

Linee guida per la diagnosi di laboratorio e istologica della malattia celiaca

E. Tonutti^a, D. Visentini^a, N. Bizzaro^b, D. Villalta^c, M. Bagnasco^d, R. Tozzoli^e, M. Tampoia^f, D. Bassetti^g, M. Musso^h, M. Liguoriⁱ, A. Antico^l, S. Platzgummer^m, F. Manoniⁿ, L. Camogliano^o, M. Pradella^p, V. Villanacci^q, P. Ceppa^r, R. Fiocca^r

^aImmunopatologia e Allergologia Ospedale S. Maria della Misericordia di Udine, ^bLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo (UD), ^cImmunologia Clinica e Virologia Ospedale S. Maria degli Angeli di Pordenone, ^dDIMI Università di Genova, ^eLaboratorio Analisi Ospedale di Latisana (UD), ^fPatologia Clinica Policlinico di Bari, ^gPatologia Clinica II Ospedale S. Chiara, Trento, ^hLaboratorio Analisi Ospedale S. Croce e Carle, Cuneo, ⁱLaboratorio Analisi Ospedale Brotzu, Cagliari, ^lLaboratorio Analisi Ospedale di Cittadella (PD), ^mLaboratorio Centrale Ospedale di Merano (BZ), ⁿLaboratorio Analisi Ospedale di Monselice (PD), ^oLaboratorio Analisi Ospedale S. Giacomo, Novi Ligure (AL), ^pLaboratorio Analisi Ospedale di Castelfranco Veneto (TV), ^qIl Servizio di Anatomia Patologica - Spedali Civili, Brescia, ^rDICMI - Sez Anatomia Patologica - Università di Genova.

Riassunto

La diagnosi di malattia celiaca viene posta in base al quadro clinico, al riscontro di anticorpi e autoanticorpi specifici e alla dimostrazione del danno istologico evidenziabile con la biopsia duodenale. Le linee guida da noi sviluppate vogliono proporre un corretto utilizzo dei test sierologici attualmente disponibili, dei test genetici in grado di definire l'appartenenza ai gruppi a rischio e dei diversi quadri istologici, definendo gli step diagnostici e interpretativi in maniera diversificata a seconda della motivazione della richiesta (diagnosi, monitoraggio, gruppi a rischio) e all'età dei pazienti. Queste raccomandazioni sono formulate sulla base della esperienza personale degli autori, dei dati di letteratura, del consenso raggiunto sui diversi punti all'interno del gruppo di studio e del contributo dei numerosi partecipanti alla discussione che ha fatto seguito alla stesura preliminare delle linee guida pubblicate su questa rivista nel 2002 e diffuse sul sito web della SIMeL. L'attuale versione inoltre è un modello di lavoro interdisciplinare che ha visto una fattiva collaborazione tra patologi clinici, immunologi e anatomo-patologi.

Abstract

Guidelines for the serological and histopathological diagnosis of celiac disease.

The diagnosis of celiac disease is made on the basis of a patient's clinical and genetic history, the finding of specific antibodies and auto-antibodies, and the evidence of histological damage revealed by a duodenal biopsy. These guidelines were written in order to provide education and guidance for the appropriate use of serological and genetic tests, and for the correct interpretation of the different histological patterns. Differing diagnostic and explanatory steps have been described so as to respond to various needs (diagnoses, monitoring, groups at risk) and according to the age of the patients. The recommendations have been based on the authors' personal experience, medical literature, consensus reached on numerous points by the study group, and the contributions from many who participated in the discussion which followed the publication of the preliminary version of the guidelines in this same journal in 2002 and also on the website of the SIMeL. Moreover, the current version is a model of interdisciplinary work which has resulted from an effective collaboration between clinical pathologists, immunologists and surgical-pathologists.

Key words: Anti-transglutaminase antibodies, anti-endomysial antibodies, celiac disease, guidelines, small bowel biopsy.

La malattia celiaca (MC) è una patologia immuno-mediata che si manifesta in persone geneticamente suscettibili, in seguito all'introduzione nella dieta di alimenti contenenti glutine. Viene considerata una malattia autoimmune ed è una condizione clinica che persiste per tutto l'arco della vita. In Europa la sua prevalenza nella popolazione generale è stimata tra lo 0.3 e l'1.2%, con variazioni che sembrano essere condizionate più dai modelli degli studi epidemiologici che da reali condizioni ambientali o genetiche¹⁻⁷. Percentuali simili di prevalenza a quelle europee sono riportate nelle popolazioni nord-americane e australiane⁸; recenti studi hanno evidenziato un'alta prevalenza anche nelle popolazioni nord-africane, con punte del 5-6% nelle popolazioni del Sahara occidentale⁹.

