



GLI ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI SONO PIÙ SENSIBILI DEGLI ANTICORPI ANTI-ENDOMISIO NELLA DIGNOSI DELLA MALATTIA CELIACA
Trevisiol C, Baldas V, Gerarduzzi T, Berti I, Spanò A
IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Summary

616 patients with clinical signs compatible with a diagnosis of celiac disease, 30 parents or brothers of celiac patients and 200 control children hospitalised for surgical causes were administered an ELISA dosage of IgG and IgA antibodies against cloned hTg (human tissue transglutaminase), expressed and purified from intestinal biopsies. Then a comparison was made with EMA antibodies (anti-endomysium) tested on human umbilical cord vein. Out of these patients, 99 were positive to anti-hTg IgGs and IgAs, but only 88 were also positive to the EMA technique. All the patients which turned out to be anti-hTg positive had an intestinal biopsy positive to celiac disease. Therefore, the anti-hTg technique we conceived was at least 10% more sensible than the EMA technique.

Introduzione - L'antigene riconosciuto dagli anticorpi anti-endomiosio, di recente, è stato identificato come la transglutaminasi tissutale (tTG). Abbiamo sviluppato una metodica immunoenzimatica basata su una tTG umana ricombinante (htTG) nella ricerca di anticorpi anti-tTG per la diagnosi della malattia celiaca.

Tali anticorpi hanno il vantaggio, rispetto a quelli anti-endomiosio, utilizzati correntemente nel test EMA, di essere anche di classe IgG, e dunque di superare il problema della individuazione dei non rari soggetti celiaci con deficit di IgA. Sebbene tali anticorpi non siano semplicemente dei marcatori (come lo erano gli anticorpi anti-gliadina) e abbiano invece quasi sicuramente anche un ruolo patogenetico centrale nella malattia celiaca, non era tuttavia certo a priori che la disponibilità di una tecnica per il loro riconoscimento e dosaggio potesse rappresentare un reale progresso pratico nella diagnostica della malattia, in particolare, ci si poteva domandare se

potesse rispondere davvero a problemi di riproducibilità, di economicità, di sensibilità e specificità.

Obiettivo della ricerca - Valutare la sensibilità e la specificità del test ELISA per la htTG nei confronti del test EMA.

Materiali e metodi - *Soggetti*: Abbiamo analizzato il siero di 616 pazienti con segni clinici attribuibili alla malattia celiaca. Sono stati testati anche 30 parenti di primo grado di pazienti celiaci. Come gruppo di controllo abbiamo preso in considerazione 200 bambini che sono stati ricoverati nel nostro ospedale per problemi chirurgici extra-addominali.

Metodiche: Abbiamo clonato, fatto esprimere e purificato la htTG da biopsie intestinali di pazienti celiaci. Si è utilizzato il test ELISA per la ricerca delle IgA e delle IgG dirette contro htTG. Tutti i sieri sono stati testati per gli anticorpi anti-endomiosio usando come substrato la vena di cordone ombelicale umano. Tutti i soggetti risultati positivi al test anti-hTg e/o al test EMA sono stati sottoposti alla biopsia intestinale per confermare la diagnosi di celiachia.

Risultati - Dei 646 soggetti testati 88 sono risultati positivi per entrambi i test e quindi sottoposti alla biopsia che mostrava una mucosa piatta; 11 su 646 soggetti sono risultati positivi per la htTG, ma negativi per gli EMA nonostante la biopsia intestinale fosse piatta; tutti questi avevano un titolo anticorpale alto per le IgA e un aplotipo DQA1*0501 e DQB1*0201. Gli altri 547 soggetti sono risultati negativi per entrambi i test. Nessuno dei 200 bambini testati come gruppo di controllo è risultato positivo per l'uno o l'altro test.

Conclusioni - I nostri dati preliminari mostrano che il test ELISA contro htTG è consistentemente più sensibile del test EMA, anche al di fuori dei casi di deficit di IgA. La quasi assoluta sensibilità e specificità di questo semplice test, unito alla sua semplicità ed economicità consentiranno lo screening di massa in popolazione generale e in quella a rischio per la malattia celiaca.



