

## Accuratezza della determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi nella casistica pediatrica

Mario Plebani<sup>1</sup>, Daniela Basso<sup>1</sup>, Nicoletta Gallo<sup>1</sup>, Graziella Guariso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, <sup>2</sup>Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedale-Università, Padova

**RIASSUNTO** *Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'accuratezza del dosaggio degli anticorpi anti-transglutaminasi tessutale (tTG) per la diagnosi di malattia celiaca in età pediatrica, confrontando diversi metodi presenti in commercio. Abbiamo studiato una casistica di 304 bambini: 70 erano bambini non affetti da malattia celiaca, 81 avevano malattia celiaca documentata istologicamente e 153 erano bambini affetti da celiachia in trattamento con dieta priva di glutine. Nel siero sono stati determinati gli anticorpi anti-tTG con 7 diversi metodi ELISA atti ad individuare anticorpi di classe IgA o IgG, e impieganti antigene murino o umano (ricombinante o purificato da eritrociti). Le IgA anti-tTG individuate con sistemi utilizzando l'antigene murino presentavano una minore capacità discriminante (aree sotto le curve ROC =  $0,92 \pm 0,04$ ) rispetto ai sistemi diagnostici atti ad individuare anticorpi di classe IgA diretti verso l'antigene umano sia ricombinante (area sotto la curva ROC =  $0,98 \pm 0,01$ ) che purificato da eritrociti ( $0,97 \pm 0,02$ ). L'individuazione degli anticorpi di classe IgG presentava complessivamente una minore capacità discriminante anche utilizzando l'antigene umano sia ricombinante ( $0,93 \pm 0,03$ ) che purificato da eritrociti ( $0,82 \pm 0,05$ ). La sensibilità (95,7%, cutoff=20 Unità/mL e 96,8% cutoff=1,0 Unità/mL) e la specificità (95%) migliori sono state ottenute impiegando i sistemi diagnostici QUANTA Lite/Inova e CELIKEY Pharmacia & Upjohn Diagnostics rispettivamente. Possiamo pertanto concludere, sulla base dei dati presenti in letteratura e di quanto presentato in questo studio, che gli anticorpi anti-tTG sono un indice sensibile e specifico per la diagnosi della malattia celiaca nel bambino. E' consigliabile comunque optare per i metodi che utilizzano l'antigene umano ricombinante o purificato, rispetto a quelli che utilizzano l'antigene murino, e per quelli che consentono l'identificazione degli anticorpi di classe IgA rispetto alle IgG, poiché garantiscono i migliori livelli di accuratezza diagnostica.*

