

Zanesljivost serumskih antigliadinskih in antiendomizijskih protiteles kot kazalcev prisotnosti atrofije sluznice tankega črevesa pri celiakiji v otroški dobi*

The reliability of serum antigliadin and antiendomysial antibodies as indicators of children with small intestinal mucosa atrophy in coeliac disease*

Tomaž Križnar**

Ključne besede
celiakija
antigliadinska protitelesa
antiendomizijska protitelesa
atrofija sluznice tankega črevesa

Key words
coeliac disease
antigliadin antibodies
antiendomysial antibodies
small intestinal mucosa atrophy

Izvleček. V diagnostiko celiakije poskušamo vpeljati serumske označevalce, ki bi nadomestili ali dopolnili biopsijo sluznice tankega črevesa. Na otroškem oddelku mariborske bolnišnice določamo antigliadinska (AGA-IgA ter AGA-IgG) in antiendomizijska protitelesa. Želeli smo ugotoviti, kako zanesljivo omenjeni serumski označevalci celiakije pokažejo stanje črevesne sluznice. Pregledali smo dokumentacijo 74 otrok, pri katerih je bila opravljena biopsija sluznice tankega črevesa in so imeli istočasno določena tudi antigliadinska in antiendomizijska protitelesa. Glede na stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa smo oblikovali tri skupine. V prvi skupini je bilo 24 otrok z normalno sluznico, v drugi 30 otrok z delno ali zmerno atrofijo in v tretji 20 otrok s popolno atrofijo črevesne sluznice. Za vse označevalce smo dokazali povezanost s stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa. Zanesljivost negativnih označevalcev kot kazalcev zdrave sluznice se je za vse označevalce in kombinacije gibala med 44,4 % in 57,1 %. Zanesljivost pozitivnih serumskih označevalcev pa je bila popolna (100-odstotna) za označevalce: AGA-IgA, za kombinaciji AGA-IgA+AGA-IgG in AGA-IgA+EMA ter za kombinacijo vseh treh označevalcev. Pozitivni označevalec antiendomizijskih protiteles je bil zanesljiv v 95,2 % in AGA-IgG v 78,6 %. Menimo, da bi bilo pri otrocih s pozitivnimi vsemi tremi označevalci celiakije smiselno razmisliti o upravičenosti biopsije sluznice tankega črevesa.

Abstract. We set out to introduce serum markers into the diagnosis of coeliac disease as a substitute or supplement to small intestinal mucosa biopsy. At the Paediatrics Department of the Maribor Teaching Hospital, determinations of antigliadin (AGA-IgA and AGA-IgG) and antiendomysial antibodies are carried out in to assess the reliability of these coeliac disease markers in indicating the state of small intestinal mucosa. We examined the records of 74 children in which small intestinal mucosa biopsy had been performed and ANTIGLIADIN as well as ANTIENDOMYSIAL antibodies had been determined at the same time. According to the degree of small intestinal mucosa atrophy they were assigned to the following three groups: 1. 24 children with normal small intestinal mucosa, 2. 30 children with partial or moderate atrophy and 3. 20 children with total atrophy of the small intestinal mucosa. For all markers the connection with the degree of small intestinal mucosa atrophy was proven ($p < 0.0001$ in all markers). The reliability of negative markers as indicators of healthy mucosa lay between 44.4% and 57.1% for all markers and combinations. The reliability of positive serum markers was absolute (100%) for the following markers: AGA-IgA, for the combinations AGA-IgA+AGA-IgG and AGA-IgA+EMA as well as for the combination of all three markers. A positive ANTIENDOMYSIAL was reliable in 95.2% and AGA-IgG in 78.6%. We believe that in children in which all three markers of coeliac disease are positive, it would be reasonable to contemplate whether small intestinal mucosa biopsy is justified.

* Delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1995

** Tomaž Križnar, abs. med., Učna bolnišnica Maribor, Klinični oddelek za otroške bolezni Učne bolnišnice Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Uvod

Celiakija (glutenska enteropatija, netropska sprue) je bolezen začetnega dela tankega črevesja, katerega sluznica je bolezensko spremenjena. Bolniki ne prenašajo glutena (v vodi netopne beljakovinske frakcije moke), zato morajo vse življenje imeti brezglutensko dieto. To pa pomeni izločitev pšenice, ječmena, rži, pa tudi ovsa iz prehrane. Bolezen je značilna za otroško dobo, čeprav se lahko prvič pojavi kadarkoli v življenju (1).

Diagnostični postopek pri bolniku s sumom na celiakijo

Klasične diagnostične kriterije za celiakijo je sprejelo Evropsko združenje za otroško gastroenterologijo in prehrano (European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition, ESPGAN) že leta 1969 v Interlaknu, kasneje pa so bili še večkrat potrjeni (2, 3). Diagnoza celiakije temelji na dveh ključnih kriterijih. Prvi je dokaz hiperplastične atrofije sluznice tankega črevesa v aktivnem obdobju nezdravljene bolezni, drugi pa dokaz škodljivosti glutena na bolnike s celiakijo (glutenska intoleranca).

Pri bolniku s celiakijo se po prehodu na brezglutensko dieto klinična slika izboljša, prej atrofična sluznica pa se popravi. Po ponovni obremenitvi z glutenom se sluznica spet bolezensko spremeni, prav tako pa se lahko zopet pojavijo tudi klinični simptomi. Škodljivost glutena je tako dokazana.

Po klasičnih kriterijih ESPGAN-a (2, 3) so tako za diagnozo potrebne tri biopsije tankega črevesa (jejunum):

- prvo biopsijo naredimo bolniku, ko uživa še normalno hrano z glutenom in kaže klinične znake celiakije. Histološki izvid mora pokazati znake hiperplastične atrofije sluznice tankega črevesa.
- druga biopsija sledi po najmanj dvoletni brezglutenski dieti. Histološki izvid mora zdaj pokazati normalizacijo ali izboljšanje atrofije črevesne sluznice, bolnik pa ne sme več imeti kliničnih znakov celiakije.
- tretja biopsija sledi po šestih mesecih ponovne obremenitve z glutenom (bolnik preide na normalno hrano). Črevesna sluznica mora spet pokazati znake atrofije. Če se klinični znaki celiakije pojavijo prej, se lahko odločimo za tretjo biopsijo tudi pred pretekom šestih mesecev.