INIBIZIONE DELL'APOPTOSI DA PARTE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI UMANI ANTI-TRANSGLUTAMINASI
Tommasini A, Soban M, Berti I, Trevisiol C, Panfili E, Santon D, Lenhardt, Baldas V, Fragonas E
IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Summary

The celiac disease is characterized by the production of tTG (anti-transglutaminase) antibodies. These antibodies could only be a marker of the disease, or, which is more likely, could be involved in the pathogenesis of intestinal lesions (inhibition of enterocyte differentiation) as well as of a secondary tumour and immunologic disease (inhibition of apoptosis). To assay this possibility, apoptosis was induced in PHA pre-challenged lymphocyte cells and 3T3 cells, by adding dexamethasone and by subtracting serum to the medium. The cells were then incubated with anti-hTg monoclonal antibodies. Anti-HIV monoclonal antibodies were the controls. The addition of anti-hTg antibodies inhibited apoptosis in a very significant way. The results were consistent with the idea that, even in vivo, anti-hTg antibodies do have an anti-apoptotic effect on the im-

mune system, thus favouring the development of self-aggressive clones.

Introduzione - La famiglia dei geni per la transglutaminasi include enzimi che catalizzano i legami crociati Ca-dipendenti delle catene polipeptidiche. L'enzima viene prodotto in grandi quantità durante i processi di apoptosi, cioè di morte cellulare programmata, in cui la transglutaminasi gioca un ruolo fondamentale attraverso l'impacchettamento e l'eliminazione dei detriti cellulari nei corpi apoptotici.

Una risposta anticorpale contro la tTG è caratteristica dei soggetti con malattia celiaca. Sebbene la risposta umorale sia considerata meno importante di quella cellulosa-mediata nella patogenesi del danno mucosale, alcuni dati suggeriscono che gli autoanticorpi anti-tTG di classe IgA dei soggetti celiaci non trattati possano avere un ruolo patogenetico nella malattia.

Un esempio di questo potenziale effetto patogeno è dato dalla inibizione della differenziazione delle cellule epiteliali intestinali in vitro: in vivo, lo stesso effetto è probabilmente responsabile delle alterazioni istologiche della mucosa intestinale celiaca. Allargan-

do la problematica alle cellule del sistema immunitario, si può ipotizzare che anche a questo livello gli anticorpi anti tTG possano esercitare un effetto patogeno disturbando la fisiologia cellulare e in particolare il processo apoptotico.

Scopo della ricerca - Recentemente abbiamo ottenuto anticorpi ricombinanti contro la transglutaminasi umana htTG. Abbiamo voluto saggiare in vitro gli effetti di tali autoanticorpi su linfociti umani pre-stimolati con PHA e poi indotti all'apoptosi. L'ipotesi di lavoro era che gli autoanticorpi anti-htTG potessero influenzare negativamente il fenomeno apoptotico.

Materiali e metodi - Linfociti da sangue periferico venivano attivati con PHA 3 mcg/ml per 72 ore e dopo 5 giorni con IL-2 20 U/ml. L'apoptosi è stata indotta con desametasone a 10^{-7} M per 24 ore. Abbiamo valutato l'effetto sull'apoptosi degli anticorpi monoclonali anti-tTG e abbiamo utilizzato come controllo anticorpi monoclonali anti HIV. L'apoptosi è stata valutata mediante la citometria a flusso dopo colorazione con ioduro di propidio e annessina V coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC).

Risultati - I risultati preliminari hanno mostrato una riduzione

Cellule apoptotiche CD3+	Inibizione	
Controlli positivi	23.2%	
Controlli mAb	21.0%	9.5%
Anti-tTG 2.6	15.9%	31.5%
Anti-tTG 3.7	14.3%	38.3%
Anti-tTG 3.12	13.4%	42.2%

significativa del livello apoptotico indotto in presenza di anticorpi anti-tTG rispetto ai controlli (anticorpi monoclonali anti-HIV).

Risultati comparabili sono stati ottenuti utilizzando cellule 3T3 nelle quali l'apoptosi è stata indotta privandole del siero. Anche su queste cellule gli anticorpi anti-htTG hanno determinato una inibizione dell'apoptosi di entità simile a quella ottenuta sui linfociti trattati con desametasone.

