

Malattia celiaca: screening sierologico

Di Leo M., Lerro P., Bramante L., Ansaldo N., Dotti G.¹, Perrucci V.¹, Fiorucci G.C.¹, Weisz G.², Mezzedimi R.², Cristiano A.³, Paciello F.³

Servizio di Gastroenterologia Pediatrica dell'Università di Torino

¹Laboratorio di analisi chimico - cliniche e microbiologia O.I.R.M. - Torino

²Laboratorio di analisi chimico - cliniche Ospedale Martini Nuovo - Torino

³Servizio di Immunoematologia e Trasfusione O.I.R.M. - Torino

ABSTRACT

Coeliac disease: serological screening

Coeliac disease is the most common cause for malabsorption, but the clinical symptoms may appear not diagnostic. Since the histological examination of the intestinal mucosa is the diagnostic gold-standard for such a disease, the availability of a low-invasive, reliable test to suggest the need for intestinal biopsy is very important. Aim of this work was to assess the diagnostic reliability of anti-endomysial antibodies (EMA), anti-gliadin type IgA and IgG antibodies, and anti-transglutaminase antibodies (tTG) as screening tests for coeliac disease. EMA have been determined in 297 subjects with biopsy-confirmed coeliac disease, and AGA were also measured in 198 of them. As controls, EMA and AGA were measured in respectively 736 and 85 subjects with negative biopsy but with clinical symptoms suggesting the need for gastroscopy. tTG have been determined, in conjunction with EMA, in 99 coeliac subjects, in 78 pediatric controls and in 78 adults affected by different pathologies. Specificity, sensitivity and positive and negative predictive values have been calculated for each test. It is concluded that the diagnostic accuracy of EMA is slightly higher than that of tTG. However, the immunofluorescent method for EMA determination is less practicable, more time-consuming and more prone to subjective interpretation in comparison to the ELISA method for tTG measurement. Therefore, the latter may be usefully employed for population screening.

RIASSUNTO

La malattia celiaca rappresenta la più frequente causa di malassorbimento ma i sintomi possono essere extraintestinali o essere assenti o può essere associata ad altre malattie autoimmuni. Poiché l'esame istologico della mucosa digiunale continua ad essere il criterio diagnostico fondamentale diventa indispensabile disporre di tests poco invasivi ma sufficientemente affidabili per indicare l'esecuzione della biopsia digiunale. Scopo del lavoro è quello di valutare l'accuratezza diagnostica per la malattia celiaca degli anticorpi antiendomio (EMA) degli anticorpi antigliadina (AGA) di tipo IgA ed IgG e degli autoanticorpi anti trasglutaminasi (tTG) e di appurare se questi ultimi, che si determinano con il metodo ELISA, possono sostituire gli EMA che richiedono il metodo in immunofluorescenza per essere evidenziati. Gli EMA sono stati eseguiti in 297 soggetti celiaci accertati con biopsia digiunale (età mediana di 7 anni e 3 mesi), in 198 di essi sono stati eseguiti anche gli anticorpi antigliadina. Gli EMA sono stati valutati anche in 736 e gli AGA IgA ed IgG in 85 controlli di età sovrapponibile che avevano una sintomatologia per la quale era indicata la gastroscopia ma la cui mucosa digiunale era normale. Gli autoanticorpi anti tTG contemporaneamente agli EMA sono stati determinati in 99 soggetti celiaci, in 78 controlli in età pediatrica ed in 78 soggetti adulti affetti da patologia varie considerati controlli. In 58 soggetti gli EMA e gli autoanticorpi anti tTG sono stati ricontrollati dopo 6 mesi di dieta senza glutine. Gli EMA sono risultati positivi in 293 su 297 bambini celiaci gli AGA di tipo IgA in 166 su 198 gli AGA di tipo IgG in 181 su 198. Nei 736 controlli gli EMA sono risultati negativi in 728. Nei celiaci gli autoanticorpi anti tTG sono stati positivi in 97 e gli EMA in 98 casi. Nei 156 controlli gli autoanticorpi anti tTG sono risultati negativi in 147 e gli EMA negativi in tutti. La specificità, la sensibilità ed il valore predittivo positivo e negativo sono espresse nelle tabelle del testo. In conclusione per la diagnosi di malattia celiaca l'accuratezza degli EMA è lievemente superiore rispetto a quella degli anticorpi anti tTG tuttavia il metodo di immunofluorescenza per la determinazione degli EMA è più indaginoso e dispendioso e soggetto ad interpretazioni individuali rispetto a quello ELISA per la determinazione degli anticorpi anti tTG, di conseguenza questi ultimi potrebbero essere utilizzati per lo screening di popolazione.

