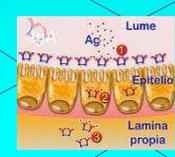


“ La Malattia Celiaca tecniche diagnostiche e molecolari ”

Tecniche diagnostiche di primo livello

Liliana Traina Farina  
**Laboratorio Uditore**  
**Gruppo Uditore - Consud**



# MALATTIA CELIACA



- INTOLLERANZA PERMANENTE AL GLUTINE GENETICAMENTE DETERMINATA

# LA MALATTIA CELIACA

- E' un prototipo di malattia autoimmune in cui sono noti :
- Il fattore scatenante Glutine **fattore ambientale**
- Alcuni dei geni responsabili HLA II DQ2 – DQ8 **predisposizione genetica**
- L'autoantigene coinvolto **Transglutaminasi tessutale**

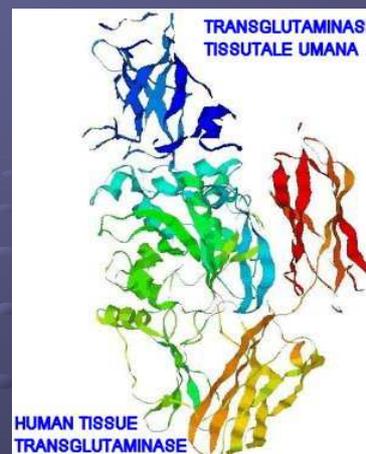
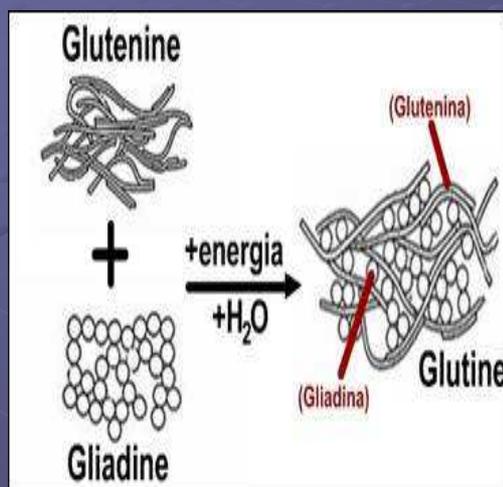
## AUTOIMMUNITA'

E' stato dimostrato che gli **EMA** sono diretti contro la **Transglutaminasi Tissutale umana**.

Questo enzima è coinvolto nelle funzioni riparative e nell'apoptosi cellulare e si presume che funga da **Auto Antigene** nella malattia celiaca.

La **Gliadina**, dopo l'aggancio alla **TG**, implica una risposta specifica anticorpale contro la **TG** modificandone la struttura e creando nuovi epitopi.

Si creano così le condizioni di una vera malattia autoimmune dove è nota la predisposizione genetica (**HLA**), dove il **Glutine** rappresenta il trigger esogeno e dove la **TTG** rappresenta l'autoantigene.



## Perché è importante fare diagnosi precoce

Una mancata diagnosi oppure una diagnosi tardiva espongono i pazienti al rischio di sviluppare patologie autoimmuni a carico:

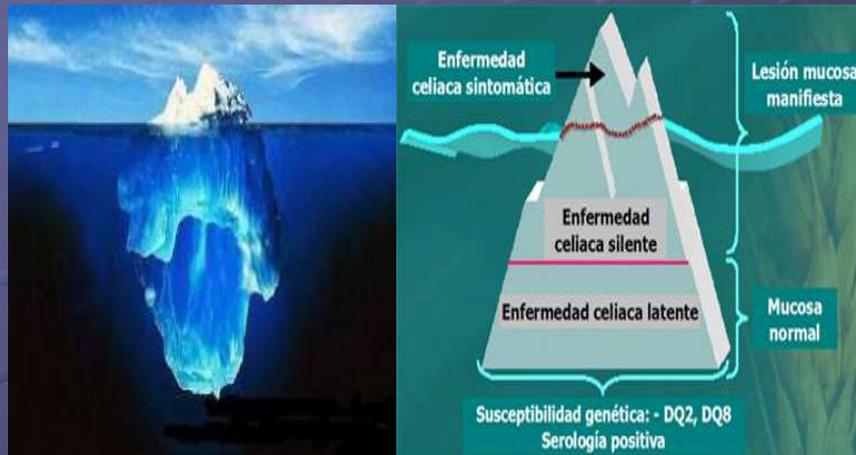
- Del sistema nervoso centrale e periferico -
- Dell'apparato cardiocircolatorio -
- Del sistema endocrino -
- Del fegato -
- Della cute -

## AZIONE DELLA tTG apoptosi



## QUADRI CLINICI

LA PARTE SOMMERSA DELL'ICESBERG  
DEI CELIACI E' MAGGIORE DELLA  
PARTE CLINICAMENTE EMERGENTE



## PRIMO PROTOCOLLO DIAGNOSTICO

- I vecchi criteri diagnostici formulati dal 'ESPGHAN' (Società Europea di Gastroenterologia Epatologia e Nutrizione Pediatrica) nel 1970 prevedevano

l'esecuzione di tre biopsie intestinali:

- - a dieta libera;
- - a dieta priva di glutine;
- - dopo riesposizione al glutine.