La MC è caratterizzata istologicamente da un danno immuno-mediato della mucosa intestinale innescato dal glutine presente in cereali quali frumento, orzo e segale. Anche se in passato l'avena è stata considerata potenzialmente patogenica per i celiaci, recenti studi hanno dimostrato che la reintroduzione nella dieta di questo cereale non è in grado di provocare il danno istologico alla mucosa intestinale¹⁰.

Lo spettro clinico di questa patologia è estremamente eterogeneo e comprende quadri che vanno da drammatiche condizioni generali dovute al malassorbimento (rare), a sintomi clinici sfumati (frequenti), spesso con assenza dei classici sintomi gastrointestinali^{11,12}.

A differenza di altre patologie autoimmuni, la celiachia è curabile nella quasi totalità dei casi adottando una alimentazione appropriata, qualora non si siano già instaurate complicanze irreversibili.

Gli esami di laboratorio sono fondamentali per l'inquadramento della MC e spesso sono in grado di individuare soggetti celiaci con segni clinici subdoli e di non facile interpretazione; permettono inoltre il monitoraggio dei pazienti in dieta priva di glutine. Studi epidemiologici eseguiti su vasta scala hanno dimostrato che solo il 10-20% dei casi di celiachia sono identificati sulla base dei dati clinici^{1,2,13}; negli ultimi anni le conoscenze di fisiopatologia e l'utilizzo di marcatori sierologici sensibili e specifici hanno notevolmente migliorato le possibilità di identificare i soggetti affetti da celiachia. Nel 1997 l'enzima transglutaminasi tissutale (tTG) è stato identificato quale principale se non unico bersaglio degli autoanticorpi presenti nel siero dei soggetti celiaci¹⁴; ciò ha permesso la comprensione dei meccanismi fisiopatologici della malattia. L'enzima agisce infatti deamidando la gliadina che, così modificata e associata agli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (HLA II: human leukocyte antigen) DQ2 o DQ8, viene presentata ai linfociti T della lamina propria¹⁵⁻¹⁷; la cronica stimolazione di queste cellule porta ad una attivazione immunologica persistente e ad una trasformazione della mucosa intestinale (infiltrazione linfocitaria, iperplasia delle cripte, atrofia dei villi)^{18,19}.

La biopsia duodenale è l'approccio diagnostico conclusivo e deve essere eseguita sulla base delle indicazioni fornite dai test di laboratorio²⁰.

Fattori di rischio

Genetica. La MC è una patologia a forte predisposizione genetica: nei gemelli omozigoti la concordanza per la ma-

lattia è del 75%²¹, mentre il 5-10% dei familiari di primo grado ne è affetto. La MC è strettamente associata alla presenza dell'antigene HLA di classe II DQ2 e più del 90% dei soggetti celiaci esprime questo marcatore; i pochi pazienti DQ2 negativi sono DQ8 positivi²². La predisposizione genetica legata al sistema HLA spiega solo parzialmente il modo di estrinsecazione di questa patologia; infatti, benché la prevalenza dell'antigene DQ2 nella popolazione generale europea sia compresa tra il 20% e il 30%²²⁻²⁴, solo una piccola parte di questi individui è affetta da MC. Il valore predittivo positivo di DQ2, considerando una prevalenza della malattia nella popolazione generale dell'1%, sarebbe quindi compreso tra il 3.0% e il 4.5%, mentre il valore predittivo negativo con DQ8, sarebbe vicino al 100%. La stretta associazione alplotipica permette tuttavia di utilizzare la determinazione degli antigeni HLA di classe II per scopi diagnostici o per la identificazione dei soggetti a rischio.

Sesso. La prevalenza del morbo celiaco è più elevata, anche se di poco, nel sesso femminile, con un rapporto maschi/femmine di 1/2^{25,26}.

Dieta. La malattia si manifesta in seguito all'assunzione del glutine con gli alimenti; esso comprende una famiglia di proteine vegetali, le prolamine, contenute nel frumento (gliadine), nell'orzo (ordeine), e nella segale (secaline). Nonostante il suo scarso valore nutrizionale per la mancanza di aminoacidi essenziali quali la lisina e il triptofano, il glutine ha tuttavia un ruolo strutturale importante poiché conferisce alla farina di grano la capacità di formare assieme all'acqua un impasto tenace ed elastico, proprietà essenziale per la panificazione. Nel 1984 Kasarda e coll. hanno determinato la sequenza strutturale dell'alfa-gliadina, proteina costituita da 266 aminoacidi²⁷. L'alto contenuto di prolina e glutammina, trovato soprattutto in alcune sequenze delle gliadine, rende queste proteine immunogeniche; i siti antigenici immunodominanti risultano essere le porzioni peptidiche ricche in prolina. Nei soggetti geneticamente suscettibili, la non assunzione di glutine evita l'instaurarsi del danno alla mucosa, e nei soggetti identificati come celiaci una rigorosa dieta priva di glutine è in grado di far ripristinare la normale architettura dei villi nell'arco di 6-12 mesi²⁸.

