

## Avances en el diagnóstico de la enfermedad celíaca: anticuerpos antitransglutaminasa y linfocitos intraepiteliales intestinales

F. León<sup>a</sup>, P. Eiras<sup>a,b</sup>, C. Camarero<sup>c</sup>, E. Roldán<sup>a</sup>, L. Sánchez<sup>a</sup>, R. R-Pena<sup>a</sup>, A. Asensio<sup>d</sup>, A. Bootello<sup>a</sup> y G. Roy<sup>a</sup>

Servicios de <sup>a</sup>Inmunología y <sup>c</sup>Pediatría. Hospital Ramón y Cajal. <sup>b</sup>Universidad San Pablo-CEU. <sup>d</sup>Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Puerta de Hierro. Madrid.

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica muy prevalente y frecuentemente asintomática, por lo que está infradiagnosticada. Su detección en adultos es cada vez más usual, cobrando importancia creciente la sintomatología atípica y las complicaciones derivadas del diagnóstico tardío. En los últimos años se han producido importantes avances en el ámbito del diagnóstico de cribado de esta enfermedad, con el descubrimiento de la enzima transglutaminasa tisular (tTG) como el autoantígeno reconocido por los anticuerpos antiendomiso. Esto ha permitido desarrollar técnicas antígeno-específicas, más objetivas y estandarizables. Por otro lado, el estudio de los linfocitos intraepiteliales (LIE) de la mucosa del intestino delgado ha aportado gran especificidad al diagnóstico histológico de confirmación, puesto que la EC presenta alteraciones características en la distribución de las subpoblaciones de los LIE. El presente trabajo pretende plantear estas novedades diagnósticas de la EC, discutiendo su interés y utilidad en la práctica clínica, y proponiendo un algoritmo diagnóstico que recoge estos avances.

### LA ENFERMEDAD CELÍACA

La enfermedad celíaca o enteropatía sensible al gluten es una enfermedad crónica del intestino delgado con una elevada prevalencia: 1/200 en nuestro entorno<sup>1-3</sup>. Está originada por una intolerancia permanente al gluten, un componente proteico de cereales habituales en la dieta

occidental (trigo, centeno, cebada)<sup>4</sup>, cuya ingestión desencadena una activación de los linfocitos T CD4+ de la lámina propia intestinal. Esta estimulación inmunológica anormal produce, en último término, una enteropatía característica, con atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas<sup>5</sup>. Los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) se comportan como marcadores de susceptibilidad génica, constatándose en el 95% de los enfermos la existencia de HLA-DQ2, y en otro 4% la presencia de HLA-DQ8. El otro hallazgo objetivable y constante es el importante aumento de LIE  $\gamma\delta$  en la mucosa, sin que se conozca el significado de esta alteración ni la etiopatogenia exacta de la enfermedad<sup>6</sup>.

El diagnóstico se basa en la demostración de la relación causal entre la ingestión de gluten y la enteropatía, lo que requiere la obtención de al menos una biopsia intestinal y, dependiendo de la edad y características clínicas, de hasta 3 biopsias (la primera en el momento del diagnóstico, la segunda tras la retirada del gluten y la tercera con su reintroducción)<sup>7</sup>. Como cribado y medida de la actividad de la enfermedad se determina clásicamente la presencia de anticuerpos séricos asociados a la EC, como los antiendomiso (EMA), antirreticulina y antigliadinas (AGA)<sup>8-11</sup> y, más recientemente, los anticuerpos antitransglutaminasa (ATG).

Clinicopatológicamente existen variantes en la EC<sup>12,13</sup>: a) EC sintomática, con clínica, atrofia vellositaria y autoanticuerpos característicos; b) EC silente: con ausencia casi total de síntomas, a pesar de la existencia de enteropatía y de la presencia de autoanticuerpos; c) EC latente, que se diagnostica en pacientes que, ingiriendo una dieta con gluten, tienen una mucosa histológicamente normal, pero que han padecido en el pasado una enteropatía asociada al gluten con afectación histológica; d) EC potencial, variante en la que los pacientes presentan alteraciones inmunológicas típicas de la EC, como cambios en los LIE o autoanticuerpos<sup>14</sup>, pero sin que se haya objetivado atrofia vellositaria en ningún momento. Los celíacos latentes y potenciales pueden, además, presentar sintomatología<sup>15</sup>.

Francisco León es becario del Fondo de Investigaciones Sanitarias (BEFI n.º 01/9417). Proyecto de financiación FIS 00/196.

Correspondencia: Dra. G. Roy.  
Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal.  
Ctra. Colmenar, km 9. 28039 Madrid.  
Correo electrónico: groy@hrc.insalud.es

Recibido el 13-9-2001; aceptado para su publicación el 30-10-2002.

