



Coeliakia: klinikai laboratóriumi vonatkozások

Laboratóriumi továbbképzés

Kenesei Éva

2016.05.18.

Témakörök

- Történeti áttekintés, diagnosztikus lehetőségek
- ESPGHAN coeliakia klinikai guideline ismertetése.
- Szerológiai módszerek fejlesztési iránya
- Gyorstesztek
- Más antitest alapú tesztek
- Új biomarker jelöltek

Általános laboratóriumi eltérések coeliakiában

A vékonybél nyálkahártya morfológiai és funkcionális elváltozás következményét jelző eltérések:

- Alacsony szérum összfehérje
- Ca, P, Zn, Fe
- Vértkép, vas hiányos anaemia,
- Vitaminok: D, A, E, K, folát , B12

Jellemző a steatorrhoea- széklet szír > 4 g /nap

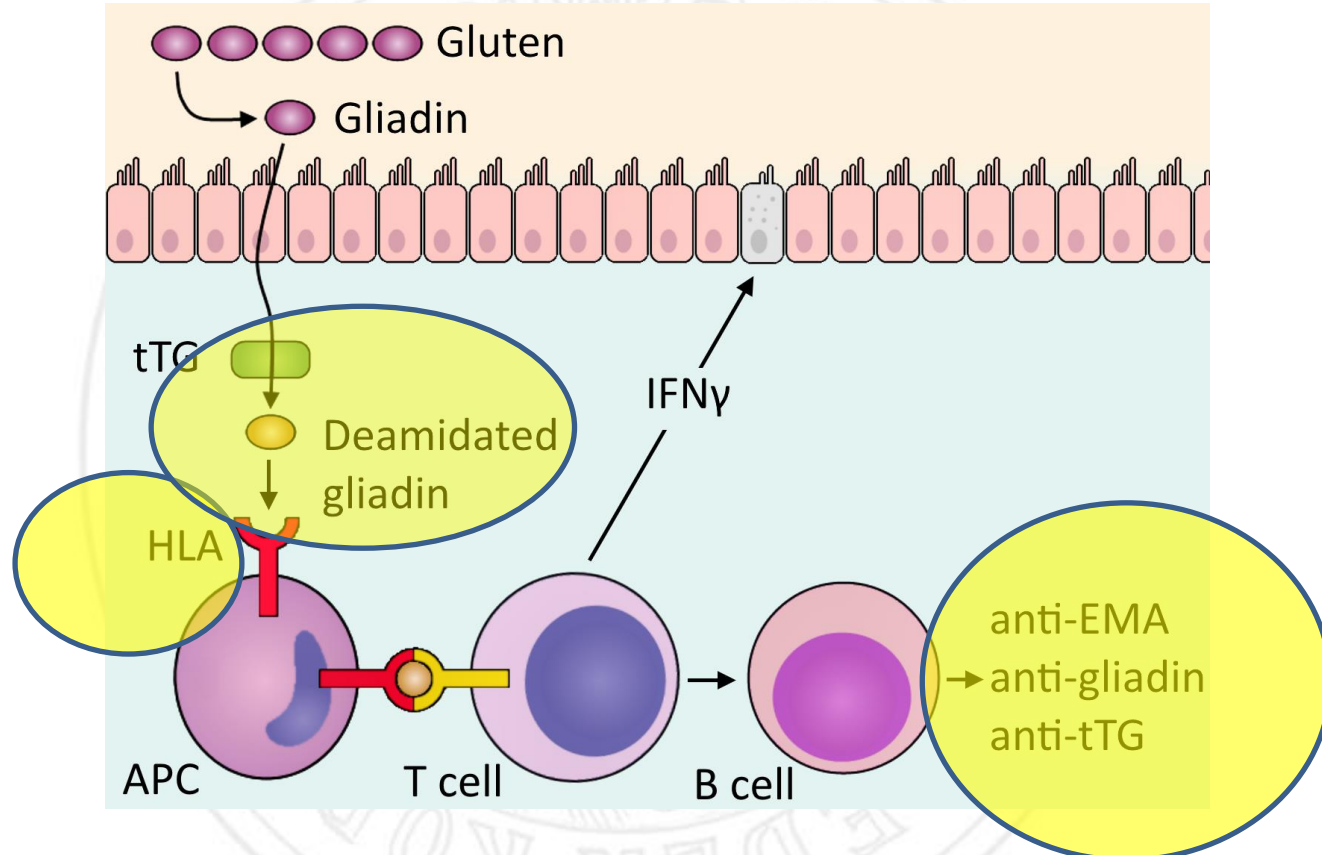
A vékonybél nyálkahártya transzport zavarát jelző D-xilóz teszt kóros

A pontos diagnózist vékony biopsziás minta mucosa károsodás vizsgálatán alapult.

Coeliakia diagnózisának történeti áttekintése

- **1960** előtt - klinikai gyanú, tünetek, biopszia- szövettan
- **1971** Seah - reticulin antitest (ARA)- specifikus, de nem szenzitív
- **1982** Gliadin antitest (AGA) Sens 70%; Spec 70%
- **1983** Chorzelski - Endomysium antitest IFA (EMA) Sens 70 – 90%; Spec 100%
- **1997** Dieterich- szöveti transzglutamináz antitest –ELISA (tTG) Sens és Spec 90 – 95%
- **2005**: Anti-deamidált gliadin: Sens 85%, Spec 90%
- HLA DQ genetikai vizsgálatok

Gliadin és transzglutamináz ellen termelődő antitestek keletkezési mechanizmusa



A coeliakiában jellegzetes autoantitestek mutathatók ki, melyek célpontja a TG2 fehérje. A specifikus antitestek glutén dependensek és csak HLA-DQ2/DQ8 hordozó személyeknél termelődnek.