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

La malattia celiaca, enteropatia sensibile al glutine, rappresenta la più frequente causa di malassorbimento da

accertare con metodi diagnostici ben codificati (1, 2). Riferimento fondamentale per la diagnosi di malattia celiaca resta il criterio istologico della mucosa digiunale, e secondariamente quello clinico indicati nel primo protocol-

lo dettato dalla Società Europea di Gastroenterologia Pediatrica (ESPGA) nel 1969 (3), ribaditi successivamente dalla Società di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica (ESPGAN) nel 1979 (4) ed in seguito integrati e semplificati nel 1990 (5). I sintomi clinici tipici della malattia celiaca si manifestano ormai in pochi soggetti mentre diventano sempre più frequenti le forme con segni extraintestinali anche monosintomatiche. Inoltre la malattia celiaca si può riscontrare in soggetti affetti da altre malattie autoimmuni (diabete, tiroiditi). D'altra parte una diagnosi precoce ed una dieta senza glutine attuata tempestivamente può ridurre il rischio di insorgenza di complicazioni quali l'osteoporosi, l'anemia sideropenica, le malattie autoimmuni ed il linfoma intestinale.

Diventa quindi sempre più importante disporre di esami poco invasivi ma sufficientemente affidabili per indicare l'esecuzione della biopsia intestinale. Gli anticorpi anti reticolina (ARA) ed antigliadina (AGA) sono stati primi ad essere impiegati nella diagnosi e nel controllo dei soggetti con malattia celiaca. Gli ARA sono considerati molto specifici ma poco sensibili (6), mentre gli AGA di classe IgA sono più specifici e gli AGA IgG più sensibili (7), tuttavia gli AGA non sono consigliabili come prove di screening (8).

La prima segnalazione dell'importanza degli anticorpi antiendomio (EMA) nella malattia celiaca risale a Chorzelski e coll. (9); in seguito sono state riportate casistiche anche numerose sia nell'adulto (10, 11) che nel bambino, sia come prova di screening in soggetti sani (2) sia come esame per indicare l'esecuzione della biopsia intestinale e per l'osservazione durante la dieta senza glutine (12, 13, 14, 15) anche per lo studio della familiarità (16). I risultati di questi studi dimostrano che gli EMA di tipo IgA hanno una buona sensibilità e specificità ma sono dispendiosi e richiedono, come tutte le tecniche di immunofluorescenza, notevole impegno tecnico e se si impiega come substrato l'esofago di scimmia, intervengono anche problemi etici. Recentemente è stato adoperato come substrato il cordone ombelicale (17,18) con buoni risultati ma il metodo è sempre l'immunofluorescenza che richiede notevole esperienza ed è soggetto ad interpretazioni individuali.

Recentemente Dieterich e coll. (19) hanno identificato l'enzima tissutale transglutaminasi come il principale, se non l'unico, bersaglio degli EMA. La transglutaminasi tissutale legata alla gliadina produrrebbe autoanticorpi diretti contro il complesso gliadina-transglutaminasi oppure questo complesso agirebbe sulle cellule T helper che a loro volta stimolerebbero le cellule B a produrre autoanticorpi anti-tTG.

Dieterich e coll., hanno sviluppato un metodo immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione degli autoanticorpi di tipo IgA diretti verso tale enzima (tTG) ed hanno applicato tale esame in pazienti a dieta libera ed in soggetti controllo ottenendo una sensibilità del 98,1% ed una specificità del 94,7% (20).

Analoghi risultati sono stati riferiti da altri studiosi (21,22,23,24,25,26,27,28,29).

L'accuratezza diagnostica di tali autoanticorpi risulta aumentata se si impiega come substrato la transglutami-

nasi umana (30,31,32) oppure gliadina (33) o se si esegue una preincubazione dei sieri dei soggetti celiaci con transglutaminasi e gliadina (34).

