

Retrospective multicenter study to compare the diagnostic performance of three tissue transglutaminase IgA tests for diagnosis of celiac disease

DAR Castelijn¹, AH Mulder², P van der Pol³, J Hollander¹, T Kuiper², C Bijmens⁴, J Damoiseaux⁴, HJ Bontkes¹

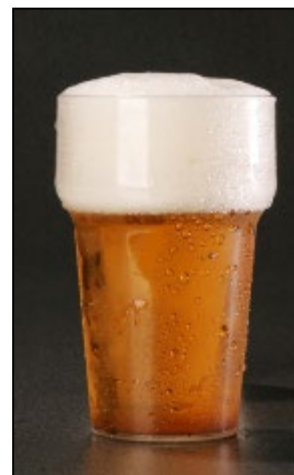
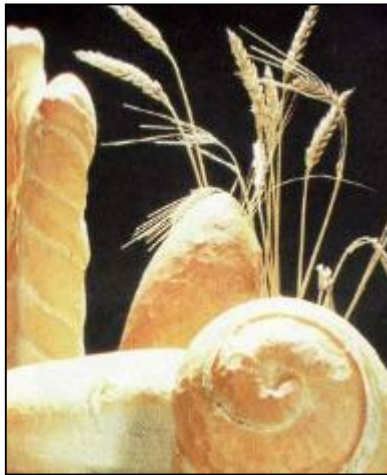
¹Laboratory Medical Immunology, Dept. Clinical Chemistry, Amsterdam UMC, location VUMC. Amsterdam Institute for Infection and Immunity, Amsterdam Gastroenterology Endocrinology Metabolism. ²Medlon B.V., Enschede; Ziekenhuis Groep Twente, Almelo. ³Medical Laboratories, Dept. of Immunology, Reinier Haga MDC, Delft. ⁴Central Diagnostic Laboratory, Maastricht University Medical Center.

d.castelijn@amsterdamumc.nl
hj.bontkes@amsterdamumc.nl

Definitie Coeliakie



Coeliakie is een auto-immune enteropathie veroorzaakt door gluten:
Een pro-inflammatoire immuunreactie veroorzaakt schade aan de dunne darm epitheel
waardoor de absorptie van voedingsstoffen wordt aangetast.