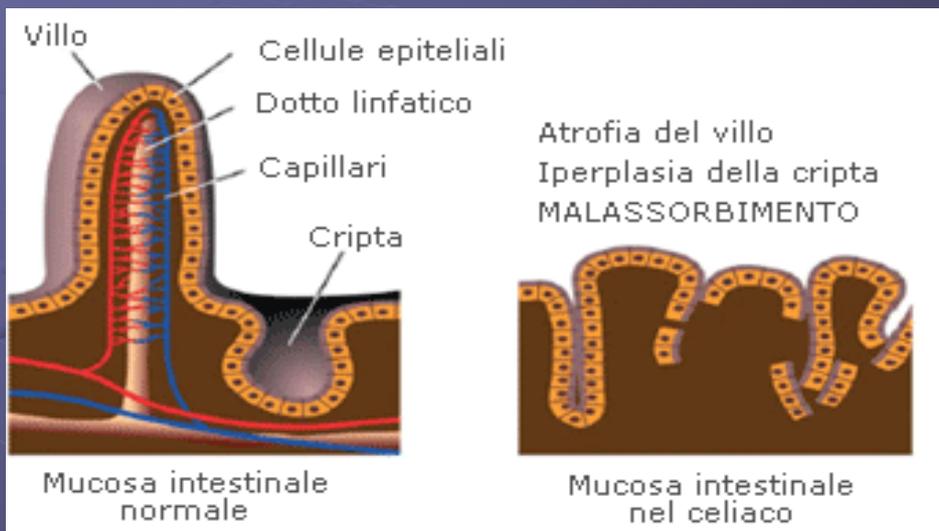
Tali biopsie avevano lo scopo di confermare la glutine - dipendenza di:

- - lesioni intestinali;
- - sintomatologia clinica.

## CELIACA EUROPEAN SOCIETY FOR PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION

- 1 Biopsia del piccolo intestino che evidenzia alterazione intestinale (atrofia dei villi: lesione di tipo 3 e 4).
- 2 Remissione clinica dopo dieta priva di glutine, verificata con seconda biopsia.
- 3 Se non certa (risultato equivoco), lo stimolo con glutine seguita da una terza biopsia (atrofia dei villi)

## MUCOSA INTESTINALE



# IL LABORATORIO NELLA MALATTIA CELIACA

## TEST SIEROLOGICI



## ALTERAZIONI EMATOLOGICHE E BIOCHIMICHE

- **Alterazioni dell'emocromo:**  
Linfocitopenia, MCV (aumentato o ridotto), RDW (di solito aumentato)
- **Alterazioni biochimiche:**  
**Diminuzione di:** Ferro, Ferritina, Calcio, Fosforo, IgA, A.Folico, Vit. B12, Albumina, Colesterolo
- **Aumento di:** Transaminasi, Fosfatasi Alcalina, PT, PTH

## MARCATORI SIEROLOGICI

- A partire dagli anni 80, con la comparsa dei primi marcatori sierologici, il laboratorio è diventato componente fondamentale del percorso diagnostico della malattia celiaca
- La corretta diagnosi però non può che essere la risultante della necessaria interazione tra clinico e laboratorista.
- Quest'ultimo supporterà il collega ricercando i marcatori sierologici più specifici e sensibili

## TEST SIEROLOGICI SENSIBILITA' - SPECIFICITA'

- **SENSIBILITA'**: capacità del test di individuare i **PAZIENTI VERAMENTE MALATI** indica la percentuale di pazienti malati positivi al test.
- **VERI POSITIVI AL TEST = TUTTI MALATI**
- **SPECIFICITA'**: capacità del test di individuare i **PAZIENTI VERAMENTE SENZA MALATTIA** indica la percentuale di persone sane negative al test
- **VERI NEGATIVI AL TEST = SANI**

## TEST SIEROLOGICI ANTICORPALI

- Anticorpi anti Gliadina (AGA)
- Anticorpi anti Endomisio (EMA)
- Anticorpi anti Transglutaminasi (tTG)