Z razvojem natančnejših presejalnih testov, predvsem serumskih označevalcev celiakije, so se začeli pojavljati številni članki, v katerih so avtorji predlagali, da bi bilo biopsij manj. Delovna skupina ESPGAN-a je zato leta 1989 v Budimpešti (4) sprejela nove modificirane kriterije za diagnozo celiakije, po katerih za diagnozo zadošča samo ena biopsija ter hitro in popolno izboljšanje klinične slike po uvedbi brezglutenske diete skupaj z izginotjem serumskih označevalcev: antigliadinskih (AGA), antiretikulinskih (ARA) in antiendomizijskih (EMA) protiteles.

Klasično pot do diagnoze pa še vedno uberemo v primerih, ko je bolnik pri prvi biopsiji mlajši od dveh let (v tem obdobju so namreč pogoste tudi druge bolezni, ki povzročijo poškodbo sluznice, npr. alergija na kravje mleko, giardiazia ipd.) ali ko je bolnik prešel na brezglutensko dieto pred prvo biopsijo. Če je klinična slika neznačilna, in če obstaja kakršenkoli sum v diagnozo, prav tako speljemo diagnostiko po klasični poti (1).

Histološki pregled vzorca sluznice tankega črevesa

Pri celiakiji je sluznica tankega črevesa atrofična. Črevesnih resic ni ali pa so močno skrajšane in zadebeljene. Lieberkühnovne kripte so poglobljene, število mitoz v njihovem epiteliju pa je povečano. Pri celiakiji zato govorimo o hiperplastični atrofiji sluznice tankega črevesa (5, 6).

Za lamino proprijo tankega črevesa je pri bolnikih s celiakijo značilna močna celična infiltracija, prevladujejo predvsem limfociti in plazmatke (5, 6). Število intraepitelijskih limfocitov, za katere menijo, da so najpomembnejši pri imunološki obrambi črevesja, je zvišano. Močno je povečan predvsem odstotek $\gamma\delta$ -receptorskih intraepitelijskih limfocitov, ki predstavljajo imunohistokemični označevalec za celiakijo (7). Elektronskomikroskopsko so vidne poškodbe mikrovilov na enterocitih (8), aktivnosti črevesnih disaharidaz (laktaze, saharaze, maltaze in trehalaze) pa so manjše (9).

Opisane bolezenske spremembe sluznice tankega črevesa so nespecifične, vendar so ob kliničnem sumu na celiakijo in ob izključitvi podobnih bolezni zelo značilne. Ob brezglutenski dieti počasi izzvenijo (6).

Serološki označevalci celiakije

Celiakija je pri razviti klinični sliki razmeroma lahko prepoznavna, težave pa nastopijo pri neznaki oblikah in pri bolnikih s prikritimi oblikami celiakije. Zato je potreba po presejalnem testu, s katerim bi odkrili čimveč bolnikov s celiakijo, razumljiva (10). Od presejalnih testov uporabljamo na otroškem oddelku mariborske bolnišnice obremenilni test z D-ksilozo (ksilozni tolerančni test), določamo AGA razredov IgA in IgG ter EMA. AGA in EMA predstavljajo serološke označevalce celiakije.

Imunska vzročnost celiakije je vse bolj verjetna, pa naj gre v ozadju za humoralni ali celični imunski odziv. Trije tipi protiteles so za celiakijo še posebej značilni: AGA, ARA in EMA. Vsa po brezglutenski dieti postopoma izginejo iz seruma. Šele z razvojem modernih seroloških tehnik smo dobili teste visokih specifičnosti in občutljivosti, tako da jih lahko uporabljamo v vsakdanji klinični praksi (7, 11).

Najprej so v klinično prakso sprejeli določanje AGA. Za njihovo določanje se najpogosteje uporablja encimsko-immunski test (ELISA). Protitelesa razreda IgA so se izkazala kot manj občutljiva in zelo specifična, medtem ko so protitelesa razreda IgG slabo specifična, vendar zelo občutljiva (12).

ARA in EMA so avtoprotitelesa. Za določanje uporabljamo tehniko indirektno imunofluorescence, določamo pa protitelesa IgA razreda. Za določanje ARA uporabljamo kot antigen podganje ledvice, prisotnost EMA pa ocenjujemo na preparatih požiralnikov primatov (opic). Določanje EMA daje podobne rezultate kot določanje ARA, vendar so EMA tehnično enostavnejše določljiva, zato je določanje EMA bolj razširjeno in bolj splošno uporabljano (5).

Odkritje serumskih označevalcev je odprlo nove možnosti v diagnostiki celiakije, bolje pa razumemo tudi imunopatogenetsko ozadje bolezni. S tem so nakazane nove možnosti za nadaljnje raziskave vzroka, pa tudi zdravljenja bolezni.

Namen naloge

Na otroškem oddelku Učne bolnišnice Maribor že od jeseni leta 1992 rutinsko določamo AGA in EMA. Z retrospektivno študijo smo želeli ugotoviti povezanost med omenjenimi serumskimi označevalci in stopnjo atrofije črevesne sluznice. Zanimalo nas je, če bi lahko pri nekaterih otrocih že na osnovi prisotnosti serumskih AGA in EMA določili stanje sluznice, ne da bi sploh delali biopsijo sluznice tankega črevesa.