Conclusioni - Gli anticorpi anti-tTG inibiscono i fenomeni di apoptosi, in particolare quelli a livello linfocitario. In altre parole, si può ipotizzare che nei soggetti celiaci quei meccanismi (l'apoptosi, appunto) che conducono allo spegnimento della risposta immune quando questa cessa di essere utile, siano inceppati dagli autoanticorpi specifici che l'assunzione e probabilmente la digestione della gliadina inducono nei soggetti predisposti. Questo potrebbe spiegare come mai l'assunzione del glutine, in questi soggetti, faciliti, o consenta, lo sviluppo di cloni pericolosi, autoaggressivi, sviluppo non frenato dai normali meccanismi apoptotici, inceppati dagli anticorpi anti-tTG.

Lo stesso meccanismo potrebbe spiegare anche la crescita di tumori (linfoma e cancro esofago-gastro-intestinale): infatti l'apoptosi è uno dei meccanismi che impediscono lo sviluppo di cloni tumorali.

Gli anticorpi anti-tTG interferiscono sui meccanismi fisiologici dell'apoptosi, inibendoli. Questo risultato, che ha i limiti di una ricerca in vitro, in condizioni artificiali, apre la questione (fondamentale) se la risposta immune diretta contro la tTG sia in grado di perturbare la fisiologia cellulare e se questa perturbazione possa avere un ruolo nell'aumentare il rischio di altre patologie autoimmuni (e di patologie tumorali) associate alla malattia celiaca non trattata.



ERITROMELALGIA, VASCULITE, VITILIGO, IPERTENSIONE, DIFETTO DI GH

Cimaz R, Langer A
Clinica Pediatrica De Marchi, Università di Milano

Summary

Description of a case of idiopathic erythromelalgia, started at about 5 years, which dramatically developed over many years, with painful crises to the feet (and then also to the hands) mitigated in cold conditions only, with trophic alterations to the lower members, up to the emergence of deep ulcers, incapability to walk, painful crises mitigated by cool baths only, leucocytoclastic vasculitis, hypertension. The attempts to treat the disease with corticosteroids and immunosuppressives produced transient remissions only. A treatment based on GH of an associated hypopituitarism and a symptomatic treatment almost corrected the situation.

Il caso - LB è un bambino di origine filippina, di genitori non consanguinei; viene ricoverato all'età di 10 anni (19/5/98). Ha, dietro le spalle, una lunga storia di crisi di dolore urente agli arti inferiori, e successivamente anche alle mani, ripetute più volte nella giornata, specie durante i periodi di caldo e dopo sforzo fisico, in peggioramento. Negli ultimi tempi, disturbi più lievi sono comparsi alle mani.

Dai 7 anni di età, sono comparse anche alterazioni trofiche della cute dei piedi che è arrossata e imbibita, e una sempre più severa difficoltà alla deambulazione. È stato trattato dapprima da ortopedici (plantari) poi da dermatologi (impacchi di Lysoform, con conseguenti lesioni di tipo ustione).

Alla visita, la cute dei piedi mostra succulenza, colorito bluastrò, ipertrofia al calcagno con aumento della quadrellatura, ustioni. Chiazza di vitiligine in regione temporo-mandibolare destra. Disestesia urente agli arti inferiori. Esami: Emocromo e

indici di flogosi normali, salvo che per modesta piastrinosi (520.000/mmc); aumento delle IgE (592 U/dl); ANA 1/80); capillaroscopia del letto ungueale: negativa; Rx del piede: normale (non osteopenia). Scintigrafia ossea trifasica: netto iperafflusso di sangue e ipercaptazione delle strutture osteoarticolari della cavaglia e del piede destro.

Decorso e tentativi terapeutici - Dopo alcuni mesi di osservazione, caratterizzati da un progressivo peggioramento e dalla necessità di ricorrere alla doccia e/o al bagno freddo, che calma il dolore, soprattutto notturno, si inizia un trattamento con aspirina 100 mg/die e ranitidina (150 mg/die) con evidente vantaggio.