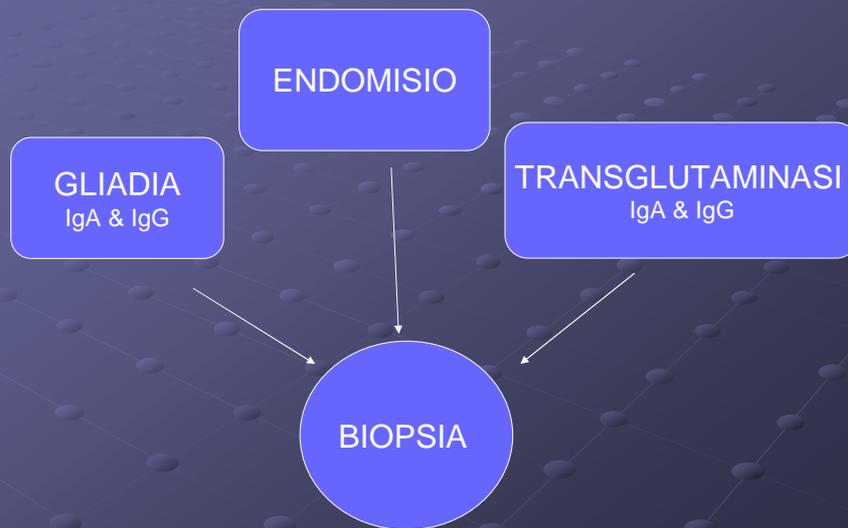
## PROTOCOLLO DI DIAGNOSI Ministero della Salute Lg. 123/05

TEST DI PRIMO  
LIVELLO

TEST DI SECONDO  
LIVELLO

- TEST ANTICORPALI
- TEST GENETICO
- BIOPSIA  
DUODENALE

## TEST DI PRIMO LIVELLO



## DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

- L'iter diagnostico della MC ha subito diversi stravolgimenti nel corso del tempo, soprattutto in relazione all'avvento della sierologia, ma essenziale ai fini di una diagnosi definitiva il **"gold standard"** rimane sempre la **biopsia intestinale**.
- Essa permette di rilevare le tipiche alterazioni istopatologiche della mucosa dell'intestino tenue rappresentate da:
  - a) totale o parziale atrofia dei villi con perdita dell'orletto a spazzola;
  - b) ipertrofia delle cripte;
  - c) infiltrato intraepiteliale;

## CLASSIFICAZIONE DI ISTOLOGICA MARSH- OBERHUBER

Fig. 2

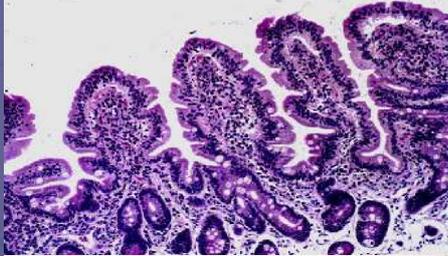


Fig. 3

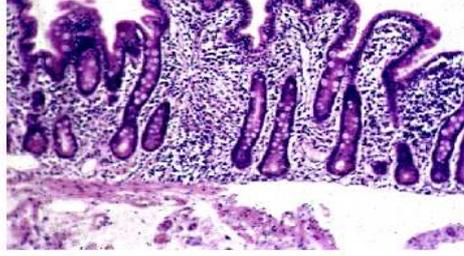
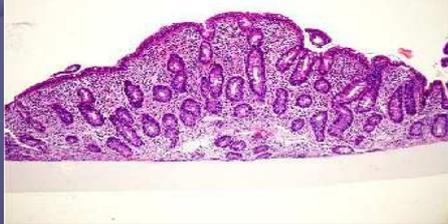


Fig. 4



Lesioni di tipo atrofico con iperplasia delle cripte ed aumento dei LIE

(classificazione di Marsh-Oberhuber):

Fig. 2: atrofia lieve dei villi intestinali (tipo 3a)

Fig. 3: atrofia dei villi di grado moderato (tipo 3b)

Fig. 4: atrofia dei villi di grado severo (subtotale)

(tipo 3c)

(colorazione ematossilina eosina x20)

(Fig. 2, 3, 4: cortesia del Dr Vincenzo Villanacci, Consulente Anatomopatologo AIC)



## TECNICHE DIAGNOSTICHE

- Dal 1960 vengono introdotte nelle tecniche di laboratorio gli **IMMUNODOSAGGI**
- Radioimmunologia (RIA)
- Immunofluorescenza indiretta (IFA)
- Immunoenzimatica (ELISA)
- .....

# TECNICHE DIAGNOSTICHE

## TEST SEROLOGICO

- ANTIGLIADINA AGA IgA IgG (1967- 1970) (Dike 1950)
- ANTIENDOMISIO EMA (1983 Chorzelski)
- ANTITRANSGlutAMINASI tTG IgA IgG (1997 W. Dieterick)

## METODO ANALITICO

- ELISA
- IFA
- ELISA

# COSTITUENTI E CARATTERISTICHE DEGLI IMMUNODOSAGGI

## COMPONENTI

- ANTICORPI POLICLONALI
- ANTICORPI MONOCLONALI
- ANTIGENE (ANALITA DA MISURARE ANALITA MARCATO)
- MARCATORI (ENZIMI FLUOROFORI CHEMILUMINESCENTI)
- CALBRATORI

