

La rilevazione degli autoanticorpi specifici per il complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina: un nuovo modo per esplorare l'iceberg celiaco?

R. Tozzoli^a, G. Kodermaz^a, M. Tampoia^b, D. Visentini^c, E. Tonutti^c, N. Bizzaro^d

^aLaboratorio Analisi Chimico-cliniche, Ospedale Civile, Latisana (UD)

^bLaboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Bari

^cImmunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine

^dLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, Tolmezzo (UD)

Riassunto

Premesse. L'identificazione di pazienti affetti da celiachia con manifestazioni cliniche atipiche e di quelli con la forma silente o potenziale rappresenta uno dei principali obiettivi della sanità pubblica, dato che almeno l'80% di questi individui rimane non diagnosticato. Nuove acquisizioni patogenetiche della malattia evidenziano un importante ruolo del complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina, in grado di evocare la produzione di autoanticorpi specifici rivolti contro neoepitopi del complesso oltre che contro i peptidi di gliadina e la transglutaminasi tissutale, marcatori diagnostici consolidati della malattia. Gli anticorpi rivolti verso i neoepitopi del complesso sembrano importanti nella storia naturale della celiachia.

Scopi di questo studio sono stati: a) la valutazione delle caratteristiche analitiche di un nuovo metodo immunoenzimatico che utilizza, come fase solida, il complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina; b) studiare la sensibilità diagnostica del nuovo metodo in soggetti sani o affetti da malattie infettive e in un gruppo di pazienti celiaci, e c) studiare la frequenza di positività degli autoanticorpi in soggetti affetti da altre malattie autoimmuni sistemiche o organo-specifiche considerati gruppo a rischio di celiachia e in soggetti con diverse patologie infettive.

Materiali e metodi. Sono stati studiati 738 pazienti, tra cui 120 soggetti sani, 41 affetti da celiachia,

471 affetti da malattie autoimmuni diverse dalla celiachia e 106 affetti da malattie infettive. Gli autoanticorpi specifici della celiachia di classe IgA sono stati rilevati mediante un nuovo metodo immunoenzimatico, che impiega come autoantigene adeso alla fase solida il complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina (AeskuLISA tTG-A New Generation, Aesku. Diagnostics, Wendelsheim, Germania, distribuito in Italia da Grifols Diagnostici, Ghezzano, Pi). I risultati sono stati confrontati con test consolidati per la identificazione di anticorpi anti-transglutaminasi IgA, anti-endomisio IgA e anti-peptidi deamidati della gliadina IgA e IgG.

Risultati. I risultati dello studio evidenziano: a) elevata accuratezza analitica del metodo in studio, b) sensibilità (95%) e specificità (97%) diagnostiche paragonabili, se non superiori a quella dei metodi consolidati, e c) la capacità di individuare la presenza di forme di celiachia classiche e non nei pazienti affetti da altre malattie autoimmuni (2,8% dei casi).

Conclusioni. Il nuovo metodo costituisce un nuovo approccio allo screening e alla diagnosi dei pazienti celiaci, potenzialmente in grado di modificare il consolidato percorso diagnostico della malattia. Resta tuttavia al momento irrisolto il caso di alcuni pazienti che presentano i soli anticorpi anti-complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina, di ancora non chiaro significato fisiopatologico e clinico.

Summary

Detection of autoantibodies specific for transglutaminase-gliadin peptides complex: a new way to explore the celiac iceberg?

Background. Identifying patients affected by celiac disease who have atypical clinical manifestations, or have silent or potential forms, represents one of the main objectives of the public health system, given that at least 80% of these individuals remain undiagnosed. New discoveries in the pathogenesis of the disease point to an important role of the gliadin-transglutaminase complex which is able to evoke the production of specific antibodies against neopeptides of the complex as well as against gliadin peptides and tissue transglutaminase, which are the consolidated diagnostic markers of the disease. The aims of this study were: (a) to evaluate the analytical characteristics of a new immunoenzymatic method which utilizes the transglutaminase-gliadin peptides complex as solid phase; (b) to study the diagnostic sensitivity of the new method in healthy subjects and subjects affected by infectious diseases along with a group of celiac patients; and (c) to study the positivity frequency of autoantibodies in subjects affected by other systemic or organ-specific auto-immune diseases - which are considered groups at risk for celiac disease - and in subjects with various infectious pathologies.

Materials and Methods. A total of 739 patients were stu-

died, including 120 healthy subjects, 41 affected by celiac disease, 471 affected by autoimmune diseases other than celiac disease, and 106 subjects affected by infectious diseases. IgA-class celiac-specific autoantibodies were detected using a new immunoenzymatic method, which uses the transglutaminase-gliadin peptides complex as the autoantigen coated to the solid phase (Aesku). The results were compared with consolidated tests for identifying IgA anti-transglutaminase antibodies, IgA anti-endomysium antibodies, and IgA - and IgG-class anti-deaminated gliadin peptides.