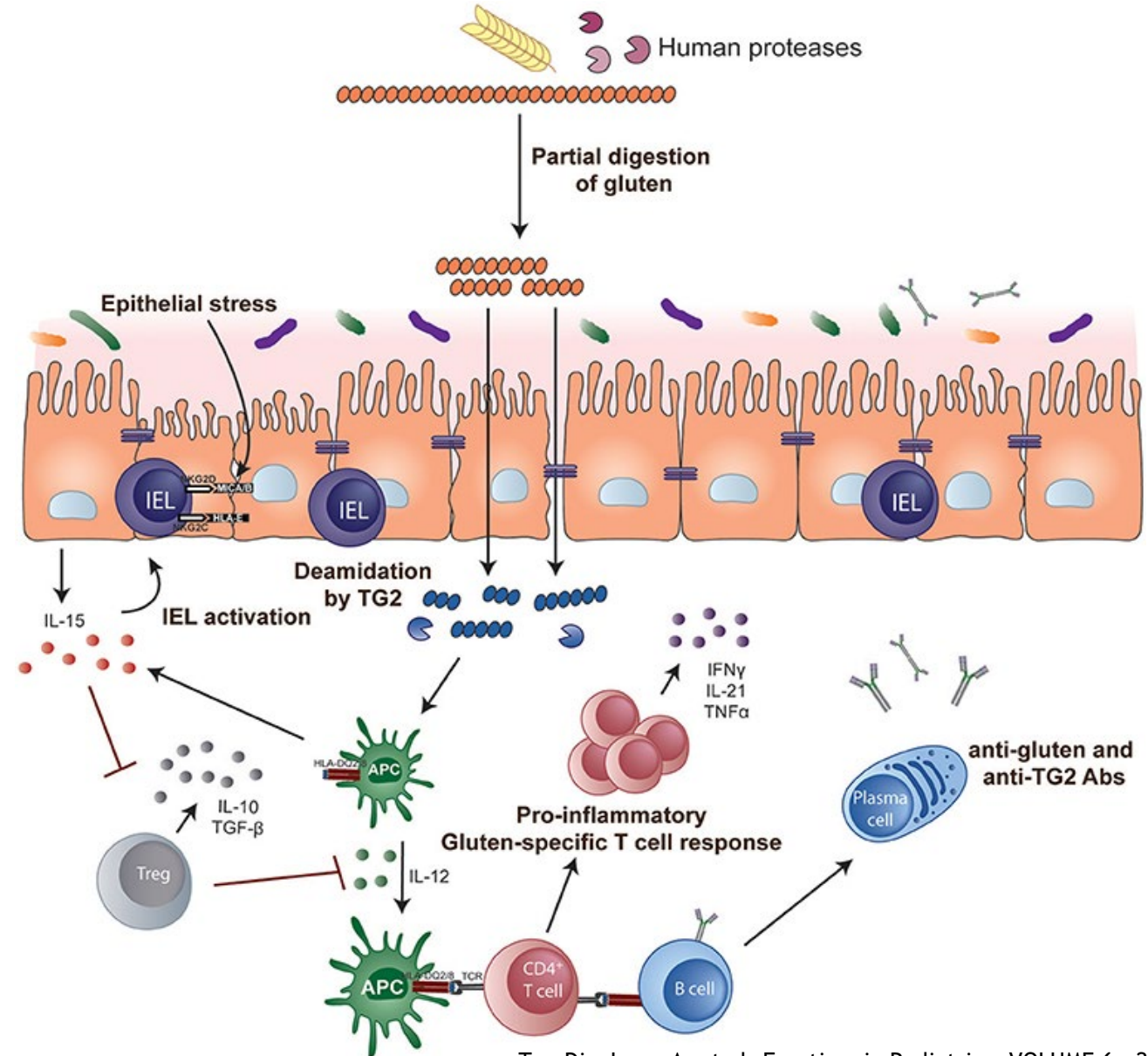


Enige succesvolle therapie: leven lang glutenvrij dieet

Pathogenese coeliakie



- Glutenpeptiden worden gedeamideerd door tissue transglutaminase
- Gedeamideerde peptiden worden door HLA-DQ2/8 gepresenteerd aan CD4+ T-cellen
- Pro-inflammatoire gliadine specifieke CD4+ T-cellen veroorzaken epitheel schade en activeren CD8+ IEL
- IL-15 geproduceerd door gestreste epitheel cellen en geactiveerde dendritische cellen activeren CD8+ IEL
- Gliadine specifieke T-cellen bieden hulp aan gliadine en transglutaminase specifieke B-cellen die uitrijpen tot anti-gliadine en anti-transglutaminase producerende plasmacellen



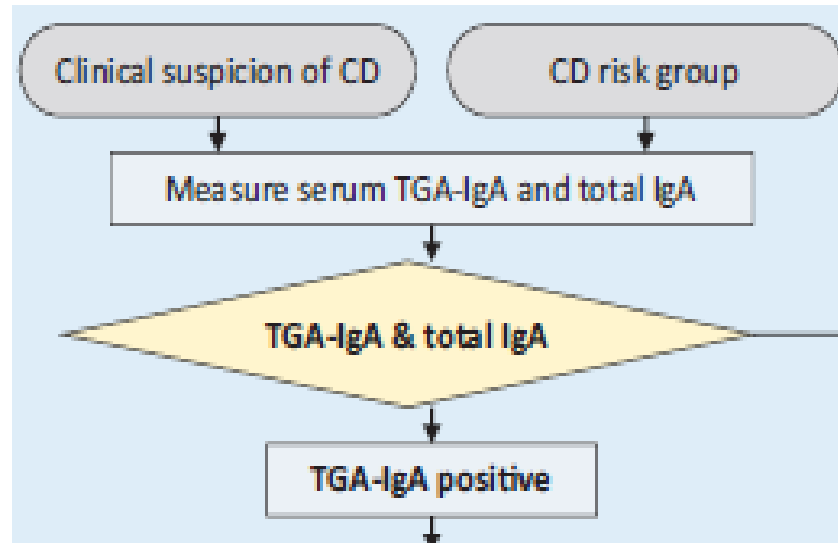
IgA deficiëntie en coeliakie



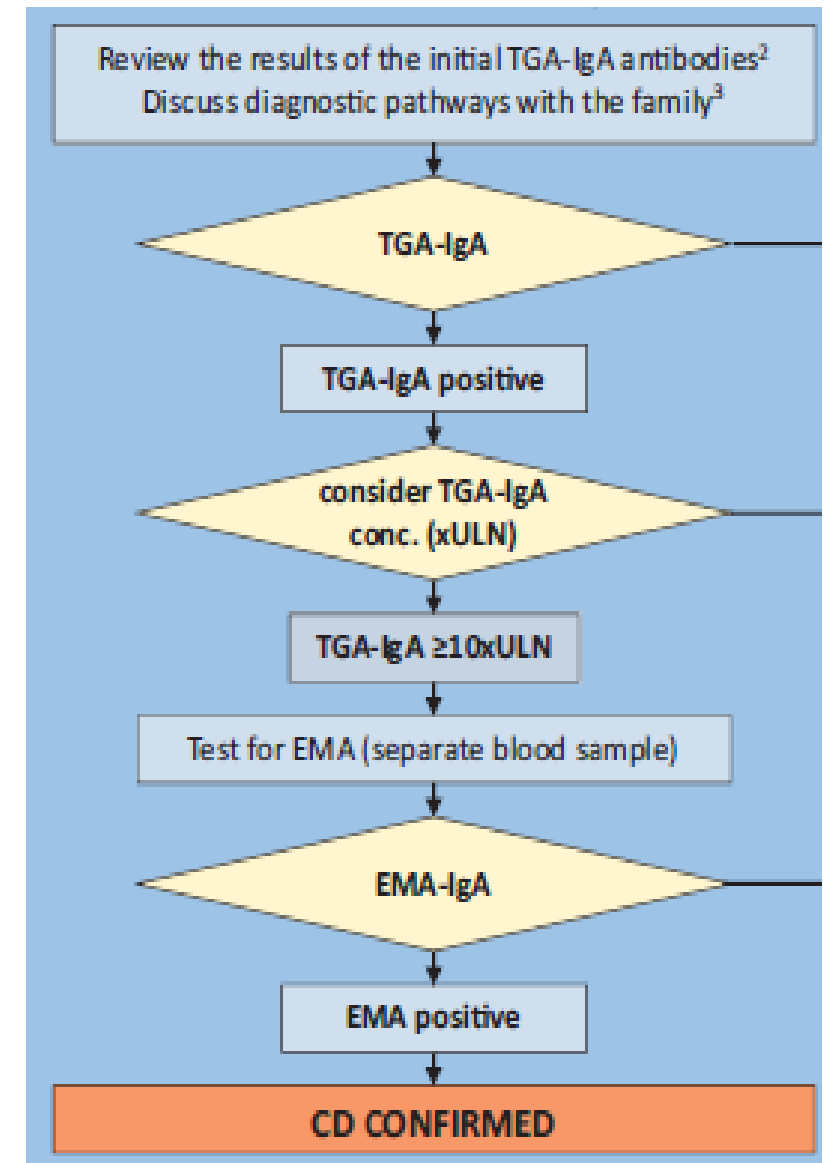
- 2-3 % van de coeliakie patiënten heeft een selectieve IgA deficiëntie
- Bij patiënten met normaal IgA zijn IgG antistoffen vaak niet aantoonbaar