Altri fattori di rischio. Il rischio di sviluppare la malattia celiaca è superiore, rispetto alla popolazione normale, nei pazienti con le seguenti condizioni: diabete mellito tipo 1 (3-5%)²⁹, sindrome di Down (4-5%), deficit di IgA (rischio aumentato di circa 10-16 volte)³⁰, familiari di 1° grado di celiaci (5-10%). In letteratura vengono inoltre descritte numerose altre condizioni cliniche associate a MC³¹, che possono essere genericamente considerate come fattori di rischio, anche se i dati attualmente disponibili non sono ancora univoci³²⁻³⁸.

Manifestazioni cliniche

I segni e sintomi che si manifestano nei soggetti celiaci sono estremamente eterogenei, riconoscono differenti meccanismi fisiopatologici (malassorbimento, attivazione immunologica, tossicità diretta dei peptidi gliadici, alterata permeabilità intestinale) e possono comparire in tempi diversi^{25,26}. Il medico deve in ogni caso essere a conoscenza dell'estremo polimorfismo clinico della MC la cui

Tabella I. Segni e sintomi che possono essere presenti in soggetti affetti da malattia celiaca.

Generali Bassa statura Perdita di peso Ritardo puberale Astenia Apatia Malessere Edema	Gastrointestinali Dispepsia Nausea Vomito Diarrea Stipsi Distensione addominale Flatulenza Glossite Ulcere cavo orale Difetto smalto dentario	Neuro-psichiatrici Neuropatia periferica Atassia Epilessia Parestesie Ansietà Depressione Irritabilità
Ematologici Anemia Carenza di ferro Carenza di folati Emorragie Ecchimosi	Osteoarticol./muscol. Artrite Osteoporosi Osteomalacia Crampi Miopatia	Altri Dermatite erpetiforme Alopecia Enuresi notturna Infertilità Poliabortività Ipertransaminasemia Coilonichia Ippocratismo digitale

diagnosi viene spesso formulata solo attraverso la collaborazione di diversi specialisti. Nella tabella I sono riportati segni e sintomi che devono suggerire al medico curante la prescrizione degli esami di laboratorio.

L'esecuzione delle indagini di laboratorio è inoltre consigliata, indipendentemente dal quadro clinico, in tutti i soggetti che appartengono ai gruppi a rischio ³¹ (diabetici, deficit di IgA, familiari di primo grado di celiaci, Down) ed eventualmente in soggetti affetti da patologie celiachia-associate come le tireopatie autoimmuni ^{32,39}, le patologie infiammatorie croniche dell'intestino ⁴⁰, il morbo di Addison ⁴¹, etc. (tabella II).

E' importante sottolineare che i soggetti celiaci non trattati possono sviluppare patologie croniche o degenerative, tra cui il linfoma intestinale T, il carcinoma dell'esofago e del digiuno, l'ileite ulcerativa, l'osteoporosi e problemi legati alla fertilità ^{31,42-48}, e che l'adozione di una rigorosa dieta priva di glutine può avere efficacia preventiva nei confronti di queste ed altre complicanze ^{43,49}.

Marcatori anticorpali e genetici

Anticorpi anti-gliadina (AGA)

Gli anticorpi anti-gliadina sono stati il primo marcatore sierologico ad essere utilizzato nella pratica clinica. I primi metodi sono stati introdotti all'inizio degli anni '80 e sono ancora in uso anche se, alla luce delle nuove acquisizioni, il loro utilizzo va ridimensionato. Abituamente si dosano sia gli AGA di classe IgG che di classe IgA con metodiche immunoenzimatiche (ELISA); sensibilità e specificità degli AGA IgG sono comprese rispettivamente tra 82-87% e 67-80%, e tra 85-90% e 83-91% per gli AGA IgA ⁵⁰. Tuttavia questi test hanno una variabilità analitica molto elevata: non sono infatti disponibili standard internazionali di riferimento per cui è esperienza diffusa il riscontro di risultati anche molto diversi da un laboratorio all'altro ⁵¹.

La determinazione degli AGA IgG può essere utile nei soggetti con deficit di IgA e nei primi anni di vita, dove la classe IgA può essere scarsamente rappresentata per deficit maturativi nel processo di sintesi delle immunoglobuline.