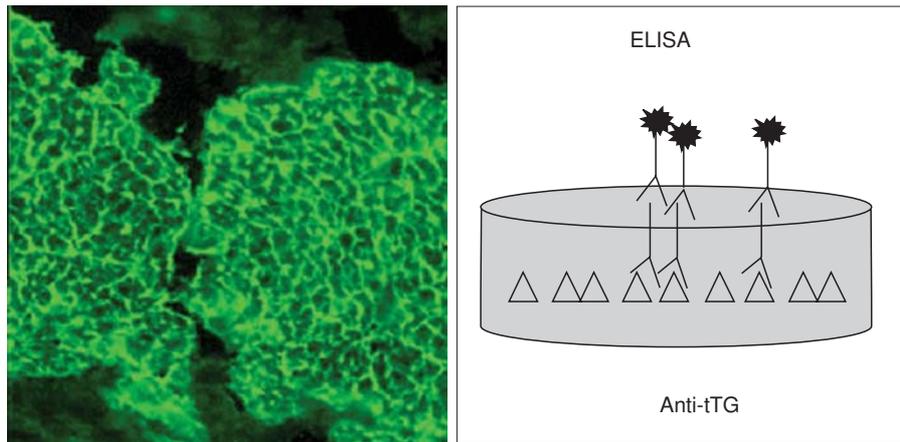


Fig. 1. Comparación esquemática de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente al ensayo de inmunoadsorción por enzimas (ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad celíaca. Izquierda: determinación de anticuerpos antiendomiso séricos (EMA) sobre un corte de esófago de mono. Se observa el patrón reticular característico ( $\times 400$ ). Derecha: esquema del ELISA, técnica en la que el suero del paciente se incuba sobre un antígeno purificado adsorbido a una superficie plástica.

El tratamiento de la EC se basa en la exclusión indefinida del gluten de la dieta, lo que resulta difícil y gravoso para el paciente. Las complicaciones, si no se trata la EC, incluyen osteoporosis, úlceras yeyunales, cáncer digestivo y linfomas intestinales en adultos<sup>16</sup> y problemas nutricionales, metabólicos y de crecimiento en la infancia.

#### ANTICUERPOS ANTITRANSGLUTAMINASA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

Entre las pruebas de cribado de la EC, la determinación de anticuerpos séricos antiendomiso de clase IgA (EMA) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (fig. 1) ha sido considerada el «patrón oro» por sus elevadas sensibilidad y especificidad, pero es una técnica laboriosa y subjetiva. Por ello, la identificación de la enzima transglutaminasa tisular (tTG) como el autoantígeno principal de los EMA<sup>17,18</sup> ha despertado gran interés, al ser posible su detección por la técnica de inmunoensayo (enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)<sup>19,20</sup>, que es estandarizable, más económica y más ecológica que la inmunofluorescencia indirecta (fig. 1).

La enzima tTG está implicada en remodelamiento tisular y en la apoptosis, y es ubicua. Sin embargo, la respuesta humoral de los pacientes celíacos frente a la tTG se produce de manera preferente en el intestino<sup>21</sup>, y se cree que esta enzima podría estar implicada en la patogenia de la EC mediante su actuación sobre el gluten, que induce una transformación bioquímica (deamidación) que exacerbaría la respuesta inmunitaria que éste genera<sup>22</sup>.

En los últimos 3 años, múltiples artículos han demostrado la eficacia de diferentes ensayos para la determinación de IgA sérica anti-tTG (ATG) (tabla I). En general, los mejores resultados parecen obtenerse con la utilización de tTG recombinante humana (rh-tTG) como antígeno de la técnica de ELISA<sup>23-26</sup>. Sin embargo, la disponibilidad comercial de este antígeno es muy reciente y costosa, por lo que la mayor parte de los trabajos publicados hasta el momento se han realizado con tTG obtenida de extracto de hígado de cobaya (*guinea pig liver* tTG, gpl-tTG-extracto). Este abordaje ha ofrecido menor sensibilidad (84-

98%) y especificidad (90-97%)<sup>19,27,28</sup> (tabla I), siendo además el resultado excesivamente dependiente del lote de extracto de tTG utilizado<sup>29</sup>.

Otro dato destacado es el alto número de pacientes diabéticos en quienes, en ausencia de clínica, serología e histología sugerentes de EC, se ha comunicado la existencia de ATG. En algunas series publicadas, el 20-40% de los pacientes positivos para gpl-tTG-extracto eran EMA negativos y no eran celíacos<sup>26,30,31</sup> (tabla II), así como el 39-50% de los positivos para rh-tTG no purificada en otras series<sup>32,33</sup>. Los diabéticos tienen una mayor susceptibilidad a padecer EC silente<sup>34</sup>, y estas positividades de los ATG fueron interpretadas inicialmente como signos de EC potencial. Sin embargo, la negatividad de los EMA ha motivado que se haya investigado la especificidad de esas reacciones. Mediante la técnica de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato sódico) se ha observado la existencia de contaminantes en el extracto de gpl-tTG comercial más utilizado (fig. 2)<sup>28</sup>. Por último, la técnica de Western blot ha demostrado que la mayoría de las positividades detectadas por ELISA en sujetos no celíacos se deben al reconocimiento inespecífico de esas proteínas contaminantes (fig. 2)<sup>28</sup>, por lo que el uso de extractos de gpl-tTG está desaconsejado en la actualidad. La utilización de gpl-tTG purificada como fuente antigénica ofrece, por el contrario, resultados casi comparables a los obtenidos mediante rh-tTG (tablas I y II).