L'esecuzione del glutine dalla dieta provoca la scomparsa di tali autoanticorpi che in taluni casi precede quella degli EMA (24,33) e durante il carico con glutine essi ricompaiono precocemente parallelamente agli EMA (25).

Scopo del nostro lavoro è quello di valutare, sulla nostra casistica di pazienti celiaci, l'accuratezza diagnostica degli esami disponibili negli anni 93-99 (AGA,EMA).

Con la recente introduzione degli anticorpi anti tTG abbiamo voluto confrontare la sensibilità e specificità rispetto agli esami tradizionali. Se tali anticorpi risultassero sufficientemente specifici e sensibili per la diagnosi della MC, il metodo ELISA (facilmente automatizzabile) potrebbe sostituire la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (che richiede manualità e soggettività di interpretazione) impiegata per valutare gli EMA.

PAZIENTI

Gli EMA dal 1993 al 1997 sono stati determinati nel Laboratorio dell'Ospedale Martini, in seguito in quello dell'Ospedale Infantile Regina Margherita, mentre gli AGA sono sempre stati determinati nel laboratorio dell'Ospedale Infantile Regina Margherita. Gli autoanticorpi anti tTG sono stati eseguiti in ambedue i laboratori.

Gli EMA sono stati eseguiti in 297 soggetti di età variabile da 8 mesi a 22 anni (età mediana 7 anni e 3 mesi) 91 maschi e 206 femmine che presentavano sintomi di malassorbimento oppure bassa statura, anemia sideropenica o erano affetti da diabete mellito o sindrome di Down, e che alla biopsia intestinale avevano una mucosa subatrofica compatibile con la diagnosi di malattia celiaca.

In 198 pazienti sono stati valutati anche gli AGA tipo IgA ed IgG.

La diagnosi di malattia celiaca è stata formulata seguendo i criteri dettati dall'ESPGAN nel 1990 (5)

Gli EMA sono stati eseguiti anche in 736 soggetti di età variabile da 10 mesi e 22 anni (mediana 9 anni e 6 mesi) 361 femmine e 375 maschi. Questi soggetti considerati controlli sono stati inviati alla nostra osservazione per una patologia per la quale era indicata l'esecuzione della gastroscopia (reflusso gastroesofageo, anemia sideropenica, dolori addominali ricorrenti, allergia alle proteine del latte vaccino, gastrite da *Helicobacter pylori*) nei quali la mucosa duodenale era istologicamente normale.

In 85 dei suddetti controlli sono stati valutati anche gli AGA IgA ed IgG.

In 99 soggetti celiaci ed in 78 controlli appartenenti ai gruppi sopramenzionati sono stati determinati gli autoanticorpi anti tTG.

Al gruppo di controllo abbiamo aggiunto 78 soggetti adulti ricoverati all'Ospedale Martini che erano affetti da epatite C, cirrosi biliare primitiva, malattia infiammatoria cronica intestinale, e malattie autoimmuni, nei quali sono stati eseguiti gli EMA e gli autoanticorpi anti tTG, pertanto il numero totale dei controlli è di 156.

In 58 celiaci tali anticorpi sono stati ricontrrollati dopo 6 mesi di dieta senza glutine.

METODI

EMA: gli anticorpi IgA endomisiali sono stati studiati in cieco usando un metodo in immunofluorescenza indiretta (IFI) seguendo le indicazioni del kit commerciale AEA prodotto dalla BIOSYSTEM (Barcellona Spagna) e distribuito dalla ditta BIOTECH.

AGA: gli anticorpi IgG e IgA antigliadina sono stati determinati seguendo le indicazioni fornite dal kit commerciale prodotto dalla ditta RADIM (metodo immunoenzimatico ELISA)

Autoanticorpi anti tTG: sono stati determinati utilizzando il kit Eu tTG prodotto dalla ditta EUROSPITAL, con metodo immunoenzimatico (ELISA). Abbiamo considerato positivi soggetti che presentavano UA>7 e negativi quelli inferiori eliminando la fascia dei borderline (5-7) per una migliore accuratezza dell'esame in quanto vengono diminuiti i falsi positivi.

ANALISI STATISTICA

La sensibilità, la specificità ed i valori predittivi sono stati calcolati con il metodo di Galen e Gambino (35).