	Patient A	Patient B
Totaal IgA	2,3 g/l	<0,06 g/L
tTG IgA	Positief	Negatief
Endomysium IgA	Positief	Negatief
tTG IgG	Negatief	Positief
Endomysium IgG	Negatief	Positief
DGP IgG	Negatief	Positief

Belangrijke rol serologie coeliakie diagnostiek



- Bij verdenking CD op basis van kliniek wordt tTG IgA ingezet
- Als positief verdere diagnostiek
- Als sterk positief (meer dan 10x de normaalwaarde (ULN)) kan bij kinderen de diagnose worden gesteld na bevestiging met endomysium antistoffen zonder verdere (invasieve) diagnostiek (sinds 2012)
- HLA typering niet meer noodzakelijk, geldt ook voor asymptomatische kinderen (2020)



Achtergrond en doel



- tTG antistoffen centraal in diagnose CD, waarbij de normaalwaarde/afkapwaarde van belang is voor de vervolgstappen
- Er worden verschillende assays gebruikt met verschillende test karakteristieken
- In Nederland zijn de meest gebruikte testen de Celikey FEIA test van Themofisher en de Quanta Flash CLIA test van Werfen/Inova (zie presentatie rondzending)
- Fabrikanten gebruiken verschillende strategieën voor het bepalen van normaalwaarden/afkapwaarden
- **Doel:** Het vergelijken van de diagnostische prestaties van drie tTG-IgA testen voor de diagnose coeliakie (follow-up, zie presentatie Leontine Mulder)

Materiaal en methoden (1)



- CD cases

95 volwassenen

65 kinderen

Controles

479 volwassenen

253 kinderen

4-5 controles per casus, matched voor geslacht en jaar van serum afname (tussen 2011 en 2021)

- Deelnemende centra

Maastricht UMC, Amsterdam UMC

Ziekenhuis Groep Twente, Reinier Haga MDC

- Test platforms:

EliA Celikey IgA (Thermo Fisher)

Quanta Flash h-tTG IgA (Werfen/INOVA)

tTG IgA ChLIA (Euroimmun)

Materiaal en methoden (2)

- Patiënt en controle selectie: evenredig aantal uit 4 verschillende centra;
 - 2 centra selectie op basis van EliA FEIA resultaten bij diagnose
 - 2 centra selectie op basis van QUANTA Flash resultaten bij diagnose
 - NB geen patiënten geselecteerd op basis van ChLIA (Euroimmun) resultaten
- CD cases: tTG IgA: $> 1x$ ULN en een klinisch CD diagnose en/of goede response op een gluten vrij dieet
- Controles: tTG IgA: $\leq 1x$ ULN, of Marsh 0/1 of HLA-DQ2/DQ8 negatief
- Voor ULN is gekozen voor de cut-off voor positief die in de bijsluiter staat van de firma:
 - EliA FEIA: 10 U/ml
 - QUANTA Flash: 20 CU
 - Euroimmun ChLIA: 10 CU/ml
- Samples zijn geblindeerd rondgestuurd en allemaal ge-(her)analyseerd op alle drie de platforms

Patiënten karakteristieken



	Adults (n = 95)	Children (n = 65)
Mean age, years (range)	44 (18 – 85)	7 (0 – 16)
Sex, n (%)	Male 41 (43) Female 54 (57)	Male 19 (29) Female 46 (71)
Marsh classification, n		
No biopsy	7	49
Marsh 0*	3	0
Marsh 1*	1	1
Marsh 2	4	1
Marsh 3A-C	80	14
DQ2 / DQ8 status, n		
Unknown	65	10
DQ2 positive	27	47
DQ2 DQ8 positive	2	4
DQ8 positive	1	4
EMA titer at diagnosis, n		
Unknown	23	4
Negative	2	0
Weakly positive	5	1
Positive	32	31
Strongly positive	33	29
Original tTG level, n (%)		
> 10x ULN	61 (64)	51 (78)
> 3 and ≤ 10x ULN	20 (21)	9 (14)
> 1 and ≤ 3x ULN	14 (15)	5 (8)

*CD diagnose gebaseerd op klinisch beeld en/of een goede klinische response op een gluten vrij dieet

Resultaten



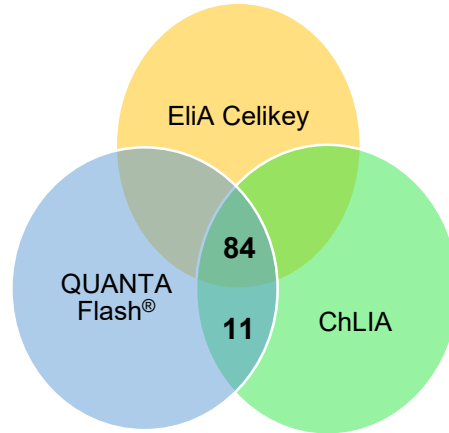
Diagnostische prestaties op basis afkapwaarde firma

