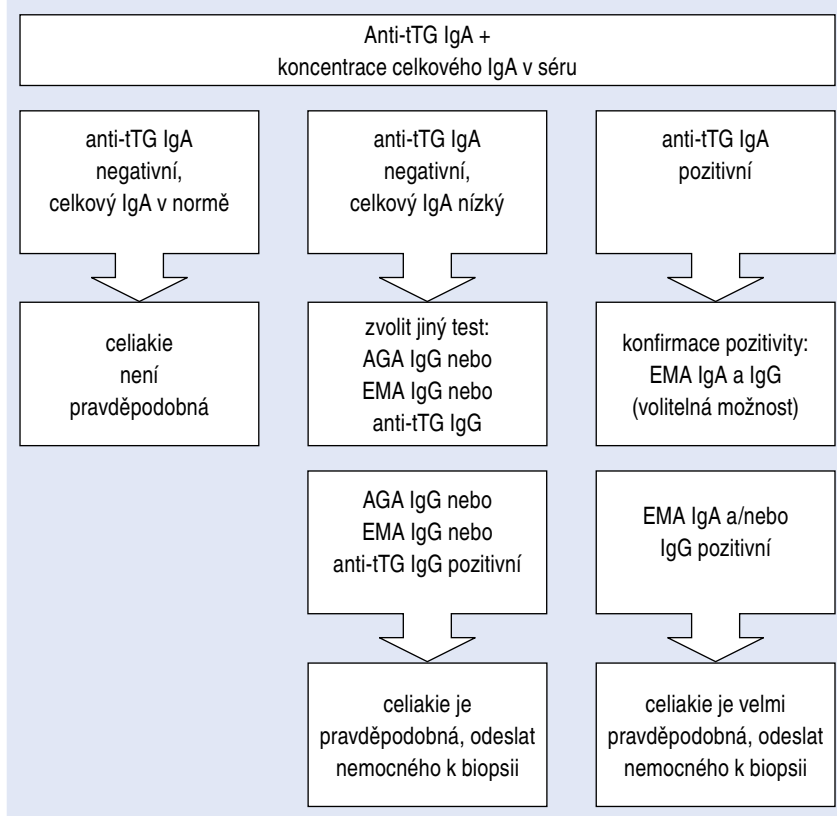
V tabulce 1 jsou uvedeny námi získané hodnoty senzitivity a specifity a jejich srovnání s údaji jiných autorů.

Diskuze

Je třeba zdůraznit, že podle závazných mezinárodních doporučení se diagnóza celiakie stanovuje na základě enterobiopsie (2). Pouze toto vyšetření může stoprocentně potvrdit gluten-senzitivní enteropatii, která je následkem intolerance gliadinu a která je charakterizována vilózní atrofií sliznice, hypertrofií krypt a intraepiteliální lymfocytární infiltrací

Obrázek 1. Koncentrace autoprotilátek u pacientů s verifikovanou celiakií (10/10 pozitivní anti-tTG IgA, 6/10 pozitivní AGA IgA, 7/10 pozitivní AGA IgG)**Obrázek 2. Autoprotilátky u pacientů bez klinických známek celiakie**

Obrázek 3. Diagnostický algoritmus imunologických vyšetření při podezření na celiakii



(2,18). Endoskopie s enterobiopsií je však invazivním vyšetřením, proto je v mnoha případech potřebné využít neinvazivního a méně nákladného laboratorního vyšetření, které je schopno dát odpověď na otázku týkající se nutnosti provedení endoskopického vyšetření. K těmto pomocným laboratorním vyšetřením patří stanovení anti-tTG, AGA, případně EMA a ARA.

Protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG) (1, 2, 5, 6, 7, 8, 12)

Tkáňová transglutamináza je enzym, který se nachází v lamina propria intestinální sliznice. Za fyziologických okolností modifikuje strukturu peptidů gliadinu, u predisponovaných jedinců pak zodpovídá za zvýšenou afinitu těchto peptidů k molekulám HLA na antigen-prezentujících buňkách. Kvantitativní nebo semikvantitativní detekce anti-tTG se provádí enzymovou imunoanalýzou (ELISA).

