

L'evoluzione della diagnostica nella malattia celiaca

Ricca V., Ferrero P., Bairo A.

Laboratorio Analisi - Ospedale Koelliker - Missionari della Consolata - Torino

La sopraggiunta disponibilità di tests sierologici sempre più semplici, sensibili e specifici, ha comportato una revisione della diagnostica della **malattia celiaca (MC)** o secondo alcuni Autori della **intolleranza al glutine geneticamente determinata (IGGD)**, con la conseguenza che l'incidenza epidemiologica, un tempo variante tra 1:300 e 1:6000, a seconda delle zone, è diventata 1:100 o meno e, anche negli USA, dove sembrava essere una questione di patologia quasi marginale, si è dimostrata in realtà essere simile (1).

- LAGLIADINA

La gliadina è la frazione glicoproteica alcool-solubile del glutine, cioè della frazione proteica più importante che si ricava dall'endosperma del grano. Anche le prolamine presenti in orzo, segale ed avena sono strutturalmente simili alla gliadina, e contengono sequenze aminoacidiche ricche in glutamina e prolina. L'avena secondo recenti osservazioni pare essere meno tossica, ma presenta sequenze aminoacidiche simili a quelle dell'A gliadina, che sono ritenute essere un epitopo critico, e pertanto forse solo la sua minor frequenza relativa la renderebbe meno tossica. Strutturalmente le gliadine sono quattro frazioni proteiche, che mediante elettroforesi si possono separare in: alfa, beta, gamma, omega e la prima è la più tossica. All'interno dell'alfa una sequenza di 266 AA è la porzione sicuramente più importante (A- gliadina) e nel suo contesto l'epitopo più tossico è caratterizzato da una sequenza di circa 19 AA(2).

- ASPETTI GENETICI

Il meccanismo con cui avviene il danno, non ancora del tutto chiarito, è attribuito ad un'anomalia del metabolismo di queste proteine, che, producendo sostanze tossiche, danneggerebbero la mucosa intestinale legandosi ad un recettore cellulare presente sull'enterocita. La comparsa del danno è geneticamente determinata, infatti il rischio di malattia tra i parenti di primo grado di malati di forma franca è del 2- 5%,

e di circa il 10 % per quelli di malati con la forma latente.

La **malattia celiaca (MC) o intolleranza al glutine geneticamente determinata (IGGD)** è una condizione HLA - linked. In particolare correla con l'aplotipo HLA DQ2, codificato dalla combinazione allelica DQA1*0501 e DQB1*0201, che è presente nel 98% dei celiaci NordEuropei ed è ereditata in cis mediante DR3 negli omozigoti e in trans mediante DR5, DR7 negli eterozigoti. L'associazione con DR3 si ritiene avvenire per *linkage disequilibrium* con DQ2. Di rilievo nel Sud Europa è il genotipo DQ2 (92% dei soggetti celiaci). Poiché però un quarto circa della popolazione è DQ2, oltre all'aplotipo sono necessarie altre condizioni genetiche ad azione modulante, non HLA linked.

- ASPETTI IMMUNOLOGICI

I T linfociti sensibili al glutine, presenti nell'intestino, riconoscono gli epitopi peptidici presentati nel contesto dell'HLA di classe seconda (DQ2). L'attivazione dei CD4+ conduce ad una risposta infiammatoria Th1/Th0 a livello della mucosa duodenale con conseguente danno. Come già detto l'epitopo critico sembra essere una sequenza peptidica di 19 AA dalla regione N - terminale dell'A-gliadina. Lavori in vitro hanno evidenziato la capacità di danno indotta da tale peptide, del quale è anche stata dimostrata la capacità di legame al DQ2 e di attivazione di T cellule di derivazione ematica. Interessante e probabilmente implicato nella patogenesi della MC o IGGD è la rilevante presenza di linfociti T con recettore / nella mucosa dei soggetti affetti, sia trattati che non (3). L'evidenza nella mucosa di tali linfociti è considerato un segnale precoce e specifico dell'enteropatia. Si ritiene che la loro implicazione patogenetica possa essere duplice: a) progressiva atrofia dei villi mediante l'alterato *turn over* riproduttivo b) iperplasia delle cripte per l'aumentata attività proliferativa (4). Nel 1997 il gruppo di Walburga Dieterich (5) ha identificato nell'enzima transglutaminasi tissutale (t-TG) il bersaglio degli anticorpi antiendomizio (AEA o EMA). La t-TG è implicata nei fenomeni di apoptosi cellulare e di

