

РЕФЕРЕНСНЫЕ ГРАНИЦЫ МАРКЕРОВ ЦЕЛИАКИИ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ELIA НА АВТОМАТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ PHADIA 250

М.А. Сновская^{1*}, Е.Л. Семикина¹, М.Г. Вершинина^{1,2}, Т.Н. Коноплева¹, А.А. Жужула¹
¹ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава РФ, Москва,
²ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» УД Президента РФ, Москва

REFERENCE LIMITS OF CELIAC DISEASE MARKERS OBTAINED WITH ELIA TECHNIQUE AND AUTOMATED ANALYZER PHADIA 250

M.A. Snovskaya^{1*}, E.L. Semikina¹, M.G. Vershinina^{1,2}, T.N. Konopleva¹, A.A. Zhuzhula¹
¹National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russia,
²Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russia

E.mail: snows@inbox.ru

Аннотация

Нами проведено обследование клинически здоровых детей и детей с ранее диагностированной целиакией двух возрастных групп – 8-12 лет (728 здоровых детей, 72 пациента) и 12-18 лет (696 здоровых детей, 60 пациентов) и определен уровень антител, используемых для диагностики целиакии. Уровень иммуноглобулинов класса А (IgA) к тканевой трансглутаминазе (ТГ) и иммуноглобулинов класса G (IgG) к деамидированным пептидам глиадина (ДГ) измеряли с помощью иммунофлюоресцентного метода на автоматическом анализаторе Phadia250 (Thermo Fisher Scientific). Порог позитивности, установленный производителем тестовой системы, принят равным 10.0 Е/мл, а границы так называемой «серой зоны» - 7.0÷9.9 Е/мл. Показано, что уровень IgA и IgG к изучаемым параметрам у здоровых детей был значимо ниже 7.0 Е/мл (нижней границы «серой зоны»). Концентрация IgG к ДГ у 95% детей не превышала значения 5.0 Е/мл независимо от возраста. Концентрация IgA к ТГ статистически значимо была выше у детей 12-18 лет ($p=0.031$), но не превышала значения 6.7 Е/мл, а у 95% детей 8-12 лет это значение не превышало концентрации 5.1 Е/мл. Анализ полученных данных показал высокую клиническую специфичность обоих тестов для детей независимо от возраста. Однако клиническая чувствительность теста зависела от возраста пациентов и применяемого для диагностики параметра. У детей 8-12 лет чувствительность тестов IgA к тканевой трансглутаминазе и IgG к ДГ была равна 86.1 и 76.4% соответственно, у детей 12-18 лет – 96.7 и 50.1% соответственно. Снижение порогового значения «cut-off» до 7.0 Е/мл значимо повышало чувствительность теста IgG к ДГ. Для теста IgA к деамидированным пептидам глиадина оптимальной являлась установленная производителем граница, равная 10.0 Е/мл.

Ключевые слова: диагностика целиакии, иммунофлюоресцентный анализ, антитела.

Abstract

Clinically healthy children (728 aged 8-12 and 696 aged 12-18) and children with previously diagnosed celiac disease (72 aged 8-12 and 60 aged 12-18) were taken in the study so as to determine levels of antibodies indicative of the celiac disease. Levels of anti-tissue transglutaminase antibodies IgA (tTG-IgA) and levels of deamidated gliadin peptide antibodies IgG (anti-DGP IgG) were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELIA) by analyzer Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific). The positivity threshold - set by the manufacturer of the test system - is equal to 10.0 U / ml, and boundaries of the so-called "gray zone" - 7.0 ÷ 9.9 U / ml. It was shown that IgA and IgG level in the studied parameters in healthy children was significantly lower than 7.0 U / ml (lower border of "gray zone"). The concentration of IgG to dg in 95% of children did not exceed 5.0 U / ml, regardless of age. IgA concentration to Tg was statistically significantly higher in children aged 12-18 ($p = 0.031$) but did not exceed 6.7 U / ml, and in 95% of children aged 8-12 this value did not exceed 5.1 U / ml. The obtained findings showed a high clinical specificity of both tests in children, regardless of age. However, the clinical sensitivity of this test depends on patient's age and diagnostic parameter.