Metode dela

Histološki pregled sluznice tankega črevesa

Vzorci sluznice tankega črevesa morajo biti v skladu s kriteriji ESPGAN-a odvzeti iz končnega dela dvanajstnika ali začetnega dela jejunuma tik pod Treitzovim ligamentom. Za odvzem vzorca sluznice uporabljamo v Mariboru hidravlično aspiracijsko sondo, ki jo bolniku skozi usta uvedemo do odščipnega mesta. Pravilno lego sonde preverimo z rentgenskim posnetkom (13).

Vzorce sluznice shranimo v 10-odstotnem formalinu in jih pošljemo na oddelek za patološko morfologijo, kjer jih obdelajo po standardnem postopku in barvajo s hematoksilinom in eozinom. Patohistolog preparate oceni pod svetlobnim mikroskopom.

Histološka analiza vzorca sluznice tankega črevesa je povezana z dvema težavama:

- glavno merilo atrofije črevesne sluznice je dolžina črevesnih resic. Ker pa pri rezanju z mikrotomom ne prerežemo vseh resic natančno po vzdolžni osi, je dolžina resic v preparatu neenotna in se lahko pri končni oceni resic močno zmotimo. Zato moramo upoštevati še ostale spremembe v atrofični sluznici (hiperplazija kript, število intraepitelijskih limfocitov idr.). Vrednotenje stopnje atrofije črevesne sluznice je zato subjektivno;
- atrofijo sluznice različni avtorji razvrščajo v različno število stopenj, od samo dveh do celo sedmih (14–16). Največ avtorjev se odloča za štiri stopnje (9, 17, 18), ki smo jih poskušali uporabiti tudi mi. Pri tej razdelitvi je osnovno merilo stopnje dolžina resic (tabela 1).

Tabela 1. Stopnje atrofije sluznice tankega črevesa. IEL = intraepitelijski limfociti.

Stopnja	Opis
0	Normalna sluznica Znakov vnetja ni, število IEL normalno, resice ozke, večinoma dolge 0,5 mm ali več
1	Delna atrofija Število IEL je povečano, prisotna hiperplazija posameznih kript, resice so tope, večinoma dolge od 0,2 do 0,4 mm
2	Zmerna atrofija Hiperplazija kript, povečano število IEL, resice so tope, večinoma krajše od 0,2 mm
3	Popolna atrofija Hiperplazija kript, vnetje, močno povečano število IEL, resic ni

Določanje antiendomizijskih protiteles

Za analizo uporabljamo sveže ali zamrznjene serume. Najprej počakamo, da vzorci krvi, odvzeti z vensko punkcijo, koagulirajo, potem pa jih centrifugiramo pri 3000G. Hemoliziranih ali lipemičnih serumov ne uporabljamo. Za določevanje uporabljamo tehnično indirektno imunofluorescence na preparatih požiralnikov primatov (opic). Na oddelku za laboratorijsko diagnostiko uporabljamo komercialni test podjetja Eurospital® iz Trsta. Čeprav pri vsakem sklopu preiskav uporabljamo negativno in pozitivno kontrolo, je vrednotenje subjektivno. Rezultate podajamo kvalitativno, vrednost testa je torej lahko pozitivna ali negativna. Pri izrazito pozitivnih odločitvah ni težka, pri »mejno pozitivnih« pa je lahko vprašljiva.

Določanje antigliadinskih protiteles

Za določanje AGA pripravimo serume na enak način kot za določanje EMA. Serumsko raven antigliadinskih protiteles razreda IgA in IgG določamo s komercialnimi encimsko-immunskimi testi (ELISA). Pri vrednotenju antigliadinskih protiteles smo morali upoštevati dvoje:

- vrednotenje AGA je semikvantitativno. Rezultate vrednotimo na osnovi kontrolnega testa, ki vsebuje 100 arbitrarnih enot antigliadinskih protiteles na mikroliter, in na osnovi presečnih vrednosti, ki jih je določil proizvajalec. Vse vrednosti pod presečno vrednostjo razumemo kot negativne. Ker je bila naša študija retrospektivna, absolutnih vrednosti pod presečno vrednostjo nismo več mogli dobiti;
- v obdobju od jeseni leta 1992 do avgusta 1995, iz katerega so zajeti otroci za našo študijo, so v laboratoriju zamenjali komercialni test podjetja Pharmacia® s testom podjetja Eurospital®. Tako smo za AGA dobili vrednosti, testirane s komercialnimi testi dveh proizvajalcev, katerih absolutne in presečne vrednosti med seboj niso primerljive.

Zato smo tudi vrednosti antigliadinskih protiteles lahko vrednotili le kot pozitivne ali negativne.

Zbiranje podatkov

Vso potrebno dokumentacijo (popise bolezni otrok, ki so se zdravili v bolnišnici, ambulantne kartone, histološke in laboratorijske izvide) sem dobil v arhivu otroškega oddelka, v kartoteki pediatrične gastroenterološke ambulante, v arhivu oddelka za patološko morfologijo in v arhivu oddelka za laboratorijsko diagnostiko Učne bolnišnice Maribor.

V obdobju od jeseni 1992 do avgusta 1995 je bilo biopriranih 192 otrok. Iz njihove dokumentacije smo zbrali podatke o starosti, spolu, klinični sliki in prehrani (predvsem glede brezglutenske diete), stopnji atrofije sluznice tankega črevesa ter prisotnosti serumskih AGA in EMA. Pozorni smo bili tudi na vse ostale posebnosti v zvezi z zdravstvenim stanjem otrok.

Obdelava podatkov

Vsak serološki izvid smo lahko vrednotili le kot pozitiven ali negativen. Imamo torej atributivno spremenljivko dihatomnega značaja. Stopnja atrofije sluznice tankega črevesa pa je atributivna spremenljivka ordinalnega značaja (19).

Povezanost med stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa in odstotkom otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci v skupini otrok glede na stopnjo atrofije smo ocenili na osnovi koeficientov korelacije ranga po Spearmanu (r_s).