RISULTATI

Gli EMA sono risultati positivi in 293 soggetti celiaci e negativi in 4 casi, 1 di essi aveva deficit di IgA (2,6 mg/dl) un altro era una dermatite erpetiforme, il terzo aveva un'anemia sideropenica ed nel quarto gli AGA IgA ed IgG erano positivi.

Gli AGA IgA sono risultati positivi in 166 pazienti e negativi in 32 di questi 3 avevano ipo IgA rispettivamente mg 2,6 mg/dl, 6mg/dl, 12mg/dl.

Tabella 1
Sensibilità, specificità e valori predittivi di AGA IgA, IgG ed EMA

	AGA IgA%	AGA IgG%	EMA%
Sensibilità	85,1	91,4	99
Specificità	70,6	54,1	98,9
Val. pred. pos.	86,9	82,3	97,4
Val. pred. neg.	67,4	73	99,6

Tabella 2
Sensibilità, specificità e valori predittivi degli anticorpi anti tTG ed EMA

	tTG%	EMA%
Sensibilità	97,9	98,9
Specificità	94,2	99,4
Val. pred. pos.	91,5	98,9
Val. pred. neg.	98,6	99,4

Gli AGA IgG sono risultati positivi in 181 casi e negativi in 17 casi.

Si sono riscontrati tassi elevati di AGA IgG su 15 pazienti celiaci nei quali era associata una patologia gastrica (precisamente: gastrite da *Helicobacter pylori* in 4, reflusso gastroesofageo in 4, iperacidità in 1 esofagite ed antrite in 6).

Tra i 736 controlli gli EMA sono risultati negativi in 728 casi, uno dei quali aveva un deficit di IgA.

Sensibilità, specificità e valori predittivi relativi a questa parte dello studio sono riportati nella tabella 1.

Per quanto attiene agli autoanticorpi anti transglutaminasi, essi sono risultati positivi in 97 su 99 celiaci, in tali pazienti gli EMA erano positivi in 98.

Nei 156 controlli gli autoanticorpi anti tTG sono risultati negativi in 147 e gli EMA negativi in tutti.

La sensibilità per gli autoanticorpi tTg è risultata del 97,9%, la specificità del 94,2%, il valore predittivo positivo del 91,5% ed il valore predittivo negativo del 98,6% (vedi tabella 2).

La concordanza tra gli autoanticorpi tTg e gli EMA è risultata essere del 94,9%.

Dopo 6 mesi di dieta senza glutine nei 58 celiaci ricontrrollati gli autoanticorpi tTg erano negativi in tutti i casi mentre gli EMA erano ancora positivi in 6.

Nessuno tra i soggetti sottoposti alla determinazione delle tTG presentava deficit di IgA.

DISCUSSIONE

La concordanza tra gli anticorpi sierici EMA e la malattia celiaca è molto evidente poiché il 97,4% dei soggetti celiaci che introduce glutine possiede tali anticorpi.

Gli EMA sono sintetizzati dalla mucosa digiunale dei soggetti celiaci a dieta con glutine infatti tali anticorpi si liberano nel supernatante delle colture di tale tessuto (36), sono prevalentemente di tipo IgA e sono diretti contro la sostanza fibrillare della muscolatura liscia di tessuti quali

l'esofago di scimmia e il cordone ombelicale che vengono impiegati come substrati.

Sebbene gli EMA siano specifici per la malattia celiaca tuttavia essi possono essere positivi anche nell'allergia alle proteine del latte vaccino (37,38) o nell'infestazione da *Giardia lamblia* (39).

Poiché il deficit di IgA è più frequente nei soggetti con malattia celiaca rispetto alla popolazione generale e gli EMA e gli AGA sono di tipo IgA è consigliabile eseguire sempre il dosaggio delle IgA in tutti i casi sospetti di tale

patologia (12).

L'entità del deficit di IgA condiziona la positività degli EMA rispetto agli AGA IgA infatti gli EMA possono risultare positivi anche nei soggetti con diminuzione delle IgA mentre gli AGA sono sempre negativi.

Nei soggetti celiaci di età inferiore ai due anni di vita gli EMA possono essere negativi (13).

Per ottenere il 100% di specificità e sensibilità alcuni AA consigliano di abbinare la determinazione degli EMA a quella degli AGA (13, 39).