For children aged 8-12, the sensitivity of tTG-IgA and anti-DGP IgG tests was 86.1% and 76.4%, respectively, and for children aged 12-18 – 96.7% and 50.1%, respectively. Lowering the cut-off threshold up to 7.0 U/ml significantly increases sensitivity of anti-DGP IgG test. As for tTG-IgA test, the optimal threshold limit was 10 E/ml, as it has been set by the manufacturer.

Key words: celiac disease, diagnostics, immunofluorescence analysis, antibodies.

Ссылка для цитирования: Сновская М.А., Семикина Е.Л., Вершинина М.Г., Коноплева Т.Н., Жужула А.А. Референсные границы маркеров целиакии, полученные методом elia на автоматическом анализаторе Phadia 250. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2021; 4: 31-36.

Многие заболевания желудочно-кишечного тракта имеют общие клинические симптомы, затрудняющие дифференциальную диагностику

[1, 2]. Несмотря на то что целиакия является одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний в мире, частота правильно по-

ставленных диагнозов на ранних сроках низка [3], что можно объяснить разнообразием клинических проявлений целиакии, а также сходством симптомов данной патологии с симптомами других глютен-ассоциированных заболеваний [4, 5].

Дифференциальная диагностика заболеваний желудочно-кишечного тракта, имеющих сходные клинические проявления, является трудоемкой задачей, требующей инвазивных методов исследования (эндоскопическое исследование, биопсия) [6, 7]. Кроме того, эндоскопия с биопсией — это высокотехнологичный, дорогостоящий метод, недоступный для полномасштабного скрининга населения [3, 4].

В связи с этим для диагностики целиакии широкое применение получили лабораторные методы, правильная оценка результатов которых сокращает время постановки диагноза и снижает риск осложнений у пациента [8, 9]. В литературе показано, что наличие у пациента с подозрением на целиакию аутоантител коррелирует с развитием воспалительного процесса в тонкой кишке, а измерение их уровня позволяет контролировать течение заболевания и оценивать эффективность проводимой терапии [7, 10].

Внедрение в практику иммунофлюоресцентного метода, реализованного на базе автоматического анализатора, позволило выявлять у пациента сверхнизкие концентрации аутоантител, использовать малые объемы биоматериала, уменьшить количество ошибок на аналитическом этапе. Однако клиническая информативность данных тестов остается неоднозначной [11, 12]. Для оценки клинической значимости определенного уровня аутоантител, выявленного у пациента, необходимо обоснованное определение референсных интервалов маркеров целиакии, которые отражают групповую биологическую вариацию и чаще применяются для разграничения патологии от состояния здоровья [11, 12].

Использование новых технологий исследования сыворотки крови ставит задачу пересмотра существующих референсных норм. В ряде зарубежных работ представлены данные по референсным границам для антиглиадиновых антител и антител к тканевой трансглутаминазе, однако информация для детской популяции Российской Федерации в настоящее время не представлена.

Цель настоящего исследования — оценить диагностическую значимость показателей концентрации IgA к тканевой трансглутаминазе (ТГ) и IgG к деамидированным пептидам глиадина (ДГ) в сыворотке крови для диагностики глютенчувствительной целиакии и определить диапазоны референсных значений данных параметров

для детей Российской популяции различных возрастных диапазонов с помощью ферментсвязанного иммуносорбентного анализа (enzyme-linked immunosorbent assay - ELIA) на автоматическом анализаторе Phadia250 (Thermo Fisher scientific).

Материалы и методы

Для реализации цели исследования проведено ретроспективное исследование с использованием медицинской документации пациентов и данных из лабораторной информационной системы (ЛИС) лаборатории Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей, далее Центра (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва). В исследование были включены 1556 детей в возрасте от 8 до 18 лет, ранее прошедших обследование в различных отделениях Центра.

Группу здоровых детей составили 728 детей в возрасте 8-12 лет и 696 детей в возрасте 12-18 лет, не имеющих клинических проявлений целиакии и патологии желудочно-кишечного тракта. Поводом для их обращения в Центр стало проведение плановой диспансеризации, в рамках которой проводились биохимические анализы. Уровни ТГ и ДГ определяли на остаточных количествах сыворотки, подлежащих утилизации.