Za posamezne serumske označevalce in kombinacije smo računali:

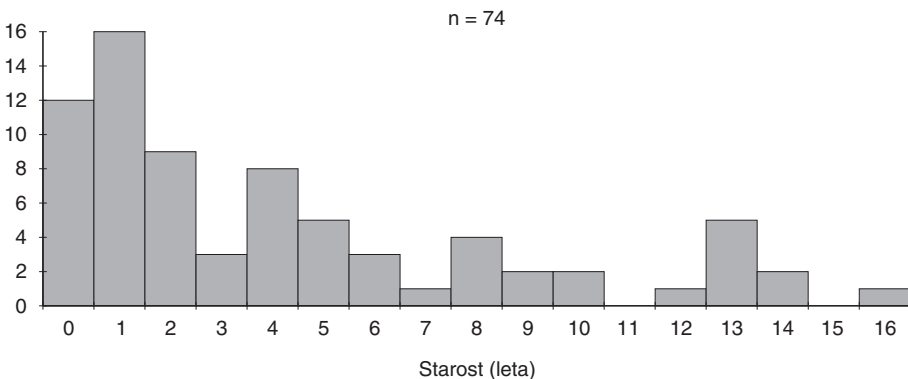
- verjetnost, da je črevesna sluznica atrofična, če so serumski označevalci pozitivni, kar smo izračunali kot odstotek »pravilno pozitivnih« glede na prisotnost atrofije sluznice tankega črevesa. Tako smo ocenili zanesljivost pozitivnih serumskih označevalcev kot kazalcev prisotnosti črevesne atrofije;
- verjetnost, da je sluznica zdrava, če so serumski označevalci negativni, torej odstotek »pravilno negativnih« glede na atrofijo, in tako ocenili zanesljivost negativnih serumskih označevalcev kot kazalcev zdrave sluznice tankega črevesa.

Bolniki

Glavni kriterij uvrstitve otroka v študijo je bila sočasnost biopsije sluznice tankega črevesa z odvzemom krvi za določitev AGA in EMA. Če omenjena posega nista bila opravljena isti dan, smo upoštevali samo tiste otroke, pri katerih je bila kri odvzeta pred biopsijo ob pogoju, da se do biopsije prehrana (glede na brezglutensko dieto) ni spremenila. Zavedamo se namreč, da prehod na brezglutensko dieto ali obremenitev z glutenom lahko bistveno spremenita vrednosti obravnavanih protiteles že v enem tednu (20), medtem ko se atrofija črevesne sluznice popravi šele v nekaj mesecih, povsem pa komaj po približno 2 letih pri otrocih, pri odraslih pa se lahko popravi tudi šele kasneje, po 3 do 4 letih (21).

Starostna struktura

Tako smo dobili skupino 74 otrok, 34 deklet in 40 fantov. Povprečna starost otrok je bila 58,1 mesec (4 leta in 4 mesece). Najstarejši fant je bil star 16 let in 4 mesece, dve deklici in deček pa so bili z 8 meseci najmlajši. Starostno strukturo prikazuje slika 1.



Slika 1. Starostna porazdelitev otrok. Število vseh preiskovancev je 74.

Čas med biopsijo in odvzemom krvi za določitev antigliadinskih in antiendomijskih protiteles

Pri 15 otrocih sta bila odvzem krvi in biopsija opravljena isti dan. Pri ostalih je bil odvzem krvi v povprečju 9,3 dni pred biopsijo. V tem času se dieta otrok ni spremenila. Porazdelitev prikazuje tabela 2.

Tabela 2. Porazdelitev otrok glede na čas med odvzemom krvi za določitev antigliadinskih in antiendomijskih protiteles in biopsijo.

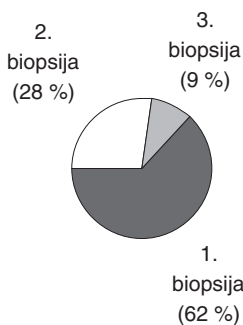
Dnevi med odvzemom krvi in biopsijo	Število otrok
0	15
1–7	34
8–14	11
15–21	7
22–28	4
29. dan in pozneje	3
Skupaj	74

Število biopsij

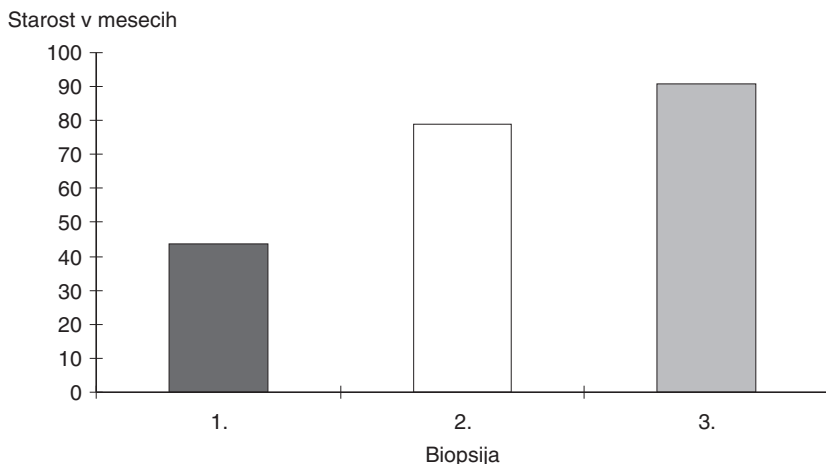
Pri 46 otrocih je šlo za prvo biopsijo, pri 21 za drugo biopsijo, 7 otrok pa je imelo tretjo biopsijo (slika 2). Odstotke in povprečno starost otrok pri posameznih biopsijah prikazuje strukturalni krog in stolpci na sliki 3. Naraščanje povprečne starosti otrok od 1. do 3. biopsije se tako ujema s shemo diagnostičnega postopka po kriterijih ESPGAN-a (3, 4), opisanih v uvodu članka.

Dieta

Vseh 46 otrok je do 1. biopsije jedlo normalno hrano. 21 otrok, ki so prišli na 2. biopsijo, je bilo na dieti brez glutena, vendar pa se je niso vsi povsem držali. Sedem otrok je na 3. biopsijo prišlo po približno polletni obremenitvi z glutenom.



