

University of Mosul

College of Medicine



**The Significance of CD3 Marker in the Diagnosis of
Celiac Disease**

A THESIS

**SUBMITTED TO THE FACULTY OF MEDICINE
UNIVERSITY OF MOSUL**

**IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN
PATHOLOGY**

By

Saja Hashim A.Al-qadir

M.B.Ch.B.

Supervisor

Professor

Wahda M.T. AL-Nuaeimy

M.B.Ch.B. MSc. FICMS(path.)

Department of Pathology

College of Medicine

University of Mosul

2021 A.D.

1442 A.H

Abstract

Background:

Celiac disease is a common, permanent and reversible health problem of small intestine occurring all over the world in genetically predisposed individuals and in combination with other environmental factors. It causes chronic inflammation of small intestine which is of autoimmune origin. The histopathological features of Celiac disease in duodenal biopsy was stated according to the modified Marsh classification.

The immunohistochemical application of CD3 marker in duodenal biopsy could facilitate the count and the distribution of intraepithelial lymphocytes along the villi, which is regarded as a key for the correct diagnosis of Celiac disease in early stages (Marsh 1).

Aims of the study :

To correlate the significance of CD3 immunohistochemical expression of intraepithelial lymphocytic population to histopathological changes in Celiac disease, to identify the distribution of CD3 marker along the villi (crescendo or decrescendo) and (diffuse or patchy) in duodenal biopsy and to delineate the pattern of the age and sex distribution of Celiac disease in our locality.

Materials and methods:

A retrospective and prospective study was performed in the form of case series study on 100 consecutive cases suspected to have Celiac disease over a period of 16 months started from January 2019 to May 2020, who were referred to the esophageogastroduodenoscopy at the gastrointestinal units in Mosul city. Duodenal biopsies were taken from test subjects and sent to histopathological units. This procedure has been performed in the hospitals of Mosul city (Ibn Sina, Al Mosul, AL-Jamhory, AL-Khansaa and AL-Salam Teaching Hospitals), some private clinics and histopathology laboratories.

Slides from the paraffin blocks were stained with Hematoxylin and Eosin and Modified Giemsa stain in AL-Jamhory Teaching Hospital laboratory, and Immunohistochemical stain was conducted in Veen

medical laboratory/ Duhok city/ Iraq using labelled polymer and enhanced polymer system Dako protocol. The histopathological changes in the duodenal biopsy were classified according to modified Marsh-Oberhuber classification. The Interpretation of immunohistochemical expression of CD3 marker was based on the number and distribution of the stained intraepithelial T-lymphocytes.

Results:

Out of 100 cases suspected to have Celiac disease with a mean age of $(20.74 \pm 13.37SD)$ years, children less than 15 years represented 41% of the sampled cases (27 female and 14 male) with a female to male ratio 1.9:1, while adult more than or equal 15 years 59% of the cases (42 female and 17 male) with a female to male ratio 2.4 :1.

There were 69 % female and 31% male, female : male ratio is(2.2:1).

By applying modified Marsh classification, Marsh 0 was detected in 8 % of the cases, Marsh 1 in 30 % of the cases, Marsh 2 in 10% of the cases, while Marsh 3a in 20% of the cases, Marsh 3b in 17% of the cases, Marsh 3c in 15% of the cases and Marsh 4 : 0% .

Five percent of the cases are positive for Helicobacter pylori bacteria by Hematoxylin and Eosin stain and which is later on confirmed by Modified Giemsa stain. Other types of infection were not identified.

Immunohistochemical expression of CD3 in the sampled cases i.e. $CD3 + \geq 30 / 100$ epithelial cells was detected in 79 % of the cases. Seventeen out of 30 cases that diagnosed Marsh 1 were $CD3 +$ while 2 out of 30 cases were border line i.e. $CD3 + 26-29 / 100$ epithelial cells. The last 11 out of 30 cases were negative i.e. $CD3+ \leq 25 / 100$ epithelial cells.