	EliA Celikey IgA		QUANTA Flash® h-tTG IgA		Euroimmun ChLIA	
	Adults	Children	Adults	Children	Adults	Children
Sensitivity (%)	88.4	96.6	100	100	100	100
Specificity (%)	99.8	100	99.4	98.0	98.7	97.6
Positive Likelihood Ratio	442	∞	167	50	77	42
Negative Likelihood Ratio	0.116	0.031	0	0	0	0

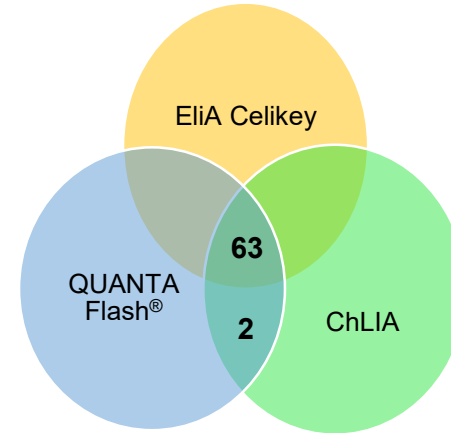
Overlap



Adult CD patients (n = 95)

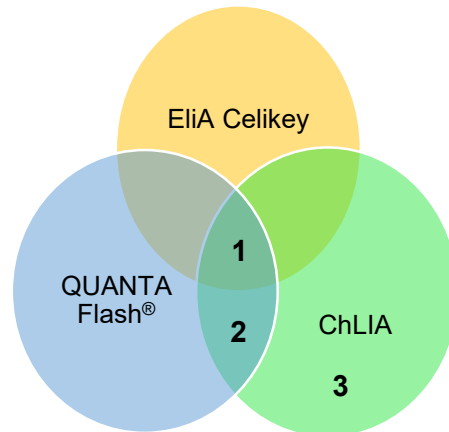


Pediatric CD patients (n = 65)



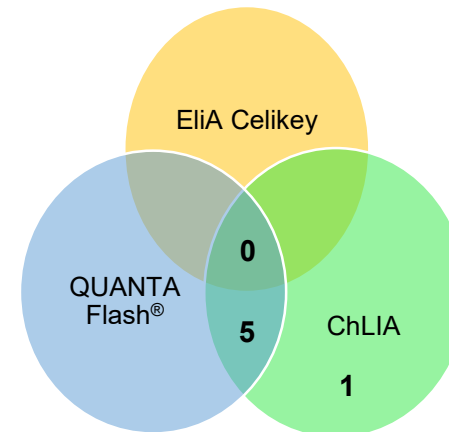
Adult control patients (n = 479)