**Parole Chiave:** Celiachia, anticorpi anti-transglutaminasi

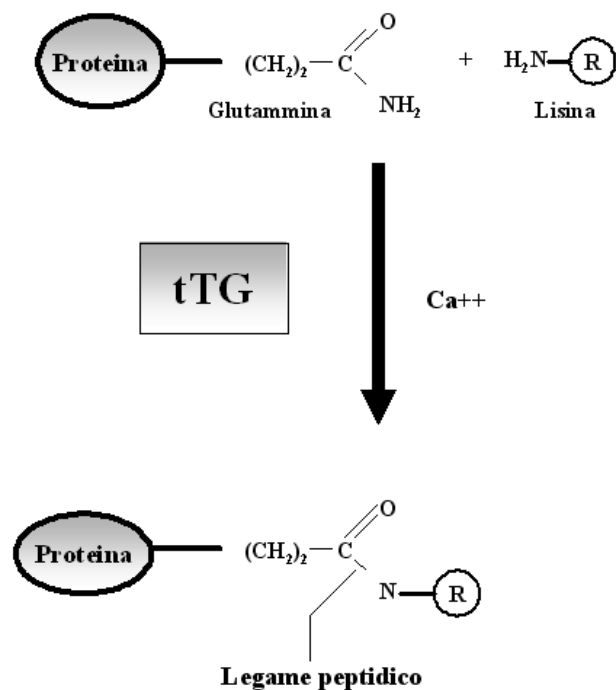
**SUMMARY** *Diagnostic accuracy of anti-transglutaminase antibody in children. The aim of the present study was to ascertain the diagnostic accuracy of anti-tissue transglutaminase (tTG) antibodies for celiac disease diagnosis in pediatric patients, comparing different ELISAs commercially available. We studied 304 children: 70 were children without celiac disease, 81 had histologically proven celiac disease and 153 were celiac children on gluten free diet. In the sera we measured anti-tTG antibodies using 7 different ELISA assays, which allowed the identification of IgA or IgG antibodies and used murine, human recombinant or human erythrocyte purified antigens. IgA anti murine tTG had a lower discriminant capacity (areas under ROC curves =  $0,92 \pm 0,04$ ) than IgA anti human recombinant (area under the ROC curve =  $0,98 \pm 0,01$ ) or erythrocyte purified antigen ( $0,97 \pm 0,02$ ). IgG anti tTG had an overall accuracy lower than that of IgA, both using the human recombinant ( $0,93 \pm 0,03$ ) and erythrocyte purified antigen ( $0,82 \pm 0,05$ ). The best sensitivities (95,7%, cutoff=20 U/mL e 96,8% cut-off=1,0 U/mL) and specificity (95%) were obtained using the diagnostic ELISAs QUANTA Lite/Inova and CELIKEY Pharmacia & Upjohn Diagnostics respectively. On the basis of literature data and of the results of the present study we may conclude suggesting that anti-tTG antibodies serum determination is a sensitive and specific index of celiac disease. The ELISA methods which use the human antigen, both recombinant or erythrocyte purified, and which allow the identification of IgA antibodies are to be preferred, since they offer the best diagnostic accuracy.*

**Key words:** Celiac disease, anti-transglutaminase antibody

### INTRODUZIONE

La transglutaminasi tessutale (tTG) è un enzima  $\text{Ca}^{++}$  dipendente che catalizza reazioni di deamidazione e transamidazione, e che riconosce fra i suoi substrati la gliadina, un peptide che entra nella composizione del glutine assieme alla glutenina. Sulla base della sequenza aminoacidica le gliadine vengono suddivise in gliadine- $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\omega$ , ed hanno una lunghezza media corrispondente a circa 250-300 residui aminoacidici, risultando particolarmente ricche di residui di prolina e glutammina<sup>1</sup>. Le reazioni di transamidazione catalizzate dalla transglutaminasi tessutale coinvolgono una amina primaria (lisina) e un residuo di glutammina, portando alla formazione di legami covalenti fra glu-

tammina e lisina (Fig. 1). Nelle reazioni di deamidazione i residui di glutammina vengono convertiti ad acido glutammico, che aumenta le cariche elettriche negative della molecola. A pH 7,3 la transglutaminasi tessutale catalizza prevalentemente le reazioni di transamidazione, mentre a pH più acido catalizza prevalentemente le reazioni di deamidazione. Fra i prodotti finali di reazione vi sono complessi gliadina-gliadina, complessi gliadina-transglutaminasi, le cui caratteristiche molecolari e conformazionali li rendono, rispetto alla molecola di gliadina, più facilmente riconoscibili e fagocitabili dalle APC (*Antigen Presenting Cells*) della mucosa intestinale. La deamidazione delle molecole di gliadina ad opera della transglutaminasi tessutale avviene in corrispondenza dei residui di glutammina, di cui la gliadi-



**Figura 1**  
 Reazioni di transamidazione catalizzate dalla transglutaminasi tessutale.  
 Formazione di legami covalenti fra glutamina e lisina

na è ricca, trasformandoli in residui di acido glutammico, provocando un aumento netto della carica elettrica negativa della molecola. Molecole a carica elettrica negativa vengono più facilmente riconosciute dalle APC, soprattutto nei soggetti portatori dell'aplotipo HLA DQ2 o DQ8, frequentemente associati alla malattia celiaca<sup>1</sup>. Pur essendo la transglutaminasi tessutale un enzima normalmente espresso nella mucosa intestinale, un aumento significativo dei suoi livelli di espressione nella regione sottoepiteliale è stato descritto nei soggetti affetti da malattia celiaca, aspetto che sottolinea ulteriormente il suo possibile ruolo eziopatogenetico nella celiachia, condizione morbosa che viene oggi classificata come malattia autoimmune scatenata da un fattore esogeno, la gliadina.