## CARATTERISTICHE

- SPECIFICITA'
- SENSIBILITA' ANALITICA
- SENSIBILITA' FUNZIONALE
- PRECISIONE
- ACCURATEZZA

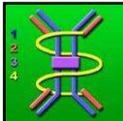
# TECNICHE IMMUNODOSAGGIO

## IFA

- Siero + substrato specifico
- Anti globulina umana marcata con isotiocianato di fluoresceina

## ELISA

- Siero + substrato specifico = Complesso Ag-Ab
- + Immunoglobuline anti-Ig coniugate con Enzima (HPR) = Ag-Ab-Antilg
- TMB substrato specifico per HPR
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> STOP



## IGA

- CLASSE IMMUNOGLOBULINICA CHE CORRISPONDE AL 20% DELLE IMMUNOGLOBULINE CIRCOLANTI
- ANTICORPI DELLA, COSIDDETTA, IMMUNITA' LOCALE, PRESENTI NELLE SECREZIONI E SULLE SUPERFICI MUCOSE
- RUOLO DI "VERNICE PROTETTIVA" DELLE SUPERFICI MUCOSE

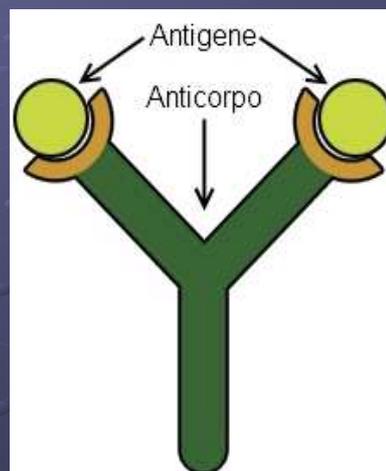
## IMMUNODOSAGGIO ANTIGENE - ANTICORPO

**Antigene Ag** → qualsiasi sostanza capace, dopo essere penetrata nei tessuti di un vertebrato superiore, di indurre una specifica risposta di difesa immunitaria.

**Anticorpo Ab** → proteine sintetizzate dai linfociti B indotta dall'introduzione nell'organismo di sostanze estranee o antigeniche

## IMMUNODOSAGGIO

- L'unione che si instaura tra un antigene ed il corrispondente anticorpo porta alla formazione di quello che viene definito **IMMUNOCOMPLESSO**. Tale unione è altamente specifica ed è regolata da forze di tipo chimico-fisico (legami di natura non covalente) che agiscono tra i determinanti dell'antigene e dell'anticorpo.



## COSTITUENTI DEGLI IMMUNODOSAGGI

### ANTIGENE è:

- L'analita da misurare
- Il calibratore
- L'analita marcato che comprende l'analita da dosare
- La molecola utilizzata per produrre gli anticorpi

### ● REATTIVO

### ANTICORPALE

### ● CURVA STANDARD

### ● TRACCIANTE è

- Il costituente che segnala la reazione antigene-anticorpo grazie a un suo legame con marcatore:

### ● ENZIMA (ELISA)

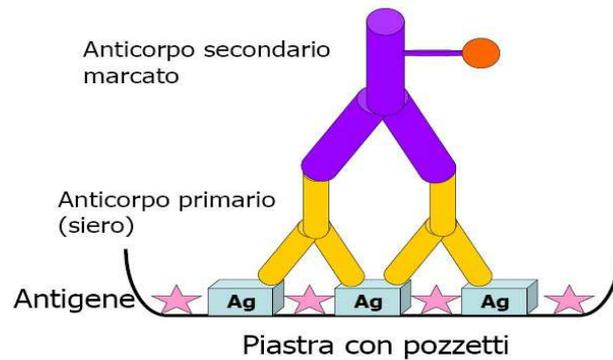
### ● FLUOROFORO (IFA)