První generace anti-tTG ELISA testů využívala jako antigen tkáňovou transglutaminázu z morčecích jater. Z důvodu „kontaminace“ antigenního substrátu jinými jaterními proteiny docházelo v těchto analýzách k četným falešným pozitivitám. Druhá generace anti-tTG ELISA využívala tkáňovou transglutaminázu z lidských erytrocytů a nejnovější testy třetí generace používají rekombinantní tkáňovou transglutaminázu. Senzitivita a specifita anti-tTG pro diagnózu celiakie je velmi vysoká, v našem souboru stoprocentní.

V seznamu zdravotních výkonů s bodovými hodnotami je vyšetření anti-tTG ELISA v jednom izotypu ohodnoceno 179 body.

Protilátky proti gliadinu (AGA) (4, 5)

Gliadin je v alkoholu rozpustná frakce glutenu, která je za určitých okolností schopna vyvolat abnormální imunitní odpověď střevního slizničního imunitního systému. Pacienti s celiakií často vykazují pozitivitu AGA v izotypu IgA i IgG, při léčbě bezlepkovou dietou titer těchto autoprotilátek klesá, může klesnout až pod hladinu detekovatelnosti. AGA se rutinně diagnostikují enzymovou imunoanalýzou (ELISA), a to obvykle paralelně v obou izotypech, protože AGA IgG je senzitivnější a AGA IgA specifitější pro diagnózu celiakie. AGA jsou při screeningu celiakie používány již čtvrt století. Nyní je však čím dál tím více zřejmé, že tento test má ve srovnání s anti-tTG své limity, zapříčiněné mj. pozitivitou AGA u řady jiných onemocnění střev, při alergiích nebo jiných imunopatologiích. Z našich výsledků vyplývají významně nižší hodnoty senzitivity i specifity AGA ve srovnání s anti-tTG. AGA lze použít jako první screeningový test při podezření na celiakii pouze ve dvou případech:

1. u dětí mladších 2 let, u kterých byla popsána nižší spolehlivost jiných screeningových testů a
2. u osob s IgA deficiencí (přičemž v těchto případech má význam pouze stanovení v IgG izotypu).

V seznamu zdravotních výkonů s bodovými hodnotami je vyšetření AGA ELISA v jednom izotypu ohodnoceno 179 body.

Protilátky proti endomysiu (EMA) (14, 17)

Tyto autoprotilátky jsou namířeny proti proteinové složce pojivové tkáně, která se nachází mezi myofibrilami stěny zažívacího ústrojí. Při dodržování bezlepkové diety je možný pokles množství EMA v séru. EMA jsou detekovány nepřímou imunofluorescencí (NIF) v izotypech IgA i IgG, antigenním substrátem je distální část primárního jícnu nebo lidský pupčík. Výsledek NIF testu je kvalitativní (pozitivní/negativní) nebo semikvantitativní (udává se nejvyšší titer séra, při kterém je nalezena pozitivní reakce). Senzitivita i specifita EMA je velmi vysoká. Stanovení EMA je ve srovnání s detekcí anti-tTG technicky i finančně náročnější (v sazebníku výkonů 227 bodů za jeden izotyp), test je vhodný ke konfirmaci pozitivních výsledků anti-tTG.

Protilátky proti retikulinu (ARA) (1, 2, 18)

Protilátky proti retikulinu jsou namířeny proti strukturálním komponentám kolagenu. Vyskytují se v 5 typech (R1, R2, Rs, R3 a R4), lišících se reaktivitou při imunofluorescenčním vyšetření na řezech krysích jater, ledvin a žaludku. Pouze typ R1 vykazuje asociaci s GSE. ARA byly populární především v 80. letech 20. století, v současné době následkem nízké senzitivity testu jejich využití klesá.