I risultati di questo studio confermano l'associazione tra autoanticorpi anti tTG e malattia celiaca poiché il 91,5% dei celiaci a dieta libera senza deficit di IgA ha in circolo tali autoanticorpi anche se tale associazione è risultata lievemente inferiore rispetto a quella degli EMA.

La discrepanza tra gli EMA e gli autoanticorpi anti tTG può essere imputabile all'impiego di substrati di specie differente per evidenziare tali autoanticorpi uno costituito da esofago di primati l'altro da fegato di cavia, oppure al fatto che gli EMA riconoscono altri autoantigeni. Infatti l'accuratezza diagnostica degli autoanticorpi anti tTG migliora quando si impiega come substrato transglutaminasi specie specifica (umana).

Il confronto tra EMA e autoanticorpi anti tTG nei celiaci ha evidenziato che un soggetto celiaco ha gli EMA negativi mentre gli autoanticorpi anti tTG sono positivi e gli AGA IgA ed IgG elevati.

Due soggetti celiaci con EMA positivi sono risultati negativi per gli autoanticorpi anti tTG.

Gli 8 controlli con EMA positivi erano affetti dalle seguenti patologie: 3 avevano un'esofagite da reflusso, uno aveva intolleranza alle proteine del latte vaccino, uno era affetto da artrite reumatoide, due soggetti avevano una gastrite (di cui uno da *Helicobacter pylori*) ed uno aveva la madre celiaca.

Nei 156 controlli nei quali sono stati determinati gli autoanticorpi anti tTG 9 di essi avevano tali anticorpi positivi ma in tutti gli EMA erano negativi.

Per evidenziare una eventuale correlazione tra il grado di atrofia digiunale e il tasso di autoanticorpi anti tTG nei soggetti celiaci, portando arbitrariamente il cut-off > 20UA, abbiamo notato che il 67,3% dei soggetti celiaci con distrofia di II - III grado ed solo il 40% di quelli con distrofia di I grado lo superavano.

Esiste quindi una relazione tra distruzione di tessuto e positività degli autoanticorpi anti tTG, questo potrebbe spiegare la positività di tali anticorpi nei soggetti controllo con morbo di Crohn grave dove esiste un esteso danno istologico con liberazione di abbondante antigene (tTG).

Due dei nostri 9 controlli adulti risultati positivi per gli autoanticorpi anti tTG e negativi agli EMA erano affetti da morbo di Crohn, gli altri 7 erano affetti da gastrite da *Helicobacter pylori*, da epatite autoimmune e da epatite C.

In letteratura sono stati segnalati casi di cirrosi epatica che sono positivi agli autoanticorpi tTG, ma con EMA negativi e mucosa digiunale istologicamente normale (40).

Quando il glutine viene eliminato dalla dieta gli autoanticorpi anti tTG negativizzano prima degli EMA (22).

Infatti nei pazienti da noi controllati dopo 6 mesi di dieta, gli autoanticorpi tTG erano negativi in tutti i casi, viceversa gli EMA erano ancora positivi in sei casi.

In conclusione i nostri risultati confermano che la tTG è un autoantigene nella malattia celiaca e che sebbene gli autoanticorpi verso tale autoantigene abbiano una sensibilità e specificità lievemente inferiore rispetto a quella degli EMA il metodo ELISA impiegato per la determinazione degli autoanticorpi anti tTG avrà una maggior diffusione rispetto al più indaginoso e dispendioso metodo di immunofluorescenza impiegato per l'evidenziazione degli EMA.

In definitiva il comportamento di fronte ad un soggetto in cui si sospetta la malattia celiaca è il seguente:

1) determinare le immunoglobuline sieriche di tipo IgA;
2) determinare gli autoanticorpi tTG di tipo IgA (oppure di tipo IgG nei soggetti con deficit di IgA);

3) se gli autoanticorpi anti tTG sono positivi valutare gli EMA IgA o IgG (deficit di IgA):

Ciò deriva dalla considerazione che, nel nostro lavoro, tra i controlli EMA negativi, 9 sono risultati positivi agli anticorpi anti tTG, mentre tra i celiaci solo 2 sono risultati anticorpi anti tTG negativi.