riparazione. La gliadina, molto ricca di glutamina, rappresenta un substrato ad alta affinità per la t-TG e sarebbe in grado di determinare una risposta autoanticorpale specifica con due modalità: a) alterandone la struttura molecolare con conseguente formazione di *neopeptidi* b) attaccandosi in funzione di *carrier* e determinando quindi una desegregazione od una perdita del suo stato di antigene self (6). Altri autoantigeni però potrebbero essere coinvolti in sequenza nella reazione autoimmune glutine dipendente, con conseguente risposta immune autoaggressiva successiva all'azione flogistica iniziale indotta dalla gliadina. La successiva produzione di autoantigeni comporterebbe la comparsa di numerosi autoanticorpi organo-specifici in molti celiaci, responsabili di quadri clinici di autoimmunità correlati con la IMC (IGGD). A tal proposito va detto che, se il rischio di sviluppare malattie autoimmuni è trascurabile in caso di diagnosi di MC (IGGD) formulata nei primi due anni di vita, esso supera il 25% se la diagnosi è formulata dopo i dieci anni.

Interessante appare l'ipotesi che l'adenovirus 12, per omologia di sequenza tra gliadina A e la sua proteina E16, possa scatenare la malattia in soggetti geneticamente predisposti, per un errore del sistema immune, che risponderrebbe contro le gliadine presenti nell'intestino senza però riuscire a distruggere il virus. Va detto però che se è vero che anticorpi antiadenovirus 12 si sono trovati in pazienti con malattia in fase attiva, il DNA dell'adenovirus 12 non è un frequente riscontro nel duodeno di soggetti malati (7).

- LA MUCOSA INTESTINALE NORMALE E CELIACA

La mucosa intestinale normale contiene cellule linfoidi, plasmacellule e T linfociti, in ampia variabilità numerica, macrofagi e rari eosinofili, che nell'insieme vengono a costituire il MALT (= *mucosa associated lymphoid tissue*), anche detto GALT (= *gut*) nelle vie digerenti e BALT (= *bronchus*) nelle vie aeree. La mucosa normale del piccolo intestino non contiene leucociti neutrofili.

Lo sviluppo delle lesioni della MC (IGGD) nella mucosa intestinale è un processo *non di tutto o nulla*, ma dinamico e modulabile, che si presenta in vari stadi e con diversi aspetti. Tra i due estremi: mucosa piatta e mucosa normale, si incontra infatti tutta una serie di variazioni morfologiche che riguardano i villi, l'architettura delle cripte, la densità cellulare della lamina propria ed i linfociti intraepiteliali (IEL).

In una mucosa con normale architettura l'unico dato anomalo è il numero elevato di IEL. Tale incremento, presente anche nello stomaco e nel grosso intestino, è il più sensibile indice di danno indotto dal glutine, e pertanto è il dato singolo più rilevante nella MC (IGGD).

I linfociti T identificabili come IEL differiscono dai linfociti periferici e degli organi linfoidi non mucosali e sembrano svilupparsi almeno in parte nell'intestino e non nel timo. Di funzioni ancora incompletamente sconosciute, essi producono citochine, fattori epiteliali di crescita ed esprimono HML-1, E 7 integrina, antigene espresso anche dal 50 % dei linfociti della lamina propria (LpL) ma non dai T linfociti periferici. Il 95% sono CD3+CD2+ ed il 70-90% sono CD8+ (alcuni esprimono solo la catena α come omodimero CD8 - piuttosto dell'eterodimero CD8 $\alpha\beta$). Molti IEL contengono granuli a contenuto citolitico e si ritengono essere T citotossici. Il 90% dei T linfociti ha TCR $\alpha\beta$ e solo il 10% presenta $\gamma\delta$, ma questi ultimi appaiono aumentati nella malattia celiaca attiva, nei famigliari di malati, nella dermatite erpetiforme e nei casi in cui, dopo la dieta senza glutine, il numero di IEL non si normalizza.