Results. The results of the study show: (a) greater analytic accuracy using the method being studied; (b) diagnostic sensitivity (95%) and specificity (97%) comparable to - if not greater than - those of the consolidated methods; and (c) the ability to detect the presence of both classic and non-classic forms of celiac disease in patients affected by other autoimmune diseases (2.8% of our cases).

Conclusions. The new method constitutes a new approach to screen and diagnose celiac patients, potentially able to modify the diagnostic course for the disease. Nevertheless, the physiopathological and clinical significance remains unclear in the case of some patients who present only antibodies against transglutaminase-gliadin peptide complex.

Key-words: Celiac disease, autoimmune iceberg, transglutaminase-gliadin peptides complex, diagnostic accuracy.

Introduzione

La celiachia (MC) è un'enteropatia cronica causata da una reazione infiammatoria T cellulare nei confronti del glutine in soggetti predisposti e caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi specifici e da alterazioni istologiche della mucosa intestinale¹.

La MC è ormai considerata patologia frequente, anche se spesso sotto diagnosticata: vi è ormai unanime consenso nel ritenere la sua prevalenza nella razza caucasica compresa tra 0.5% e 1%, sia negli adulti che nei bambini. Considerando una prevalenza dello 0.5%, si possono stimare circa 2.5 milioni di pazienti celiaci in Europa, l'80-90% dei quali non riconosciuti, a causa della variabile presentazione clinica della patologia². Tale situazione epidemiologica è nota come iceberg celiaco, concetto che indica la presenza di un piccolo numero di pazienti affetti dalla forma classica, clinicamente manifesta, e di un elevato numero di pazienti con malattia atipica, silente o potenziale, nei quali i sintomi sono sfumati (spesso extraintestinali) o assenti e sono invece sempre presenti gli autoanticorpi specifici^{1,3}.

Negli ultimi anni numerosi studi epidemiologici hanno suggerito l'opportunità di effettuare screening di popolazione 'in toto' o di gruppi a rischio, mediante l'impiego di test sierologici sensibili e specifici⁴ con l'obiettivo di esplorare la profondità dell'iceberg⁵. I

principali gruppi a rischio di sviluppare MC sono considerati: i parenti di primo grado dei soggetti celiaci, i soggetti affetti da malattie autoimmuni sistemiche e organo-specifiche, da sindromi genetiche e da deficit di IgA. In questi individui la prevalenza di MC è compresa mediamente attorno al 10%, con oscillazioni tra il 3% e il 16%¹.

La patogenesi della malattia è legata all'alterazione della permeabilità della barriera intestinale, per *up-regulation* della zonulina⁶, al passaggio transmucosale di peptidi gliadinici resistenti alla digestione intestinale⁷ e alla loro processazione a livello della lamina propria da parte della transglutaminasi tissutale (tTG), mediante deamidazione e transamidazione⁸. Il primo processo avviene nel sito attivo dell'enzima e produce peptidi deamidati di gliadina (DGP), il secondo processo avviene al di fuori del sito attivo e determina la formazione del complesso tra tTG e DGP legate con legami covalenti (CTPD). Il processo di deamidazione aumenta l'affinità dei peptidi gliadinici per le molecole HLA delle cellule presentanti l'antigene con attivazione dei linfociti T citotossici intraepiteliali⁹⁻¹¹ e successivo danno a carico degli enterociti^{1,7}. Il complesso HLA-DQ/gliadina/tTG induce inoltre una risposta dei linfociti B con produzione di anticorpi rivolti contro i DGP e la tTG^{1,7}.

La rilevazione di autoanticorpi specifici per la transglutaminasi (tTGAb) e di anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina (DGPAb) rappresenta uno strumento diagnostico fondamentale per la MC⁴. I metodi recenti per il dosaggio degli isotipi IgA e IgG dei DGPAb e tTGAb, in variabile associazione a seconda dell'età del paziente^{1,4}, sono in grado di individuare, con accuratezza diagnostica oscillante tra 95% e 100%, i soggetti affetti dalla malattia anche in forma silente o potenziale⁴.

Molto si discute sull'intimo meccanismo patogenetico che porta alla formazione dei tTGAb, dato che i peptidi deamidati della gliadina sembrano essere gli autoantigeni scatenanti l'intolleranza al glutine. In particolare non è noto se i tTGAb di classe IgA, pur strettamente associati allo sviluppo dell'enteropatia, siano causa o conseguenza del coinvolgimento intestinale¹². Secondo il modello dell'aptene-trasportatore¹³, il complesso rappresenta l'autoantigene fisiologico in grado di indurre l'attacco autoimmune nella MC: gli autoanticorpi specifici verso epitopi del complesso (CTPDAb) si formerebbero per primi nella storia naturale della malattia, seguiti dai DGPAb. I tTGAb si formerebbero per ultimi per fenomeni di mimetismo molecolare ed estensione epitopica¹⁴. In base a questa ipotesi, i CTPDAb rappresentano gli autoanticorpi presenti durante tutta la storia naturale della MC; in alcune fasi essi possono essere anche i soli autoanticorpi presenti.