La risposta immunologica scatenata dalla assunzione di gliadina è diretta non solo verso antigeni non-self, come la stessa gliadina, ma anche verso antigeni self, fra i quali spicca la transglutaminasi tessutale. Nell'ambito della risposta immunologica, quella cellulare sembra mediare il danno a carico della mucosa intestinale, mentre quella umorale è responsabile della produzione di anticorpi di classe prevalentemente IgA diretti verso gliadina e transglutaminasi tessutale; questi anticorpi, pur non essendo verosimilmente coinvolti nell'eziopatogenesi della malattia, sono la base biochimico-clinica per la diagnostica biomolecolare della malattia. Gli anticorpi anti gliadina e anti-transglutaminasi sono infatti rilevabili nel siero mediante tecniche immunologiche non solo di facile esecuzione, ma anche facilmente automatizzabili, consentendo così la realizzazione di un gran numero di determinazioni giornaliere, utili sia per la diagnosi sia per eventuali programmi di screening e monitoraggio della dieta.

Abbiamo attualmente a disposizione numerosi sistemi

biochimici per la diagnostica della malattia celiaca basati sulla identificazione di anticorpi sierici di classe IgA o IgG diretti verso antigeni esogeni (gliadina) o endogeni (transglutaminasi tessutale, endomisio). Tenendo conto che il gold standard diagnostico è ancor oggi la valutazione istologica della mucosa intestinale<sup>2</sup>, appare evidente che i principali requisiti dei test biochimici devono essere: (a) elevata sensibilità e specificità, al fine di evitare endoscopie e biopsie inutili, soprattutto nei pazienti pediatrici; (b) le informazioni derivanti da determinazioni differenti non devono essere ridondanti, ma complementari.

La determinazione degli anticorpi anti-gliadina, sia di classe IgA che di classe IgG, presenta sensibilità e specificità assai limitate (inferiori al 70%), e la loro determinazione per la diagnostica della malattia celiaca del bambino sarebbe accettabile solo in assenza di altre determinazioni molto più sensibili e specifiche, quali quelle degli anticorpi anti-endomisio o anti-transglutaminasi.

Questa determinazione, che si effettua mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta, utilizzando quali substrati il terzo distale dell'esofago di scimmia o cellule del cordone ombelicale umano, ha sensibilità e specificità estremamente elevate (>95%) ed è stata l'indagine biochimica di riferimento per la diagnosi di malattia celiaca fino a pochi anni fa, quando Dieterich e coll.<sup>3</sup> hanno dimostrato che l'autoantigene riconosciuto dagli anticorpi anti-endomisio è la transglutaminasi tessutale. Numerosi lavori presenti in letteratura documentano la concordanza quasi assoluta fra i risultati ottenibili con la determinazione degli anticorpi anti-endomisio e quelli ottenibili con la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi<sup>4-6</sup>.

## ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI: VALUTAZIONI DEI METODI

Dopo la dimostrazione da parte di Dieterich e coll.<sup>3</sup> che la transglutaminasi tessutale (tTG) è l'autoantigene riconosciuto dagli anticorpi anti-endomisio, sono stati effettuati numerosi studi sul significato clinico della determinazione sierica degli anticorpi anti-tTG e attualmente se si effettua una ricerca nelle biblioteche on line (PubMed) compaiono almeno 664 voci bibliografiche. Il gran numero di studi su questo argomento, comparsi in un così breve arco di tempo, è dovuto in parte alla rapida commercializzazione di sistemi diagnostici in vitro. I sistemi attualmente disponibili sono per la maggior parte sistemi ELISA che utilizzano micropiastre coattate con antigene murino ottenuto da tessuto epatico o antigene umano sia ricombinante che purificato (Tab. 1). I diversi sistemi presenti in commercio possono consentire il riconoscimento degli anticorpi anti-tTG di classe IgA o IgG.