Tale incremento di IEL $\alpha\beta$ non è esclusivo della malattia celiaca, ma si riscontra anche nell'enteropatia da intolleranza proteica al latte vaccino e nella sindrome post-enterite.

Per la diagnosi di malattia celiaca si contano 100 - 200 cellule epiteliali e gli IEL osservati vengono espressi come IEL/100 cellule epiteliali (EC). Normalmente la mucosa intestinale contiene sino a 40 IE/100 EC, pertanto un valore >40 è indice di reazione immunologica in corso. Da solo il conteggio degli IEL non è diagnostico di MC (o IGGD). Vanno infatti considerate nella diagnosi differenziale: la giardiasi, l'intolleranza proteica al latte vaccino (IPLV) ed altre intolleranze proteiche, la sprue tropicale, l'enteropatia autoimmune. Talora comunque un aumento di IEL si osserva anche in pazienti senza apparenti patologie.

Nei celiaci la mucosa intestinale del piccolo intestino istologicamente presenta un incremento della cellularità nella lamina propria in sede lesionale, particolarmente evidente nei due terzi superiori. Le plasmacellule produttrici *in loco* AGA ed EMA sono preponderanti. Aumentate, seppure in misura inferiore, sono anche le cellule T, sia *cytotoxic* con segni di attivazione, che *helper*, che giocano un ruolo centrale nella patogenesi. Si possono rinvenire anche neutrofili, eosinofili e mastociti. Eosinofili e neutrofili possono essere di sporadico riscontro in corso di esame biptico, ma talora sono numerosissimi ed addirittura scompaginano le cellule epiteliali. Nessuna delle alterazioni della lamina propria è comunque diagnostica.

ENTEROCITI

Possono apparire normali nei pazienti con normale architettura dei villi, mentre sono ridotti in altezza negli stadi più avanzati. Se la mucosa appare piatta, l'epitelio superficiale si presenta spesso cuboidale e basofilo. L'epitelio delle cripte presenta un elevato indice mitotico, e si ritiene che l'aumentata proliferazione sia un compenso al danno epiteliale.

IPERPLASIADELLE CRIPTE

Nella dinamicità del processo lesionale, il primo cambiamento si riscontra nell'iperplasia delle cripte, che all'inizio sono allungate e rivestite da villi apparentemente normali, ma che si assottigliano sempre più con il progredire delle lesioni. L'iperplasia delle cripte sembra essere stimolata da fattori di crescita come quelli prodotti da epatociti e cheratinociti. Nelle fasi più avanzate le metalloproteinasi della matrice, come la collagenasi e la stromalisina, sembrano essere rilevanti nel determinare il danno atrofico dei villi attraverso la degradazione del tessuto interstiziale.

ATROFIADEI VILLI

La descrizione originale delle lesioni istologiche della mucosa duodenale e digiunale della MC (IGGD) si concentrava sulla atrofia dei villi.

L'atrofia dei villi è la lesione più severa della IGGD. Si distinguono vari aspetti, variabili in base ai diversi osservatori: a) parziale atrofia dei villi = accorciamento dei villi b) atrofia subtotale dei villi = atrofia marcata con aspetti di mucosa piatta c) totale atrofia dei villi = assenza di villi

Una classificazione modificata rispetto a quella di MARSH (8) distingue quattro diversi aspetti, con alcune altre sfumature, della mucosa, in rapporto al tipo di danno:

Tipo 0 = normale

Tipo 1: si può trovare a) in pazienti a dieta senza glutine ed in tal caso indicherebbe che una minima quantità di gliadina viene ancora ingerita, o che il paziente non è in remissione completa b) nei parenti di celiaci asintomatici c) in alcuni pazienti affetti da dermatite erpetiforme di Duhring. Questo aspetto NON è diagnostico di malattia celiaca ed i soggetti in cui si riscontra non andrebbero messi a dieta neanche se EMA positivi, ma andrebbero seguiti per lungo tempo, in quanto l'evoluzione verso una mucosa piatta può avvenire nel tempo, anche dopo diversi anni. Il numero di IEL diminuisce togliendo il glutine ed aumenta con la sua reintroduzione.