A diagnosztika eszközei

CD- specifikus antitest vizsgálat

HLA vizsgálat; HLA-DQ2 és HLA-DQ8

Vékonybél biopsziás minta hisztológiai vizsgálat

Antitestek

Coeliakiában jellegzetes autoantitestek mutathatók ki, amelyeknek célpontja a TG2 fehérje.

- **Anti-tTG/TG2 (szöveti transzglutamináz) IgA, IgG**
- **Endomysium antitest (IgA)**
- **Anti- DGP (Deamidált Gliadin Peptid) IgA, IgG**
- Anti-Gliadin/ Anti Reticulin antitest

A specifikus antitestek gluten dependensek és csak HLA-DQ2/DQ8 hordozó személyeknél termelődnek.

Anti-szöveti transzglutamináz antitest (tTG)

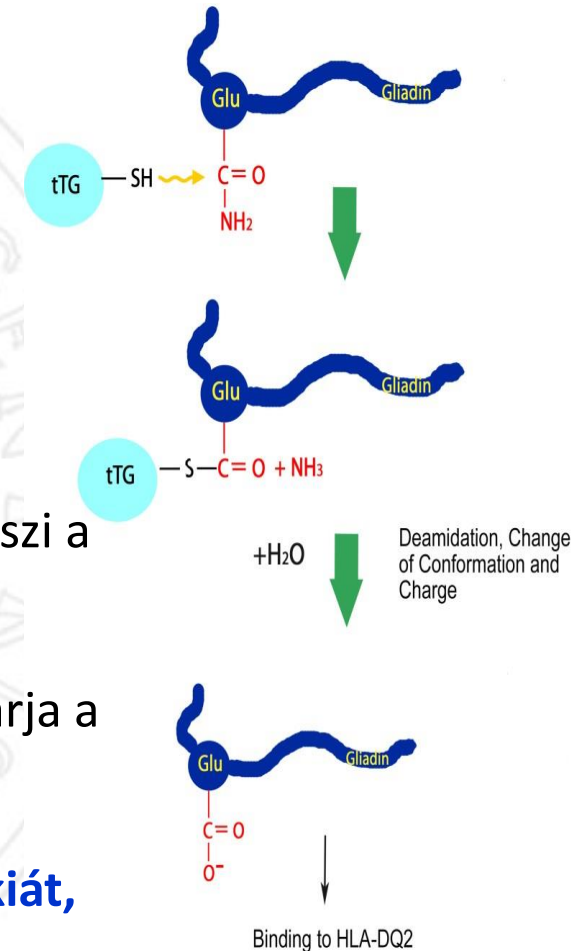
- Az enzim test szerte megtalálható (agyszövet, bőr, belek)
- Fő autoantigén coeliakiában, EMA ellenes antigén
- Elsősorban IgA anti-TG2 termelődik, de a betegek egy részében IgG is.
- **Ál pozitív:**
más autoimmun megbetegedéseknél, infekció, tumor, szövetkárosodás
- **Ál negatív:**
Korai vagy gyenge megbetegedés esetén, gyermekeknél < 2 éves kor alatt, csökkent glutén bevitel, súlyos tünetek, immunoszuppresszív kezelés, IgA hiány (coeliakiások 10-20 %-nál), technikai hiba

Eredmény értékelése

- tTG IgA jelenléte specifikus coeliakiában
- tTG IgA mérsékelt vagy erősen pozitív: valószínű a coeliakia- de meg kell erősíteni a diagnózist
- tTg IgG- pozitivitás jelezheti a coeliakiát, különösen, IgA hiányos betegeknél
- Anti-tTG titer a referencia érték >10 –szerese: erősen valószínű a coeliakia, a súlyos boholy atrophia (Marsh3). Tünettel rendelkező betegnél további laboratóriumi vizsgálatokkal (EMA, HLA) megerősítve a diagnózist, elkerülhető a biopszia.
- A megerősítő vizsgálatokra a mintavétel egy más alkalommal történjen (technikai hiba kiszűrése miatt)
- A diéta megkezdése után fél egy éven belül a tTG IgA titere csökken, a titer normál érték alá csökkenése függ a kezdeti titer értékétől.
- A vizsgálat előtt bevezetett glutén-mentes diéta esetén a teszt negatív eredményt adhat!