L'accuratezza diagnostica dei diversi sistemi ELISA dipende in gran parte dal tipo di antigene utilizzato: infatti l'antigene ottenuto da fegato murino ha solo l'81% di omologia con il corrispondente enzima umano, ed in generale i sistemi ELISA che utilizzano l'antigene murino risultano meno accurati di quelli che utilizzano l'antigene umano<sup>4-9</sup>.

Presso il nostro laboratorio abbiamo valutato l'accuratezza di diversi sistemi commerciali ELISA sia per la diagnosi che per il follow-up della malattia celiaca in pazienti

**Tabella 1**

Antigeni utilizzati in alcuni sistemi commerciali ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi

DITTA	Antigene
The Binding Site (Birmingham, UK)	Da fegato murino Umano ricombinante
Eurospital SpA (Trieste, Italia)	Da fegato murino Umano ricombinante
Genesis Diagnostics (Littleport, UK)	Da fegato murino
ImmuLisa/Immco Diagnostics Inc (Buffalo, NY, USA)	Da fegato murino
Immunopharmacology Research Diagnostics (Catania, Italia)	Da fegato murino
Inova Diagnostics Inc (San Diego, CA, USA)	Da fegato murino Umano purificato da eritrociti
Medizyme/Medipan Diagnostica GmbH (Selchow, Germany)	Da fegato murino
Orgentec Diagnostica GmbH (Mainz, Germany)	Umano purificato
Pharmacia & Upjohn Diagnostics GmbH & Co (Freiburg, Germany)	Umano ricombinante

pediatrici. Abbiamo studiato una casistica totale di 304 bambini: 70 erano bambini non affetti da malattia celiaca, 81 avevano malattia celiaca documentata istologicamente e 153 erano bambini affetti da celiachia in trattamento con dieta priva di glutine. Nel siero sono stati determinati gli anticorpi anti-tTG con 7 diversi metodi ELISA (Tab. 2).

La Tabella 3 riporta i risultati delle curve operative (ROC), ottenute con i diversi sistemi ELISA, considerandone la capacità discriminate fra presenza o assenza di malattia celiaca. Vengono riportati inoltre i valori di cutoff e la sensibilità di ciascun metodo, a specificità fissata al 95%.

La Figura 2 riporta i risultati individuali degli anticorpi anti-tTG di classe IgA determinati con il sistema QUANTA Lite/Inova utilizzando l'antigene murino o umano. Appare evidente la maggiore sensibilità del sistema che utilizza l'antigene umano rispetto a quello con antigene murino.

La Figura 3 riporta la percentuale di risultati positivi degli anticorpi anti-tTG misurati con i sette diversi sistemi studiati, riscontrata nei bambini affetti da malattia celiaca dopo 3, 12, 24 o più di 24 mesi di dieta priva di glutine. I sistemi diagnostici più sensibili (antigene umano, anti-tTG IgA) richiedono tempi più lunghi per la normalizzazione dopo dieta priva

**Tabella 2**

Metodi ELISA utilizzati per la determinazione degli anticorpi anti-tTG nella casistica da noi studiata