У 132 детей, участвовавших в исследовании, ранее был оставлен диагноз глютенчувствительной целиакии (72 ребенка в возрасте 8-12 лет, 60 детей в возрасте 12-18 лет). Главными критериями отбора пациентов для включения в данное исследование служили: симптомы мальабсорбции, нарушение белково-энергетического обмена, длительность течения заболевания у детей старше 1 года не менее 6 мес на момент обращения в Центр. Дополнительными критериями включения являлись: готовность участвовать в исследовании с соблюдением всех юридических аспектов (информированное согласие), возраст пациента от 1 года до 18 лет включительно, отсутствие хронических инфекций, отсутствие острых вирусных инфекций во время наблюдения, проведения обследования и взятия образцов крови для серологических исследований.

Полученные в ходе клинических наблюдений результаты были подвергнуты статистической обработке с использованием MS Excel пакета MS Office (Microsoft, США), программы для обработки данных SPSS Statistica (IBM, США). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0.05$.

У всех включенных в исследование детей в сыворотке крови были определены концентрации IgA к тканевой трансглутаминазе и IgG к де-

Таблица 1

Статистические характеристики параметров концентрация IgA к тканевой трансглутаминазе и IgG к деамидированным пептидам глиаина

Параметр	Возраст, годы	Количество детей	Среднее	Стандартное отклонение	Минимум	Максимум	50 процентиль	95 процентиль
IgA к ТГ	8-12	728	0.84	0.22	0.0	9.7	0.4	5.1
	12-18	696	1.03	0.29	0.0	9.2	0.6	6.6
IgG к ДГ	8-12	728	0.96	0.25	0.0	9.5	0.5	4.6
	12-18	696	1.09	0.24	0.0	10.0	0.5	5.0

Примечание. Здесь и в табл. 2 IgA к ТГ — антитела IgA к тканевой трансглутаминазе, IgG к ДГ — антитела IgG к деамидированным пептидам глиаина.

амидированным пептидам глиаина с помощью иммунофлюоресцентного метода, реализованного на автоматическом анализаторе Phadia 250.

Согласно рекомендуемой производителем тестовой системе порогового значения «cut-off», положительными считались результаты, равные и превышающие 10.0 Е/мл. Диапазон значений, в котором результаты не могут быть однозначно интерпретированы как позитивные или негативные и обозначаются как сомнительные («серая зона»), установлен производителем в пределах от 7.0 до 9.9 Е/мл.

Взятие крови у пациента проводили из локтевой вены в пробирку с разделительным гелем, после чего образец центрифугировали в течение 15 мин при 1500 об/мин для получения сыворотки, которую отбирали и затем хранили при температуре $+4 \div +6^{\circ}\text{C}$ в течение 4 ч до момента отправки в лабораторию.

Результаты и обсуждение

Мы оценили концентрацию IgA к тканевой трансглутаминазе (ТГ) и IgG к деамидированным пептидам глиаина (ДГ) у здоровых детей, не имеющих симптомов целиакии и других заболеваний желудочно-кишечного тракта. У здоровых детей 8-12 лет концентрация IgA к ТГ в среднем составляла 0.84 Е/мл (стандартное отклонение, *standart deviation*, $SD=0.22$), при этом у 95% из них концентрация антител не превышала значения 5.12 Е/мл. У детей в возрасте 12-18 лет концентрация IgA к ТГ была статистически значимо выше (1.03 ± 0.29 Е/мл), у 95% детей концентрация антител не превышала значение 6.61 Е/мл. Показаны статистически значимые различия между группами детей 8-12 и 12-18 лет (критерий Манна—Уитни, $p=0.033$). Данные приведены в табл. 1.

Статистически значимое различие в уровне антител IgG к ДГ у здоровых детей в возрасте 8-12 и 12-18 лет отсутствовало. Среднее зна-

чение концентрации IgG к ДГ было равным 1.02 Е/мл ($SD=0.25$ Е/мл), при этом у 95% из всех обследованных детей концентрация антител не превышала значения 5.0 Е/мл. Таким образом, мы определили, что у 95% здоровых детей концентрация антител к тканевой трансглутаминазе и деамидированным пептидам глиаина не превышает нижнюю границу серой зоны, равную 7.0 Е/мл.

На основании измеренных уровней изучаемых аутоантител у детей с целиакией (132 ребенка) и у детей здоровой когорты (502 ребенка) двух возрастных групп, мы провели ROC-анализ с целью установления оптимальной границы «cut-off», позволяющей с высокой надежностью диагностировать целиакию.