Del tutto recentemente un nuovo metodo immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione contemporanea degli anticorpi anti-tTG e anti-DGP è stato reso disponibile. Il metodo si basa su una fase solida costituita dal complesso CTPD e si propone di evidenziare tutti i tipi di anticorpi che si generano durante la formazione di questo complesso (DGPAb, tTGAb, CTPDAb), mimando il fenomeno fisiopatologico che si genera nella lamina propria della mucosa intestinale, a livello extracellulare.

Scopo del presente studio è stata la valutazione di

questo nuovo metodo in un vasto gruppo di soggetti a rischio di o affetti da MC, con lo scopo di esplorare in modo più completo l'iceberg celiaco mediante uno studio retrospettivo, e di confrontare i risultati ottenuti nei soggetti celiaci con i test consolidati.

Materiali e metodi

Sono stati studiati retrospettivamente 738 pazienti, 471 affetti da malattie autoimmuni diverse dalla celiachia e considerati quali gruppo a rischio (età mediana 49 anni, range 7-95), 120 soggetti sani (SS), con età mediana di 40 anni (range 20-70) selezionati sulla base di assenza di sintomatologia clinica, in particolare gastrointestinale, 106 affetti da malattie infettive (MI) con età mediana di 45 anni (range 20-81) e 41 affetti da MC a dieta libera, con età mediana di 33 anni (range 2-60) (Tab. I).

Gli autoanticorpi specifici della celiachia di classe IgA sono stati rilevati mediante un metodo ELISA, che impiega come autoantigene adeso alla fase solida il CTPD (Aeskulisa tTG-A New Generation, Aesku. Diagnostics, Wendelsheim, Germania, distribuito in Italia da Grifols Diagnostici, Ghezzeno, Pi).

In breve, campioni (100 µL) di siero dei pazienti, diluito 1:100, vengono incubati (30 minuti) nei pozzetti di micropiastre sensibilizzati con l'autoantigene CTPD. Vengono quindi aggiunti il coniugato (100 µL), costituito da immunoglobuline anti-IgA umane, marcate con perossidasi di rafano, il cromogeno tetrametilbenzidina (100 µL) e la soluzione acida (100 µL) bloccante. L'intensità del colore formato, misurata a 450 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-complesso CTPD in standard, campioni e controlli. Il metodo consente di rilevare la concentrazione di 3 tipi di autoanticorpi diretti, rispettivamente contro i DGP, contro la tTG e contro i neoepitopi del complesso CTPD.

L'imprecisione analitica del metodo varia da 1.6% e 7.0% nella serie e tra 2.0% e 7.6% tra le serie. La sensibilità analitica è di 1 U/mL.

Tabella I. Casistica dei pazienti indagati.

Pazienti	Sigla	Numero
Lupus eritematoso sistemico	LES	80
Artrite reumatoide	AR	50
Sclerosi sistemica progressiva	SSp	46
Tireopatie autoimmuni (tiroidite linfocitaria, morbo di Graves)	TA (TH, MG)	208
Cirrosi biliare primitiva	CBP	67
Dermopatia bollosa autoimmune	MB	20
Totale malattie autoimmuni		471
Malattie infettive (Toxoplasmosi, Rosolia, EBV, CMV, HBV, HCV, Sifilide)	MI	106
Soggetti sani	SS	120
Celiachia	MC	41
Totali		738

Come confronto dei risultati ottenuti sui pazienti celiaci e sui pazienti positivi al test CTPDAB sono stati utilizzati: a) un metodo di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione degli autoanticorpi anti-endomisio (EmA), prodotto da Inova Diagnostics (S. Diego, USA) e distribuito in Italia da Instrumentation Laboratory (Milano); b) due metodi ELISA per la rilevazione degli autoanticorpi diretti contro i peptidi deamidati di gliadina (DGP-IgA e IgG, Inova, distribuiti in Italia da Instrumentation Laboratory); c) un metodo ELISA per la rilevazione degli autoanticorpi diretti contro la transglutaminasi (tTG-IgA, Orgentec, Mainz, Germania, distribuito in Italia da Technogenetics, Milano). I test per gli anticorpi anti-CTPD sui pazienti a rischio sono stati eseguiti presso i laboratori di Latisana e Bari. I test anti-CTPD sui pazienti celiaci sono stati eseguiti presso il laboratorio di Udine; i sieri CTPD-positivi ottenuti nei primi due laboratori sono stati confermati nel terzo laboratorio, che ha eseguito anche la determinazione dei DGPAb e dei tTGAb. I sieri dei pazienti provengono da aree omogenee delle regioni Friuli-Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Toscana e Puglia.