La recente introduzione di metodi per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG), ha ridotto notevolmente l'impiego clinico degli AGA, anche se oggi si può ritenere importante il loro utilizzo nella fascia di età da 0 a 5 anni, in considerazione delle evidenze di sierconversione autoanticorpale riportate recentemente per la malattia celiaca. Infatti, un importante studio prospettico americano ha valutato l'incidenza della MC nella popolazione infantile di Denver (Colorado), monitorando, con la ricerca degli anti-tTG IgA, bambini selezionati alla nascita e suddivisi in gruppi a rischio sulla base della predisposizione genetica (genotipo HLA celiachia-associato). I dati indicano che la sierconversione per anti-tTG avviene prevalentemente tra i 5 e i 7 anni ⁵²: ciò suggerisce che la determinazione degli AGA può avere ancora un significato al di sotto di questa fascia di età.

Anticorpi anti-reticolina (ARA)

Questi autoanticorpi, che identificano strutture della matrice extracellulare, si evidenziano con la metodica dell'immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando come substrato fegato e rene di ratto. Gli ARA si suddividono in 5 sottotipi (R1, R2, Rs, R3, R4), ma solamente gli anti-R1 correlano significativamente con la MC e proprio questo sottotipo può essere identificato in IFI per la caratteristica fluorescenza peritubulare e periglomerulare. Si possono evidenziare anticorpi sia di classe IgA che di classe IgG; la sensibilità del metodo non è molto elevata in particolare per gli anticorpi di classe IgG, mentre la specificità varia ma è ritenuta discretamente buona. Recenti lavori hanno dimostrato che gli ARA corrispondono agli EMA e agli anti-tTG ⁵³. L'esame è in disuso, ma riteniamo importante che il patologo clinico sia in grado di identificare il pattern di fluorescenza specifico degli ARA R1, poiché alcuni casi di celiachia possono essere "scoperti" casualmente osservando questo pattern durante l'esecuzione di altre indagini in IFI per la ricerca di anticorpi anti-mitocondrio, anti-mucosa gastrica, anti-muscolo liscio su sezioni di tessuto (fegato e rene) murino.

Tabella II. Condizioni cliniche nelle quali la malattia celiaca risulta avere una maggiore prevalenza.

Tiroiditi
Connettiviti
Diabete tipo 1
Deficit di IgA
Sindrome di Down
Morbo di Addison
Patologie infiammatorie intestinali
Sclerosi multipla
Miastenia gravis
Miocardipatia dilatativa
Epatite autoimmune

Anticorpi anti-endomisio (EMA)

Sono autoanticorpi diretti contro antigeni presenti nella matrice del collagene evidenziabili con la metodica di IFI su sezioni di esofago (terzo inferiore) o di vescica di scimmia, o su sezioni di cordone ombelicale umano⁵⁴. La classe anticorpale anti-endomisio che da sempre ha dimostrato di correlare in maniera estremamente significativa con la malattia è la classe IgA, mentre la ricerca degli EMA di classe IgG viene quasi esclusivamente utilizzata per la diagnosi nei soggetti con deficit di IgA. I test in IFI per la determinazione di EMA di classe IgG sono di difficile interpretazione e richiedono una particolare procedura di esecuzione; per questi motivi le caratteristiche diagnostiche del metodo sono ancora in fase di valutazione⁵⁵.

La specificità degli EMA IgA è molto elevata (99-100%) e i rari falsi positivi sono in genere imputabili più a errori interpretativi che alle caratteristiche dei metodi impiegati. La sensibilità è anch'essa elevata (circa 95%), e i falsi negativi sono causati dalla minore sensibilità del metodo nei confronti di anticorpi specifici diretti contro epitopi conformazionali⁵⁶ più facilmente espressi dalla transglutaminasi legata alla fase solida. In alcuni casi il pattern di fluorescenza degli EMA non è quello classico (a nido d'ape), e può quindi essere di difficile interpretazione.

La ricerca degli EMA è utilizzata sia nella diagnosi che nel monitoraggio dei pazienti in dieta, nel qual caso si assiste ad una progressiva scomparsa degli autoanticorpi circolanti nell'arco di 4-12 mesi⁵⁷.

Le problematiche intrinseche a questa indagine risiedono negli elevati costi del substrato, nella crescente difficoltà nel reperire tessuti di primate e negli aspetti interpretativi della metodica, particolarmente quando il substrato è costituito da sezioni di cordone ombelicale.

Anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (anti-tTG)

La recente identificazione dell'enzima transglutaminasi tissutale quale bersaglio di autoanticorpi presenti nei soggetti celiaci¹⁴, ha permesso la comprensione dei meccanismi fisiopatologici e l'applicazione di nuove metodologie diagnostiche⁵⁸⁻⁶⁰.