При установленном производителем тест-системы пороге позитивности для изучаемых параметров, равном 10.0 Е/мл, клиническая чувствительность и специфичность теста IgA к ТГ составили 86.1 и 99.7%, а теста IgG к ДГ — 69.4 и 97.8% соответственно для детей в возрасте 8-12 лет. Данные представлены на рис. 1.

Универсальным методом анализа ROC -кривых является оценка площади под кривой (*area under curve* — AUC), изменяющейся от 0.5 (отсутствие диагностической эффективности теста) до 1.0 (максимальная эффективность теста). В данной возрастной группе величина AUC для IgA к ТГ составила 0.938, для IgG к ДГ — 0.891, что говорит о хорошей предсказательной способности построенной модели ($p=0,014$ и $p=0.028$ соответственно).

Выявление антител IgG к деамидированным пептидам глиаина у детей в возрасте 8-12 лет обладало меньшей предиктивной способностью по сравнению с параметром IgA к тканевой трансглутаминазе у детей того же возраста. Снижение границы «cut-off» до 7.0 Е/мл повышало чувствительность (76.4%), при сохранении высокой специфичности теста (97.5%). В то же время при значениях «cut-off», равных 17.0 Е/мл, достига-

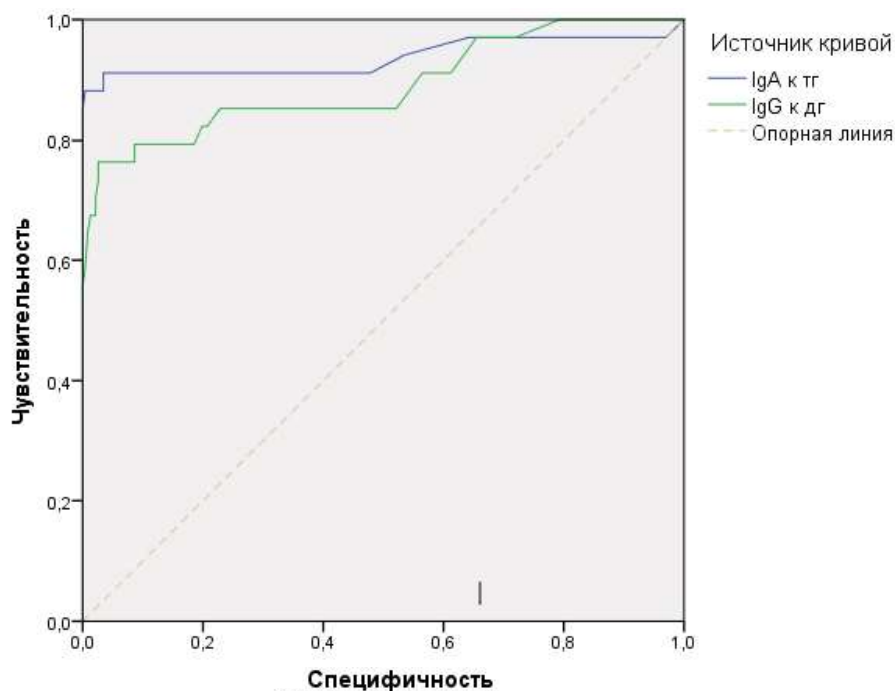


Рис. 1. ROC-кривые для диагностических маркеров целиакии у детей 8-12 лет.

лась 100.0% специфичность, однако при значительном снижении чувствительности (47.2%). Снижение «cut-off» для IgA к ТГ до 7.0 Е/мл значимо не изменяло чувствительность и специфичность теста (88.9 и 98.7% соответственно).

В возрастной группе 12-18 лет клиническая чувствительность и специфичность теста IgA к ТГ составили 96.7 и 99.9%, а теста IgG к ДГ – 50.1 и 98.6% соответственно для детей в возрасте 12-18 лет. Данные представлены на рис. 2.

Величина AUC для IgA к ТГ составила 0.967, для IgG к ДГ – 0.903, что говорит о хорошей предсказательной способности построенной модели ($p=0.019$ и $p=0.022$ соответственно). Как и в группе

детей 8-12 лет, параметр IgG к ДГ у детей в возрасте 12-18 лет обладал меньшей предиктивной способностью по сравнению с параметром IgA к ТГ. Снижение границы «cut-off» до 7.0 Е/мл повышало чувствительность (68.3%) при сохранении высокой специфичности теста (97.2%). В то же время при значениях «cut-off», равных 19.5 Е/мл, достигалась 100.0% специфичность, однако при значительном снижении чувствительности (31.7%). Снижение «cut-off» для IgA к ТГ до 7.0 Е/мл значимо не изменяло чувствительность и специфичность теста (98.3 и 99.7% соответственно).