Risultati

Il valore soglia di positività del nuovo metodo è stato definito mediante l'impiego di una curva ROC, calcolata utilizzando i risultati dei pazienti affetti da celiachia e del gruppo di controllo (sani e affetti da malattie infettive) (Fig. 1): il valore definito dalla curva ROC è di 17.6 U/mL, praticamente coincidente con il valore alto (18 U/mL) dell'intervallo di positività suggerito dal produttore (12-18 U/mL). Per la valutazione dei risultati è stato utilizzato questo valore.

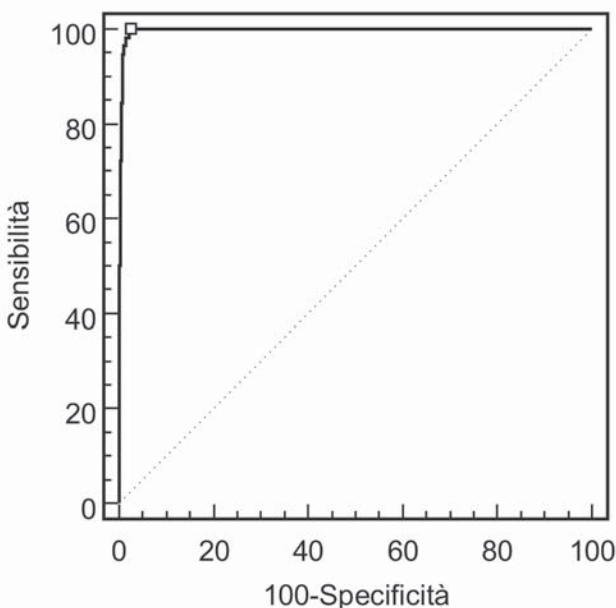


Figura 1. Curva ROC dei risultati degli autoanticorpi anti-complesso CTPD ottenuti nella casistica in studio.

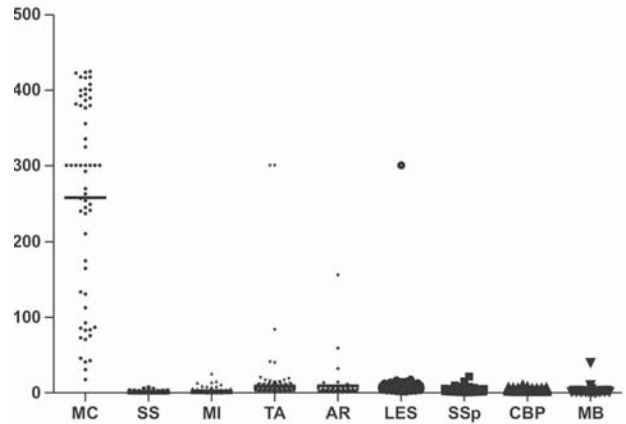


Figura 2. Distribuzione dei risultati ottenuti nella casistica di 738 pazienti (per le sigle vedi testo e Tabella I).

La distribuzione dei risultati espressi in unità arbitrarie (U/mL) ottenuti con il metodo in studio è rappresentata nella Figura 2. Nel gruppo di controllo nessun paziente è risultato positivo al test.

Nel gruppo di pazienti affetti da celiachia non in trattamento, 39 soggetti su 41 (95.1%) sono risultati positivi al test (Fig. 3); nel confronto dei risultati con altri metodi di dosaggio di IgA EmA, IgA tTG, IgA-DGP, il nuovo metodo presenta sensibilità paragonabile a EmA e superiori a tTGAb e DGPAb (Tab. II). Non è stato possibile effettuare un'analisi separata per i pazienti al di sotto dei 3 anni di età, in quanto la casistica era troppo esigua per avere significatività statistica.

Nel gruppo di soggetti affetti da malattie autoimmuni, le percentuali di positività riscontrate sono indicate nella Tabella III. Complessivamente sono stati evidenziati 13 pazienti con valori di anticorpi anti-CTPD superiori a 18 U/mL (2.8%); di questi 1 su 80 (1.3%) era un paziente affetto da lupus eritematoso sistemico (LES), 3 su 50 (6%) erano affetti da artrite reumatoide (AR), 1 su 50 (2%) da sclerosi sistemica (SSp), 5 su 166 (3.0%) da tiroidite autoimmune, 2 su 42 (4.8%) da

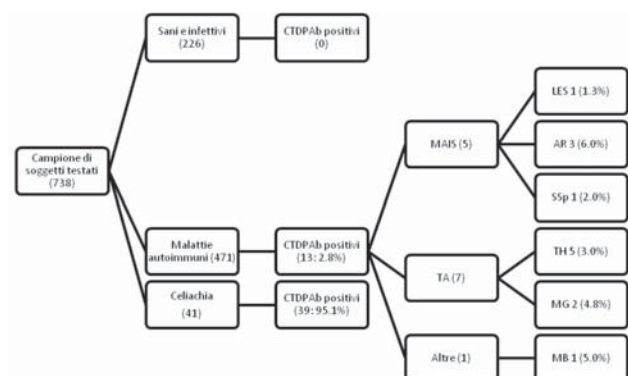


Figura 3. Casistica e risultati dei soggetti indagati nello studio (MAIS, malattie autoimmuni sistemiche; per le altre sigle vedi testo e Tabella I).