Negative for all assays: n = 473

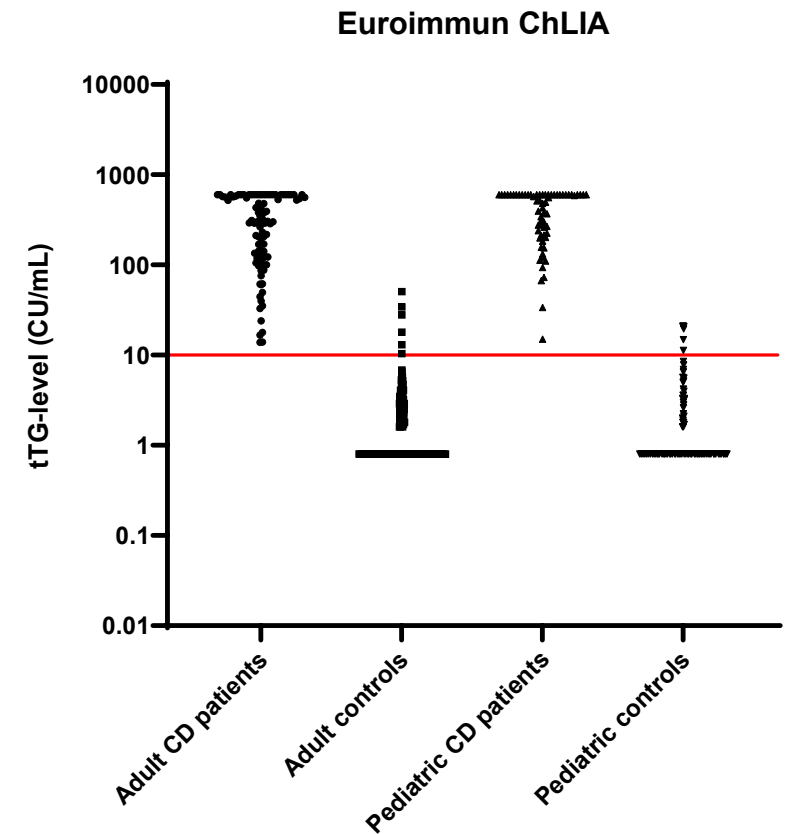
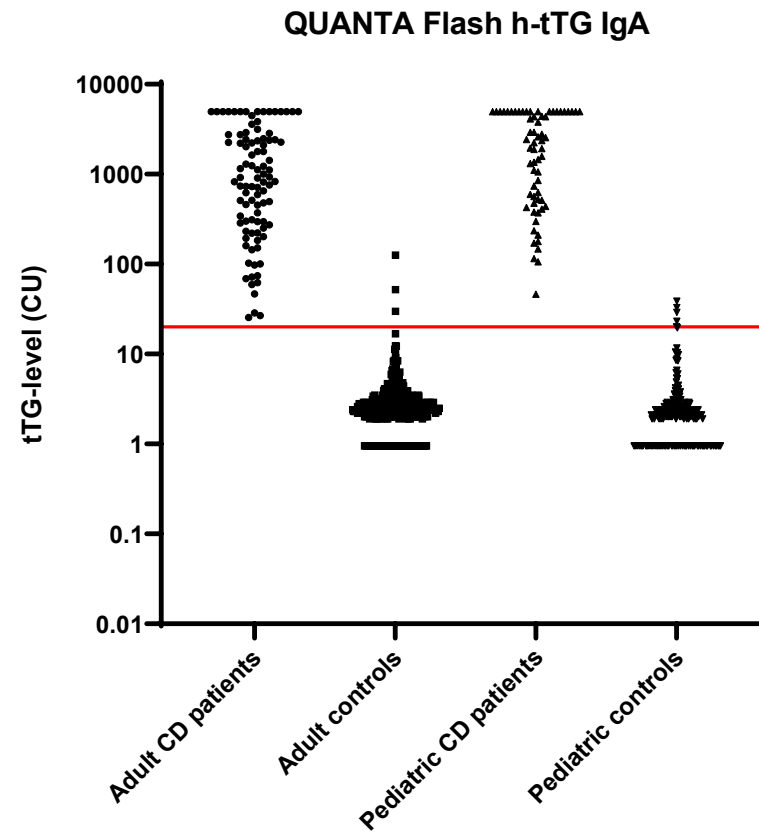
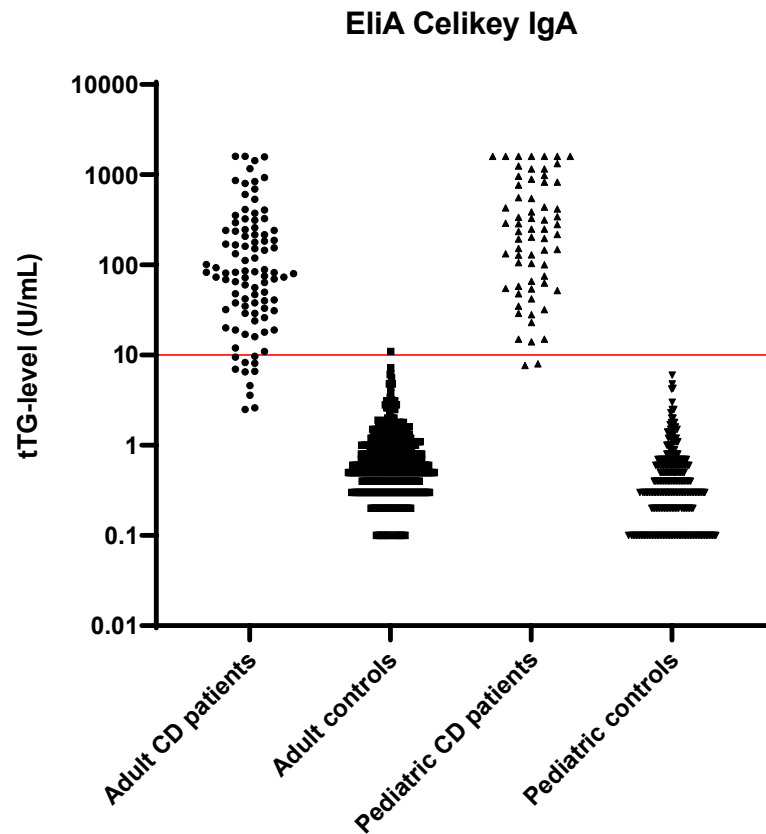