Также нами отмечено значимое снижение чувствительности теста IgG к ДГ и увеличение

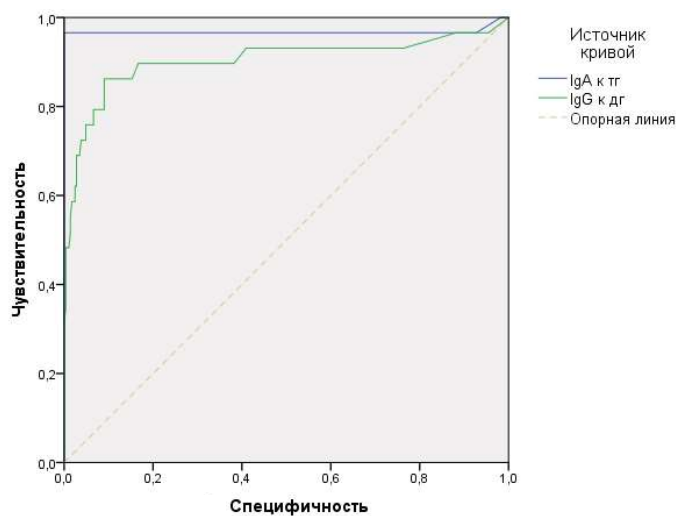


Рис. 2. ROC-кривые для диагностических маркеров целиакии у детей 12-18 лет.

Клиническая чувствительность и специфичность исследуемых тестов у детей двух возрастных диапазонов при различных порогах позитивности

Параметр	Возраст, годы	Порог «cut-off», Е/мл	Чувствительность, %	Специфичность, %
IgA к ТГ	8-12	10.0	86.1	99.7
IgA к ТГ	8-12	7.0	88.9	98.9
IgG к ДГ	8-12	10.0	69.4	97.8
IgG к ДГ	8-12	7.0	76.4	97.5
IgA к ТГ	12-18	10.0	96.7	99.9
IgA к ТГ	12-18	7.0	98.3	99.7
IgG к ДГ	12-18	10.0	50.1	98.6
IgG к ДГ	12-18	7.0	68.3	97.2

чувствительности теста IgA к ТГ для детей 12-18 лет по сравнению с детьми младшей возрастной группы. Сводные данные приведены в табл. 2.

Применение иммунофлюоресцентного метода определения антител к тканевой трансглутаминазе и деамидированным пептидам глиадина, реализованного на базе автоматического анализатора, позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики целиакии. Используемая нами современная стандартизованная технология дает возможность провести точное количественное определение концентраций антител с использованием малых объемов образца. Мы определили диагностическую ценность показателей концентрация IgA к тканевой трансглутаминазе и концентрация IgG к деамидированным пептидам глиадина в сыворотке крови у детей двух возрастных диапазонов – 8-12 и 12-18 лет, ранее не обследованных.

Нами показано, что у здоровых детей в возрасте 8-12 лет концентрация IgA к тканевой трансглутаминазе статистически значимо ниже, чем у детей 12-18 лет (критерий Манна–Уитни, $p=0.033$), в то же время статистически значимых различий в уровне антител IgG к деамидированным пептидам глиадина у здоровых детей изучаемых возрастных группы не отмечено. У 95% здоровых детей концентрация антител IgA к тканевой трансглутаминазе и IgG к деамидированным пептидам глиадина не превышала нижнюю границу «серой зоны», равную 7.0 Е/мл.

Определение уровней антител к тканевой трансглутаминазе и деамидированным пептидам глиадина являются высокоспецифичными тестами, однако чувствительность тестов различна и зависит от возраста. Порог позитивности для IgG к деамидированным пептидам глиадина, равный

10.0 Е/мл, показывает высокую специфичность для детей обоих возрастных диапазонов (97.0%), однако чувствительность при этом является низкой и уменьшается с возрастом (69.4 и 50.1% для детей 8-12 лет и 12-18 лет соответственно). В то же время показатель IgA к тканевой трансглутаминазе обладает высокой специфичностью и чувствительностью независимо от возраста пациента, при этом чувствительность теста увеличивается с возрастом. Таким образом, выявление антител IgA к тканевой трансглутаминазе в концентрации выше 10.0 Е/мл у детей старше 8 лет свидетельствует о наличии глютенной энтеропатии, а граница 10.0 Е/мл является оптимальной для данного лабораторного теста.