Tipo 2: è il tipo iperplastico (EC e cripte); è di raro riscontro, se non in condizioni sperimentali od in pazienti con dermatite erpetiforme.

Tipo 3: è il quadro definito distruttivo, e si divide in tre sottotipi in rapporto al grado di atrofia dei villi: lieve (mild), spiccata (marked), assente (absent). Il tipo 3 è diagnostico di malattia. Sebbene l'incremento degli IEL sia fondamentale per la diagnosi di tipo 3, talora il loro numero può rientrare nella norma, soprattutto se è stata già iniziata una dieta senza glutine.

LE BIOPSIE

In Pediatria sono ancora usate talora le biopsie per

suzione con le capsule di Crosby-Kugler o di Watson, che vanno condotte in sede digiunale vicino all'ansa del Treitz. Hanno il vantaggio di essere larghe e facilmente orientate dal Clinico. Inoltre si possono valutare in stereomicroscopia.

Negli adulti le biopsie si eseguono endoscopicamente. La mucosa può essere valutata macroscopicamente e si possono eseguire diversi prelievi: se ne consigliano almeno quattro.

- I SEI STADI DELLACELIACHIA

La malattia celiaca può essere suddivisa anche in base alle diverse condizioni cliniche ed istologiche in (9):

1- SINTOMATICA (ATTIVA): sintomi (deficit nutrizionali e di crescita e/o sintomi gastrointestinali di addome disteso e diarrea). Istologia tipica.

2- SILENTE: assenza di sintomi, ma biopsia digiunale patologica. Frequente nei familiari di celiaci.

3- TRATTATA: assenza di sintomi, mucosa ritornata normale.

4- LATENTE: alterazione istologica che regredisce con la dieta senza glutine e che non ritorna neanche se si rimette il glutine nella dieta (non ricadute di malattia). Ferguson riteneva latente il caso in cui istologicamente non c'erano anomalie e la dieta era con glutine, ma dopo qualche tempo il paziente andava incontro ad una lesione tipo 3 che regrediva con dieta senza glutine. Alcuni la chiamano anche "preceliachia".

5- POTENZIALE: predisposizione genetica (familiare con malattia celiaca, paziente con diabete mellito) e normale biopsia intestinale. Oggi si definisce anche come lo stato di quei pazienti con enteropatia non definita, che si sottopongono a manipolazioni dietetiche e biopsie ripetute, e che dopo alcuni anni si possono infine definire celiaci o non celiaci. Marcatori di celiachia potenziale sono EMA positivi e/o aumento degli IEL, con piccole alterazioni patologiche come l'aumento dei linfociti T intraepiteliali che esprimono TCR / , segnali di attivazione delle cellule immunitarie della mucosa.

6- REFRATTARIA: quando il paziente non risponde alla terapia. Primaria, se il paziente non risponde fin dall'inizio alla dieta iniziata dopo la diagnosi, secondaria, se dopo un periodo di risposta alla dieta senza glutine, il paziente diventa non più responsivo. Il punto critico è stabilire se il paziente è davvero celiaco o se esiste un altro problema, p.e. un linfoma (alcuni Autori infatti ritengono che in alcuni casi di malattia celiaca vi possa già essere un linfoma nascosto in una cripta intestinale). Comunque è fondamentale stabilire la causa della non responsività: introduzione inavvertita o volontaria del glutine, intolleranza proteica, insufficienza pancreatica od altro.

LADIAGNOSI SIEROLOGICA

Come già detto la disponibilità di marcatori sierologici molto specifici e sensibili per la malattia celiaca, ne ha modificato considerevolmente l'epidemiologia, anche se allo stato attuale la **biopsia** resta il *gold standard* per la diagnosi.

La collocazione di questi tests sierologici nella pratica clinica è quella di:

a) fungere da *screening* in pazienti asintomatici o con condizioni di malattia potenzialmente associabili a celiachia, i.e. il diabete mellito, o nei familiari di celiaci, al fine di evitare una biopsia non necessaria, che deve comunque essere praticata dove sussistano forti sospetti di malattia.

b) servire per valutare l'aderenza del paziente alla dieta senza glutine.