Slika 2. Delež otrok pri 1., 2. in 3. biopsiji.



Slika 3. Povprečna starost otrok ob 1., 2. in 3. biopsiji (v mesecih).

Natančnega trajanja diete za vse otroke nismo mogli določiti. Na 2. kontrolno biopsijo naročamo otroke po približno dveh letih in na 3. biopsijo pol leta kasneje. Otrokom, ki se brezgluten-ske diete ne držijo povsem, 2. biopsijo lahko napravimo tudi pozneje (po treh ali štirih letih).

Diagnoze

Podatki v tabeli 3 se nanašajo na diagnoze, ki smo jih razbrali iz popisov bolezni in ambulantnih kartonov v času biopsije. Pri mnogih otrocih je danes dokončna diagnoza že znana, vendar iz dokumentacije tega ni bilo vedno mogoče ugotoviti (nekateri otroci so prišli na biopsijo v Maribor od drugod in jih naprej vodijo drugi pediatri).

Tabela 3. Diagnoze v raziskavi obravnavanih otrok v času biopsije. *Diagnoza po modificiranih kriterijih ESPGAN-a, **diagnoza po klasičnih kriterijih ESPGAN-a, ***herpetiformni dermatitis je po zdajšnjem pojmovanju ena od oblik celiakije (5).

Diagnoza	Število otrok po 1. biopsiji	Število otrok po 2. biopsiji	Število otrok po 3. biopsiji	Skupaj
Celiakija				
– otroci v diagnostičnem postopku	40	15	0	55
– prehodna oblika	0	0	2	2
– končna diagnoza	0	6*	4**	10
– herpetiformni dermatitis***	1	0	0	1
Kronična enteropatija	2	0	1	3
Nespecifični enterokolitis	2	0	0	2
Postenteritična enteropatija	1	0	0	1
Skupaj	46	21	7	74

Dokončno diagnozo celiakije po modificiranih kriterijih ESPGAN-a (7) lahko postavimo šele ob pozitivni 1. biopsiji ter hitrem in popolnem izboljšanju klinične slike po uvedbi brezglutenske diete skupaj z izginotjem serumskih označevalcev. Ostale otroke, ki teh kriterijev niso izpolnjevali (netipična celiakija, prekrški v dieti ipd.), smo zato obravnavali kot otroke v diagnostičnem postopku. Pri njih bo (in je pri nekaterih morda že) diagnoza znana, ko bomo speljali diagnostiko po klasični poti (2, 3). Diagnoze v raziskavi obravnavanih otrok v času biopsije prikazuje tabela 3.

Razvrstitev otrok v skupine

Na osnovi histoloških izvidov smo glede na stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa otroke razvrščali v tri skupine. Opredelitev, ali gre za zdravo sluznico ali pa za popolno atrofijo sluznice, nam ni delala težav. Pri vmesnih stopnjah pa je bila odločitev težja. Ob upoštevanju dolžine črevesnih resic smo v skupino z zmerno atrofijo sluznice lahko uvrstili samo pet otrok, zato smo se odločili, da te otroke pridružimo skupini z delno atrofijo. Tako smo na koncu glede na stopnjo atrofije dobili tri približno enako velike skupine. Glede na število otrok v študiji (74 otrok) in glede na to, da smo serološke označevalce, ki smo jih želeli primerjati s stopnjo atrofije, lahko vrednotili le kot pozitivne ali negativne, razdelitev v več skupin tudi ne bi bila smiselna. Skupine so prikazane v tabeli 4.

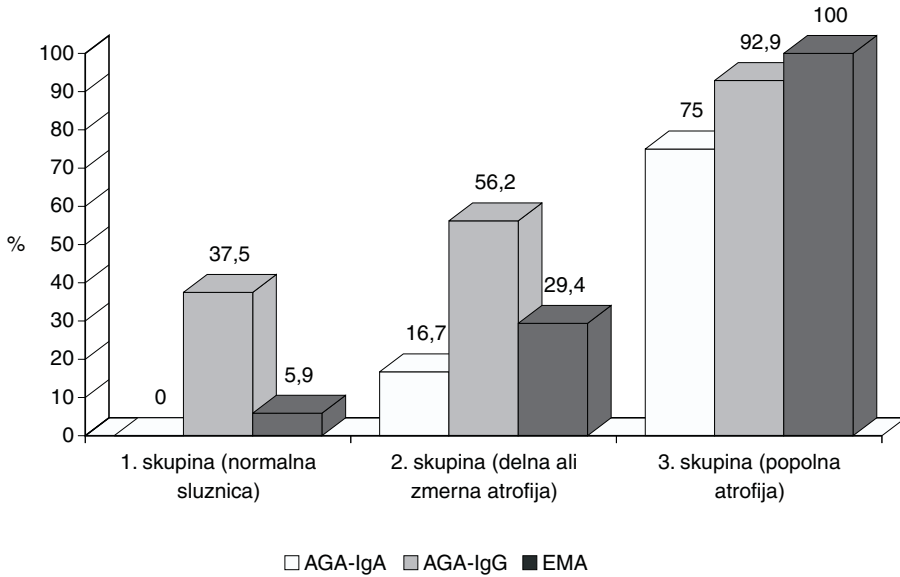
Tabela 4. Razvrstitev otrok v tri skupine glede na stopnjo atrofije črevesne sluznice. AGA-IgA označevalec je bil določen pri vseh otrocih, AGA-IgG in EMA pa ne pri vseh.