Pediatric control patients (n = 253)

Negative for all assays: n = 247

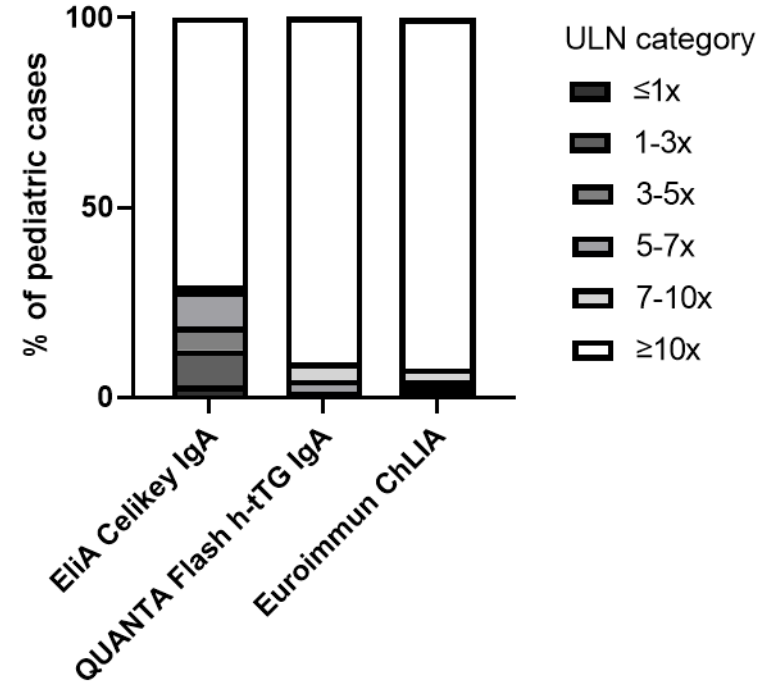
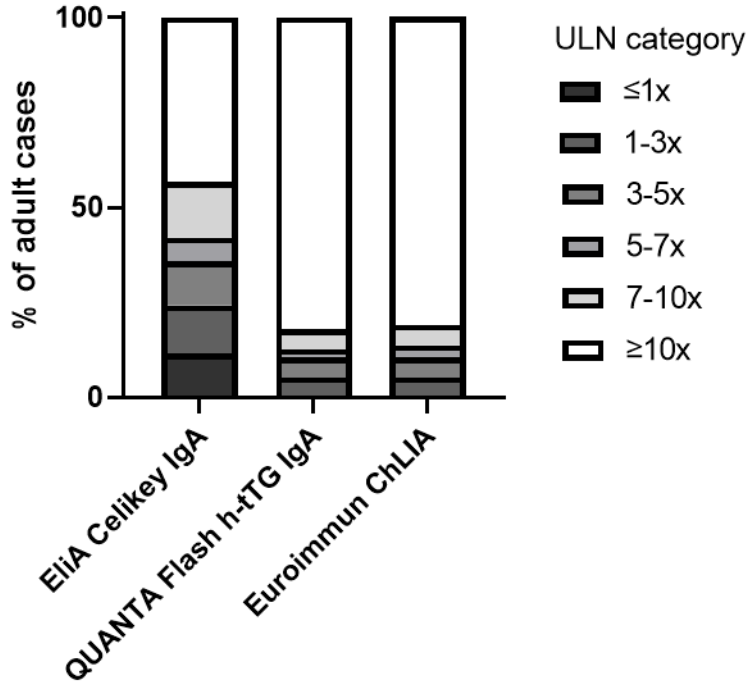