#### LINFOCITOS INTRAEPITELIALES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA. EL SISTEMA INMUNOLÓGICO ASOCIADO A MUCOSAS

El intestino es un órgano linfóide primario que alberga una masa de tejido linfóide superior a la del bazo. Este tejido linfóide asociado a la mucosa gastrointestinal (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) está integrado por dos compartimientos, uno de ellos difuso (formado por los linfocitos intraepiteliales [LIE] y los linfocitos de la lámina propia [LPL]) y otro organizado (compuesto por las placas de Peyer, el apéndice, los ganglios lin-

TABLA I. Selección de trabajos publicados sobre ATG en el diagnóstico de la enfermedad celíaca

Método	Autor	Sensibilidad	Especificidad
ELISA gpl-tTG-extracto	Dieterich et al, Gastroenterol, 1998	98,1	94,7
	Sulkanen et al, Gastroenterol, 1998	95	94
	Lampasona et al, Lancet, 1998	84	92
	Bazzigaluppi et al, J Autoimmun, 1999	84,8	91,1
	Troncone et al, J Pediatr, 1999	92	98
	Biagi et al, Am J Gastroenterol, 1999	94,8	90,1
	Lock et al, J Clin Pathol, 1999	85	97
	Piaggio et al, Medicina (Buenos Aires), 1999	100	100
	Amin et al, Clin Chim Acta, 1999	87	97
	Miller et al, Aust N Z J Med, 1999	100	97
	Koop et al, Am J Gastroenterol, 2000	90	76
	Sblattero et al, Am J Gastroenterol, 2000	84	98
	Hansson et al, J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000	95	96
	Stern et al, J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000	93	95
	León et al, Gastroenterol, 2001	95,3	92,5
	ELISA gpl-tTG-purificada	Vitoria et al, J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1999	100
Amin et al, Clin Chim Acta, 1999		82	95
Sugai et al, Am J Gastroenterol, 2000		92	98
Bonamico et al, Am J Gastroenterol, 2001		90	100
León et al, Gastroenterol, 2001		98	99
Basso et al, J Clin Lab Anal, 2001		84	95
ELISA tTG eritrocitaria humana	Hansson et al, J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000	100	98
	Bazzigaluppi, et al, J Autoimm, 1999	97,3	95,6
ELISA rh-tTG	Sardy et al, Clin Chem, 1999	98,1	98,2
	Sblattero et al, Am J Gastroenterol, 2000	91,5	99
	León et al, Scand J Gastroenterol, 2001	99	99
	Basso et al, J Clin Lab Anal, 2001	90	95
	Lampasona et al, Lancet, 1998	98	96,7
RadioBinding rh-tTG (IgA+IgG)	Seissler et al, Horm Metab Res, 1999	95,6	99,5
	Baldas et al, Gut, 2000	100	98
Dot blot rh-tTG	Amin et al, Clin Chim Acta, 1999	100	100
RadioBinding rh-tTG (IgA)	Bonamico et al, Am J Gastroenterol, 2001	ND	ND

Se indican la técnica utilizada, el primer firmante, la revista y año de publicación, y la sensibilidad y especificidad alcanzadas. Puede observarse la mayor especificidad derivada del uso de transglutaminasa tisular (tTG) purificada de hígado de cobaya (gpl-tTG-purificada) y tTG recombinante humana (rh-tTG). ELISA: enzimoimmunoanálisis; ND: no determinable.

fáticos mesentéricos y los folículos linfoides del epitelio)<sup>35</sup>.

Los LIE están situados anatómicamente entre la membrana basal y la luz intestinal, dispersos entre los enterocitos<sup>36</sup>. Constituyen un compartimento muy heterogéneo, que en el intestino delgado humano está formado predominantemente por linfocitos T con receptor de linfocito T (TcR) de tipo TcR- $\alpha\beta$  denominados LIE  $\alpha\beta$ . El segundo subgrupo de LIE más numeroso lo componen los LIE tipo *natural killer* (LIE *NK-like*) y, por último, existe una minoría de LIE T con TcR  $\gamma\delta$  (LIE  $\gamma\delta$ )<sup>37,38</sup>.

### LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES Y LA ENFERMEDAD CELÍACA

Se desconoce la etiopatogenia de la EC<sup>22</sup>, aunque está demostrado que existe un componente de autoagresión inmunológica sobre una susceptibilidad genética ligada a HLA-DQ2<sup>39,40</sup>. El modelo patogénico más extendido en la actualidad considera que la transglutaminasa tisular actuaría sobre el gluten<sup>22</sup>, modificándolo para que pueda ser presentado a los linfocitos CD4+ de la mucosa intestinal por moléculas de HLA-DQ2 presentes en la superficie de células presentadoras de antígeno<sup>41</sup>.

Además de la asociación a HLA, el segundo hallazgo objetivo y propio de la EC es el aumento de LIE  $\gamma\delta$  que se observa<sup>22</sup>. Este aumento, si bien muy característico, no es patognomónico de la EC, ya que también se ha demos-

TABLA II. Eficacia de los anticuerpos antitransglutaminasa en el cribado de la enfermedad celíaca (EC)

Pacientes	(n = 259)	Extracto gpl-tTG	gpl-tTG purificada	rh-tTG	EMA
EC al diagnóstico	87	82	84	85	85
Sensibilidad		94,2%	96,5%	97,7%	97,7%
EC dieta sin gluten	20	1	0	0	0
Diabetes mellitus tipo I	65	5	0	0	0
Otras enteropatías	47	3	1	0	2
Controles	40	3	1	1	0
Especificidad		93%	98,8%	99,4%	98,8%

Se comparan tres técnicas de ELISA de transglutaminasa (de cobaya en extracto, gpl-tTG-extracto; de cobaya purificada, gpl-tTG-purificada; y recombinante humana, rh-tTG) frente a la determinación de anticuerpos antiendomio (EMA) por inmunofluorescencia indirecta. Se detallan los resultados del análisis de una serie de 259 sueros, indicándose el número de pacientes encontrados positivos con cada técnica. Por tanto, los no detectados entre los celíacos son falsos negativos y los detectados entre los no celíacos son falsos positivos. Puede observarse la tasa superior de falsos positivos encontrada con el uso de gpl-tTG-extracto, sobre todo en el grupo de diabéticos, sin que ninguno de ellos fuera celíaco (adaptada de León F et al<sup>26</sup>).

trado en algunos pacientes con intolerancia a las proteínas de leche de vaca y alergia alimentaria<sup>42</sup> y con enfermedad de Crohn<sup>43</sup>.

El estudio de los LIE en la EC mediante una técnica muy resolutiva, la citometría de flujo<sup>37,38,44</sup>, ha permitido caracterizar detalladamente las alteraciones que se producen en esta enfermedad. Así, en la EC se constata (tabla III): a) un aumento de LIE  $\alpha\beta$ , dependiente de la actividad de la enfermedad; b) una práctica ausencia de los LIE *NK-like* en las fases activas de la EC, ausencia que es parcialmen-