Skupina	Št. otrok	Dekleta	Fantje	št. otrok, pri katerih so bili določeni posamezni označevalci		
				AGA-IgA	AGA-IgG	EMA
1. skupina (normalna sluznica)	24	11	13	24	16	17
2. skupina (delna ali zmerna atrofija)	30	12	18	30	16	17
3. skupina (popolna atrofija)	20	11	9	20	14	15
Skupaj	74	34	40	74	46	49

Rezultati

Odstotki otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci po skupinah glede na stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa

Na sliki 4 so primerjalno prikazani odstotki otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci po posameznih skupinah. Odstotki otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci med skupinama 1 in 2 so statistično značilni le za AGA-IgA ($p < 0,05$), za AGA-IgG in EMA pa razliki med skupinama 1 in 2 nista statistično značilni ($p > 0,5$). Razlike med skupinami 2 in 3 se povsod statistično razlikujejo ($p < 0,01$).



Slika 4. Odstotki otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci celiakije po skupinah otrok glede na stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa.

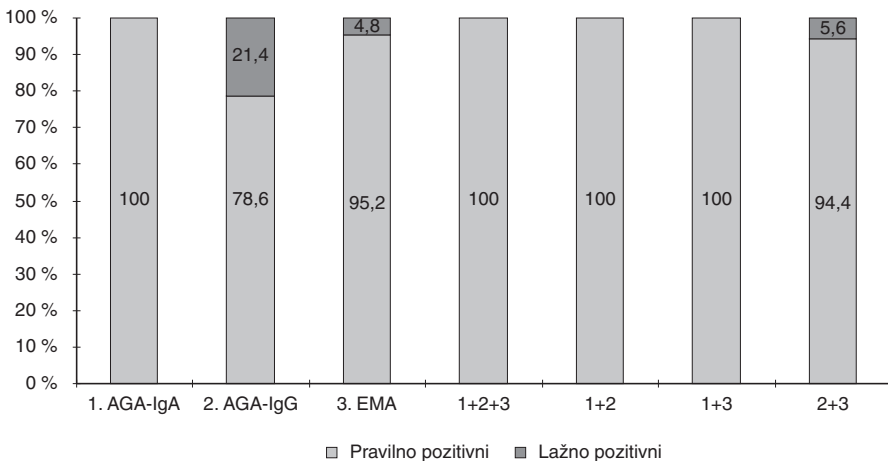
Tudi razlike med otroki z zdravo sluznico (1. skupina) in tistimi z atrofično sluznico (neglede na stopnjo atrofije, torej 2. in 3. skupina skupaj) so statistično značilne. Za AGA-IgA in EMA je p manjši od 0,001, za AGA-IgG pa je p manjši od 0,05.

Spearmanovi koeficienti korelacije ranga

Za odstotke otrok s pozitivnimi AGA oz. EMA po skupinah glede na stopnjo atrofije črevesne sluznice smo izračunali Spearmanove koeficiente korelacije ranga (r_s). Pri vseh je statistično tveganje skoraj zanemarljivo ($p < 0,0001$) (tabela 5).

Tabela 5. Koeficienti korelacije ranga po Spearmanu (r_s) med odstotkom otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci po skupinah otrok glede na stopnjo atrofije črevesne sluznice

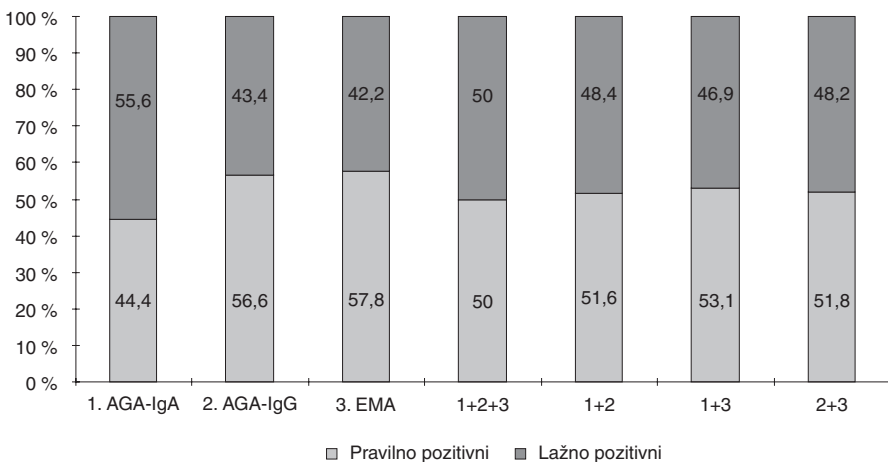
Označevalec	r_s
AGA-IgA	0,63034
AGA-IgG	0,45210
EMA	0,75499



Slika 5. Primerjava odstotkov »pravilno pozitivnih« za vsak posamezen označevalec celiakije in kombinacije. Razliko do 100 % predstavljajo »lažno pozitivni«.

Zanesljivost serumskih označevalcev kot kazalcev prisotnosti atrofije črevesne sluznice

Med otroki s pozitivnimi serumskimi označevalci smo izračunali odstotek otrok s prisotno atrofijo sluznice tankega črevesa (odstotek »pravilno pozitivnih«), med otroki z negativnimi serumskimi označevalci pa odstotek tistih z zdravo sluznico (»pravilno nega-



Slika 6. Primerjava odstotkov »pravilno negativnih« za vsak posamezen označevalec celiakije in kombinacije. Razliko do 100 % predstavljajo »lažno negativni«.

tivni«). Odstotke pravilno pozitivnih za vsak označevalec in kombinacije pregledno prikazujejo stolpci na sliki 5, odstotke pravilno negativnih pa stolpci na sliki 6.

Razprava

Poenostavitev diagnostičnega postopka pri sumu na celiakijo z uporabo otrokom prijaznejših neinvazivnih diagnostičnih postopkov je že dolgo potrebna. Vendar pa so mnega o možnostih opustitve biopsije sluznice tankega črevesa še vedno neenotna. V naši nalogi smo preučevali serumska AGA in EMA, ki jih v Mariboru določamo od leta 1992 naprej. Prisotnost omenjenih protiteles smo primerjali s stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa. V retrospektivni študiji smo zajeli skupino 74 otrok, pri katerih je bila za razjasnitev končne diagnoze biopsija črevesne sluznice po sedanjih kriterijih nujna. Zanimalo nas je, če bi morda pri nekaterih izmed teh otrok lahko določili stanje črevesne sluznice, ne da bi sploh delali biopsijo.