A loro almeno parziale merito va anche ascritta la revisione dell'iter diagnostico per malattia celiaca, maturato dal 1977 al 1989. Nel 1977 infatti i criteri stabiliti dall'ESPGAN (Società europea di gastroenterologia e nutrizione pediatrica) prevedevano 3 successive biopsie:

1) riscontro di mucosa digiunale subatrofica concordemente ai dati clinico-laboratoristici di malassorbimento.

2) riscontro di normalizzazione mucosale con miglioramento clinico.

3) peggioramento istologico dopo la riassunzione del glutine nella dieta.

Il rispetto di questi 3 criteri, quasi al limite dell'etico, considerando la rialimentazione con glutine di un paziente verosimilmente non tollerante, necessitava di tre successivi campionamenti di mucosa intestinale.

Nel 1989, anche in virtù dell'utilizzo dei tests sierologici come AGA ed EMA si è introdotta una revisione semplificata, come già indicato qualche tempo prima dalla Società Italiana di gastroenterologia pediatrica.

Si ritengono pertanto presupposti diagnostici indispensabili:

a) l'atrofia subtotale dei villi con l'iperplasia delle cripte, le alterazioni dell'epitelio superficiale e l'incremento di linfociti intraepiteliali.

b) la scomparsa dei sintomi, rapida e persistente, dopo esclusione del glutine dall'alimentazione.

La modificazione da positivi (in fase attiva di malattia) a negativi (dieta senza glutine) degli AGA e degli EMA è un rafforzamento della diagnosi.

Un'eventuale altra biopsia va condotta solo nei pazienti asintomatici alla diagnosi o in quelli in cui la risposta clinica è controversa, per oggettivare la normalizzazione istologica della mucosa.

Il protocollo tradizionale (con tre biopsie) va invece attuato nel caso si abbiano dubbi sulla diagnosi iniziale (se p.e. manca la prima biopsia o il dato istologico non è probante) o se è stata formulata prima dei due anni di vita, per escludere altre condizioni di atrofia mucosale (intolleranza proteica al latte vaccino,

giardiasi, malassorbimenti postenteritici...). Sarebbe comunque meglio, per evitare interferenze nella crescita, non reintrodurre il glutine prima dei due o meglio ancora dei sei anni di età e nemmeno nella fase di scatto puberale.

In tutti questi casi la prima biopsia va eseguita prima di introdurre il glutine e la seconda alla ricomparsa dei sintomi clinici e comunque entro 3-6 mesi. Poiché non sempre il dato clinico procede di pari passo con quello istologico, i tests sierologici trovano utilità nel far scegliere i tempi corretti della biopsia. In caso di riscontro di mucosa normale, il paziente va seguito nel tempo per ripetere la biopsia al ricomparire dei sintomi, ed in ogni caso dopo due anni dalla reintroduzione di prova.

I più comuni tests sierologici (10) per la diagnosi di malattia celiaca sono distinguibili in anticorpi:

a) antireticolina (ARA)

b) antigliadina (AGA)

c) antiendomio (EMA)

d) anti transglutaminasi (guinea pig t-TG, human t-TG)

Prima dell'introduzione di tali tests i mezzi di laboratorio per porre diagnosi di malattia celiaca si basavano sulla valutazione della steatorrea e sulla determinazione del valore di xilosio (un aldopentoso comunemente non presente nell'uomo) nel sangue e nell'urina, i cui bassi valori riscontrati dopo il carico orientavano verso il malassorbimento.

ANTICORPI ANTIRETICOLINA (ARA)

L'uso di anticorpi antireticolina è stato suggerito nel 1971 da Seah (11). Il test, che ha avuto il merito di far individuare per primo forme di celiachia oligosintomatiche, non ha comunque avuto ampio sviluppo e diffusione, per le difficoltà di lettura del pattern, che registrava sensibilità variabili dal 16 al 76 %, con una specificità intorno al 100 % (12).