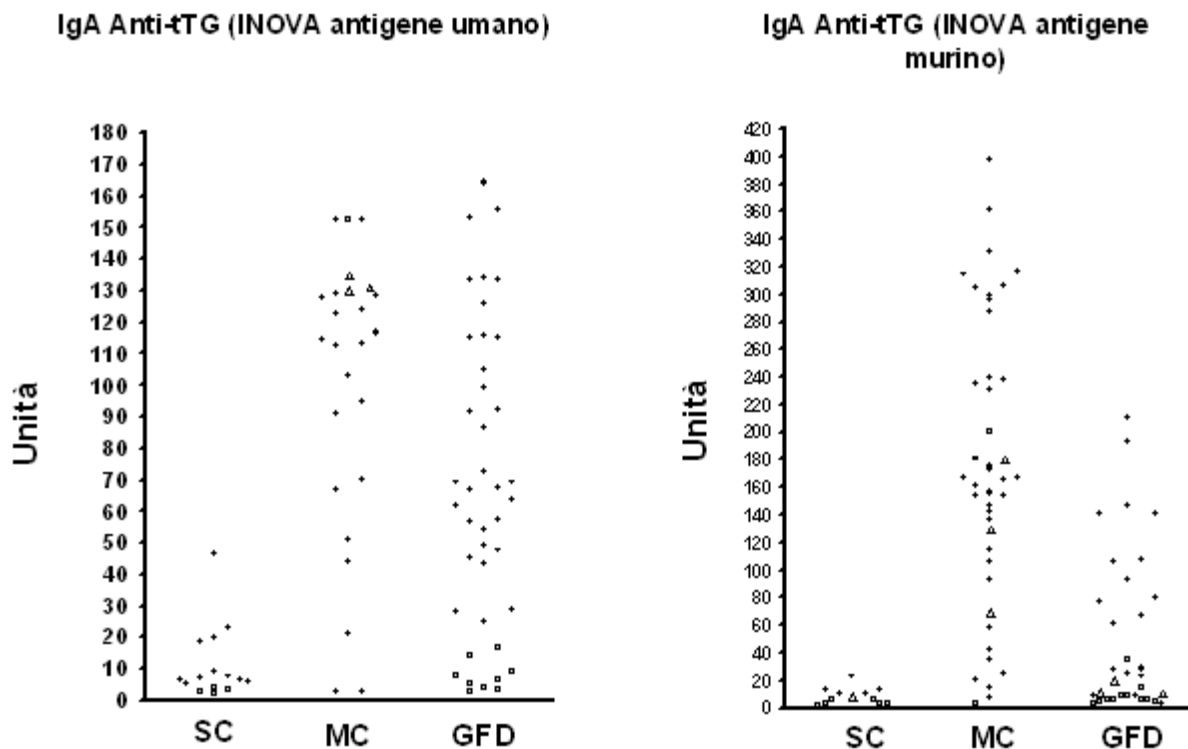
Ditta	Antigene	Classe Ig Anti-tTG
EU-tTG Eurospital SpA (Trieste, Italia)	Da fegato murino Umano ricombinante	IgA IgA
QUANTA Lite/Inova Diagnostics Inc (San Diego, CA, USA)	Da fegato murino Umano purificato da eritrociti Umano purificato da eritrociti	IgA IgA IgG
Celikey™/Pharmacia & Upjohn Diagnostics GmbH & Co (Freiburg, Germany)	Umano ricombinante Umano ricombinante	IgA IgG

**Tabella 3**

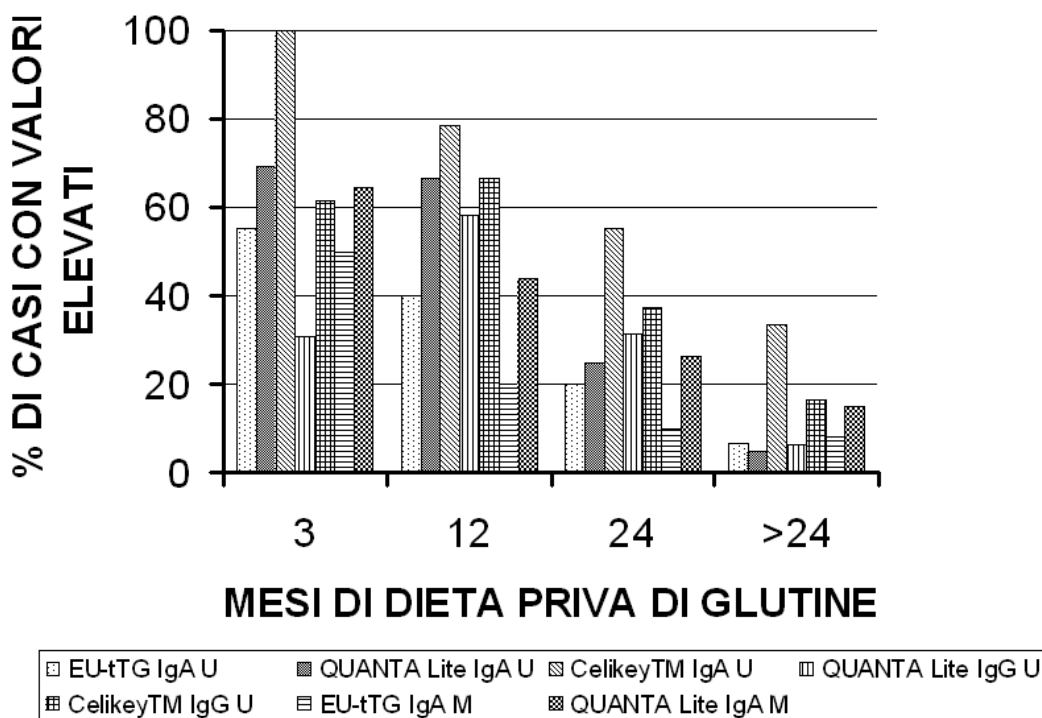
Risultati delle curve operative (ROC), ottenute con i diversi sistemi ELISA, considerandone la capacità discriminate fra presenza o assenza di malattia celiaca. Sono riportate le aree sotto le curve e gli errori standard (ASC e es), gli intervalli di confidenza al 95% (IC), la sensibilità ed i corrispondenti cutoff per specificità fissata al 95%