Otroke smo razvrstili v tri skupine glede na stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa. V vsaki skupini smo izračunali odstotek otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci. Na osnovi Spearmanovih koeficientov korelacije ranga smo potrdili povezanost med odstotkom otrok s pozitivnimi serumskimi označevalci celiakije in stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa ($p < 0,0001$).

Specifičnost in občutljivost serumskih označevalcev se v literaturi nanaša na diagnozo celiakije. V naši nalogi pa prisotnosti serumskih označevalcev nismo vrednotili glede na končno diagnozo celiakije, ampak smo jih primerjali s stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa. Naši rezultati zato s specifičnostmi in občutljivostmi, ki jih navajajo druge študije, niso primerljivi, zato v nalogi govorimo raje o zanesljivosti serumskih označevalcev kot kazalcev stopnje atrofije sluznice tankega črevesa.

Okvirno pa naše rezultate vseeno lahko primerjamo z drugimi študijami. Ujemanje pozitivnih serumskih označevalcev kot kazalcev stopnje atrofije črevesne sluznice s specifičnostmi, ki jih navaja literatura, je večinoma zanesljivo. Zanesljivost negativnih označevalcev kot kazalcev zdrave sluznice pa je bila pri nas nižja kot občutljivosti, ki jih navaja literatura. To si razlagamo kot posledico dejstva, da pri prehodu na brezglutensko dieto protitelesa iz seruma izginejo hitreje, kot pa se črevesna sluznica normalizira (20, 21). Pri uvrščanju otrok v raziskavo smo upoštevali le tiste, pri katerih sta bila biopsija in odvzem krvi za določitev protiteles opravljena istočasno, oziroma tiste, pri katerih se prehrana v času med odvzemom krvi in biopsijo ni spremenila. Očitno smo v skupino, kljub skrbnemu izboru, nehote vključili tudi otroke, pri katerih se je dietni režim pred biopsijo spremenil, tako da se je vrednost protiteles v serumu že spremenila, stopnja atrofije sluznice pa je ostala nespremenjena. Otroci s sumom na celiakijo pogosto preidejo na dieto že pred 1. biopsijo, nekateri otroci pa se predpisane diete pred 2. biopsijo ne držijo povsem (prekrški), tik pred kontrolno biopsijo pa preidejo na popolno dieto. Protitelesa iz seruma tako že izginejo, atrofija sluznice pa še ostane.

V literaturi navajajo za AGA-IgA veliko, za AGA-IgG pa majhno specifičnost, občutljivost pa je za AGA-IgA majhna, za AGA-IgG pa velika (12). Oba označevalca skupaj naj bi tako bila zelo specifična in občutljiva.

Zanesljivost pozitivnega AGA-IgA kot kazalca atrofije črevesne sluznice je bila pri naših otrocih 100-odstotna in za AGA-IgG 78,6-odstotna. AGA-IgA je bil torej dober kazalec atrofične sluznice, medtem ko je bil AGA-IgG slab kazalec. Negativen AGA-IgA je bil slab kazalec zdrave sluznice (44,4 %), kar smo po predvidevanjih iz literature pričakovali, vendar pa je bil tudi AGA-IgG razmeroma nezanesljiv (56,6 %), čeprav je po podatkih v literaturi zelo občutljiv.

Specifičnost serumskega označevalca EMA se v literaturi giblje med 95 % in 100 %, občutljivost pa med 90 % in 100 % (22–24). V naši skupini otrok je bil označevalec EMA pri 23 otrocih z normalno sluznico negativen, le pri eni deklici je bil mejno pozitiven in smo ga upoštevali kot pozitivnega. Zanesljivost pozitivnega označevalca EMA je bila tako 95,2-odstotna, torej slabša od zanesljivosti AGA-IgA, čeprav je v literaturi EMA bolj specifičen od AGA-IgA. Zanesljivost negativnega označevalca EMA pa je bila spet slaba, le 57,1-odstotna.

Nazadnje smo pogledali še kombinacije označevalcev. Zanimalo nas je, kako zanesljivi kazalci stanja sluznice so hkrati vsi trije pozitivni označevalci in spet dobili 100-odstotno zanesljivost, medtem ko je pri negativnih vseh treh hkrati sluznica neatrofična le v 50 %.

Zdaj se večina pediatrov pri otrocih, ki imajo negativne vse tri omenjene markerje, ne odloča za biopsijo sluznice tankega črevesa, razen pri zelo izraziti klinični sliki. Nasprotno pa je pri otrocih, ki imajo pozitivna vsa tri protitelesa. To je indikacija za biopsijo sluznice tankega črevesa (24).

Naše ugotovitve pa so v nasprotju s takimi odločitvami. Vsi trije hkrati pozitivni označevalci so bili namreč pri naših otrocih 100-odstotno zanesljivi kazalci atrofije, medtem ko je bila pri otrocih s hkrati negativnimi vsemi tremi označevalci sluznica zdrava le v 50 %.

Na vzorcu 74 otrok, ki smo jih zajeli v retrospektivno študijo, smo ugotovili, da vsi trije hkrati pozitivni obravnavani serumski označevalci celiakije zelo zanesljivo kažejo na atrofijo sluznice tankega črevesja, zato menimo, da bi bilo v teh primerih smiselno razmisliti, če je biopsija sploh potrebna, še posebej, če je tudi klinična slika značilna za celiakijo. Naše ugotovitve bi bilo zato zanimivo preveriti z obsežnejšimi in načrtovanimi raziskavami večjega števila otrok.