La tTG (EC 2.3.2.13), è un enzima intracellulare Ca⁺⁺ dipendente e ubiquitario⁶¹ che catalizza la formazione di legami covalenti e irreversibili tra residui glutamminici e residui lisinici presenti nella stessa o in differenti catene polipeptidiche. L'enzima ha inoltre un ruolo nella

trasduzione di segnali extracellulari e sembra avere un ruolo critico nel controllo dell'omeostasi cellulare e tissutale regolando la proliferazione, la differenziazione terminale e il processo apoptotico⁶². Sebbene la tTG sia normalmente localizzata nel citoplasma, in particolari condizioni può essere rilasciata nell'ambiente extracellulare dove si lega a proteine della matrice come la fibronectina, l'osteonectina e il collagene ed ha il ruolo di stabilizzare e riparare i tessuti⁶³.

Mentre la funzione maggiormente conosciuta della tTG è il cross-linking proteico, mediante l'introduzione di un legame covalente tra glutammina e lisina, è stato anche dimostrato che l'enzima è in grado di deamidare i residui glutamminici in assenza di residui lisinici. La gliadina, che ha un alto contenuto in glutammina, è perciò un eccellente substrato per la transglutaminasi. La deamidazione gliadinica catalizzata dalla tTG aumenta l'affinità di legame tra peptidi gliadinici e molecole DQ2 e DQ8; i neoepitopi antigenici sono in grado di attivare sia i linfociti T che i linfociti B specifici con conseguente sintesi di anticorpi anti-gliadina e anti-tTG. Recenti studi hanno dimostrato che gli autoanticorpi sierici anti-tTG del paziente celiaco sono in grado di inibire l'attività catalitica della tTG umana sia in vitro che in situ⁶⁴. Alcuni sintomi della MC potrebbero quindi essere spiegati dal processo di inibizione dell'attività enzimatica da parte degli autoanticorpi nei vari tessuti.

Il riconoscimento della tTG quale proteina bersaglio degli anticorpi anti-endomisio ha permesso di sviluppare metodi immunoenzimatici e radioimmunologici ad elevata sensibilità e specificità⁶⁵⁻⁶⁸. I metodi commerciali attualmente disponibili per la ricerca di anti-tTG offrono ottime garanzie di qualità analitica; il substrato utilizzato può essere costituito da antigene estrattivo (eritrociti o placenta) o ricombinante umano⁶⁹⁻⁷¹, mentre non sono più utilizzati substrati costituiti da antigene estrattivo di origine animale a causa della dimostrata inferiore sensibilità e specificità^{50,72}. La concentrazione nel siero degli anticorpi anti-tTG nei soggetti non affetti da MC risulta essere molto bassa tale da essere appena rilevabile con i metodi quantitativi. Nei soggetti sani di età compresa tra 1 e 20 anni il titolo degli anti-tTG non evidenzia significative differenze, mentre aumenta progressivamente dai 20 anni in poi, pur rimanendo ampiamente al di sotto del cut-off del metodo⁷³. Perciò un risultato negativo per anti-tTG, ma con un titolo non lontano dal livello decisionale, deve essere valutato attentamente in rapporto all'età del paziente essendo indicativo, in alcuni casi, di una sierconversione in fase iniziale.

Possono essere determinate entrambe le classi anticorpali IgA e IgG^{74,75}, tuttavia l'utilizzo dei test per la ricerca di IgG anti-tTG è condizionato da una elevata discordanza dei risultati ottenuti utilizzando reagenti diversi⁶⁸. Recentemente sono stati proposti anche metodi ELISA che usano come substrato transglutaminasi ricombinante in associazione con peptidi gliadinici. Dai primi dati disponibili però tali test sembrano essere dotati di una minore specificità diagnostica rispetto a quelli che usano il solo antigene estrattivo o ricombinante umano⁷⁶.

La letteratura riporta una superiore sensibilità degli anticorpi anti-tTG nei confronti degli EMA sia nella diagnosi che nel monitoraggio della MC⁷⁷.

Anticorpi anti-actina enterocitaria

Un recente studio multicentrico ha ipotizzato, sulla base di un'ampia casistica, un ruolo degli anticorpi anti-actina IgA nella diagnostica della MC. Questi anticorpi sono evidenziabili in IFI su linee di enterociti in coltura. La ricerca degli anticorpi anti-actina sembrerebbe essere utile non come marcatore per la diagnosi della MC, ma come indicatore di danno istologico severo della mucosa intestinale, in quanto, la presenza e il titolo di tali anticorpi sembrano correlare positivamente con il grado di atrofia dei villi⁷⁸. Qualora la metodica risultasse applicabile su scala sufficientemente ampia e i primi dati fossero confermati, sarebbe opportuno considerare un suo posizionamento come marcatore di lesione d'organo.