Deamidált gliadin peptid antitest (IgA és IgG)

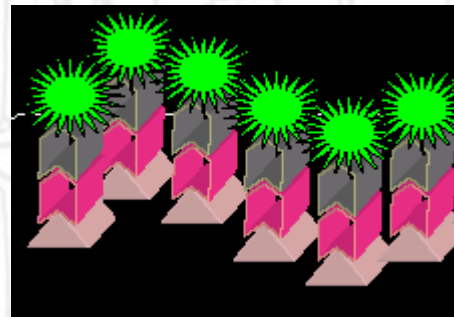
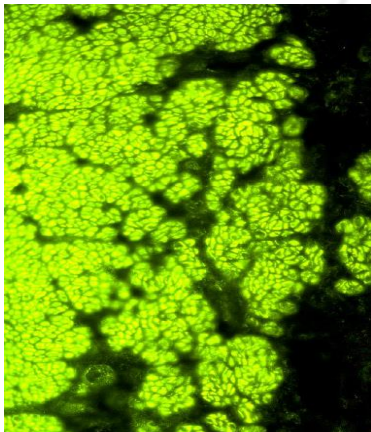
- A teszt a tTG által deamidált gliadint mutatja ki
- Érzékenyebb és specifikusabb, mint a régi módosítatlan gliadin antitest vizsgálat
- A teszt a tTG –antitest vizsgálatot nem helyettesíti,
- Negatív eredmény (diétamenteseknél) valószínűtlenné teszi a coeliakiát
- Az eredmény önmagában nem igazolja és nem is nem zárja a betegséget.
- **Két év alatti gyermekeknél érzékenyebben jelzi a coeliakiát, mint tTG antitest, a mucosa károsodást érzékenyen jelzi**



Endomysium IgA antitest (EMA)

Antitest kimutatás indirekt immunfluoreszcens eljárással történik

Szubsztát: simaizmokot tartalmazó szövet metszet (majom nyelvcső/
humán köldökzsín)



FITC-jelzett anti-IgA
Szérum antitest
Szöveti antigén

Közel 100%-ban specifikus coeliakiára

Értékelése : negatív/pozitív (hígítási fok megadásával) szakemberigényes

Amennyiben nincs festődés, IgA hiány feltételezhető

Pozitív EMA normál biopsziás eredmény mellett is coeliakiát jelez-
megjelenése megelőzheti a a boholyatrophia kialakulását

Laboratóriumi szempontok

- Speciális CD diagnosztikát végző laboratóriumnak folyamatosan részt kell venni belső és külső minőségellenőrzési vizsgálatokban .
- Az alkalmazott teszt validált legyen pl:EMA referencia standardra
- Az egyes tesztek között szenzitivitásában, specificitásában, normál küszöbértékben lehetnek különbségek
pl: anti-tTG - különböző generációs tesztek léteznek
- A laboratóriumnak meg kell adni az alkalmazott teszt felső normál küszöbértékét
- EMA vizsgálatnál közölni kell a cut off hígítási fogát. Megadható a legnagyobb hígítás, amelynél még pozitív a teszt. Jelezni kell, milyen szövetet használ a labor szubsztrátként. A vizsgálat kivitelezése során ügyelni kell a lehetséges rebound effektusra (magas ellenanyag titer).

Az eredmények megfelelő interpretálásához szükséges további szempontok

- a beteg kora
- a beteg IgA szérum szintje, IgA kompetens egyéneknél elsődlegesen a IgA antitest eredmény a mérvadó
- a beteg glutén fogyasztási szokásai (glutén mentes diéta esetén a negatív eredmény nem értékelhető)
- Részesül e a beteg immunsuppresszív kezelésben

Serological test	Sensitivity %	Specificity %	Antibody isotype
Anti-tTG	91-95	95-97	IgA and IgG
Anti-endomysal	85-98	95-100	IgA
Anti-gliadin	58-75	85-95	IgA and IgG
Anti-deamidated gliadin peptid	86-90	93-96	IgA and IgG

Michael X Ma et al. Diagnostic dilemmas in celiac disease Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol 7(7),643-655 (2013)

Endoszkópia és biopszia, histopatológia

Normal vékonybél

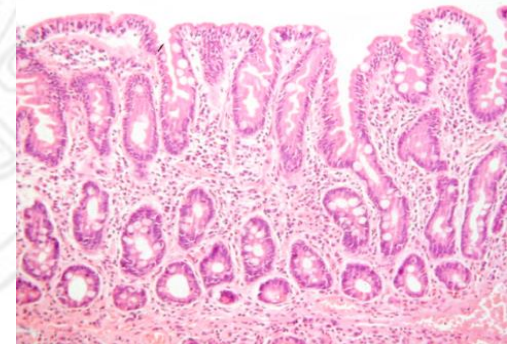
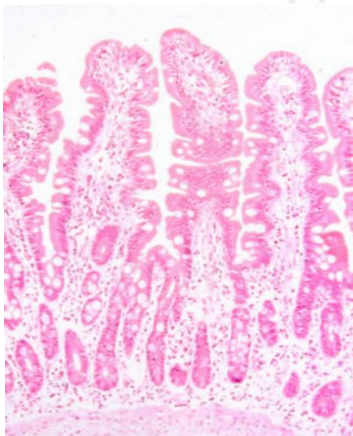
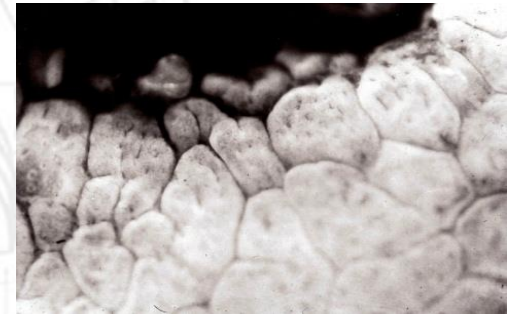
Coeliakiás beteg vékonybél