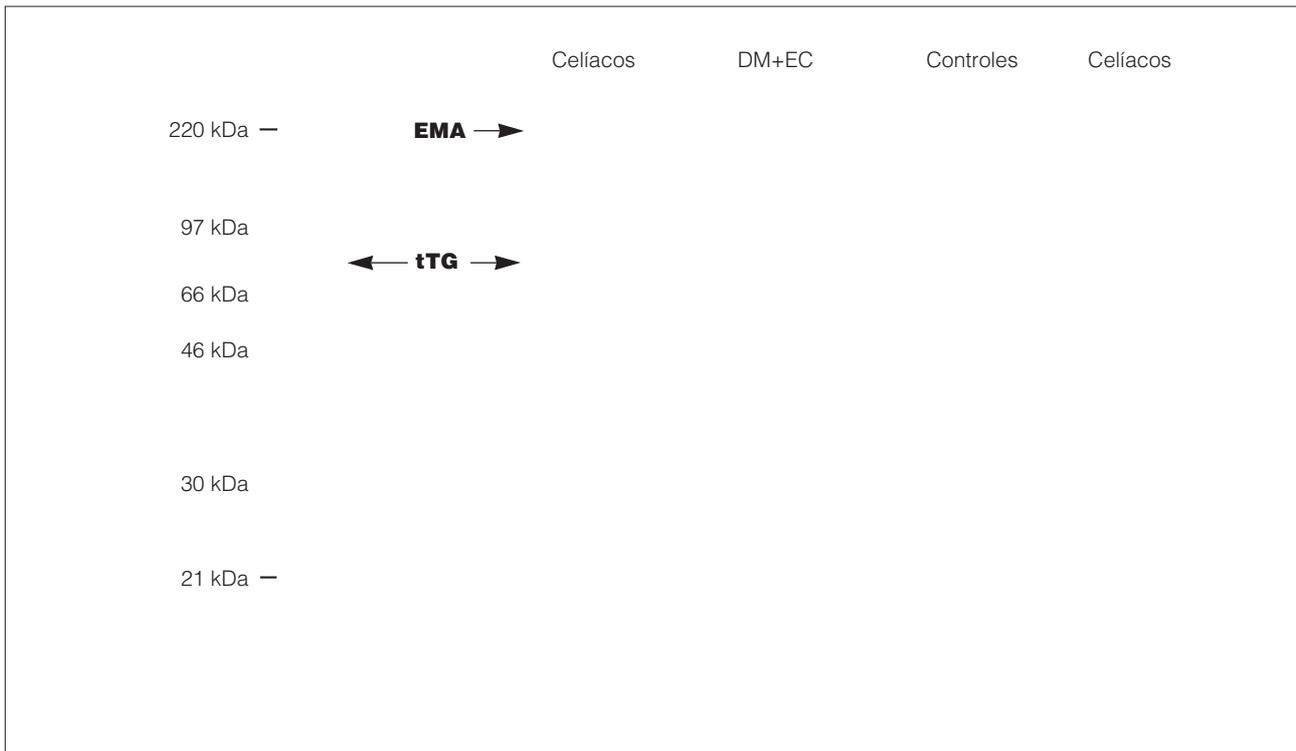


Fig. 2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-tTG. La técnica de SDS-PAGE (izqda.) revela la presencia de al menos 14 bandas proteicas diferentes en el extracto de gpl-tTG, correspondiendo la de 85 kDa a la tTG. En el Western blot (dcha.) se aprecia que cinco de los pacientes con anticuerpos antiendomiso (EMA) reconocen bandas de peso molecular diferente de la gpl-tTG y son, por tanto, falsos positivos por reactividad específica (adaptada de León F, et al<sup>28</sup>).

TABLA III. El linfograma LIE en las distintas fases de la EC

	% LIE totales	% LIE $\gamma\delta$	% NK-like
Controles	10	6	42
EC al diagnóstico	21	28	5
EC en provocación	20	28	2
EC potencial	26	36	3
EC en dieta sin gluten	12	24	11
Otras enteropatías	9	11	43
Gastritis por <i>H. pylori</i>	11	11	19

Se indican las medias de las proporciones de LIE totales (respecto a la celularidad total del epitelio), y de LIE  $\gamma\delta$  y NK-like (respecto a los LIE totales), de cada grupo clínico. Se observa el incremento de LIE totales en la EC (excepto en dieta sin gluten), y el aumento permanente de LIE  $\gamma\delta$  en esta enfermedad, así como el descenso de LIE NK-like (adaptada de Camarero C, et al<sup>44</sup>).

te reversible durante la dieta sin gluten, y c) el ya referido aumento de los LIE  $\gamma\delta$  que se ha revelado como constante, presente en todas las fases de la enfermedad, incluso en los pacientes en tratamiento con dieta sin gluten, los celíacos latentes y los potenciales<sup>44</sup>. El estudio de los LIE en otras enfermedades intestinales ha permitido concluir que la EC es la única en la que el aumento de LIE  $\gamma\delta$  se produce de manera sistemática y permanente, además de con mayor intensidad (de una media de un 4% de LIE  $\gamma\delta$  respecto a LIE totales en individuos sanos a un 25% en celíacos en el momento del diagnóstico<sup>44</sup>).

La cuantificación de los 3 parámetros alterados en la EC (LIE totales, LIE  $\gamma\delta$  y LIE NK-like), perfil que denomina-

remos el «linfograma LIE», presenta una gran sensibilidad y especificidad (ambas del 95%<sup>44</sup>) en el diagnóstico de la EC, y puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de las formas latentes y potenciales, en las que los marcadores serológicos son inconstantes y la atrofia no es manifiesta<sup>44</sup>, y en el déficit de IgA, en el que los EMA/tTG no son valorables. Si bien la implantación de esta técnica en la práctica clínica es minoritaria, el desarrollo de métodos sencillos de obtención de LIE a partir de biopsias de intestino delgado<sup>45</sup> posibilita su aplicación rutinaria en un futuro próximo.

#### PROPUESTA DE UN ALGORITMO DIAGNÓSTICO INICIAL DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

A la vista de la gran eficiencia de la determinación de los ATG y los LIE en el diagnóstico de la EC (siendo claramente superiores los ATG frente a los AGA<sup>29</sup>, excepto en el déficit de IgA), se ha propuesto un algoritmo diagnóstico inicial de la EC que recoge estos avances<sup>46</sup>, siempre a expensas de la clínica de los pacientes (fig. 3).