Závěr

Celiakie je velmi časté imunopatologické onemocnění. Podle evropských epidemiologických studií je incidence tohoto onemocnění asi 1:200 – 1:250, některé studie hovoří až o poměru 1:125 a v budoucnu nelze vyloučit vzestup incidence této nemoci (11, 15, 17). Z toho vyplývá potřebnost neinvazivních, rychlých a relativně nenáročných screeningových testů, které mohou pomoci spolehlivě vytýpat pacienty s podezřením na celiakii. V případě jednoznačných klinických příznaků celiakie je nezbytné odeslat nemocného k odbornému gastroenterologickému vyšetření, jehož součástí je enterobiopsie. U atypických příznaků, při podezření na monosymptomatickou formu celiakie, při vyšetřování rizikových skupin (například příbuzných pacientů s celiakií) nebo při screeningu běžné populace navrhuje při indikaci imunologických vyšetření tento postup (obrázek 3).

Seznam použitých zkratk

AGA – protilátky proti gliadinu
anti-tTG – protilátky proti tkáňové transglutamináze
EMA – protilátky proti endomysiu
ARA – protilátky proti retikulinu

Literatura

1. Alaedini A, Green PH. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med.* 2005 Feb 15; 142 (4): 289–298.
2. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: celiac sprue. *Gastroenterology* 2001; 120: 1522–1525.
3. Baldas V, Tommasini A, Trevisiol C, Berti I, Fasano A, Sblattero D, et al. Development of a novel rapid non-invasive screening test for coeliac disease. *Gut* 2000; 47: 628–631.
4. Catassi C, Fabiani E, Gasparin M, Troncone R. Quantitative antigliadin antibody measurement in clinical practice; an Italian multicentre study. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 366–370.
5. Catassi C. New developments in childhood celiac disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2002 Jun; 4 (3): 238–243.
6. Dieterich W, Ehris 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.
7. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 1317–1321.
8. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*; 2001: 120: 636–651.
9. Holmes GKT, Catassi C. *Coeliac disease*. Oxford (UK): Health Press- Fast Facts, 2000.
10. Janatková I, Malíčková K, Fučíková T, Kožnarová R, Macurová H. Diagnostický přínos stanovení autoprotilátek u gluten-senzitivní enteropatie. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 51, 2002; 3: 125–130.
11. Kocna P, Vanickova Z, Perusicova J, Dvorak M. Tissue transglutaminase-serology markers for coeliac disease. *Clin Chem Lab Med.* 2002 May; 40 (5): 485–492.
12. Koop I, Ilchmann R, Izzi, Adragna A, Koop H, Barthelmes H. Detection of autoantibodies against tissue transglutaminase in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2009–2014.
13. Leon F, R-Pena R, Camarero C, Sanchez L, Eiras P, Del Amo A, et al. Limitations of anti-guinea pig liver transglutaminase IgA screening of celiac disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 586–587.
14. Rostami K, Kerckhaert J, Tiemessen R, von Blomberg BM, Meijer JW, Mulder C. Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated coeliac disease: disappointing in clinical practice. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 888–894.
15. Schuppan D. Current Concepts of Celiac Disease Pathogenesis. *Gastroenterology* 2000 Jul; 119 (1): 234–242.
16. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabo IR, Samesio A, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 1322–1328.
17. Vančíková Z, Chlumecký V, Dokol D, Horáková D, et al: The serologic screening for celiac disease in the general population (blood donors) and in some high-risk groups of adults (patients with autoimmune diseases, osteoporosis and infertility) in the Czech republic. *Folia Microbiol.* 2002; 47 (6): 753–758.
18. Volta U, Molinaro M, de Franceschi L, Fratangelo D, Bianchi FB. IgA antiendomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. Save both money and monkeys. *Dig Dis Sci.* 1995; 40: 1902–1905.
19. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909–911.
20. Xarchas KC, Tsolakidis GF. Galen: author of the first flatfoot description. *J Am Pediatr Med Assoc.* 2004 Sep-Oct; 94 (5): 508–509.