## ANTICORPI ANTI GLIADINA IgA-IgG PRIMO MARCHER SIEROLOGICO

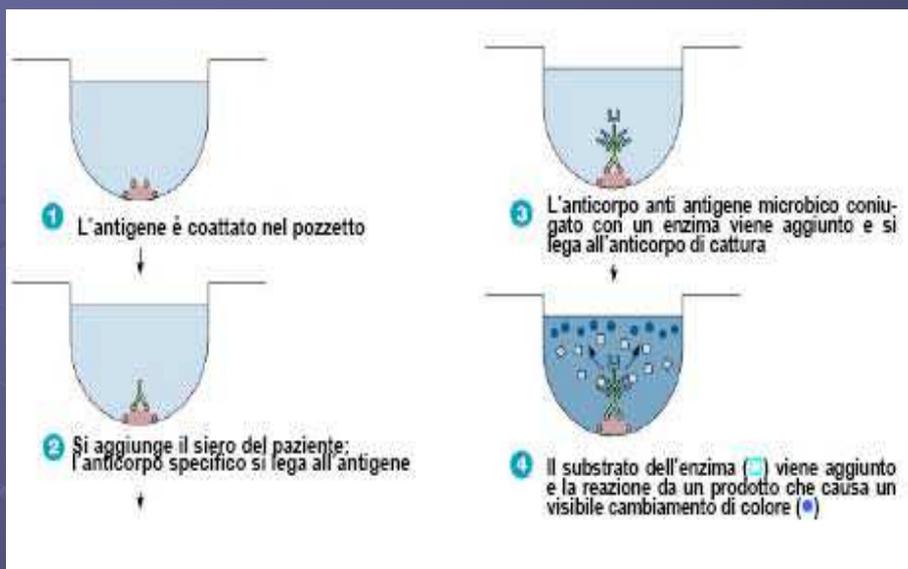
- La gliadina è una frazione del glutine (frazione alcol solubile)
- I celiaci presentano anticorpi circolanti di classe IgA-IgG
- Un tempo esame di elezione per la diagnosi di celiachia ora
- passato di seconda scelta.
- In quanto risultati essere positivi anche in altre patologie
- BASSA SENSIBILITA' 70-90% E SPECIFICITA' 82-92% (1950 DIKE)
- CROHN'
- COLITE ULCEROSA
- ARTRITE REUMATOIDE
- GASTRITE
- SINDROME DI DOWN
- FIBROSI CISTICA
- PSORIASI
- .....ED ANCHE NEI SOGGETTI SANI

# TECNICHE DIAGNOSTICHE

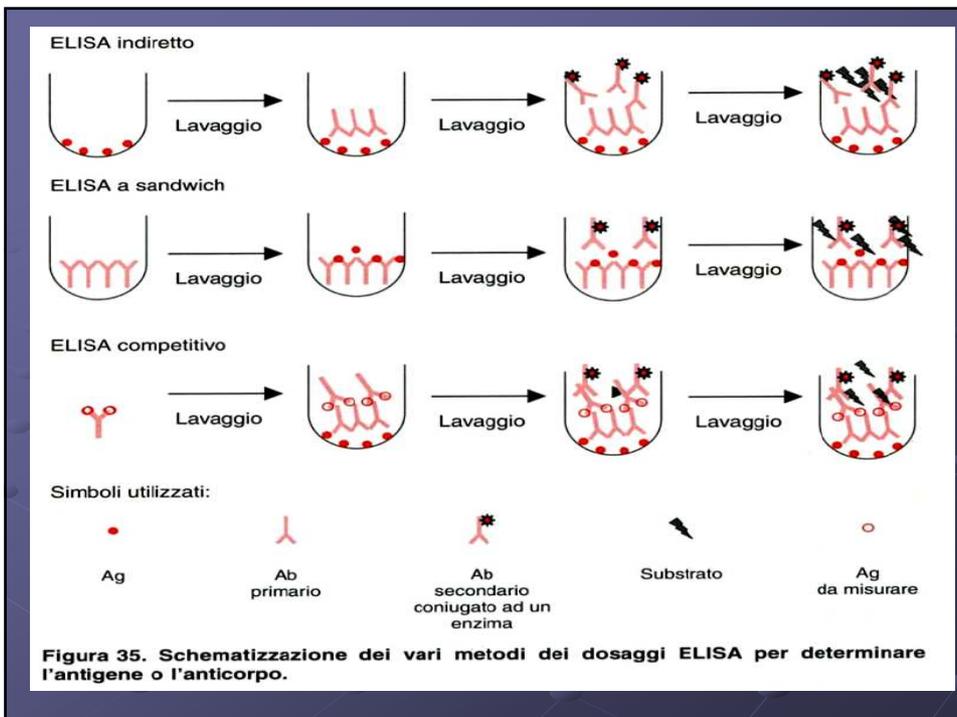
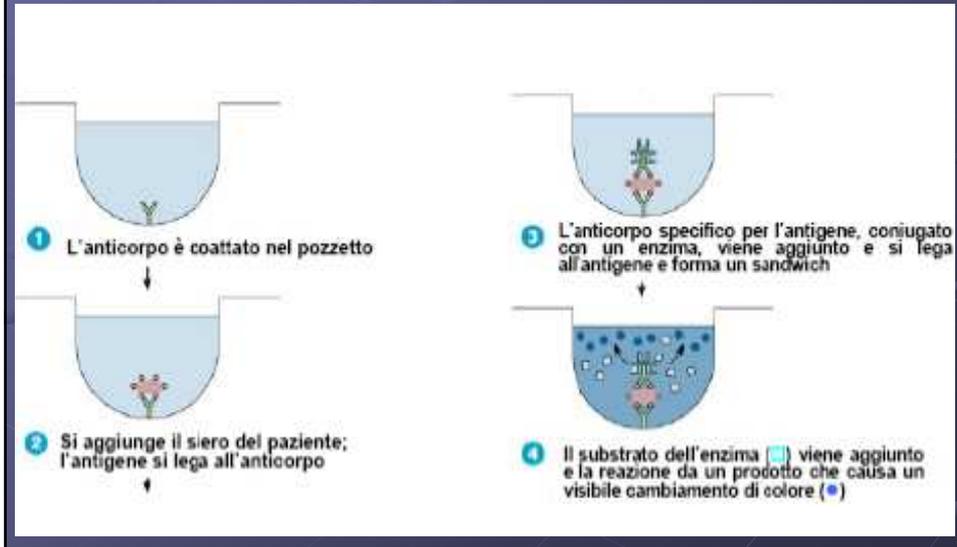
## ELISA