Tabella II. Pazienti positivi alla ricerca di autoanticorpi celiachia-correlati (CTPD, complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina; EmA, anticorpi anti endomisio; tTG, transglutaminasi; DGP, peptidi gliadinici deamidati).

Anticorpi	Totale	Positivi(n)	Positivi(%)
CTPD-IgA	41	39	95.1
EmA	41	39	95.1
tTG-IgA	41	38	92.7
DGP-IgA	41	33	80.5

Tabella III. Caratteristiche autoanticorpali e cliniche dei 13 pazienti positivi al test CTPD (CC, celiachia classica; CS, celiachia silente; per le altre sigle vedi Tabelle I e II).

Paz.	Patologia	Anti-CTPD-IgA(<18 U/mL)	EMA IgA	tTG-IgA (<8 UI/mL)	DGP-IgA (<15 U/mL)	DGP-IgG (<12 U/I)	Anticorpi (n.)	HLA	Diagnosi
1	LES	300.0	Positivo	25	54	80	4	DQ2	CC
2	AR	59.3	Positivo	47.4	11.3	100	3	DQ2	CC
3	AR	32.1	Positivo	18.4	5.5	34	3	DQ2	CS
4	TL	300.0	Negativo	1	174	65	2	DQ2	CS
5	PB	41.3	Positivo	75.8	6.9	5.5	2	DQ8	?
6	MB	39.7	Negativo	6	16	3	1	DQ2	?
7	TL	40.8	Negativo	1	15	5	1	DQ2	?
8	MB	83.6	Negativo	1	11	3	0	DQ2	?
9	TL	18.5	Negativo	2	8	2	0	Altro	?
10	AR	156.5	Negativo	0	5	3	0	Altro	?
11	SSp	21.6	Negativo	4.1	27.7	11.3	1	?	?
12	TL	20.1	Negativo	1	4	3	0	?	?
13	TL	300.0	Negativo	2	7	3	0	?	?

morbo di Basedow e 1 su 20 (5.0%) da pemfigoide bolloso.

Tra questi pazienti, 1 era positivo contemporaneamente a tutti e quattro gli altri test, 2 erano positivi a tre test, 2 a due test, 3 a un solo test, mentre 5 erano completamente negativi ai test consolidati. Inoltre 8 su 13 sono risultati positivi alla ricerca degli aplo tipi DQ2/DQ8 e 5 negativi (Tab. III). Solo per 4 pazienti è stato possibile effettuare la biopsia intestinale: per 2, con istologia positiva, la diagnosi è stata di celiachia classica, per gli altri 2, con istologia negativa, è stata posta diagnosi di celiachia silente, data la positività ad almeno 2 test autoanticorpali (Tab. III). Tre infatti erano positivi a tTGAb/EmA e 1 a DGP IgA/IgG ad alta concentrazione.

Nei restanti 9 pazienti, la diagnosi di celiachia è stata solo ipotizzata nei 4 pazienti DQ-positivi, data la mancanza del dato istologico, mentre i restanti 5 pazienti restano al momento insoluti dal punto di vista diagnostico. Tra i 4 pazienti DQ-positivi 1 era positivo a tTGAb/EmA ad alta concentrazione.

Discussione

Sempre maggiore consenso presenta l'ipotesi che il

complesso transglutaminasi-peptidi di gliadina rappresenti l'autoantigene fisiologico in grado di indurre l'attacco autoimmune nella MC, secondo la teoria del complesso aptene-trasportatore¹³. Tale complesso, identificato a livello della mucosa intestinale¹⁵, si origina a seguito della formazione di legami crociati covalenti tra la transglutaminasi e i peptidi di gliadina, mediante una reazione di transamidazione¹⁰. Contemporaneamente la transglutaminasi deamida i peptidi di gliadina, con formazione di peptidi deamidati (DGP), che rappresentano potenti stimolatori delle cellule T implicate nella patogenesi della MC.

La sequenza di eventi che portano alla formazione degli autoanticorpi presenti nella MC è considerata la seguente:

- in presenza del CTPD si formano autoanticorpi specifici verso epitopi (neoepitopi) condivisi tra transglutaminasi e peptidi di gliadina, ad opera di cellule B memoria, che persistono a lungo nella mucosa intestinale¹²;
- queste cellule B internalizzano il complesso aptene-trasportatore e lo riespongono sulla superficie fungendo da cellule presentanti l'antigene (gliadina-deamidata) alle cellule T CD4 specifiche, determinan-

Tabella IV. Prevalenza di MC in pazienti affetti da tireopatie autoimmuni secondo i dati di letteratura.