tTG-IgA concentratie verschillen



Resultaten boven bovengrens van de assay (na evt 10x verdunning) zijn gesteld op een maximum van 1600 U/mL, 4965.5 CU, en 600 CU/mL voor respectievelijk EliA Celikey IgA, QUANTA Flash, en Euroimmun ChLIA. De rode lijn geeft de ULN aan.

ULN verdeling cases

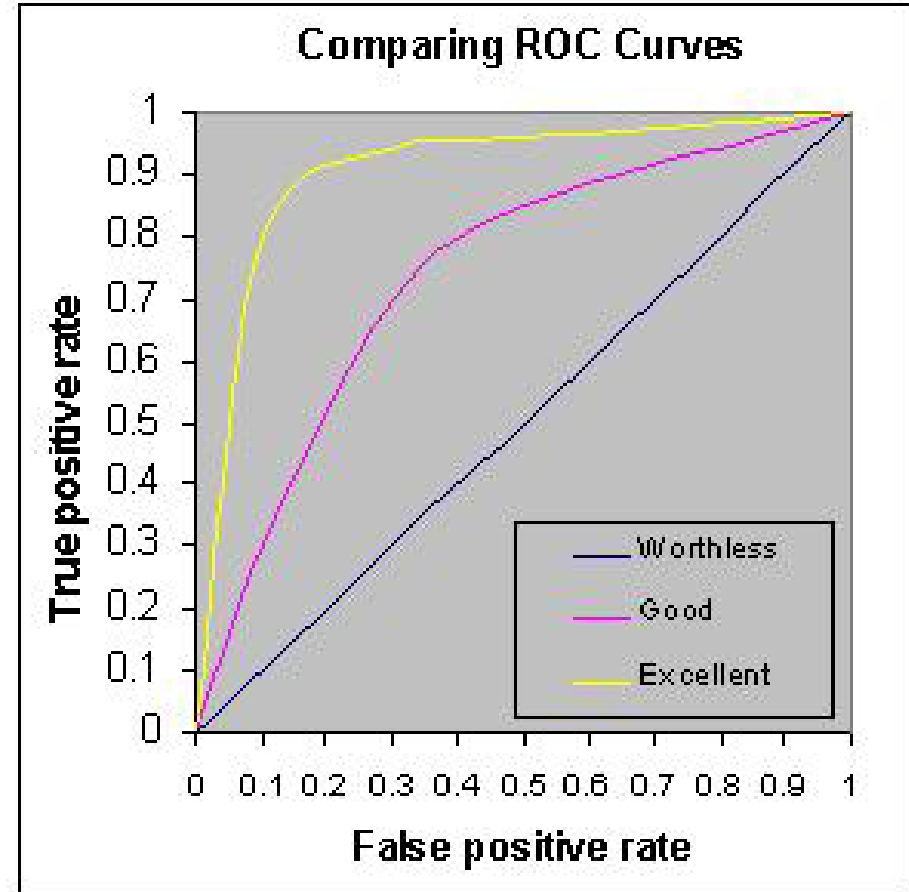


Receiver Operator Characteristic Curve

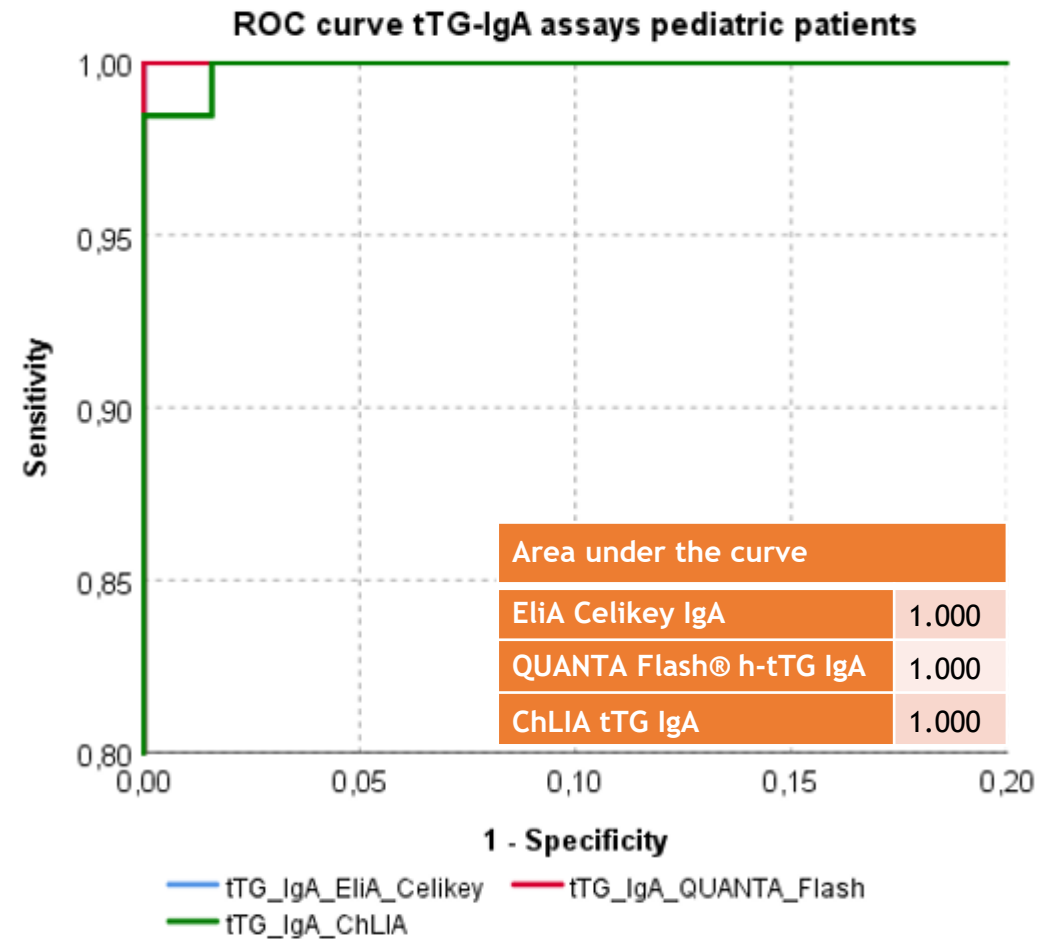
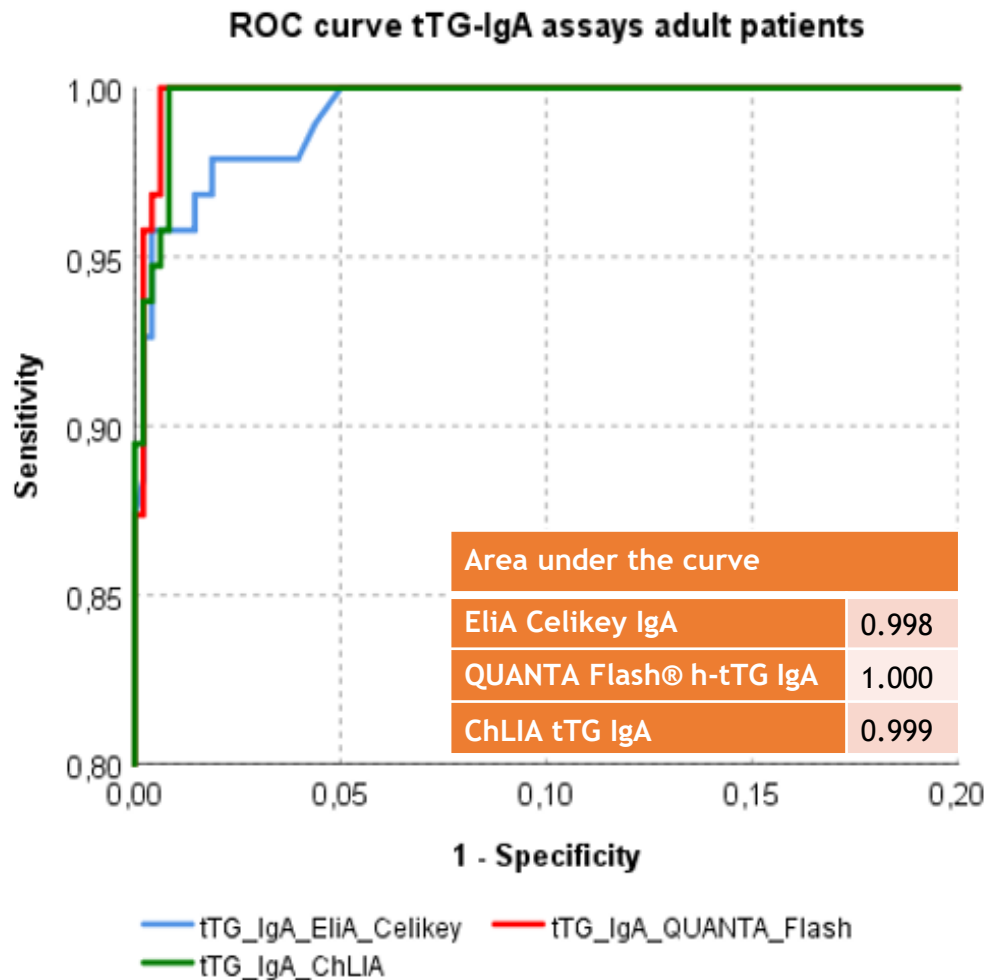


ESPGHAN:

“The optimal threshold values for antibody positivity (ULN) of a test should be established. This is done by receiver operating characteristics curves plotting sensitivity against specificity at different cutoff levels”.