Il 10/9 98 e il 3/1/99 il piccolo viene ricoverato nuovamente. La cute degli arti inferiori è estremamente sottile, secca, scura, con iniziale distrofia ungueale. Leucociti (42.490) e piastrine (563.000) elevati. La PA, (135/80 in condizioni di base) aumenta a 150/100 durante gli episodi. Un trattamento con corticosteroidi fa diminuire la frequenza degli episodi, ma produce un aumento del peso e, forse, contribuisce a mantenere l'ipertensione, che si fa stabile (95/140-195/165). Nifedipina

Il 9/2/99 nuovo ricovero. La riduzione del dosaggio aumenta le crisi. LB sta sempre peggio, la cute degli arti inferiori presenta ulcere a stampo, di alcuni cm di diametro. Non cammina (sedia a rotelle). Sta relativamente bene solo quando la PA è relativamente bassa; le crisi dolorose sono accompagnate sempre da ipertensione, che viene meglio controllata da un beta-bloccante (propranololo). Sono in aumento VES (70), fibrinogeno (919 mg/dl), piastrine (815.000), ANA (1/160). Microematuria. ECO-doppler: amplificazione della componente diastolica, come da vasodilatazione periferica.

Biopsia cutanea: acantosi, infiltrati neutrofili nel derma papillare e perivascolare e nell'ipoderma, con leucocitoclasia, neutro-

filii, linfociti e rari eosinofili. Occlusione di un piccolo vaso per iperplasia dell'endotelio. Immunofluorescenza diretta, granulare, positiva per IgM in corrispondenza dei vasi papillari e, lineare, per fibrinogeno e complemento in corrispondenza del derma superficiale.

Tentativi di trattamento con alte dosi di nitroprussiato, con ACE-inibitori e con beta-bloccanti sono inefficaci. Tre boli di prednisona danno un'ottima risposta, con scomparsa totale delle crisi, che tuttavia riprendono dopo una diecina di giorni.

La storia si complica con una infezione respiratoria da candida e con un micetoma polmonare, trattato e risolto con una energica terapia antifungina.

Il problema - La diagnosi di eritromelagia discende dalla descrizione clinica, dalla scintigrafia e dall'ECO-doppler. La patogenesi della malattia è certamente complessa. L'etiologia autoimmune è quanto meno probabile (coerentemente con quanto suggerito dalla coesistenza di vasculite e di vitiligo, dal pro-

gressivo incremento degli indici di flogosi, dalla presenza di ANA, dalla immunofluorescenza, e dall'evidente ancorché transitorio vantaggio clinico ottenuto con gli steroidi). Il vero problema riguarda il da farsi. I suoi sintomi hanno risposto più volte, chiaramente, alla terapia steroidea: ma si tratta di una terapia incompatibile con la grave ipertensione, con la estrema distrofia cutanea, con l'infezione da candida, e il suo mantenimento nei tempi lunghi è improponibile. La terapia sintomatica appare insufficiente.

La soluzione - La soluzione arriva per una strada impreveduta. Si rende evidente un deficit staturale, dovuto a un difetto di GH. Il bambino viene messo in trattamento sostitutivo con GH. Apparentemente, questa terapia, oltre ad avere un evidente effetto sulla statura, si accompagna a un netto miglioramento clinico. La ulcera si rimarginano, il trofismo cutaneo migliora notevolissimamente, le stesse crisi melalgiche si riducono di numero e gravità e divengono sopportabili.



WHEEZING RICORRENTE, SINUSITE, REFLUSSO GASTRO-ESOFAGEO

*Patria MF, Rusconi F
Clinica Pediatrica De Marchi, Milano*

Summary

Description of a very instructive case of chronic asthma, scarcely sensible to bronchodilators and environmental prophylaxis. An antibiotic treatment for concurrent sinusitis cured the latter, but not asthma which kept on worsening, despite of a heavy treatment, started with chronones, continued with chronically administered inhalant steroids and bronchodilators. A pathologic gastroesophageal reflux was identified. Asthma and reflux were permanently cured with a treatment based on omeprazole+cisapride to stop the asthma>GER>asthma vicious circle.

Il caso - Alessandro arriva alla nostra osservazione a 9 anni, con una storia di bronchiti asmatiche ricorrenti. Questi sono iniziati a 2 anni di età, sotto forma di episodi febbrili con broncospasmo; dopo i 6 anni questi episodi si sono fatti considerevolmente più rari; è comparsa però asma da sforzo.