Ditta	Antigene	Classe Ig Anti-tTG	ASC±es	IC	Sensibilità (%)	Cutoff <sup>a</sup>
EU-tTG Eurospital SpA (Trieste, Italia)	Da fegato murino	IgA	0,92±0,04	0,85-1,00	86,1	5,0 AU/mL
	Umano ricombinante	IgA	0,88±0,05	0,77-0,98	86,1	7,0 AU/mL
QUANTA Lite/Inova Diagnostics Inc (San Diego, CA, USA)	Da fegato murino	IgA	0,92±0,026	0,87-0,97	86,4	10,0 U/mL
	Umano purificato da eritrociti	IgA	0,97±0,02	0,92-1,00	95,7	20,0 U/mL
	Umano purificato da eritrociti	IgG	0,82±0,05	0,73-0,91	50	6,0 U/mL
CELIKEY Pharmacia & Upjohn Diagnostics GmbH & Co (Freiburg, Germany)	Umano ricombinante	IgA	0,98±0,01	0,96-1,00	96,8	1,00 U/mL
	Umano ricombinante	IgG	0,93±0,03	0,87-0,99	89,1	1,75 U/mL

<sup>a</sup>U: unità utilizzate dalla Ditta; AU: unità arbitrarie



**Figura 2**  
 Valori individuali di anticorpi anti-transglutaminasi tessutale dosati nel siero di bambini di controllo (SC), bambini affetti da malattia celiaca alla diagnosi (MC) e dopo terapia con dieta priva di glutine (GFD). Sono confrontati i risultati ottenuti con due metodi ELISA forniti dalla stessa ditta e differenti per l'antigene utilizzato: umano o murino. Ciascun quadrato rappresenta 10 casi; ciascun triangolo rappresenta 5 casi



**Figura 3**  
 Percentuale di valori elevati di anticorpi anti-transglutaminasi tessutale misurati con sette diversi sistemi ELISA, in bambini affetti da malattia celiaca dopo diversi periodi di dieta priva di glutine

**Tabella 4**

Valori individuali di anti-tTG IgA ed IgG nei sette bambini con deficit severo di IgA totali affetti da malattia celiaca in trattamento con dieta priva di glutine

IgA totali	Mesi di dieta priva di glutine	anti-tTG IgA, U/mL		amto-anti tTG IgG, U/mL	
		QUANTA Lite/Inova	CELIKEY Pharmacia & Upjohn IgA	QUANTA Lite/Inova	CELIKEY Pharmacia & Upjohn IgA
<0,23 g/L	3	56,9 U	15,7	101,9	64,2
<0,23 g/L	4	133,6 U	150	5,2	6,2
<0,23 g/L	36	4,5 U	0,6	7,5	2
<0,23 g/L	36	11,2 U	1,4	2,9	1,4
<0,23 g/L	36	9,6 U	0,8	4,5	1,2
<0,23 g/L	60	3,3 U	0,2	2,8	0,7
<0,23 g/L	72	3,2 U	0,2	2,3	0,5

di glutine rispetto ai sistemi che utilizzano l'antigene murino o che individuano gli anticorpi anti-tTG di classe IgG.