ANTICORPI ANTIGLIADINA (AGA)

Già nel 1967 - 1970, l'identificazione di anticorpi antiglutine ed antilatte sembrava poter fornire utili informazioni nei pazienti con malattia celiaca (13). Negli anni '90 poi, lo sviluppo di metodiche immunoenzimatiche (ELISA) e di immunoblot per identificare gli isotipi anticorpali (IgG, IgA) specifici, hanno consentito di applicare tali test su vasta scala (14). La loro ricerca è semplice e, dato il metodo usato, non risente della variabilità soggettiva dell'operatore, come per gli anticorpi antiendomio, ma sono presenti oltre che nella celiachia non trattata, anche in altre malattie gastroenteriche, nella dermatite atopica ed anche talora in soggetti sani. Pertanto non sono speci-

fici di celiachia e tendono ad aumentare con l'età nei soggetti normali. Nell'infanzia, nei soggetti con manifestazioni cliniche di malassorbimento la sensibilità è di circa il 100%, mentre negli adulti si scende sino al 50 - 80%. Utilizzati come screening si ha un notevole numero di falsi positivi anche a titolo elevato. Sono infatti falsi positivi per la malattia celiaca, ma indicano un danno recente, anche modesto, della mucosa intestinale. E' importante l'età del paziente per stabilire un livello di *cut off*. Per esempio con un alto livello di *cut off*, che nel bambino sotto i due anni è ancora in grado di dare sensibilità di circa il 100 % e specificità di circa il 97%, nel bambino più grande o nell'adulto si perdono circa il 50% dei positivi. Ma se per contro si abbassa il *cut off* al valore in cui solo il 90% dei celiaci adulti è ancora identificato, permane un 30% di falsi positivi.

ANTICORPI ANTIENDOMISIO (EMA)

Confrontando AGA, ARA ed EMA, la sensibilità (90%) e specificità (100%) più elevata è posseduta dalle IgA antiendomiso, che però presentano tre svantaggi. Il primo è che la loro lettura in immunofluorescenza indiretta (IFI) è critica e dipende dall'esperienza dell'osservatore, per cui l'affidabilità delle risposte dipende strettamente dal livello di accuratezza e di esperienza diagnostica dei vari laboratori. Il secondo è che il 3-10% dei celiaci che presentano associato il deficit di IgA non può essere valutato con tale metodo, pena dei falsi negativi. Pertanto è sempre bene conoscere il valore delle immunoglobuline prima di eseguire il test oppure eseguire contemporaneamente EMA IgA ed AGA IgG. Da ultimo uno dei substrati utilizzati è l'esofago di scimmia, con conseguenti connessi problemi di eticità e di costo. L'uso però di cordone ombelicale umano ha consentito recentemente di ovviare almeno a quest'ultimo problema (14).

Gli anticorpi antiendomiso (EMA) di classe A identificati nel 1983 (Chorzelski ed all., 1984) (15) come anticorpi diretti contro l'endomiso, cioè il rivestimento di fibre reticolari circondante ciascuna fibrocellula muscolare liscia, sono stati riscontrati nella dermatite erpetiforme e nella malattia celiaca e riconoscerebbero come antigene proteine della matrice del tessuto connettivale. I substrati utilizzabili sono a) esofago di scimmia III inferiore b) cordone ombelicale umano 3) digiuno di scimmia.

Dal punto di vista strettamente operativo laboratoristico i punti critici della valutazione degli EMA sono: 1) fonte del substrato e sua conservazione 2) specificità e diluizione del coniugato 3) interpretazione del pattern fluoroscopico.

Per contro, come già detto la loro specificità (circa 100%) e sensibilità (circa 90%) consentono una completa correlazione con il dato biotico (16).

EMA su esofago di scimmia

La lettura deve essere condotta utilizzando il terzo inferiore dell'esofago perchè è la zona più ricca di proteine reagenti con gli anticorpi, data l'abbondanza di tessuto muscolare liscio e di *muscularis mucosae*.