Marcatori genetici

La dimostrazione che i soggetti affetti da MC esprimono selettivamente gli antigeni HLA di classe II DQ2 o DQ8 ha permesso di introdurre questa indagine nella pratica clinica. La determinazione degli antigeni HLA attraverso l'identificazione degli alleli specifici, viene oggi effettuata con metodiche di biologia molecolare, rese disponibili da più fonti commerciali, con riduzione dei tempi e dei costi di esecuzione.

La molecola DQ2, un eterodimero formato da una catena α e una catena β , è situata sulla superficie delle cellule coinvolte nella risposta immune (linfociti B e macrofagi) ed è codificata da due alleli della subregione DQ, rispettivamente DQA1*0501 per la catena α e DQB1*0201 per la catena β . Il 90-95% dei pazienti celiaci presenta l'aplotipo DQ2 comparato con il 20-30% della popolazione generale. La percentuale residua dei pazienti celiaci DQ2 negativi porta l'aplotipo DQ8^{4,22-24} il cui eterodimero è geneticamente codificato dagli alleli DQA1*0301 e DQB1*0302. Un recente lavoro dell'European Genetics Cluster on Coeliac Disease ha dimostrato che il 10% dei soggetti celiaci studiati (tra 1007 pazienti complessivi), non presentava l'eterodimero DQA1*05/DQB1*02 (sierologicamente denominato DQ2), ma presentava per metà l'eterodimero che codifica per l'antigene DQ8, e per la quota rimanente (circa il 5.5% del totale), uno solo degli alleli associati a rischio elevato di malattia (DQA1*05 o DQB1*02)^{79,80}.

A causa del forte disequilibrio di legame che porta ad ereditare il gruppo dei geni del sistema HLA come aplotipi estesi, la maggior parte dei pazienti celiaci esprime l'aplotipo HLA DR3-DQ2. Questo aplotipo è di particolare interesse perché è associato a numerose malattie autoimmuni come il diabete tipo 1, l'epatite autoimmune⁸¹, la colangite sclerosante⁸², le sindromi autoimmuni poliendocrine⁸³ e al deficit selettivo di IgA⁸⁴. Per questo motivo il rischio di celiachia è notevolmente aumentato in soggetti con le patologie citate.

L'identificazione dell'aplotipo associato a celiachia, proprio per la sua elevata diffusione nella popolazione generale, non deve essere considerato un test di conferma ma piuttosto un esame a completamento del quadro diagnostico in alcune situazioni particolari che verranno in seguito considerate, e quindi deve essere interpretato con le caratteristiche del marcatore di esclusione di malattia. Va infatti ricordato che il valore predittivo positivo di DQ2, consi-

derando una prevalenza della malattia nella popolazione generale dell'1%, sarebbe compreso tra il 3% e il 4.5% mentre il valore predittivo negativo, insieme a DQ8, sarebbe vicino al 100%. I risultati degli studi sul rischio relativo di HLA-DQ per la MC, hanno recentemente dimostrato che, considerando i genotipi suscettibili di intolleranza al glutine, vi è massimo rischio per i soggetti omozigoti DQ2/DQ2 ed eterozigoti DQ2 ma che presentano un secondo allele DQB1*02, medio rischio per gli individui DQ2/non DQ2 (DQ2 eterozigoti) e basso rischio per i non DQ2/non DQ2⁸⁵.

È bene infine sottolineare che è sufficiente richiedere al laboratorio la sola identificazione degli alleli DQ per la determinazione degli antigeni DQ2 e DQ8 e non la mappatura completa dell'aplotipo HLA di classe I e II.

Prelievo biotico, esame istologico e immunoistochimico e diagnosi differenziale

La valutazione morfologica della biopsia duodenale rappresenta ancora oggi l'esame conclusivo per la diagnosi della MC nella maggior parte dei casi. Il ruolo dell'anatomopatologo assume pertanto un'importanza fondamentale per confermare o meno il sospetto clinico e il dato di laboratorio. In questi ultimi anni ha assunto rilievo la certezza che la lesione intestinale indotta dal glutine non è solo quella da tempo conosciuta caratterizzata dalla totale scomparsa dei villi intestinali ma, oltre ad una variabilità nell'espressione clinica della malattia, si riconosce oggi anche una variabilità nell'estrinsicazione del danno intestinale e di conseguenza delle alterazioni valutabili morfologicamente. Esiste infatti uno spettro di lesioni dipendenti dal glutine che va dal semplice aumento del numero di linfociti, in una mucosa per il resto normale, fino al danno più severo descritto come "atrofia totale della mucosa".