El diagnóstico de cribado se basaría en la determinación de ATG por ELISA y de IgA sérica si los ATG fuesen negativos. La congelación de suero en la primera visita del paciente permitiría realizar pruebas ulteriores sin requerir su presencia (antigliadina o antiendomiso IgG si hay déficit de IgA, IgE sérica total y específica si hay

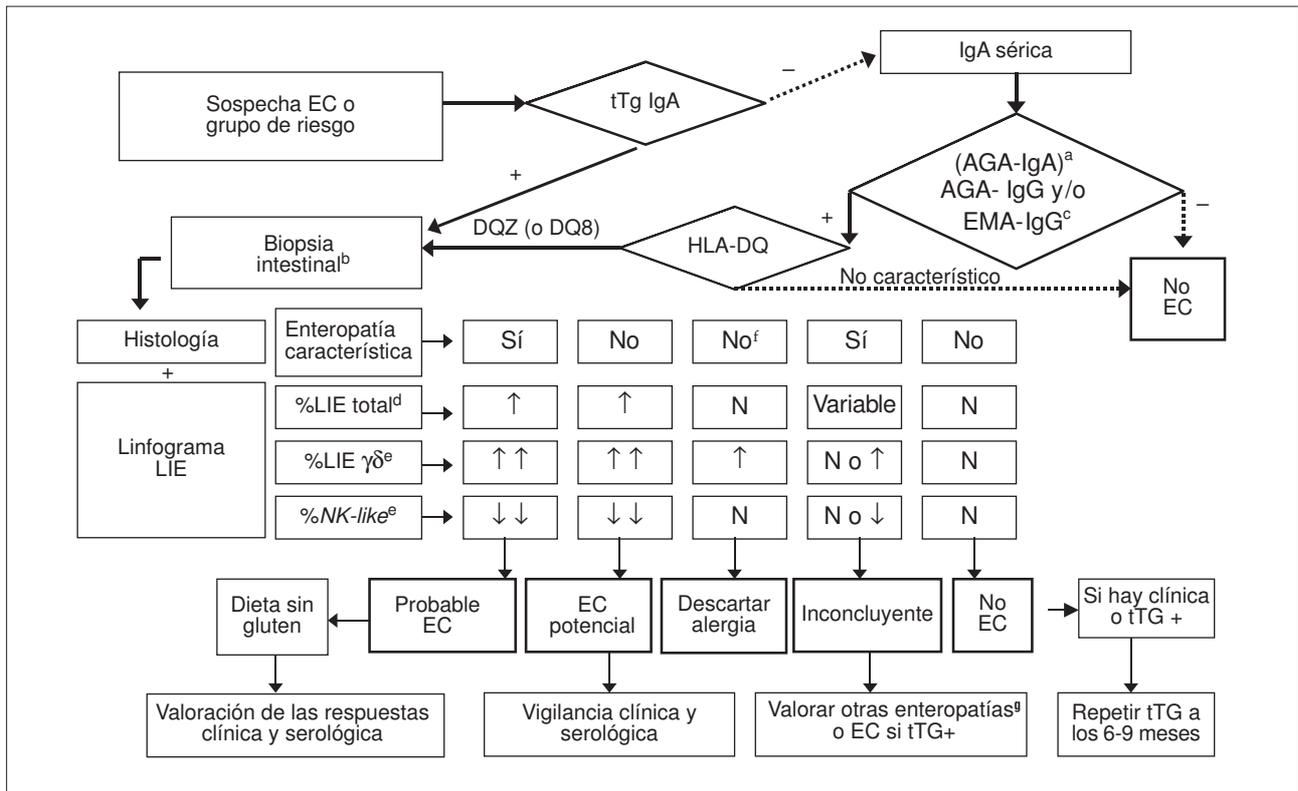


Fig. 3. Propuesta de algoritmo diagnóstico inicial en la enfermedad celíaca (EC). a) Si hay deficiencia de IgA, sólo se determinará la IgG; b) si la clínica es importante puede que se biopsie, aun con serología negativa, para descartar otras enteropatías; c) tras la negatividad de tTG-IgA es más rentable realizar AGA/EMA-IgG que EMA-IgA; d) porcentaje respecto al total de células en el epitelio; e) porcentaje respecto al total de LIE; f) se observa atrofia en la intolerancia a la leche de vaca y soja en < 2 años; g) otras enfermedades pueden producir AGA+, atrofia vellositaria y aumento ocasional de LIE gd: alergia alimentaria, enfermedad inflamatoria intestinal, giardiasis, etc. (adaptada de León F, et al<sup>46</sup>).

sospecha posterior de alergia alimentaria, autoanticuerpos si hay sospecha posterior de enfermedad inflamatoria intestinal o enteropatía autoinmunitaria, etc. Por motivos prácticos, en muchos centros será más conveniente solicitar al laboratorio la determinación de IgA sérica, e incluso de AGA, al tiempo que la anti-tTG, pero en el algoritmo se sigue la secuencia diagnóstica lógica. Igualmente, en muchos centros no será posible esperar la determinación del HLA-DQ antes de realizar la biopsia intestinal.