Autore	Anno	Pazienti	Celiachia (n)	Celiachia (%)
Collin	1994	83	4	4.8
Sategna-Guidetti	1998	152	5	3.3
Cuoco	1999	92	4	4.3
Valentino	1999	150	5	3.3
Berti	2000	172	6	3.4
Volta	2001	220	7	3.2
Meloni	2001	297	13	4.4
Mainardi	2002	100	2	2
Ch'ng	2005	115	5	4.5
Spadaccino	2007	272	10	3.7
Totale		1653	61	3.7

done l'attivazione;
 c) le cellule T CD4 inducono la risposta autoimmune nei confronti della mucosa intestinale per attivazione di cellule T CD8 effettrici e per amplificazione della risposta delle cellule B, con formazione iniziale di anticorpi anti-gliadina, che in genere compaiono per primi nella storia naturale della celiachia¹⁶ e successivamente degli anticorpi anti-transglutaminasi per estensione epitopica e/o mimetismo molecolare¹⁴.

Nei pazienti affetti da celiachia sono quindi presenti 3 tipi di autoanticorpi: i CTPDAB, che probabilmente si formano per primi e permangono a lungo, i DGPAB, che si formano subito dopo, e infine i tTGAb: questi ultimi due anticorpi possono presentare fluttuazioni e diminuzioni significative della loro concentrazione, fino a risultare non rilevabili con i metodi immunologici correnti in alcuni momenti della storia naturale della MC.

Secondo questa ipotesi gli anticorpi rivolti contro il complesso CTPD dovrebbero costituire il marcatore immunologico ideale per la diagnosi precoce della celiachia. In questo studio l'ipotesi sembra suggerita dai risultati ottenuti con l'impiego di un metodo ELISA che utilizza come autoantigene il complesso CTPD ed è in grado di rilevare la presenza di tutte e tre le classi autoanticorpali e quindi di segnalare una risposta autoimmune contro la gliadina in tutti i momenti della storia naturale della celiachia.

Gli anticorpi anti-CTPD nei soggetti celiaci. Il nuovo metodo evidenzia la presenza di anticorpi anti-CTPD di classe IgA nel 95% dei soggetti affetti da celiachia, evidenziando una sensibilità diagnostica superiore a quella degli anti-DGP di classe IgA e IgG e degli anti-tTG di classe IgA e sovrapponibile a quella degli EmA (Tab. II). Dai dati di questo studio risulta confermata l'elevata specificità diagnostica degli EmA e dei tTGAb, ampiamente segnalata in letteratura, e anche dei DGP IgA e IgG, di conoscenza più recente¹⁷⁻²⁰.

Gli anticorpi anti-CTPD nei soggetti affetti da altre malattie autoimmuni. In letteratura la presenza di AGA, EmA e

tTGAb è stata dimostrata in pazienti affetti da altre malattie autoimmuni con frequenza superiore a quella della popolazione aperta. Tra questi, i pazienti affetti da tireopatie autoimmuni rappresentano un gruppo spesso indagato per la ricerca della contemporanea presenza di celiachia, a configurare la sindrome autoimmune multipla di tipo 3B. Una prevalenza aumentata di soggetti affetti da MC positivi agli anticorpi specifici è stata dimostrata nei pazienti affetti da TAI con percentuale media del 3.7% e range compreso tra 2.0% e 4.8%²¹⁻³⁰ (Tab. IV). Lo studio più recente pubblicato su questo argomento³⁰ considera i pazienti positivi a tTG/Ab/EMA come soggetti celiaci, indipendentemente dalla conferma istologica (celiachia silente o potenziale). Secondo questo approccio, su 15 pazienti positivi (5.4% del totale), 2 su 90 (2.2%) erano affetti da morbo di Basedow (MB), mentre 13 su 186 (7%) erano affetti da tiroidite linfocitaria (TL). I dati del presente studio sono simili, essendo dimostrati positivi 7 pazienti su 208 (3.6%), di cui 2 su 42 (4.8%) affetti da MB e 5 su 162 (3.0%) affetti da TL. I dati da noi ottenuti nei pazienti affetti da MB sono molto simili a quelli di uno degli studi più recenti²⁹. Complessivamente la prevalenza media degli autoanticorpi celiachia-correlati nelle tireopatie è stata nel nostro studio 5-10 volte superiore a quella rilevabile nella popolazione aperta (0.4-1.0%).

Sebbene meno frequentemente indagati, i pazienti affetti da malattie reumatiche autoimmuni presentano percentuali di positività oscillanti tra 0% e 5% per l'AR³¹⁻³⁵, 1% e 6% per il LES^{32,33,36} e 0% e 7% per la SSp^{33,36} (Tab. V). Per l'AR in questo studio la frequenza è superiore, attestandosi al 6%, mentre per il LES e SSp i risultati sono confrontabili a quelli precedentemente ottenuti, alcuni dei quali prodotti dal nostro gruppo.