All the $CD3 +$ cases that detected in 79 % of the cases are of crescendo pattern of distribution from the base to the tips of the villi while the border line and negative cases are of decrescendo pattern of distribution from the base to the tips of the villi.

The diffuse distribution of CD3+ intraepithelial lymphocytes along the villi was noted in 78 out of 79 cases of CD3 + cases, while only one case was observed with patchy distribution and associated with *Helicobacter pylori* infection.

The distribution of staining of CD3 + lymphocytes was global surface (sCD3+) in 98% of the cases and clonal surface (sCD3+) & intracytoplasmic (iCD3 +) in < 20% in 2% of the cases, that need flowcytometric analysis to confirm the diagnosis of Refractory Celiac disease.

The 5% of the cases of Celiac disease that associated with *Helicobacter pylori* infection are CD3+ lymphocytes and they are of crescendo pattern of distribution from the base to the tips of the villi. Four of them like other Celiac disease cases; CD3+ lymphocytes, diffusely distributed along the villi and only one case with patchy distribution of CD3+ lymphocytes through the epithelial cells which is of Marsh 1.

Conclusions:

The immunohistochemical expression of CD3+ intraepithelial T-lymphocytes was seen in 79% of the sampled cases. There is a significant relationship between the count of CD3+ T-lymphocytes per 100 epithelial cells and the histopathological changes in the duodenal biopsy according to modified Marsh classification. The immunohistochemical expression of CD3+ T-lymphocyte could lead to a definite assessment in 43.3 % of the sampled cases with Marsh 1.

The crescendo distribution of CD3+ intraepithelial T-lymphocytes was found in all positive cases, while the decrescendo pattern was found in all negative and border line cases. The diffuse distribution of CD3+ intraepithelial lymphocytes along the villi was noted in all CD3+ cases except one case was observed with patchy distribution and associated with *Helicobacter pylori* infection. In addition, the global surface distribution of CD3 immunohistochemical stain (sCD3 +) was noted in 98% of CD3+ intraepithelial T-lymphocyte; while the clonal surface (sCD3+) and intracytoplasmic (iCD3+) CD3+ immune stain were noted in less than 20% of intraepithelial lymphocytes in 2% of the cases only.

On the other hand, females were more affected than males with Celiac disease and there is a significant relationship between the gender of the sampled cases and the histopathological changes in the duodenal biopsy.

The disease can be diagnosed at any age and there is no significant relationship between the age distribution of the sampled cases and the histopathological changes in the duodenal biopsy.

Keywords: Celiac disease, intraepithelial lymphocytes, modified Marsh classification, CD3, Immunohistochemistry.

جامعة الموصل

كلية الطب



الأهمية لواسمة عنقود التمايز الثالث في تشخيص الداء الزلاقي

رسالة مقدمة الى كلية الطب جامعة الموصل كجزء من متطلبات منح
درجة الماجستير في علم الامراض

من قبل

سجى هاشم عبدالقادر

بكالوريوس طب وجراحة عامة

بإشراف

أ.د. وحدة محمد طيب النعيمي

بكالوريوس طب وجراحة عامة/ماجستير علم الامراض

بورد علم الامراض

استاذ – فرع علم الامراض

كلية الطب-جامعة الموصل

2021 A.D.

1442 A.H.

الخلاصة

الخلفية

الداء الزلاقي هو مشكلة صحية شائعة، دائمية وقابلة للانعكاس في الامعاء الدقيقة، تحدث في كافة انحاء العالم عند الاشخاص المستعدين وراثيا لها بالاضافة الى اسباب بيئية اخرى. كما انها تؤدي الى التهاب مزمن في الامعاء الدقيقة ويكون ذو مصدر مناعي ذاتي. التشريح المرضي للداء الزلاقي على خزعة الاثني عشر يصنف حسب تصنيف مارش المعدل.

استخدام الفحص المناعي النسيجي الكيميائي لواسمة عنقود التمايز الثالث لخزعات الاثني عشر من الممكن ان تسهل عملية عد ومعرفة توزيع الخلايا للمفاوية داخل الطبقة الطلائية على طول الزغابات، مما يعتبر مفتاح للوصول للتشخيص الصحيح للداء الزلاقي في مراحل المبكرة (مارش 1).