Per l'anatomo-patologo, nell'ambito di un lavoro di equipe a stretto contatto con gli altri specialisti, quali il gastroenterologo endoscopista (pediatra o dell'adulto) e il patologo clinico, è indispensabile conoscere le seguenti notizie che riguardano il paziente:

- motivo della biopsia: sintomatologia, familiarità, storia di pregressa diagnosi di celiachia, patologie associate;
- esami di laboratorio: positività o meno dei marcatori sierici di MC
- notizie eventuali riguardanti la dieta: priva di glutine, con glutine, durata della dieta;
- reperti endoscopici: la celiachia di regola si accompagna ad alcuni reperti endoscopici caratteristici, per quanto non specifici.

E' da sottolineare che il referto istologico è un dato inoppugnabile qualora associato a clinica e a esami di laboratorio compatibili con diagnosi di MC. A volte la biopsia è necessaria per eliminare un dubbio (esistono infatti soggetti con sierologia dubbia o negativa e clinica positiva), o per rivalutare una diagnosi posta in epoca pre-sierologica. Tuttavia in alcuni casi non è necessario e in altri è controindicato eseguire il prelievo biotico e in particolare: in presenza di crisi celiaca importante del bambino (nel qual caso si deve attuare una terapia e dieta immediata), gravidanza, macroglossia, deficit della coagulazione, ipertrofia adenoidea, rifiuto di sottoporsi a biopsia a fronte di clinica e sierologia positive⁸⁶. In tutti questi (e altri

possibili casi), la mancanza di referto istologico non preclude in assoluto la diagnosi e la certificazione di MC. E' importante infatti rilevare che nessuna delle pertinenti leggi dello Stato Italiano ha mai preteso che la condizione celiaca fosse accertata attraverso biopsia intestinale: la legge attualmente in vigore (Decreto Legge dell'8 Giugno 2001) che ha rivisitato i criteri dell'erogazione dei prodotti dietoterapeutici, non indica come arrivare alla diagnosi ma sottolinea espressamente all'art. 2 il fatto che "le patologie di cui all'art.1, comma 1 (tra le quali appunto la celiachia), sono accertate e certificate dai centri di riferimento a tal fine individuati dalle Regioni".

Prelievo bioptico

Nei bambini al di sotto dei due anni la biopsia viene eseguita mediante l'impiego della capsula di Crosby-Watson per via perorale o mediante esofago-gastro-duodenoscopia. Al di sopra dei due anni la biopsia viene eseguita con esame endoscopico. Questa regola, tuttavia, non è categorica e l'indirizzo attuale è quello di eseguire l'esame endoscopico a qualsiasi età in modo da poter esplorare ulteriori distretti anatomici dell'apparato gastro-enterico. La biopsia va sempre eseguita nella seconda e terza porzione duodenale, in quanto il bulbo e il duodeno prossimale possono essere fonte di erronee valutazioni; si consigliano almeno quattro campionamenti, due per ognuno dei settori sopra citati. Sarebbe consigliabile il posizionamento delle biopsie, a seconda della tecnica utilizzata, su filtri millipore di acetato di cellulosa. L'orientamento dei prelievi sui filtri da parte dell'endoscopista è fondamentale per una corretta valutazione istologica. Tale orientamento deve far sì che i villi siano rivolti verso l'alto e che la parte cruentata appoggi sul supporto. Anche il procedimento di inclusione in paraffina deve essere eseguito in modo da rispettare l'orientamento sopra descritto. In un recente studio multicentrico europeo è stato riportato che l'11% delle biopsie intestinali non risultano diagnostiche a causa del non corretto orientamento dei preparati⁸⁷.

Per valutare tutti gli elementi morfologici necessari è sufficiente una colorazione panottica con ematossilina-eosina, ed eventualmente una colorazione con PAS. E' utile inoltre, per i motivi che saranno esposti più avanti, approntare una sezione non colorata da dedicare alla tipizzazione immunoistochimica.

Esame istologico

Dal punto di vista della microscopia ottica considereremo prima l'aspetto della mucosa intestinale normale, poi i tre quadri istologici con progressiva gradualità di lesioni che possono essere osservati nel corso della MC.