При выполнении исследования с применением иммунофлюоресцентного метода снижение границы «cut-off» с 10.0 до 7.0 Е/мл для параметра IgG к ДГ значительно повышает чувствительность диагностики при сохранении высокой специфичности.

Заключение

Изученные нами показатели обладают хорошими аналитическими характеристиками. Использование разработанных нами пороговых показателей позволяет проводить надежную диагностику целиакии у ранее не обследованных детей.

Литература

1. Pascual V., Dieli-Crimi R., López-Palacios N., et al. *Inflammatory bowel disease and celiac disease: Overlaps and differences // World J Gastroenterol.* – 2014. – V. 20. – №. 17. – P. 4846-4856. doi: 10.3748/wjg.v20.i17.4846.
2. Gujral N., Freeman H.J., Thomson A. *Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment // World J Gastroenterol.* – 2012. – V.18. – №. 42. – P. 6036-6059. doi: 10.3748/wjg.v18.i42.6036.

3. Lebwohl et al. // *Coeliac Disease. Lancet.* – 2018. – V. 391. – №. 10115. – P. 70-81. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31796-8.
4. Picarelli A., Di Tola M., Borghini R., et al. *The High Medical Cost of Celiac Disease Missed Diagnosis: Is it Cheaper to Suspect it in Time?* // *Intern Med.* – 2014. – V. 4:155. doi: 10.4172/2165-8048.1000155.
5. Sapone A., et al. *Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification* // *BMC Medicine.* – 2012. – V. 10. – №.13. doi: 10.1186/1741-7015-10-13.
6. Green P.H. *The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population.* // *Gastroenterology.* – 2005. – V.128. – P. 74-78. doi: 10.1053/j.gastro.2005.02.016.
7. Lauret E., Rodrigo L. *Celiac disease and autoimmune associated conditions.* // *BioMed Research International.* – 2013. – V.2013. – article ID 127589. doi: 10.1155/2013/127589.
8. Григорьев К.И., Богомаз Л.В. *Целиакия у детей: базовые сведения и принципы этапной помощи* // *Медицинская сестра.* – 2016. – №. 6. – С. 31-37. [K.I. Grigoryev, L.V. Bogomaz *Celiac disease in children: basic information and principles of staging care* // *Medicinskaya sestra (Medical nurse).* – 2016. – №. 6. – P. 31-37.
9. Захарова И.Н., Боровик Т.Э., Рославцева Е.А. и др. *Целиакия: диагностика и лечение.* // *Педиатрия.* – 2014. – №.4. – С. 59-64. [I.N. Zakharova, T.E. Borovik, E.A. Roslavitseva et al. *Celiac disease: diagnosis and treatment* // *Pediatriya (Pediatrics).* – 2014. – №.4. – P. 59-64.
10. Van der Windt, Daniëlle A. W. M. et al. *Diagnostic Testing for Celiac Disease Among Patients With Abdominal Symptoms* // *Journal of the American Medical Association.* – 2010. – V. 303. – №. 17. – P. 1738-1746. doi: 10.1001/jama.2010.549.
11. Национальный стандарт российской федерации от 01.01.2010. *Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. ГОСТ Р 53022.3-2008.* [The National standard of the Russian Federation from 01.01.2010. *Laboratory clinical technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory research . State standard R 53022.3-2008. In Russian*].
12. Камалова А.А., Тимофеева Д.О., Шакирова А.Р. *Современные аспекты диагностики целиакии у детей* // *Вопросы современной педиатрии* – 2020. – Т.19. – №.5. – С. 371-378. [Kamalova A.A., Timofeeva D.O., Shakirova A.R. *Modern Aspects of Celiac Disease Diagnosis in Children* // *Voprosi sovremennoy pediatrii (Issues of modern pediatrics)* – 2020. – V.19. – №. 5. – P. 371-378. In Russian]. doi: <https://doi.org/10.15690/vsp.v19i5.2217>.