اهداف الدراسة

اظهار العلاقة لاهمية التعبير عن الفحص المناعي النسيجي الكيميائي لعنقود التمايز الثالث للتعداد للمفاوي داخل الطبقة الطلائية والتغيرات النسيجية في الداء الزلاقي، لتحديد توزيع عنقود التمايز الثالث على طول الزغابات (تصاعدي، تنازلي) و(منتشر او مرقع) في خزعة الاثني عشر ولتحديد نمط العمر و توزيع الجنس لهذا المرض في موقعنا الجغرافي.

المواد وطرق العمل

هي دراسة ماضية و مستقبلية بصيغة حالات مرضية متوالية والتي شملت مئة حالة من المتوقع تشخيصها بالداء الزلاقي خلال مدة ستة عشر شهرا يبدأ من كانون الثاني 2019 الى ايار 2020، المحالين الى وحدات الجهاز الهضمي لأجراء ناطور المرئ والمعدة والاثني عشر في مدينة الموصل. هذه الخزعات تؤخذ وترسل الى وحدات النسيج المرضي في مختبرات مستشفيات مدينة الموصل (ابن سينا، الموصل، الجمهوري، الخنساء والسلام) التعليمية وبعض العيادات ومختبرات النسيج المرضي الخاصة.

شرائح كتل البارافين صبغت بصبغة الهيماتوكسيلين و الايوسين و صبغة كيمزا المعدلة في مختبر مستشفى الجمهوري التعليمي والصبغة المناعية النسيجية الكيميائية تمت في مختبر مستشفى فين في مدينة دهوك/العراق بأستخدام نظام البوليمير المسمى والبوليمير المحسن لنظام داكو. التغيرات النسيجية المرضية في خزعة الاثني عشر صنفت حسب تصنيف مارش المعدل من قبل اوبر هير.

التعبير عن الفحص المناعي النسيجي الكيميائي لواسمة عنقود التمايز الثالث يعتمد على عدد و توزيع الخلايا للمفاوية المتواجدة داخل الطبقة الطلائية للزغابات.

النتائج

من مئة حالة متوقع اصابتها بالداء الزلاقي كان متوسط العمر 20.74 سنة مع انحراف معياري 13.37 . عدد الاطفال (اقل من 15 سنة) يمثل 41 % من الحالات، 27 اناث و 14 ذكور وبنسبة 1.9:1 .

بينما كان عدد البالغين (اكثر من او يساوي 15 سنة) يمثل 59 % من الحالات ، 42 اناث و 17 ذكور وبنسبة 2.4:1.

أي 69 % اناث و 31 % ذكور ، ونسبة الاناث الى الذكور 2.2:1.

حسب تطبيق تصنيف مارش المعدل كان مارش 0 : 8 % من الحالات ، مارش 1 : 30 % من الحالات، مارش 2 كان في 10 % ، مارش 3 كان 20 % ، مارش 3: 17 % ، مارش 3 ج كان 15 % من الحالات و مارش 4 كان 0 % .

بالفحص المناعي النسيجي الكيميائي لعنقود التمايز الثالث عل العينات ، كان عنقود التمايز الثالث موجبا أي ≤ 30 لكل 100 خلية طلائية في 79 % من الحالات.

سبعة عشر من ثلاثين حالة تم تشخيصها بالداء الزلاقي مارش 1 كانت ايجابية لعنقود التمايز الثالث واثان من الثلاثين يعتبران على الخط الحدودي حيث ان تعداد الخلايا للمفاوية هو 26-29 لكل 100 خلية طلائية. احدى عشر من 30 هي سالبة أي ان عدد الخلايا للمفاوية اقل من او يساوي 25 لكل 100 خلية طلائية.

جميع الحالات الايجابية المحددة في 79 % من الحالات هي ذات توزيع متزايد من قاعدة الزغابات الى طرفها. بينما الحالات السالبة والحدودية هي ذات توزيع تنازلي من قاعدة الزغابات الى طرفها.