ROC curves



Cut-off CL(h)IA assays optimaal

Optimale cut-off FEIA: 6,5 U/ml

	6.5 U/mL		7.0 U/mL		10 U/mL	
	Adults	Children	Adults	Children	Adults	Children
Sensitivity (%)	95.8	100	93.7	100	88.4	96.6
Specificity (%)	99.6	100	99.6	100	99.8	100
Positive Likelihood Ratio	240	∞	234	∞	442	∞
Negative Likelihood Ratio	0.042	0	0.063	0	0.116	0.031

% cases > 10 xULN



≥ 10 x threshold (%)	Volwassenen	Kinderen
Elia (10 U/ml)	43	71
Elia (7 U/ml)	59	72
Elia (6,5 U/ml)	59	74
Quanta Flash (20 CU)	82	91
Euroimmun (10 CU/ml)	81	92



- Alle drie de testen tonen uitstekende diagnostische prestaties
- Beide CLIA testen hebben een hogere sensitiviteit dan de FEIA assay, met name bij volwassen patiënten
- De FEIA test heeft de hoogste specificiteit, ook bij de optimale cut-off van 6,5 U/ml
- De resultaten van de beide CLIA testen komen het best met elkaar overeen
- Hoger percentage van de CD patiënten heeft een tTG IgA > 10x ULN in de CLIA testen vergeleken met de FEIA test, als ULN is gebaseerd op ROC analyse met ziekte controles.
- Bij 10 x ULN zijn alle testen 100% specifiek

- Retrospectieve studie, door selectie over 4 centra en 2 testen te verdelen bias geminimaliseerd
- Geen patiënten geselecteerd met de tTG IgA ChLIA (Euroimmun) test



Richtlijn Coeliakie en glutengerelateerde aandoeningen staat op het punt uit te komen: deadline voor bestuurlijke goedkeuring is 27 maart 2023.

Enkele highlights:



Module 1a: serologie diagnostiek bij volwassenen:

- Stel de diagnose coeliakie bij volwassenen die een glutenbevattend dieet nuttigen op basis van **tTG-IgA $\geq 10 \times \text{ULN}$** . Bevestig deze uitkomst door positieve IgA antistoffen tegen **endomysium (EMA-IgA)** in een **separaat bloedonderzoek**. Gebruik alleen antilichaamtests, waarbij **10 x ULN binnen het meetbereik** van de test valt. Een histologische bevestiging is in deze specifieke situatie niet nodig.

Verricht bij andere differentiaal diagnostische overwegingen dan coeliakie of alarmsymptomen aanvullend onderzoek.

- Stel de diagnose coeliakie bij volwassenen in alle andere situaties door middel van serologie in combinatie met histologie. Houdt daarbij rekening met het feit dat serologisch onderzoek negatief kan zijn terwijl er toch sprake is van glutengevoelige enteropathie.

Overweeg bij klinische verdenking op coeliakie en negatieve serologie endoscopisch onderzoek met afname van bipten voor histologie. Neem bij IgA-deficiëntie altijd duodenumbipten af en zet IgG testen in.

- Verwerp de diagnose coeliakie bij een negatieve serologische test en normale histologie van het duodenum.



Module 1d: serologie diagnostiek bij kinderen:

- Gebruik tTG-IgA als eerste diagnostische test bij kinderen met een normaal serum IgA, die verdacht worden van coeliakie.
- Verricht geen andere coeliakie-specifieke test behoudens tTG-IgA als eerste diagnostische test.
- Vraag bij patiënten met een laag totaal IgA- in serum (laag voor de leeftijd of <0.2 g/L indien ouder dan 3 jaar) een op IgG-gebaseerde test (DGP, EMA of tTG) aan.
- Hanteer bij kinderen een **tTG-IgA serum concentratie van ≥ 10 x ULN** om de diagnose zonder duodenumbipten te kunnen stellen.
- Gebruik alleen antilichaamtests, waarbij **10 x ULN binnen het meetbereik** van de test valt.
- Neem bij IgA-deficiënte patiënten met positieve coeliakie-specifieke antistoffen van de IgG-klasse altijd duodenumbipten af.
- Bevestig de diagnose coeliakie bij kinderen met tTG-IgA ≥ 10 x ULN door een **positieve EMA-IgA** test in een tweede bloedmonster/sample, als kinderen/ouders akkoord zijn met het achterwege laten van duodenumbipten.

HLA-DQ testen, wanneer?



Module 1c Negatieve serologie bij een afwijkend biopt

Verricht een HLA-test bij negatieve serologie. Afwezigheid van DQ2 en DQ8 sluit de diagnose coeliakie uit.

Module 1e Glutenbelasting

Bepaal HLA-DQ2 en HLA-DQ8 bij patiënten die glutenvrij eten, negatieve coeliakieserologie hebben en bij wie de wens bestaat om coeliakie aan te tonen dan wel uit te sluiten. Indien deze genen afwezig zijn, is de diagnose coeliakie uitgesloten.

Voor het stellen van de diagnose zonder biopt bij tTG >10 xULN geen HLA typering inzetten!

HLA-DQ testen, hoe?



Richtlijn HLA-DQ typering in coeliakie diagnostiek

Met dank aan



Lab Medische Immunologie, Afd Klinische Chemie, Amsterdam UMC, locatie VUMC:

- Jolien Hollander, Daan Casteleijn

Medlon B.V., Enschede; Ziekenhuis Groep Twente, Almelo:

- Leontine Mulder, T Kuiper

Medische Laboratoria, Afd Immunologie, Reinier Haga MDC, Delft:

- Pieter van der Pol

Centraal Diagnostiek Laboratorium, Maastricht University Medical Center:

- Jan Damoiseaux, Caroline Bijns

INOVA, Thermo Fisher en Euroimmun voor het kosteloos beschikbaar stellen van reagentia



m8.com/m8.com