In base alla nostra esperienza, quindi, la ricerca degli anticorpi anti tTG potrebbe essere utilizzata per lo screening di popolazione della malattia celiaca ma se essi risultassero positivi sarebbe meglio eseguire gli EMA prima di sottoporre il soggetto alla biopsia digiunale.

BIBLIOGRAFIA

1. Catassi C. Fabiani E. et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicenter antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr.(Suppl)*1996;412:29-35.
2. Korponay-Szabo I.R., Kova'cs J. B, Czinner A., Gora'cz G., Vamos A., Szabò T. High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1999;28;26-30.
3. Meeuwisse G. W. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paed. Scand.* 1970;59:461-463.
4. Mc Neish A. S, Harms H. K, Rey J., Shmerling D. H, Walker-Smith J. A. Reevaluation of diagnostic criteria for coeliac disease. *Arch. Dis. Child.* 1979;54:783-786.
5. Walker-Smith J. A, Guadalini S., Schmitz J., Sherling D. H., Visakorpi J. K. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch. Dis. Child.* 1990;65:909-911.
6. Lazzari R., Volta U., Bianchi F. B et al. Reticulin antibodies: Marker of celiac disease in children on a normal diet and on gluten challenge. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1984;3:516-522.
7. Bode's., Weile B., Krasilnikoff P. A., Gudmand-Hoyer E. The diagnostic value of the gliadin antibody test in celiac disease in children: a prospective study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1993;17:1993.
8. Picarelle A., Triglione P., Mariani P. et al. Use of a threshold serum level of anti-gliadin antibodies improves diagnostic efficiency of the test. *Ital. J. Gastroenterol.* 1996;420:325-334.
9. Chorzelski T. P. Sulei I., Tchorzewska H. Jablonska S., Beutner E. H. Kumar V. IgA class endomysium antibodies (IgA-EMA) in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad. Sci.* 1983;420:325-334.