El diagnóstico de confirmación se basaría en la biopsia, sobre la que se realizaría estudio anatomopatológico (arquitectura vellositaria) e inmunofenotípico (linfograma LIE: cociente LIE  $\gamma\delta$ /NK-like y proporción de LIE totales). Si los resultados de este primer estudio fuesen coherentes, el seguimiento podría ser serológico (comprobar que los ATG se negativizan tras la retirada del gluten y se positivizan tras una prueba de provocación). En caso de que el primer estudio inmunohistológico fuese inconcluyente, sería necesaria la realización de segundas y terceras biopsias tras la retirada y la reintroducción del gluten, respectivamente.

En nuestra experiencia, este algoritmo permite la orientación diagnóstica correcta de la inmensa mayoría de los casos remitidos para descartar EC. Además, facilita la

detección de EC potencial y latente, así como de celíacos con déficit de IgA, e implica un ahorro económico y de morbilidad para el paciente (con un impacto diferente en función del protocolo de cada centro). Puesto que la determinación de anti-TG comienza a utilizarse en el cribado poblacional con gran eficacia<sup>47</sup>, es esperable que el algoritmo sea también de utilidad en este tipo de abordajes.

## CONCLUSIONES

1. La eficiencia de la determinación de ATG por ELISA puede llegar a igualar a la de los EMA en el diagnóstico de cribado de la EC, siempre que la pureza del antígeno sea adecuada.
2. La positividad para gpl-ATG de diabéticos EMA-negativos se debe en muchos casos a la reactividad de anticuerpos séricos de estos pacientes contra proteínas contaminantes del extracto, en lugar de signos tempranos de EC.
3. El estudio de las subpoblaciones de LIE (linfograma LIE) es de utilidad clínica, sobre todo en presentaciones atípicas de la EC, EC potencial y latente, valoración de EC en tratamiento, diagnóstico de EC asociada a déficit de IgA y diagnóstico diferencial con otras enteropatías que cursen con atrofia intestinal.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Dicke W. Coeliakie. Tesis doctoral. Universidad de Utrecht, 1950.
2. Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr* 1996;412:29-35.
3. Csizmadia CG, Mearin ML, von Blomberg BM, Brand R, Verloove-Vanhorick SP. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *Lancet* 1999;353:813-4.
4. Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997;349:1755-9.
5. Walker-Smith JA. Celiac disease. En: Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 3th ed. Ontario, BC Decker Inc., 2000; p. 727.
6. Savilahti E, Arato A, Verkasalo M. Intestinal gd receptor bearing T lymphocytes in coeliac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatric Research* 1990;28:579-81.
7. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. *Arch Dis Chil* 1990;65:909-11.
8. Chan KN, Phillips AD, Mirakian R, Walker-Smith JA. Endomysial antibody screening in children. *J Pediatr Gastr Nutr* 1994;18:316-20.
9. Grodzinsky E, Jansson G, Skogh T, Stenhammar L, Fälth-Magnusson K. Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: A clinical study to develop a practical routine. *Acta Paediatr* 1995;84:294-8.
10. Vogelsang H, Genser D, Wyatt J, Lochs H, Ferenci P, Grandaisth G, et al. Screening for coeliac disease: A prospective study on the value of noninvasive test. *Am J Gastroenterol* 1995;90:394-8.
11. Roldán MB, Barrio R, Roy G, Parra C, Alonso M, Yturriaga R, et al. Diagnostic value of serological markers for celiac disease in diabetic children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998;11:751-6.
12. Ferguson A, Arranz E, O Mahory S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease: active, silent, latent, potential. *Gut* 1993;34:150-1.
13. Ferguson A, Gillet H, Humphreys K, Kingstone K. Heterogeneity of celiac disease: clinical, pathological, immunological and genetic. *Ann N Y Acad Sci* 1988;859:112-20.
14. Arranz E, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterology* 1993;104:1263-72.
15. Troncone R, Greco L, Mayer M, Paparo F, Caputo N, Micillo M, et al. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr* 1996;412 (Suppl):10-4.
16. Holmes GKT, Prior P, Lane MR, Pope D, Allan RN. Malignancy and coeliac disease: effect of a gluten-free diet. *Gut* 1989;30:333-8.
17. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nat Med* 1997;3:797-801.
18. Uhlig HH, Lichtenfeld J, Osman AA, Richter T, Mothes T. Evidence for the existence of coeliac disease autoantigens apart from tissue transglutaminase. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:1017-20.
19. Dieterich W, Laag E, Schöpfer H, Volta U, Ferguson A, Guillet H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, 1998;115:1317-21.
20. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korporani-Szabo IR, Sarnesto A, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1584-94.
21. Marzari R, Sblattero D, Florian F, Tongiorgi E, Not T, Tomasini A, et al. Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol* 2001; 166:4170-6.
22. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:234-42.
23. Sardy M, Odenthal U, Karpati S, Paulsson M, Smyth N. Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *Clin Chem* 1999;45: 2142-9.
24. Baldas V, Tommasini A, Trevisiol C, Berti I, Fasano A, Sblattero D, et al. Development of a novel rapid non-invasive screening test for coeliac disease. *Gut* 2000;47:628-31.
25. Bonamico M, Tiberti C, Picarelli A, Mariani P, Rossi D, Cipolletta E, et al. Radioimmunoassay to detect antitransglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1536-40.
26. León F, Camarero C, Pena R, Eiras P, Sánchez L, Baragaño M, et al. Anti-transglutaminase IgA ELISA: clinical potential and drawbacks in Celiac Disease diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:849-53.
27. Lampasona V, Bazzigaluppi E, Barera G, Bonifacio E. Tissue transglutaminase and combined screening for coeliac disease and type I diabetes-associated autoantibodies. *Lancet* 1998;352: 1192-3.
28. León F, R-Pena R, Camarero C, Sánchez L, Eiras P, Amo A, et al. Limitations of anti-guinea pig liver transglutaminase IgA in the screening of celiac disease. *Gastroenterology* 2001;120: 586-7.
29. Stern M, for the Working group on serologic screening for Celiac Disease. Comparative evaluation of serologic tests for celiac disease: an european initiative toward standardization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:513-9.
30. Koop I, Ilchmann R, Izzi L, Adragna A, Koop H, Barthelmes H. Detection of autoantibodies against tissue transglutaminase in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2009-14.
31. Kordonouri O, Dieterich W, Schuppant D, Webert G, Müller C, Sarioglu N, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase are sensitive serological parameters for detecting silent coeliac disease in patients with Type I diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000;17:441-4.
32. Lampasona V, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Venerando A, Chiumello, Bonsi E, et al. Antibodies to tissue transglutaminase C in type I diabetes. *Diabetologia* 1999;42:1195-8.
33. Bao F, Yu L, Babu S. One third of HLA-DQ2 homozygous patients with Type I diabetes express celiac disease associated transglutaminase autoantibodies. *J Autoimmun* 1999;13:143-8.
34. Hummel M, Bonifacio E, Stern M, Dittler J, Schimmel A, Ziegler AG. Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type I diabetes. *Diabetologia* 2000;43:1005-11.
35. Sim GK. Intraepithelial lymphocytes and the immune system. *Adv Immunol* 1995;58:297-343.
36. Robijn RJ, Logtenberg LJJ, Wiegman GP, Van Berge Hene-gouwen GP, Houwen RW, Koningsberg JC. Intestinal T lymphocytes. *Scand J Gastroenterol* 1995;212(Suppl):23-33.
37. Eiras P, Roldán E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3- CD7+ intraepithelial subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry* 1998;34:95-102.
38. Eiras P, León F, Camarero C, Lombardía M, Roldán E, Bootello A, et al. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing Natural Killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scand J Immunol* 2000;52:1-6.
39. Spurkland A, Sollid LM, Polanco I, Vartdal F, Thorsby E. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. *Hum Immunol* 1992;35:188-92.
40. Fernández-Arquero M, Polanco I, Escobar H, Figueredo MA, De la Concha EG, Clerici-Larracet N. HLA-DQ alleles and susceptibility to celiac disease in Spanish children. *Tissue Antigens* 1995;45:145-7.
41. Molberg Ö, McAdam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998;4:713-7.
42. Kokkonen J, Holm K, Karttunen TJ, Maki M. Children with untreated food allergy express a relative increment in the density of duodenal gammadelta+ T cells. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1137-42.
43. Trejdosiewicz LK, Calabrese A, Smart CJ, Oakes PD, Howdle JE, Crabtree JE. gd T cell receptor-positive cells of the human gastrointestinal mucosa: occurrence and V region gene expression in Helicobacter pylori-associated gastritis, coeliac disease

- and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:440-4.
44. Camarero C, Eiras P, Asensio A, León F, Olivares F, Escobar H, et al. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: Permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gd subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr* 2000;89:285-90.
45. Madrigal L, Lynch S, Feighery C, Weir D, Kelleher D, O'Farrelly CJ. Flow cytometry analysis of surface major histocompatibility complex class II expression on human epithelial cells prepared from small intestinal biopsies. *J Immunol Methods* 1993;158:207-14.
46. León F, Camarero C, Eiras P, Bootello A, Roy G. Anti-transglutaminase and intraepithelial lymphocytes in a screening algorithm for celiac disease [carta]. *Gut* 2002;50:740.
47. Kiren V, Baldas V, Not T, Tommasini A, Trevisiol C, Gerarduzzi T, et al. New dimension of coeliac iceberg in childhood by using human tissue transglutaminase based ELISA test. 34th Annual Meeting of ESPGHAN, 9-12 mayo 2001, Ginebra, Suiza.