Al primo controllo (10/94) le condizioni generali sono buone, la spirometria di base è normale; è presente cutipositività marcata per acari, gatto, betulla, ambrosia, alternaria. Eosinofili 660/mm³; immunoglobuline e alfa-1-antitripsina normali.

Si consiglia bonifica dell'ambiente domestico e trattamento con cromoni.

Al controllo successivo (02/95) il bambino si presenta con tosse. L'ascoltazione dà un reperto di sibili e di rantoli fini. La radiologia mostra un torace iperespanso, con aree di disventilazione e una sinusite mascellare bilaterale. Terapia antibiotica+steroidi nasali.

Alessandro sta bene per 3 mesi; poi torna (5/95) con lo stesso quadro dell'ultima volta. La spirometria di base è peggiorata (FVC 81%; FEV1 87%; FEV1/FCV 96%; FEF 25-75 96%) senza risposta al broncodilatatore. Sierologia negativa per *Mycoplasma* e *Chlamydia*. Si prescrivono un macrolide e un broncodilatatore per aerosol.

Il mese successivo (06/95) i seni paranasali sono puliti, ma la spirometria è sempre patologica. Si sostituiscono i cromoni con un trattamento sistematico di beclometasone per aerosol. Alessandro sta bene per 3 mesi; poi la sintomatologia, ormai francamente asmatica, si aggrava, e diventa necessario un trattamento broncodilatatore quotidiano.

Spirometria peggiorata (FVC 50%; FEV1 74%; FEV1/FVC

94%; FEF 25-75 71%). Test del sudore negativo (11/95). Terapia antibiotica+broncodilatatore+fisioterapia.

Nessun sostanziale miglioramento.

I genitori riferiscono che Alessandro, dopo il pasto, presenta pallore e sensazione di amaro in bocca. Una pH-metria esofagea dimostra la presenza di reflusso patologico; la gastroscopia evidenzia una esofagite di grado modesto; la radiografia del digerente è normale. L'anamnesi remota non risveglia il ricordo di disturbi alimentari (vomito, regurgito) nella prima infanzia.

Viene iniziata terapia anti-reflusso con cisapride e omeprazolo. Il quadro clinico e le spirometrie si normalizzano. Viene sospeso il broncodilatatore.

Nel giugno '96 viene sospeso lo steroide inalatorio; nel settembre '96 anche la pH-metria si è normalizzata.

Per 3 anni il ragazzo sta bene; non ha bisogno di controlli. Non pratica terapia farmacologica; ha avuto 3 crisi d'asma curati con broncodilatatore e steroidi per os.

Il contributo - Il nostro caso è molto didattico.

Alessandro è un pan-allergico, e questo poteva bastare a spiegare la storia clinica iniziale. Ma la insufficiente risposta della spirometria di base alla profilassi ambientale e alla terapia inalatoria con cromoni e poi con beclometasone dipropionato devono far pensare a un "focus asmogeno".

Questo poteva essere costituito dalla sinusite e il trattamento di fondo si è orientato dapprima in quella direzione, con apparente successo, ma questo successo si è rivelato solo transitorio.

Il reflusso gastroesofageo (GER) si associa all'asma cronico nel 50% dei casi, e specialmente ai casi con distelettasia e/o con broncopolmonite ricorrente.

Nel nostro caso il reflusso è certamente secondario all'asma (nessun sintomo nel primo anno di vita, guarigione definitiva del reflusso con terapia medica) e tuttavia è stato altrettanto certamente un fattore perpetuante dell'asma (come dimostra la normalizzazione della clinica e della spirometria dopo trattamento del reflusso, per rottura del circolo vizioso asma>reflusso>asma).

È stato probabilmente necessario e sufficiente l'uso dell'omeprazolo, per inibire il riflesso provocato dall'acidità sui sensori esofagei.

Il caso è anche indicativo della scarsa percezione soggettiva del GER, che ne giustifica la ricerca anche nel ragazzo relativamente maturo, con asma resistente, senza chiari segni di disturbo gastro-esofageo.