Gli anticorpi anti-CTPD nel gruppo di controllo. Il nuovo metodo non rileva la presenza di anti-CTPD nei 226 pazienti sani e affetti da malattie infettive, evidenziando in questa categoria una specificità diagnostica asso-

Tabella V. Prevalenza di MC in pazienti affetti da malattie reumatiche secondo i dati di letteratura.

Autore	Anno	Pazienti AR	Celiachia (n)	Celiachia (%)
Francis	2002	160	1	0.6
Bizzaro	2003	100	1	1
Luft	2003	50	1	2
Nisihara	2007	83	0	0
Atzeni	2008	20	1	5
Totale		278	4	1.4
Pazienti LES				
Luft	2003	50	3	6
Marai	2004	100	1	1
Totale		150	4	2.6
Pazienti SSp				
Bizzaro	2003	100	0	0
Luft	2003	30	2	7
Totale		130	2	1.5

luta. Tuttavia, considerando gli 8 casi risultati positivi in soggetti autoimmuni (negativi ad altri autoanticorpi o solo debolmente positivi) non ancora dimostrati affetti da celiachia, la specificità diagnostica complessiva appare essere del 98.8% (689/697).

Conclusioni

Complessivamente la ricerca degli anticorpi anti-CTPD con metodo ELISA sembra costituire un test affidabile: per l'elevata sensibilità il dosaggio di questi autoanticorpi può essere considerato un test di screening per indagare l'iceberg celiaco, dato che il metodo in esame sembra integrare le informazioni relative ai test di più recente introduzione (tTGAb con antigene ricombinante, DGPAb). Il test risulta positivo nei pazienti autoimmuni con doppia positività per DGPAb e tTGAb/EmA (3 su 13), o nei pazienti con singola positività (solo DGPAb: 3 su 13, solo tTGAb/EmA: 2 su 13). Il nostro studio conferma i recenti dati di Reeves, che ha operato il confronto tra vari metodi di dosaggio di autoanticorpi correlati con la celiachia, evidenziando un'elevata sensibilità del metodo per il dosaggio degli anti-CTPD³⁷.

Dai dati del presente studio non è ancora chiaro il significato delle positività riscontrate in 5 pazienti negativi ai singoli test consolidati (tTGAb/EmA e DGPAb) e in 3 pazienti con deboli positività. Si può ipotizzare che questi pazienti presentino anticorpi rivolti contro i neo-epitopi del complesso CTPD, dimostrati sperimentalmente¹⁵, ma non è ancora chiaro se questi siano presenti nella storia naturale di pazienti celiaci e quindi avere un significato predittivo o se possano essere presenti, occasionalmente e per brevi periodi di tempo, anche in soggetti non celiaci, sani o affetti da altre patologie autoimmuni e non. Ulteriori studi sono al riguardo necessari, anche per verificare la pos-

sibilità di risultati falsi-positivi analitici, come sembra evidenziato da un nostro studio precedente³⁸.

Bibliografia

- Gatti S, Catassi C. La malattia celiaca. In: Tozzoli R, Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Pinchera A, ed. Il laboratorio nella malattie autoimmuni d'organo. Bologna: Esculapio; 2009. p. 344-63.
- Mearin ML. Celiac disease among children and adolescents. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2007; 37:86-105.
- Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120:636-51.
- Tonutti E, Bizzaro N. Gli anticorpi nella malattia celiaca. In: Tozzoli R, Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Pinchera A, ed. Il laboratorio nella malattie autoimmuni d'organo. Bologna: Esculapio; 2009. p. 364-75.
- Tozzoli R. L'iceberg autoimmune: alla ricerca del sommerso. *RIMeL/IJLaM* 2008;4(suppl): 60-4.
- Drago S, El Asmar S, Di Pierro MR, Clemente MG, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41:408-19.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray MG, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 297:2275-9.
- Fleckenstein B, Qiao S-W, Larsen MR, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *J Biol Chem* 2004; 279:17607-16.
- Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998; 4:713-7.
- Skovbjerg H, Anthonsen D, Knudsen E, Sjöström H. Deamidation of gliadin peptides in lamina propria: implications for celiac disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2917-24.