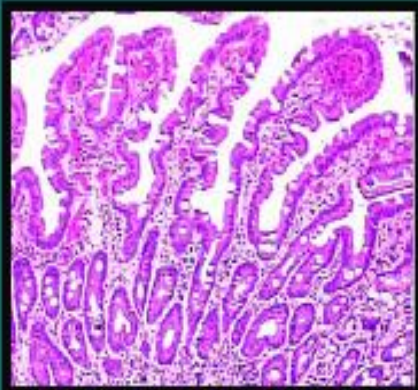
Gluten



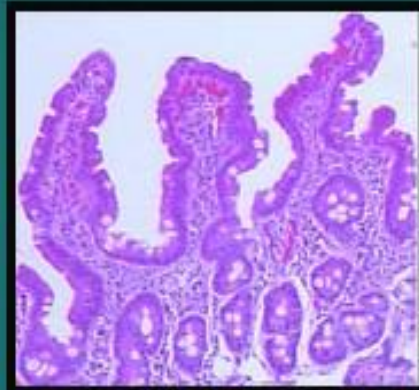
Gluten-mentes diéta



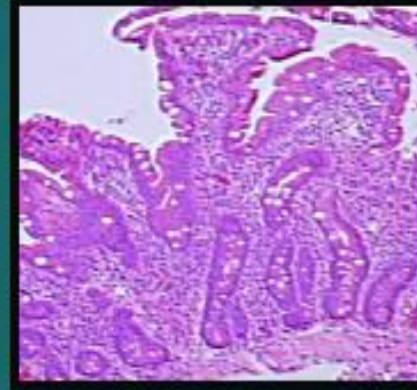
Módosított MARCH besorolás



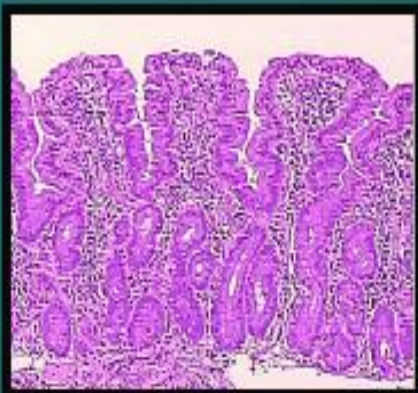
Normal 0



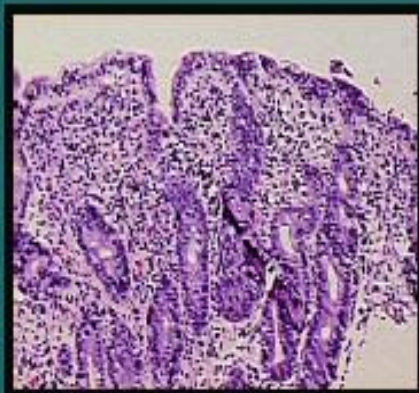
Infiltrative 1



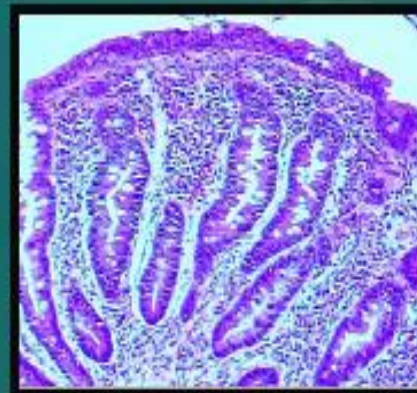
Hyperplastic 2



Partial atrophy 3a



Subtotal atrophy 3b



Total atrophy 3c

Genetikai vizsgálatok

- Több gén vesz részt a betegség kialakulásában
- A HLA DQ2 /DQ8 egyike, vagy mindkettő állandóan jelen van, szükséges feltétel a coeliakia kialakulásában, de nem elegendő.
- A gén hordozása nem valószínűsíti a megbetegedését, azonban a CD-ben megtalálható
- Anti TG2 és EMA csak HLA-DQ2 vagy DQ8 adottságú személyekben termelődik

Gének



+

Glutén**Coeliakia**

HLA tipizálás

- HLA DQ2 and DQ8
 - Erős negatív prediktív értéke van
 - A coeliakiások >95%-ban megtalálható
 - A normál populáció 25-30%-ban hordozza
 - Gyenge a pozitív prediktív értéke



ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosis of Coeliac Disease)

Klinikai Guideline 2012

Kiket vizsgáljunk ?

1. csoport : gyermekek és felnőttek, akiknek más okkal nem magyarázható tünetei vannak

- Krónikus intermittáló hasmenés
- Növekedési elmaradás, fogyás
- Kései pubertás, amenorrhoea
- Vashiányos anaemia
- Hányinger, hányás
- Hasi fájdalom
- Krónikus fáradtság
- Visszatérő fekélyek

2. csoport: tünetmentes gyermekek és felnőttek

- 1-es típusú diabetes
- Down szindróma
- Autoimmun pajzsmirigy megbetegedés
- Turner szindróma
- Szelektív IgA hiány
- Autoimmun májbetegség
- A coeliakiások első fokú rokonai

Child / Adolescent with Symptoms suggestive of CD

Anti-TG2 IgA & total IgA*

Anti-TG2 positive

Anti-TG2 negative

Not CD

Transfer to Paediatric GI

Paed. GI discusses with family the 2 diagnostic pathways and consequences considering patient's history & anti-TG2 titers

Consider further diagnostic testing if:
IgA deficiency
Age: < 2 years
History: - low gluten intake
- drug pretreatment
- severe symptoms
- associated diseases

Pos. Anti-TG2 > 10 x normal

Pos. Anti-TG2 < 10 x normal

EMA & HLA DQ8/DQ2

Not available

OEGD & biopsies

EMA pos.
HLA pos.