10. Sategna-Guidetti c, Bruno M., Pulitano R., Ferfoglia G. Disease specificity of IgA class anti-endomysium antibodies (IgA-EmA) in adult coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*.1991;3:251-254.
11. Volta U., Molinaro N., Fusconi M., Cassani F., Bianchi FB. IgA antiendomysial antibody test. A step forward in celiac disease screening. *Dig. Dis. Sci*.1991;36:752-756.
12. Dickey W., McMillan S. A, McCrum E. E., Evans A. E. Association between serum levels of total IgA and IgA class endomysial and anti gliadin antibodies: implications for coeliac disease screening. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*.1997;9:559-562.
13. Burgin-Wolff, Gaze H., Hadziselimovic F., Huber H., Lentze M. J., Nussle D., Reymond-Berthet C. Anti gliadin and anti-endomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch.Dis. Child*.1991;66:941-947.
14. Cataldo F., Ventura A., Lazzari R., Balli F., Nassimbeni G., Marino V. Antiendomysium and antibodies and coeliac disease: solved and unsolved questions. An Italian multicenter study. *Acta Paediatr*.1995;84:1125-1131.
15. Del Rosario M. A., Fitzgerald F., Chong S. K., Croffie M., Grupta S. K. Further studies of anti-endomysium and anti gliadin antibodies in patients with suspected coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*.1998;7:191-195.
16. Victoria J. C., Arrita A., Astigarraga I., Garcia-Masdevall D., Rodriguez-Soriano J. Use of serological markers as a screening test in family members of patients with coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*.1994;19:304-309.
17. Bottaro G., Volta U., Spina M., Rotolo N., Sciascia A., Musumeci S. Antibody pattern in childhood coeliac disease diagnostic tool for coeliac disease in childhood. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*.1997;24:559-562.
18. Sulkanen S., Collin P., Lauaila K., Maki M. IgA and IgG-class antihuman umbilical antibody tests in adult coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol*.1998;3:251-254.
19. Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E. O., Shuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nature Med*.1997;3:797-801.
20. Dieterich W, Laag E., Shopper H., Volta U., Ferguson A., Gillet H., Riecken E. O., Shuppan D. *Gastroenterology* 1998;115:1317-1321.
21. Sulkanen S., Halttunen T., Laurila K., Kolko K. L., Korponay-Szabo I., Sarnesto A., Savilhati E., Collin P., Maki m. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting coeliac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1322-1328.
22. Volta U., De Francesco L., Granito A., Molinaro N., Bianchi F.B. IgA to tissue transglutaminase and endomysium which is the best tool for monitoring coeliac disease? *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol*.1998;30 (Suppl.2) A171
23. Brusco G., Corazza G. R. Tissue transglutaminase antibodies for coeliac disease screening. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol*.1998;30:496-497.
24. Micillo M., Maurano F., Rossi M., Greco L., Auricchio R., Petrone F., Salerno G., Salvatore F., Sacchetti L., Troncone R. IgA antibodies to tissue transglutaminase an effective diagnostic test for coeliac disease. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol*.1998;30: (Suppl 1) A30.
25. Troncone R., Maurano F., Rossi M., Micillo M., Greco L., Auricchio R., Salerno G., Salvatore F., Sacchetti L. IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for coeliac disease. *J. Pediatr*.1999;134: 166-171.
26. Collin P. Serologic screening for coeliac disease-time for tissue transglutaminase test? *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol*.1998;30(5) :498-499.
27. Amin M., Eckhardt t., Kapitzka S., Fleckenstein B., Jung G., Seissler J., Weichert H., Richter T., Stern M., Mothes T. Correlation between tissue transglutaminase antibodies and endomysium antibodies as diagnostic marker of coeliac disease. *Clinica Chimica Acta*.1999;282(1-2): 219-225.
28. Miller A., Paspaliaris W., Elliot P. R., d'Apice A. Anti-transglutaminase antibodies and coeliac disease. *Austr. and New Zel. J. Med*.1999; 29(2):239-242.
29. Lock R.J., Glimour J.E., Unsworth D.J. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies-The antibody trinity of coeliac disease.
30. Sblatter D., Berti I., Trevisol C., Marzari R., Bradbury A., Not T., Fasano A., Ventura A. Human tissue transglutaminase ELISA: a powerful mass screening diagnostic assay for coeliac disease. *Atti 32nd Annual Meeting ESPGHAN, 2-5 june 1999 Warsaw 0-1*.
31. Bazzigaluppi E., Lampason V., Barena G., Venerando A., Bianchi C., Chiumello G., Bonifacio E., Bosi E. Comparison of tissue transglutaminase-specific antibody assays with established antibody J. *Autoimmun*.1999 ;12:51-56.
32. Bonamico M., Rossi D., Cipolletta E., Danesi abatella L., Tiberti C., Carabba B., Di Mario U. IgA transglutaminase autoantibodies and coeliac disease. *Atti 32nd Annual Meeting ESPGHAN 1999, 2-5 june Warsaw P-104*.
33. Volta U., Granito A., De Franceschi L., Molinaro N., Bianchi F.B. Antibodies to cross-linked gliadin-tTG increase the serological sensitivity for coeliac disease. *Atti Eighth International Symposium on Coeliac Disease 21-24 april 1999 Napoli PD16 pag. 71*.
34. Foti M., Di Pasquale G., Sferlazza C., Magazzù G. Improving diagnostic accuracy of tissue transglutaminase autoantibody determination in coeliac disease. *Atti 32nd Annual Meeting ESPGHAN 1999, 2-5 june Warsaw P-105*
35. Galen R. S., Gambino S. R. Sensitivity specificity, prevalence and incidence. In Galen R. S, Gambino S. R., editors *Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis*. New York: Wiley;1977.p 10-14.
36. Piccarelli A., Maiuri L., Frate A., greco M., Auricchio S., Londei M. Production of endomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. *Lancet* 1996;348: 1065-1067.
37. Chan K.N., Phillips A. D., Mirakian R., Walker-Smith J.A. Endomysial antibody screening in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 1994;18:316-320.
38. Carroccio A., Iacono G., Montalto G., Cavataio F., Soresi M. Immunological and absorptive test in coeliac disease: can they replace intestinal biopsies? *Scand. J. Gastroenterol* 1993;28:673-376.
39. Rossi T. M., Kumar V., Lerner A. et al. Relation of endomysial antibodies to jejunal mucosa pathology: specificity toward both J. *Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 1998 ;7:858-863.
40. Izzi L., Adragna A. D. Coeliac disease screening utilising an anti-transglutaminase ELISA test. *Atti Eight International Symposium on Coeliac disease, 21-24 april 1999 Napoli Poster 048 p.206*.