التوزيع المنتشر للخلايا للمفاوية الايجابية على طول الزغابة لوحظ في 78 من 79 حالة ايجابية لعنقود التمايز الثالث. بينما حالة واحدة فقط لوحظت بشكل توزيع رعي وهي مرتبطة بتواجد عدوى بكتيريا العصيات الملوية البوابية.

توزيع الصبغة للخلايا للمفاوية الايجابية لعنقود التمايز الثالث كان اما على سطح غشاء الخلايا للمفاوية بشكل شامل لجميع الخلايا الايجابية لعنقود التمايز الثالث في 98 % من الحالات او نسيلي بنسبة اقل من 20% حيث ان بعض الصبغات كانت على سطح غشاء الخلايا للمفاوية وبعضها في داخل السايوبلازم في 2 % من الحالات مما تحتاج تحليل التدفق الخلوي للتأكد من تشخيص الداء الزلاقي المقاوم.

خمسة % من حالات الداء الزلاقي مرتبطة بعدوى بكتيريا العصيات الملوية البوابية وهي ايجابية لعنقود التمايز الثالث ومتزايدة في العدد من قاعدة الزغابات الى اطرافها ، 4 منهم هي كأى حالة داء الزلاقي حيث ان الخلايا للمفاوية الايجابية لعنقود التمايز الثالث كانت منتشرة

على طول الزغابات و واحدة فقط هي مرقعة التوزيع للخلايا للمفاوية الايجابية لعنقود التمايز الثالث خلال الخلايا الطلانية وهي تعتبر مارش 1.

الاستنتاج

التعبير عن الفحص المناعي النسيجي الكيميائي لعنقود التمايز الثالث للخلايا للمفاوية لوحظ في 79% من العينات ، حيث يوجد علاقة ايجابية و ذات دلالة بين عدد الخلايا الايجابية له لكل 100 خلية طلانية و بين التغيرات النسيجية في خزعات الاثني عشر و حسب تصنيف مارش المعدل. التعبير عن الفحص المناعي النسيجي الكيميائي لعنقود التمايز الثالث في الخلايا للمفاوية تي من الممكن ان تؤدي الى تقدير حاسم ل 43.3 % من العينات وهي مارش 1.

التوزيع التصاعدي للخلايا للمفاوية وجد في جميع الحالات الايجابية بينما التوزيع التنازلي وجد في الحالات السالبة وذات الخط الحدودي ، وكذلك فان التوزيع المنتشر للخلايا الايجابية لعنقود التمايز الثالث للخلايا للمفاوية بين الطبقة للطلانية على طول الزغابات لوحظ في جميع الحالات الايجابية عدا حالة واحدة كانت ذات توزيع مرقع وهي متعلقة بعدوى بكتريا العصيات الملوية البوابية بالإضافة الى ذلك فان توزيع الصبغة المناعية النسيجية الكيميائية بشكل كلي على سطح الخلايا للمفاوية الايجابية لعنقود التمايز الثالث لوحظ في 98 % من الخلايا الايجابية له بينما التوزيع النسيجي للصبغة (على سطح الخلية وفي داخل الساييتوبلازم) للخلايا الايجابية لعنقود التمايز الثالث لوحظ لأقل من 20 % من الخلايا للمفاوية خلال الطبقة الطلانية في 2% من الحالات فقط.

من جهة اخرى، لوحظ بأن الاناث كن أكثر تأثراً من الذكور بالداء الزلاقي، حيث تم رصد علاقة ذات دلالة احصائية بين جنس العينات و التغيرات النسيجية لخزعات الاثني عشر.

يمكن لهذا المرض ان يشخص في أي عمر ولا يوجد أي صلة ايجابية بين العمر للعينات والتغيرات النسيجية لخزعات الاثني عشر.

كلمات دالة: الداء الزلاقي، الخلايا للمفاوية خلال الطبقة الطلانية، تصنيف مارش المعدل، عنقود التمايز الثالث، الفحص المناعي النسيجي الكيميائي.