EMA pos.
HLA neg.

EMA neg.
HLA neg.

EMA neg.
HLA pos.

Marsh 0-1

Marsh 2 or 3

CD+

Consider false neg. HLA test.
Consider biopsies

Consider false pos. anti-TG2

Unclear case

Consider:
false pos. serology
false neg. biopsy or potential CD
Extended evaluation of HLA/serology/biopsies

CD+

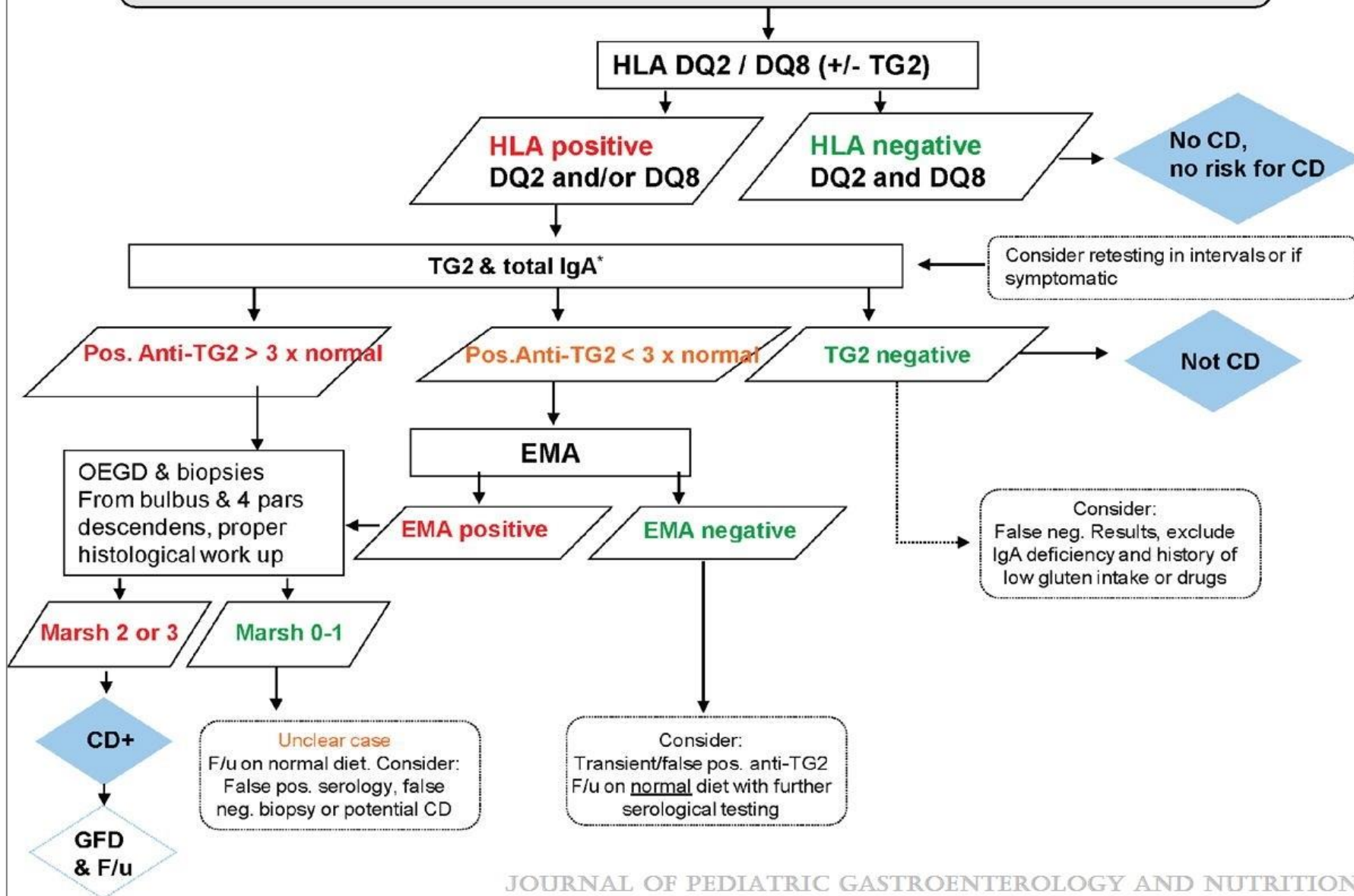
GFD & F/u

GFD & F/u

Symptomatic patient. CD= coeliac disease; EMA= endomysial antibodies; F/u= follow-up; GFD= gluten-free diet; GI= gastroenterologist; HLA= human leukocyte antigen; IgA= immunoglobulin A; IgG= immunoglobulin G; OEGD= oesophagogastroduodenoscopy; TG2= transglutaminase type 2.