## ELISA DIRETTO



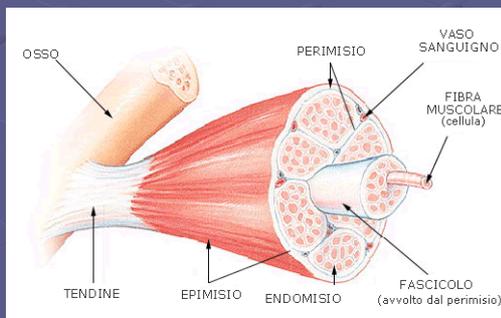
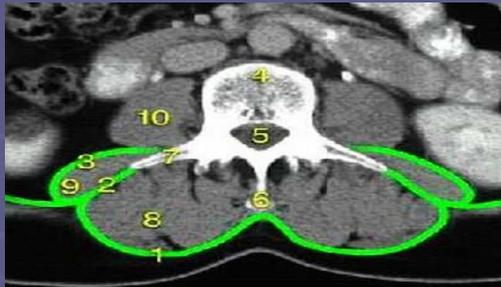
# ELISA INDIRECTO



## ANTICORPI ANTI ENDOMISIO EMA

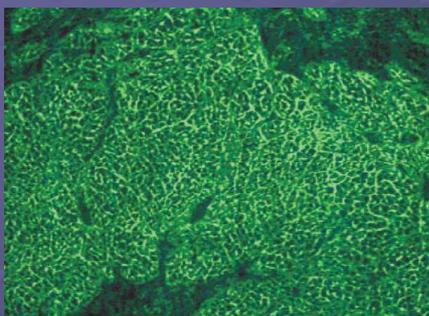
- Anticorpi anti Endomisio (EMA)
- Sono autoanticorpi
- diretti verso l'endomisio della muscolatura liscia.
- Per endomisio si intende il delicato rivestimento di fibre reticolari che circonda ciascuna cellula muscolare liscia
- Gli EMA di classe IgA sono presenti nella quasi totalità dei soggetti con celiachia florida.
- La loro produzione viene scatenata dal glutine ed il suo allontanamento dalla dieta provoca la normalizzazione del quadro sierologico dopo circa sei mesi (4-12).
- Nei celiaci con deficit selettivo delle IgA, vi sono solo EMA di classe IgG.
- Gli EMA IgA possono essere assenti nei celiaci con età inferiore ai due anni.
- (1983 CHORZEISKI)

## ANATOMIA FIBRE MUSCOLARI



- L'ENDOMISIO E' L'INVOLUCRO CHE RIVESTE LA SINGOLA CELLULA

## Come si evidenziano gli EMA

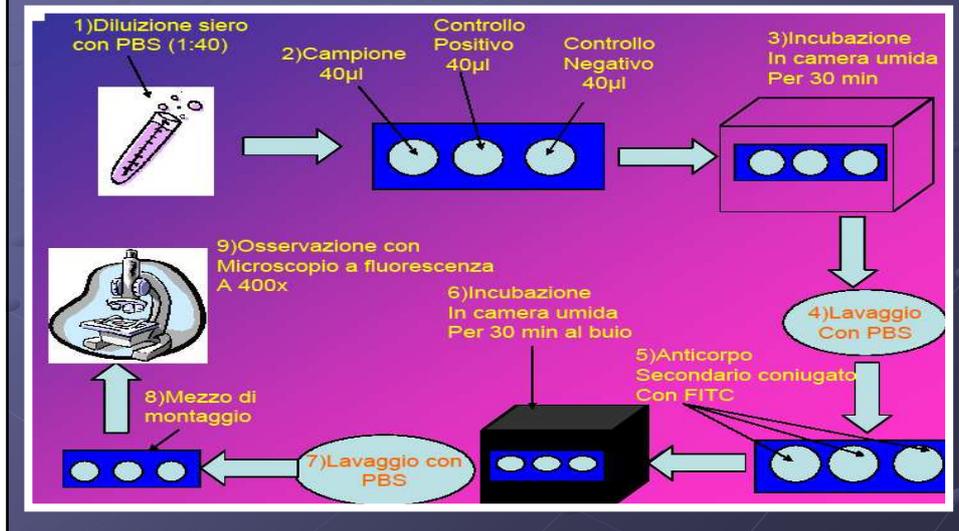


- mediante una tecnica di immunofluorescenza indiretta
- usando come substrato, contenente l'antigene specifico,
- sezioni criostatiche di muscolatura liscia di esofago o digiuno o l'utero di primate, oppure rene e stomaco di topo o ancora cordone ombelicale umano.
- Nei soggetti con deficit selettivo di IgA troviamo solo IgG1