La sensibilità e la specificità della determinazione degli anticorpi anti-tTG di classe IgG non sono risultate superiori a quelle degli anticorpi di classe IgA. Teoricamente la prima determinazione dovrebbe essere utile nei casi di deficit di IgA. Nella nostra casistica un deficit severo di IgA totali è stato rilevato in sette bambini affetti da celiachia in trattamento con dieta priva di glutine. In nessun caso abbiamo rilevato valori elevati di anti-tTG IgG associati a valori normali di anti-tTG IgA (Tab. 4). I due bambini con celiachia alla diagnosi e valori normali di anti-tTG misurati con il sistema più sensibile, non avevano valori elevati di anti-tTG IgG e presentavano solo un moderato deficit di IgA totali (0,68-0,82 g/L). Questi risultati indicano la scarsa utilità della determinazione degli anticorpi anti-tTG IgG anche nei casi con deficit severo di IgA totali, dove potrebbe avere una qualche utilità la determinazione degli anticorpi anti-gliadina IgG<sup>10</sup>.

## CONCLUSIONI

Possiamo pertanto concludere, sulla base dei dati presenti in letteratura e di quanto presentato in questo studio, che la gli anticorpi anti-tTG sono un indice sensibile e specifico per la diagnosi ed il follow-up della malattia celiaca nel bambino. E' consigliabile comunque optare per i metodi che utilizzano l'antigene umano ricombinante o purificato, rispetto a quelli che utilizzano l'antigene murino, e per quelli che consentono l'identificazione degli anticorpi di classe IgA rispetto alle IgG, poiché garantiscono i migliori livelli di accuratezza diagnostica. La determinazione ELISA delle IgA anti-tTG utilizzando sistemi con antigene umano, è preferibile ed alternativa rispetto agli EMA perché:

- a) è altrettanto accurata per la diagnosi ed il monitoraggio della malattia celiaca,
- b) è una determinazione operatore indipendente,
- c) presenta il vantaggio, rispetto agli EMA, di essere automatizzabile.

*Per corrispondenza:*

Dott. Mario Plebani  
 Dipartimento di Medicina di Laboratorio  
 Azienda Ospedale-Università di Padova  
 Via Giustiniani 2, 35128 Padova  
 e-mail: mario.plebani@sanita.padova.it

## BIBLIOGRAFIA

1. **Sollid LM.** Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;2:647-55.
2. **Ciclitira PJ.** AGA technical review of celiac sprue. *Gastroenterology* 2001;120:1526-40.
3. **Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al.** Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat med* 1997;3:797-801.
4. **Martini S, Mengozzi G, Aimo G, et al.** Comparative evaluation of serologic tests for celiac disease diagnosis and follow-up. *Clin Chem* 2002;48:960-3.
5. **Salmaso C, Ocmant A, Pesce G, et al.** Comparison of ELISA for tissue transglutaminase autoantibodies with antiendomysium antibodies in pediatric and adult patients with celiac disease. *Allergy* 2001;56:544-7.
6. **Basso D, Gallo N, Guariso G, et al.** Role of anti-transglutaminase (anti-tTG), anti-gliadin and anti-endomysium serum antibodies in diagnosing celiac disease. *J Clin Lab Anal* 2001;15:112-5
7. **Wong RCW, Wilson RJ, Steele RH, et al.** A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. *J Clin Pathol* 2002;55:488-94.
8. **Clemente MG, Musu MP, Frau F, et al.** Antitissue transglutaminase antibodies outside celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:31-4.
9. **Basso D, Guariso G, Plebani M.** Serologic testing for celiac disease. *Clin Chem* 2002;48:2082-3.
10. **Tesei N, Sugai E, Vazquez H, et al.** Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase may detect coeliac disease patients undiagnosed by endomysial antibodies. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1415-23.