Zaključek

Pri otrocih, zajetih v našo študijo, smo ugotovili:

- da je odstotek otrok s pozitivnimi obravnavanimi serumskimi označevalci za vse označevalce koreliral s stopnjo atrofije črevesne sluznice ($p < 0,0001$);
- da je bila zanesljivost pozitivnih serumskih označevalcev kot kazalcev prisotnosti atrofije sluznice tankega črevesa zelo dobra (za AGA-IgA, za kombinacijo vseh treh markerjev ter za kombinaciji AGA-IgA+AGA-IgG in AGA-IgA+EMA smo dobili 100-odstotno zanesljivost);
- da je bila zanesljivost negativnih serumskih označevalcev kot kazalcev zdrave sluznice pri otrocih v naši študiji relativno slaba (44,4 %–57,1 %).

Iz navedenih ugotovitev lahko zaključimo, da bi bilo pri otrocih z izrazito klinično sliko celiakije in z visoko pozitivnimi vsemi tremi obravnavanimi serumskimi označevalci celiakije smiselno razmisliti o upravičenosti biopsije sluznice tankega črevesa. Seveda pa bi morale našo domnevo potrditi še druge študije na večjih vzorcih bolnikov, preden bi pri takih bolnikih zares lahko opuščali biopsijo sluznice tankega črevesa.

Zahvala

Mentorici prof. dr. Dušanki Mičetić – Turk, ki me je uvedla v raziskovalno delo, se zahvaljujem za vso pomoč in nasvete. Ves čas mi je stala ob strani in nikoli ji ni bilo žal časa in truda.

Zahvaljujem se tudi dipl. ing. matematike Meti Zaletel za pomoč pri statistični obdelavi podatkov, dipl. ing. pharm. Maksimilijanu Gorenjaku za nasvete pri vrednotenju seroloških testov, prof. Cvetani Tavzes za lektoriranje in gospe Marijani Gajšek – Marchetti za prevod izvlečka. Hvala tudi osebju otroškega oddelka mariborske bolnišnice, še posebej sestri Sonji Poštuvan, ki mi je pomagala pri iskanju popisov, in glavni sestri Ivici Brumec, ki mi je odstopila računalnik.

Literatura

1. Walker-Smith JA. Coeliac Disease. In: Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. Philadelphia: Decker, 1991: 700–18.
2. Weijers HA, Lindquist B, Anderson ChM, Rey J, Shmerling DH, Visakorpi JK, Hadorn B, Grüttner R. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand* 1970; 59: 461–3.
3. McNeish AS, Harms HK, Rey J, Shmerling DH, Visakorpi JK, Walker Smith JA: The diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1979; 54: 783–6.
4. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909–11.
5. Visakorpi JK. The diagnosis of coeliac disease. *Annales Nestlé* 1993; 51: 43–9.
6. Silverman A, Roy CC. *Pediatric Clinical Gastroenterology*. St Louis: Mosby, 1983: 265–80.
7. Mičetić-Turk D. Analiza intraepitelnih limfocitov (IEL) kot diagnostični kriterij za celiakijo. In: *Izbrana poglavja iz pediatrije*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1993: 32–8.
8. Shinner M, Nichols VN, Barrish JP, Nichols BL. Pathogenesis of small intestinal mucosal lesions in chronic diarrhea in infancy: II. An electron microscopic study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 464–80.
9. Radolli L. *Aktivnost črevesnih disaharidaz pri otrocih z glutensko enteropatijo: korelacija s stopnjo atrofije sluznice tankega črevesa*. Magistrsko delo. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1994.
10. Igerc-Grošelj B. Primerjava dveh presejalnih metod za določitev celiakije: obremenilnega testa z D-ksilozo in IgA antigliadinskimi protitelesi. In: *Izbrana poglavja iz pediatrije*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1993: 27–31.
11. Murch S, Walker-Smith J. The immunology of coeliac disease. *Annales Nestlé* 1993; 51: 59–65.
12. Troncone R, Ferguson A. Antigliadin antibodies. *J Ped Gastroenterol Nutr* 1991; 12: 150–8.
13. Mičetić-Turk D, Vio PMA, Sinkovič K. Peroralna biopsija tankega črevesa pri otrocih. *Zdrav Vestn* 1979, 48: 13–6.
14. Desjeux JF, Sassier P, Tichet J, Sarrut S, Lestrade H. Sugar absorption by flat jejunal mucosa. *Acta Paediatr Scand* 1973; 62: 531–7.
15. Berg NO, Dahlquist A, Lindberg T, Norden A. Correlation between morphological alterations and enzyme activity in the mucosa of small intestine. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 51–4.

16. Heitlinger LA, Rossi TM, Ping-Cheung L, Lebenthal E. Human intestinal disaccharidase activities: correlation with age, biopsy technique and degree of villus atrophy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12: 204–8.
17. Calvin RT, Klish WJ, Nichols BL. Disaccharidase activities, jejunal morphology and carbohydrate tolerance in children with chronic diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; 4: 949–53.
18. Hyams JS, Stradford RJ, Watkins JB. Correlation of lactose breath hydrogen test, intestinal morphology, and lactase activity in young children. *J Pediatr* 1980; 97: 609–12.
19. Adamič Š. Temelji biostatistike. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1989.
20. Troncone R, Caputo N, Micillo M, Maiuri L, Poggi V. Immunologic and Intestinal Permeability Test as Predictors of Relapse during Gluten Challenge in Childhood Coeliac Disease. *Scand J Gastroenterol* 1994: 144–7.
21. Juteršek A. Patomorfologija sluznice jejunuma pri celiakiji. In: *Izbrana poglavja iz pediatrije*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1993: 39–55.
22. Multicenter Study on the Reproducibility of Antigliadin (AGA) and Antiendomysial Antibodies (EmA) in Celiac Sprue Screening. *J Clin Gastroenterol* 1994; 19: 81–2.
23. Chan KN, Phillips AD, Mirakian R, Walker-Smith: Endomysial Antibody Screening in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18: 316–20.
24. Bürgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nusslé D, Reymond-Berthet C. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child* 1991; 66: 941–7.

Prispelo 1. 7. 1996