Asymptomatic person at genetic risk for CD

Explain implication of positive test result(s) and get consent for testing



Miért szükséges más algoritmust használni szimptómás ill. tünetmentes, de veszélyeztetett betegeknél ?

1. Az ál pozitív vagy tranziens TG2 gyakoribb a genetikailag veszélyeztetetteknél, mint a szimptómás betegeknél

2. Normál hisztológiai esetén (Marsh 0) a TG2 titer általában alacsony, a norm. felső érték $<3x$ -a.

Tünetmentes betegnél alacsony antitest titer esetén a biopsziával lehet várni, szimptómásoknál a hasonlóan alacsony titer esetén tovább kell lépni a definitív diagnózis érdekében .

Új módszerek

Célkitűzés:

- az invazív beavatkozás, biopszia csökkentése érdekében a szerológiai módszerek további fejlesztése,
- gyorsdiagnosztikai módszerek
- további új biomarkerek, non-invazív módszerek kifejlesztése a pontos diagnosztikára és a betegségység nyomon követésére.

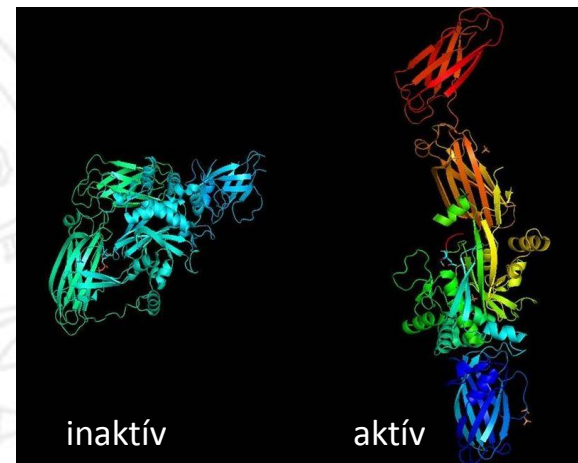
tTG antitest alapú szerológiai tesztek fejlesztése

1. szenzitivitás növelése

A TG2 – két konformációja van,
– zárt (enzimatisan inaktív)
– nyitott (katalitikusan aktív)

Az aktív konformációt használó ELISA tesztek érzékenyebbek.

Alkalmazása: -glutén mentes diétát megszegők monitorozása
-rövid ideig tartó glutén challenge esetén kis autoantitest válasz kimutatása,
-gyógyszerkipróbálások

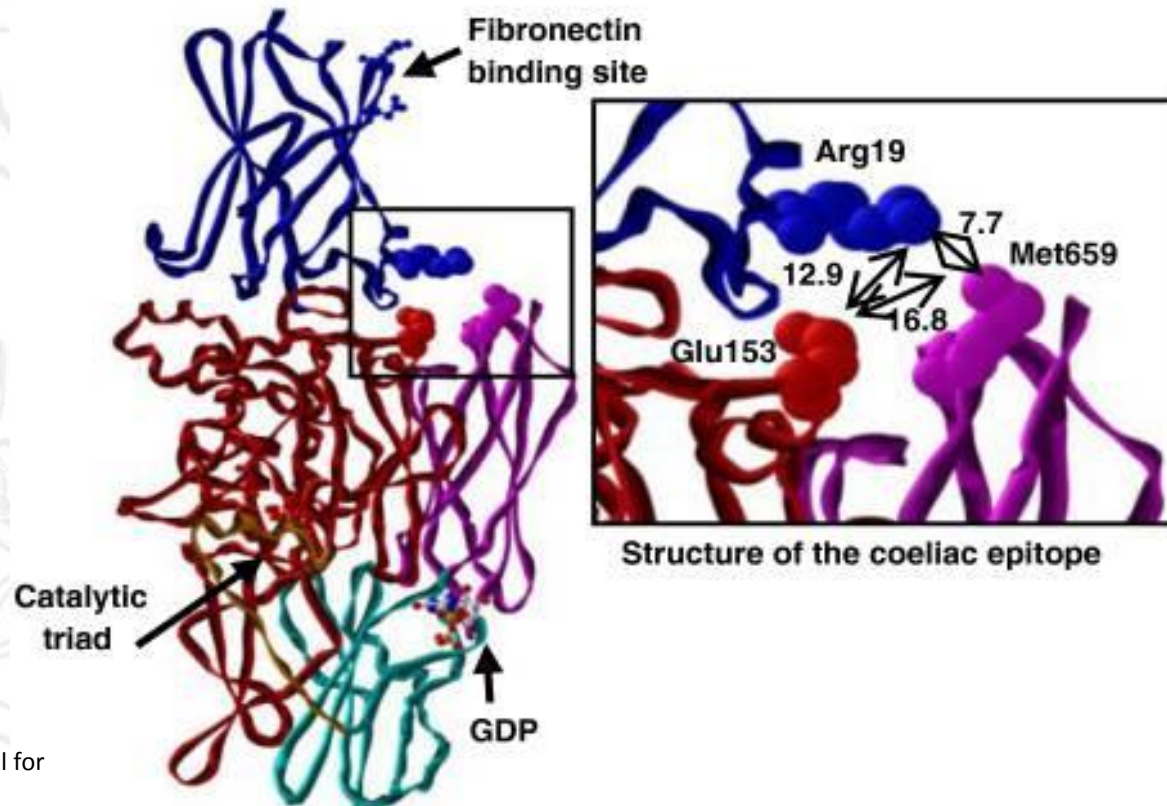


tTG struktúra megismerése, tesztek fejlesztésének iránya

Ismert a TG2 coeliakia-specifikus epitópja, fontos a konformáció megőrzése, hogy a teszt hatékony legyen.