## IMMUNOFLORESCENZA

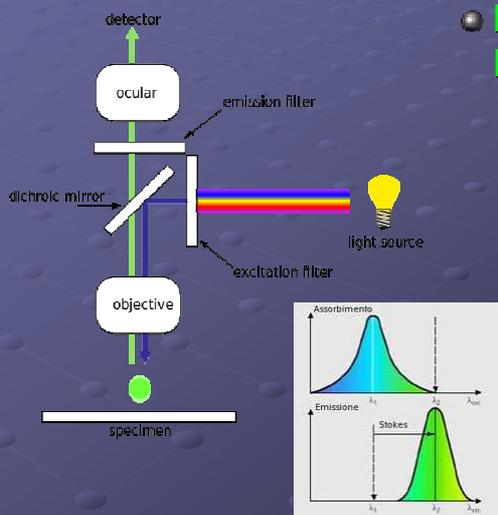
- E' possibile rendere visibile una reazione **ANTIGENE-ANTICORPO** marcando uno dei reagenti con sostanze chiamate **FLUOROCROMI** (fluoresceina, rodamina) che hanno la capacità di emettere fluorescenza se osservate con un microscopio a luce ultravioletta. La tecnica è applicabile a sezioni di tessuto

# METODICA IMMUNOFLORESCENZA INDIRETTA



# IMMUNOFLORESCENZA

## MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

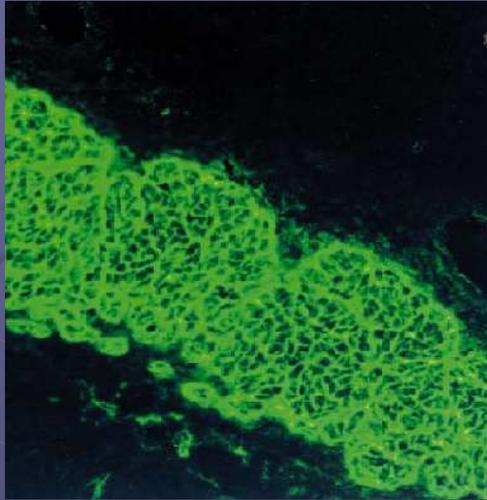


**Diapositiva 39**

---

**MSOffice1** ; 21/05/2011

## ANTICORPI AN-TENDOMISIO



- Diretti contro la matrice del collagene  
Che fascia il muscolo liscio dei primati (endomysio)

## TRANSGLUTAMINASI TISSUTALE tTG

La transglutaminasi tissutale è l'antigene responsabile della positività endomisiale: questa scoperta ha aperto nuovi orizzonti per la diagnosi sierologica della malattia celiaca. La determinazione degli anticorpi anti-tTG è oggi il test di riferimento per la diagnosi ed il follow up di questa patologia.

(1997 W.DIETERCH)

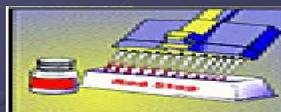
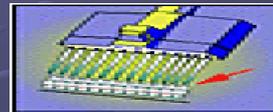
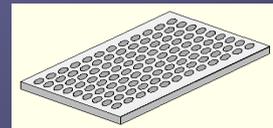


# METODICA tranglutaminalasi

- Dosaggio immunoenzimatico sandwich.
- L'enzima transglutaminasi tessutale ricombinante umana è legato ai pozzetti per microtitolazione.
- Gli anticorpi specifici per tale antigene presenti nel siero del paziente si legano all'antigene stesso.
- Gli anticorpi non specifici vengono allontanati mediante lavaggio.
- Si aggiungono quindi anticorpi di capra anti-IgA umane marcati con perossidasi di rafano che si legano agli anticorpi rimasti adesi al fondo del pozzetto.
- Il coniugato in eccesso viene allontanato per lavaggio.
- Si aggiunge poi un substrato colorimetrico.
- Dopo un'ulteriore incubazione, si aggiunge la soluzione di stop e si misura il valore di D.O. 405 con apposito lettore di micropiastre.