Nell'esofago di scimmia si distinguono 4 strati:

a) la tonaca mucosa ricoperta dal suo rivestimento epiteliale, che giace sopra ad un connettivo lasso inglobante la *muscularis mucosae* (tessuto muscolare liscio)

b) la tonaca sottomucosa di tessuto connettivale lasso contenente vasi sanguigni

c) la tonaca muscolare composta da due strati di tessuto muscolare liscio, uno più interno circolare ed uno più esterno longitudinale.

La positività caratteristica è fornita dall'aspetto cribroso, detto a nido d'ape, che viene ad assumere il reticolo delle fibre endomisiali per il legame degli anticorpi con la sostanza intermiofibrillare della *muscularis mucosae*.

Naturalmente è positiva anche la tonaca muscolare, mentre una tenue fluorescenza si nota anche sulle miofibrille interposte tra le fibrille reticoliniche.

Sono possibili interferenze con aspecificità di fluorescenza per la presenza degli autoanticorpi tipo anti-muscolo liscio (ASMA) ed antinucleo (ANA).

La positività del pattern degli autoanticorpi ASMA si presenta diversamente, in quanto essi sono rivolti verso strutture citoplasmatiche delle fibrocellule muscolari lisce, in particolare verso strutture costituenti il citoscheletro cellulare. Si riscontrano in soggetti normali (10 %), in soggetti affetti da epatite virale o da mononucleosi infettiva. E' un po' come vedere un negativo fotografico del positivo, intendendo per positivo l'EMA.

La presenza di ASMA può mascherare il pattern EMA ed allora i sieri vanno testati con titoli diversi 1:20, 1:50, o più, in modo da ridurre la fluorescenza di copertura dell'ASMA ed evidenziare l'eventuale presenza di EMA.

EMA su cordone ombelicale umano

Il problema etico ed il costo degli anticorpi su esofago di scimmia, ha condotto all'introduzione del cordone ombelicale umano (HUC ed HUC EMA). Le fibre muscolari lisce, presenti nella parete della vena ombelicale restante (una si occlude alla quinta settimana di vita fetale) e delle due arterie ombelicali, sono circondate da fibrille reticoliniche analoghe per struttura e conformazione all'endomiso della tonaca muscolare dell'esofago di scimmia. Sensibilità e specificità sono identiche all'esofago di scimmia, ed inoltre si evitano problemi etici ed i costi sono più ridotti (17 - 18).

Il pattern di lettura degli HUC EMA presenta una fluorescenza di lettura più critica almeno all'inizio e può necessitare di un breve training. Nei sieri positivi la fluorescenza è riscontrabile a livello dell'endomiso delle fibre della tonaca media dei vasi ombelicali.

Mentre su esofago di scimmia il pattern di positività riguarda tutte le fibre endomisiali della tunica muscolare del III inferiore dell'esofago, con maggiore o minore intensità, proporzionalmente al titolo anticorpale del siero in esame, su cordone ombelicale il pattern si presenta diverso in funzione del titolo anticorpale.

In presenza di un titolo elevato quasi tutte le fibre reticoliniche che circondano le fibre muscolari (tonaca media) poste intorno al lume del vaso in sezione sagittale sono positive, dalla zona periendoeliale sino alla periferia estrema. Con titoli elevati è positivo anche l'endoelio delimitante il vaso (transglutaminasi). Se invece il titolo è basso la fluorescenza si riduce alla sola porzione esterna del vaso, dove si identificano i filamenti di reticolina, scarsi, discontinui e quindi di talora arduo riconoscimento. In caso di assenza però di anticorpi nel siero in esame, si ha il buio completo.

Anche con il cordone ombelicale si può avere il mascheramento (*masking effect*) da parte degli anticorpi antimuscolo liscio, e pertanto si può rendere necessaria una maggiore diluizione del siero (1: 50), per smascherare la copertura e rendere visibile l'eventuale fluorescenza per le fibre reticoliniche nella parete dell'arteria (19).

In conclusione, la progressiva introduzione dei *kits* diagnostici per gli anticorpi antireticolina (ARA), gliadina (AGA) ed endomisio (EMA) e del tutto recentemente per l'antitransglutaminasi (t-TG) (20) hanno determinato una vera rivoluzione diagnostica e conseguentemente epidemiologica, nel senso che si è compreso come il classico quadro di malattia celiaca, caratterizzata da spiccato malassorbimento e dalle sue dirette conseguenze, è solo la punta dell'iceberg, cioè la più rara delle varie manifestazioni della intolleranza al glutine (o meglio all'alfa gliadina) geneticamente correlata.