A humán recombináns TG2 általában megfelel a követelményeknek, sen 93%, spec 95%. Korábbi tesztekben tengerimalac májkivonat TG2 antigén ill. humán erythrocyta antigént használtak.

A coeliakia specifikus autoantitest epitóp

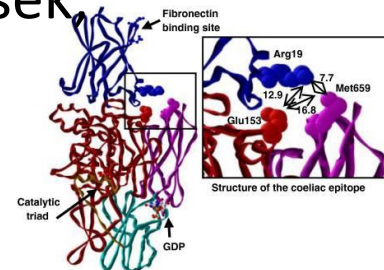


Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, et al. A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects.

tTG antitest alapú szerológiai tesztek fejlesztése 2. specifitás növelése

Ál pozitív eredményt, alacsony TG2 antitest titert mutatnak az autoimmun megbetegedésben szenvedők : lupus erythematosus, type 1. diabetes, thyroid megbetegedések, Sjögren's szindróma, rheumatoid arthritis stb.

A hagyományos teszt nem elég specifikus.



Új felismerés: coeliakiás betegek szérum antitestjei specifikusan felismerik a három aminosav által kialakított, strukturális TG2 epitópot. Más autoimmun betegek szérum antitestjei nem.

Új elgondolás: vad- típusú TG2 és coeliakia- specifikus epitópot hordozó TG2 alapú teszttel elkülöníthető lenne a coeliakia asszociált antitest a nem specifikus TG2 –vel reagáló állapotoktól.

POCT tesztek

Előnyei:

gyors eredmény, alacsony költség, családszűrés, diéta monitorozása, használata fejlődő országokban, ahol nincs laboratóriumi háttér

Gyorsteszttel a coeliakia diagnózisa nem állítható fel!

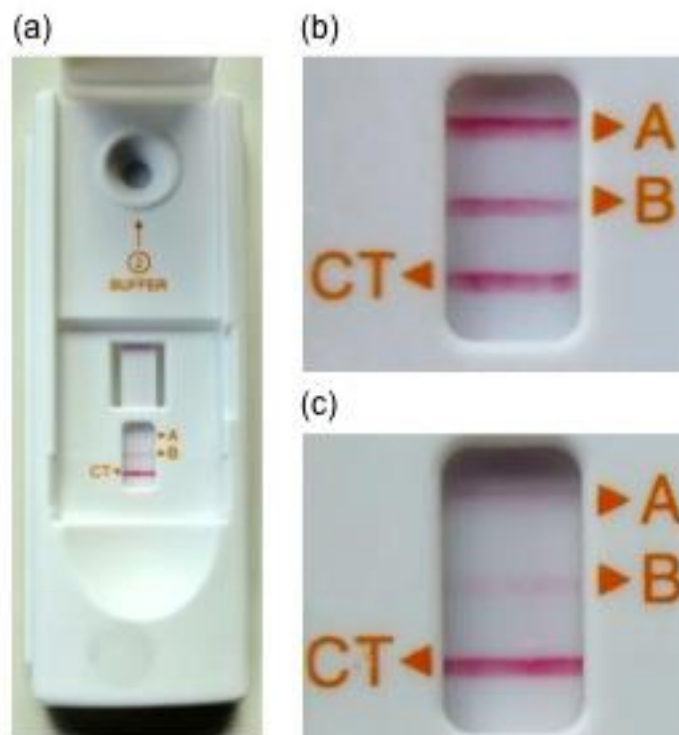
Módszerek:

1. Hemolizált vörösvértest eredetű TG2 alapú szerológia- kezeletlen coeliakiásoknál sens 97% *, gluténmentes diéta monitorizálására eredményes
IgA hiányban- fals negatív
2. IgA / IgG DGP antitest kimutatás- gyermekeknél (coeliakia gyanús csoport) sens 93% spec 95%,**
Fals pozitívitás –genetikailag kizárt betegeknél

*Korponay-Szabó IR et al. Coeliac disease case finding and diet monitoring by point-of care testing. Aliment Pharmacol Ther 2005;22:729-37

**Biennvenu F et al. Evaluation of a point-of-care test based on deamidated gliadin peptides for celiac disease screening in a large pediatric population. Eur J Gastroenterol Hepatol 2012;24:1418-23

Presentation of the POCT device. a) Result interpretation of the POCT device with the 3 bands: A line corresponds to IgA/IgG DGP, B line to Total IgA, and CT line to control. b) Picture of the test after 10 minutes incubation. Result represents a celiac positive (A line) with normal IgA levels (line B). c) Representation of a false positive result with a thin line A after 10 minutes. This band becomes stronger after 30 minutes of incubation (picture not showed)



Claude-Olivier Marti et al. Evaluation of a DGP Point-of-care Test for Celiac Disease in a Pediatric Population. International Journal of Celiac Disease, 2015, Vol. 3, No. 1, 7-11. doi:10.12691/ijcd-3-1-8

© The Author(s) 2015. Published by Science and Education Publishing.