## PROCEDURA TEST ELISA



## TTG - EMA

- L'ambito di utilizzo degli anti-TTG è simile a quello degli EMA, alta sensibilità 95-100% e specificità 98-99% , con il vantaggio di una procedura ELISA
- automatizzata, non operatore dipendente.
- il test di "prima generazione" utilizza come antigene la TTG di guinea pig – elevato numero di falsi positivi –
- il test "di seconda generazione" che impiega quale antigene invece la TTG umana o ricombinante umana sembrerebbe decisamente superiore rispetto al primo
- Metodica laboriosa
- Interpretazione soggettiva
- Utilizzo di substrati ottenuti da specie protette
- Metodica semiquantitativa
- Metodica qualitativa
- Elementi critici della procedura
- ALTA SENSIBILITA' 98-100%
- ALTA SPECIFICITA' 97%-100%

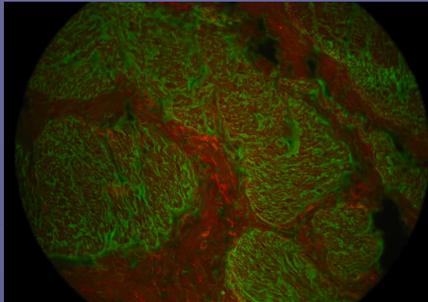
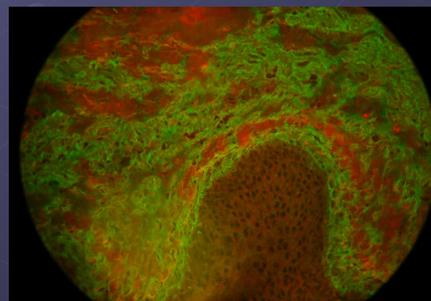
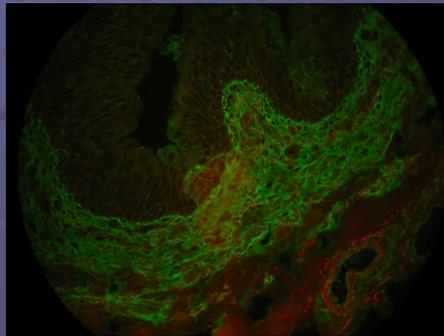
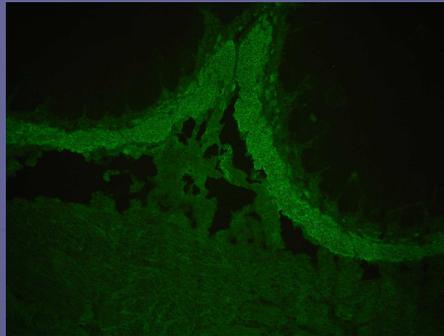


Foto di EMA effettuate con il microscopio a fluorescenza. l'artefatto è dato dal colore rosso



## Anticorpi anti endomisio

Foto Laboratorio Uditore



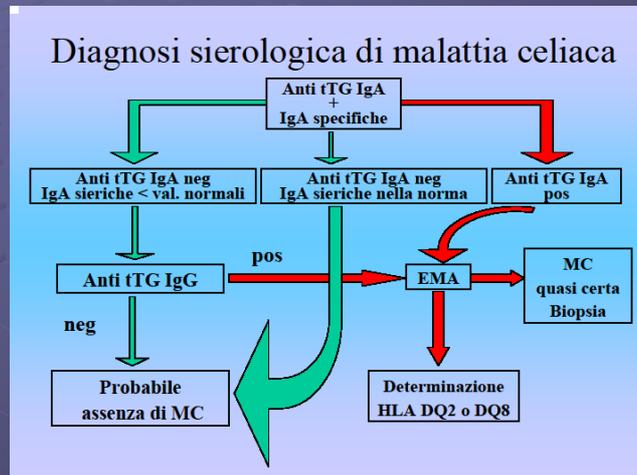
## Confronto fra anti-tTG ed EmA

- Sensibilità → anti-tTG > EmA
- Specificità → anti-tTG < EmA
- Riproducibilità → anti-TG > EmA
- Disponib. Substr. → anti-TG > EmA
- Sempl. tecnica → anti-TG > EmA

Nel complesso, anti-tTG è il test di  
prima scelta



# ALGORITMO MALATTIA CELIACA



## CONCLUSIONI

- **Premessa: nessun anticorpo pone diagnosi di celiachia senza la conferma della biopsia intestinale che certifichi la patologia**
- **MA**
- **CERTEZZE DELLA SIEROLOGIA A SUPPORTO DELLA DIAGNOSI**
- **EMA IgA** sono specifici al 100% per celiachia con 100% PPV. Titoli >1/40
- correlano con severità danno di mucosa, titoli 1/5 sono spesso espressione di celiachia potenziale
- **TTG IgA** positivi ad alto titolo (> 10 volte cut off) sono sempre espressione di celiachia, (vale, per i soggetti TTG IgA negativi, il discorso di verificare il dosaggio delle IgA totali)
- La positività per gli ab di classe IgG (TTG,EMA,AGA) è altamente predittiva nei pazienti affetti da deficit selettivo di IgA)
- **AGA IgA** in bambini di età inferiore ai 2 anni sono fortemente indicativi di celiachia anche in assenza di EMA/TTG



GRAZIE  
*e . . . . à la prochaine*