11. Falini ML, Elli L, Caramanico R, Bardella MT, Terrani C, Roncoroni L, et al. Immunoreactivity of antibodies against transglutaminase-deamidated gliadins in adult celiac disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2697-701.
12. Marietta EV, Rashtak S, Murray JA. Correlation analysis of celiac sprue tissue transglutaminase and deamidated gliadin IgG/IgA. *World J Gastroenterol* 2009; 15:845-8.
13. Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase - guilty by association? *Gut* 1997; 41:851-2.
14. Korponay-Szabò IR, Vecsei Z, Király R, Dahlbom I, Chirido F, Nemes E, et al. Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46:253-61.
15. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Ara C, Biagi F, Perilli M, Amicosante G, et al. Gliadin and tissue transglutaminase complexes in normal and coeliac duodenal mucosa. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:516-24.
16. Simell S, Kupila A, Hoppu S, Hekkala A, Simell T, Stahlberg MR, et al. Natural history of transglutaminase autoantibodies and mucosal changes in children carrying HLA-conferred celiac disease susceptibility. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:1182-91.
17. Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA. Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:426-32.
18. Volta U, Granito A, Fiorini E, Parisi C, Piscaglia M, Pappas G, et al. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci* 2008; 53:1582-8.
19. Liu E, Li M, Emery L, Taki I, Barriga K, Tiberti C, et al. Natural history of antibodies to deamidated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45:295-300.
20. Ankelo M, Kleimola V, Simell S, Simell O, Knip M, Jokisalo E, et al. Antibody response to deamidated gliadin peptide show high specificity and parallel antibodies to tissue transglutaminase in developing coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 150:285-93.
21. Collin P, Salmi J, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Autoimmune thyroid disorders and coeliac disease. *Eur J Endocrinol* 1994; 130:137-40.
22. Sategna-Guidetti C, Bruno M, Mazza E, Carlino A, Predebbon S, Tagliabue M, et al. Autoimmune thyroid diseases and coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10:927-31.
23. Cuoco L, Certo M, Jorizzo EA, De Vitis I, Tursi A, Papa A, et al. Prevalence and early diagnosis of coeliac disease in autoimmune thyroid disorders. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31:283-7.
24. Valentino R, Savastano S, Tommaselli AP, Dorato M, Scarpitta MT, Gigante M, et al. Prevalence of coeliac disease in patients with thyroid autoimmunity. *Horm Res* 1999; 51:124-7.
25. Berti I, Trevisiol C, Tommassini A, Citta A, Neri E, Geatti O, et al. Usefulness of screening program for celiac disease in autoimmune thyroiditis. *Dig Dis Sci* 2000; 45:403-6.
26. Volta U, Ravaglia G, Granito A, Forti P, Maioli F, Petrolini N, et al. Coeliac disease in patients with autoimmune thyroiditis. *Digestion* 2001; 64:61-5.
27. Meloni GF, Tomasi PA, Bertonecelli A, Fanciulli G, Delitala G, Meloni T. Prevalence of silent celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis from Northern Sardinia. *J Endocrinol Invest* 2001; 24:298-302.
28. Mainardi E, Montanelli A, Dotti M, Nano R, Moscato G. Thyroid-related autoantibodies and celiac disease: a role for a gluten-free diet? *J Clin Gastroenterol* 2002; 35:245-8.
29. Ch'ng CL, Biswas M, Benton A, Jones MK, Kingham JG. Prospective screening for coeliac disease in patients with Graves' hyperthyroidism using anti-gliadin and tissue transglutaminase antibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62:303-6.
30. Spadaccino AC, Basso D, Chiarelli C, Albergoni MP, D'Odorico A, Plebani M, et al. Celiac disease in North Italian patients with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2008; 41:116-21.
31. Francis J, Carty JE, Scott BB. The prevalence of coeliac disease in rheumatoid arthritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:1355-6.
32. Luft LM, Barr SG, Martin LO, Chan EK, Fritzler MJ. Autoantibodies to tissue transglutaminase in Sjögren's syndrome and related rheumatic disease. *J Rheumatol* 2003; 30:2613-9.
33. Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Doria A, Tampoia M, Bassetti D, et al. IgA and IgG tissue transglutaminase antibody prevalence and clinical significance in connective tissue diseases, inflammatory bowel disease and primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003; 48:2360-5.
34. Nisihara RM, Skare TL, Silva MB, da Rosa Utiyama SR. Rheumatoid arthritis and anti-endomysial antibodies. *Acta Rheumatol Port* 2007; 32:163-7.
35. Atzeni F, Doria A, Ghirardello A, Villalta D, Zampieri S, Carrabba M, et al. Organ-specific autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab: a prospective long-term follow-up. *Autoimmunity* 2008; 41:87-91.
36. Marai I, Shoenfeld Y, Bizzaro N, Villalta D, Doria A, Tonutti E, et al. IgA and IgG tissue transglutaminase antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13:241-4.
37. Reeves GEM, Squance ML, Duggan AE, Murugasu RR, Wilson RJ, Wong RC, et al. Diagnostic accuracy of celiac serological tests: a prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18:493-501.
38. Villalta D, Crovatto M, Stella S, Tonutti E, Tozzoli R, Bizzaro N. False positive reactions for IgA and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies in liver cirrhosis are common and method-dependent. *Clin Chim Acta* 2005; 356:102-9.