Új biomarker jelöltek 1.

I-FABAP (Intestinal Fatty Acid Binding Protein)

- Bél epithel sejt cytoplazmában található - mucosa károsodás esetén gyorsan felszabadul, keringésbe kerül
- Kezeletlen coeliakiásoknál magasabb, mint nem coeliakiásoknál. Glutén mentes diéta során csökken. Vékonybél károsodást gyorsan jelző marker
- Koncentrációja a mucosa károsodással arányos

Felhasználási terület: coeliakia gyógyszerkifejlesztése során használható, nem invazív kiegészítő marker.

Hátrány: egyéb mucosa károsodásban is jelez pl: Crohn betegség

Új biomarker jelöltek 2.

CYP3A4 katalizált Simvastatin metabolizmus mérése

- A cytochrome P450 3A4-t a bélbolyhok epithel sejtjei expresszálják– a simvastatin metabolizálásáért felelős
- Boholy atrophia esetén expressziója csökken
- Kezeletlen coeliákiásoknál oralis simvastatin vér koncentráció bizonyítottan szignifikánsan magas, mivel nem metabolizálódik CYP3A4 hiányában
- A boholy károsodást 90%-os* pontossággal jelzi.

*Morón B et al. CYP3A4-catalysed simvastatin metabolism as a non-invasive marker of small intestinal health in celiac disease. Am J Gastroenterol 2013;108:1344-51

Új biomarker jelöltek 3.

Interferon- γ (INF- γ) mérése (ELISpot módszer)

- Rövid, három napos glutén-challenge estén is már a perifériás vér T-sejt válasza INF- γ méréssel igazolható.

Felhasználási terület:

Coeliakia pontos diagnózisa nélkül bevezetett glutén-mentes diéta esetén sem a coeliakia specifikus antitestek sem a hisztológia nem ad egyértelmű diagnózist.

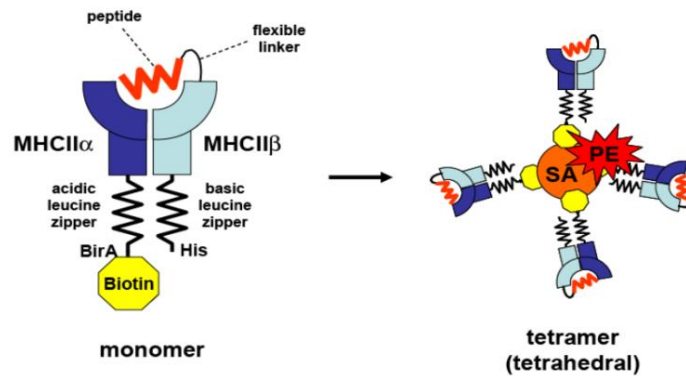
A pontos diagnosztika érdekében glutén adást kell indítani- rövid ideig tartó gluten provokáció hatása INF- γ méréssel igazolható

Hátrány:

a módszer szenzitivitása alacsony, további fejlesztést igényel.

Új biomarker jelöltek 3

Glutén-reaktív CD4+ T-seit kimutatása vérben flow cytometriával



PE = phycoerythrin SA = streptavidin

Flow cytometriás analízist jelzett gliadin tetramerrel párosítva a gliadin-specifikus T-sejtek kimutathatók a vérben

A sejtek gluténmentes diéta bevezetése után is megtalálhatók a keringésben.

Alkalmazása:

Glutén-mentes diéta elkezdése diagnózis nélkül és egyéb olyan bizonytalan esetekben, amikor glutén terhelésre lenne szükség.

A tetramerek alkalmazásával a biopsziák az esetek többségében elkerülhetőek.

Új biomarker jelöltek 4

Coeliakiások intestinalis microbiota profilja és specifikus micro-RNS profil vizsgálat.

Microbiota: Jelenleg még nem ismert a coeliakia specifikus microbiota mintázat, ezért ennek megvalósítása kérdéses.

Micro-RNS: ismert, hogy kezeletlen coeliakiások vékonybél mucosa micro-RNS expressziója megváltozott és hasonló profil található a vérben is.

Ponteciális új non-invazív biomarker lehet a keringő mikro-RNS mintázat vizsgálata.

Összefoglalás

A DIAGNÓZIS ÉS KEZELÉS EGY ÉLETRE SZÓL

- a diagnózis felállítását nagy körültekintéssel kell végezni.
- a beteg ne kezdjen glutén-mentes diétát a diagnózis felállítása előtt.
- Az alkalmazott tesztek érzékenysége, specificitása és minőségbiztosítása kiemelten fontos.
- Alul diagnosztizált kórkép a coeliakia-sceening vizsgálatok indokoltak

Vizsgált markerek

- **Total IgA** vizsgálat a szelektív IgA hiány kimutatására
- **Anti -tTG (IgA és IgG)**
>10 –szeres IgA titer emelkedés erősen valószínűsíti a CD diagnózist
- **Anti-Deamidált gliadin peptid (IgA és IgG)**
2 éves kor alatt szenzitívebb mint tTG
- **Anti EMA** IgA –legspecifikusabb és legszenzitívebb

A specifikus antitestek glutén-mentes diéta során hiányozhatnak

- **HLA DQ 2 & HLA DQ 8**
A negatív eredmény kizárja a CD diagnózist