Molti celiaci addirittura non hanno sintomi o, se li presentano, essi sono di natura eterogenea e con sfumature svariate e dipendenti dalla selezione evolutiva avvenuta, in rapporto al diverso modo di interagire del proprio sistema immunitario con il glutine.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ventura A., Petaros P., Gerarduzzi T., Torre G., Martelossi S., Persic M. Celiachia: dal bambino all'adulto. *Medico e Bambino*, 19, I, 19-30, 2000.
- 2) Parnell N.D.J., Ciclitira P.J. Review article: coeliac disease and its management. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1999;13, 1-13.
- 3) Sollid L.M., Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105: 910-922
- 4) Kutlu T., Brousse N., Rambaud C, et al.: Numbers of T cells receptor (TCR) alpha beta+ but not of TCR gammadelta+ intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut*, 34: 208-14, 1993.
- 5) Walburga Dieterich, Tobias Ehnis, Michael Bauer, Peter Donner, Umberto Volta, Ernst Otto Riecken e Detlef Schuppan: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 3 (7): 797-801, 1997.
- 6) Tommasini A., Not T., Marzari R., Ventura A.: Malattia celiaca tra passato e futuro. *Prosp.Ped.*, 29: 181-96, 1999.
- 7) Kagnoff M.F., Austin R.K., Hubert S.J. et al.: Possible role for human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J.Exp. Med.*, 160: 1544, 1984.
- 8) Oberhuber G., Granditsch G., Vogelsang H.: The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 1999, 11: 1185-1194.
- 9) Ferguson A.: Coeliac disease research and clinical practice: maintaining momentum into the twenty-first century. *Baillieres Clin. Gastroenterol*, 1995; 9:395-412.
- 10) Maky M., Hallstrom O., Marttinem A., Lipsanen V., Viander M., Holm K., Collin P., Koskimies S.: Screening Tools for Use in Coeliac Disease. *Dynamic Nutrition Research*. Vol 2, pp 93-104, 1992.
- 11) Seah PP., Fry L., Rossiter M.A., Hoffbrand A.V., Holborow E.J.: Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult celiac disease. *Lancet*, 1971, i: 834 - 836.
- 12) Unsworth DJ, Walzer-Smith JA, Holborow EJ: Gliadin and reticulon antibodies in childhood coeliac disease. *Lancet* 1983; 874-875.
- 13) Visakorpi JK, Immonem P: Intolerance to cow's milk and wheat gluten in the primary malabsorption syndrome in infancy. *Acta paediatr Scand* 1967; 56: 49-56.
- 14) Catassi C, Ratsch IM, Fagiani E, Rossigni M, Candela F, Mordicchia F, et al: Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*, 1994, 22: 200-203.

- 15) Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, et al: IgA-antiendomysial antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br J Dermatol* 1984; 111: 395-402.
- 16) Swift G.L., Smith P.M.: Screening test for coeliac disease. *Lancet*, 349 (26), : 1254, 1997.
- 17) Sategna-Guidetti C., Grosso S. B., Bruno M., Grosso S.: Is human umbilical cord the most suitable substrate for the detection of endomysium antibodies in the screening and follow up of coeliac disease? *Hepatol.* 1997, 9: 657-660.
- 18) Francesca Castellino, Nadia Scaglione, Silvia B. Grosso and Carla Sategna-Guidetti: A novel method for detecting IgA endomysial antibodies by using human umbilical vein endothelial cells. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2000, 12: 45-49.
- 19) Antiendomysium. Diverse soluzioni per la ricerca degli EMA nella diagnosi di malattia celiaca. Fascicolo tecnico scientifico di U. Volta. Eurospital.
- 20) Maki M: Tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Gut* 1997; 41: 565.

*Address reprints request to:
Ricca V.
Laboratorio Analisi - Ospedale Koelliker
Missionari della Consolata -
C.so G. Ferrario, 251
10100 Torino*