Una mucosa intestinale normale presenta: villi con aspetto digitiforme e rapporto tra l'altezza dei villi stessi e quella delle cripte sempre a favore del villo (3/1 o più); enterociti con altezza normale di 29-34 mm; numero di linfociti intraepiteliali inferiore a 20 per 100 cellule epiteliali (si considera patologica una quota di linfociti superiore a 40 per 100 enterociti, mentre un range compreso tra 20 e 40 è da considerare border-line e necessita di approfondimento)⁸⁸; numero di mitosi per cripta in genere non superiore a una. La lamina propria presenta normalmente un infiltrato costituito da plasmacellule, eosinofili, istiociti, mastociti e

linfociti, con assenza di neutrofili; plasmacellule e linfociti sono le componenti cellulari più rappresentate e talora formano aggregati linfoidi.

La descrizione della mucosa intestinale patologica è basata sulla classificazione secondo Marsh universalmente riconosciuta e validata^{17,89}, per la quale recentemente è stata proposta, a completamento, una modifica da parte di Oberhuber e coll.^{90,91} che prevede la suddivisione della lesione di tipo 3 di Marsh in tre sottogruppi. Si consiglia quindi di utilizzare uno schema descrittivo del quadro morfologico basato sulla classificazione secondo Marsh rivista da Oberhuber qui sotto brevemente riportata:

lesione di tipo 1 o infiltrativa: villi con architettura nei limiti morfologici della norma (normale rapporto villo/cripta 3/1), incremento del numero dei linfociti intraepiteliali (superiore a 40 per 100 cellule epiteliali);

lesione di tipo 2 o iperplastica: villi con architettura nei limiti morfologici della norma, incremento del numero di linfociti intra-epiteliali (superiore a 40 per 100 cellule epiteliali), iperplasia degli elementi delle cripte (aspetto rigenerativo evidenziato da allungamento delle cripte, riduzione dell'attività mucipara e aumento del numero delle mitosi);

lesione di tipo 3 o distruttiva o atrofica: atrofia dei villi di grado variabile associata ad iperplasia delle cripte ghiandolari (rapporto villo/cripta alterato), enterociti di superficie di altezza ridotta, con brush-border irregolare e vacuoli citoplasmatici, incremento del numero di linfociti intraepiteliali (superiore a 40 per 100 cellule epiteliali).

La lesione di tipo 3 viene pertanto suddivisa in:

3a- villi con lieve atrofia e incremento patologico dei linfociti intraepiteliali.

3b- atrofia dei villi di grado moderato e incremento patologico dei linfociti intraepiteliali.

3c- atrofia totale dei villi e incremento patologico dei linfociti intraepiteliali.

I tre quadri istologici principali, per quanto schematici, rappresentano le lesioni istologiche visibili in corso di celiachia. E' importante considerarli fenomeni dinamici e progressivi (sia in un senso che nell'altro), in quanto funzione dell'esposizione quantitativa e temporale al glutine.

Ricordiamo che i campioni prelevati in una singola occasione bioptica possono presentare lesioni di diversa gravità; in tale evenienza è opportuno segnalare la disomogeneità dei reperti e graduare la lesione in riferimento al reperto più grave. Nella descrizione del quadro morfologico è importante che siano elencati tutti gli elementi sopra riportati con una descrizione precisa delle alterazioni riscontrate; dovrebbe seguire un giudizio di compatibilità o meno con la diagnosi di celiachia a fronte di dati clinici e di laboratorio completi.

Tipizzazione immunoistochimica

Da quanto sopra esposto, uno dei punti fondamentali nella diagnosi di celiachia, risulta essere la conta dei linfociti T intraepiteliali che, in condizioni patologiche, deve essere superiore a 40 linfociti per 100 cellule epiteliali. Il dato è particolarmente importante per il fatto che oggi si osserva un elevato numero di lesioni non atrofiche (tipo 1 e 2 secondo Marsh) clinicamente e sierologicamente compatibili con intolleranza al glutine.

La conta linfocitaria può essere effettuata anche su un preparato colorato con ematosilina-eosina ma si consiglia, soprattutto nelle forme non atrofiche, di associare l'indagine immunoistochimica con anticorpi monoclonali anti-CD3 che consentono di visualizzare meglio i linfociti. Un ulteriore elemento può essere la valutazione dei linfociti mediante anticorpi monoclonali anti-CD8; ciò è particolarmente utile nelle forme refrattarie di MC non rispondenti alla dieta (in particolare dei soggetti anziani) da molti considerate manifestazioni pre-linfomatose, nelle quali i linfociti T non esprimono il CD8⁹².

Avendo a disposizione materiale congelato può essere effettuata una tipizzazione immunoistochimica per il recettore g/d dei linfociti T che in condizioni normali non viene espresso da più del 2-3% dei linfociti, mentre in corso di MC può raggiungere il 20-30% del totale. Questa indagine, potenzialmente utile nelle lesioni non atrofiche (tipo 1 e 2 di Marsh), non rientra tra le metodiche diagnostiche routinarie ma è impiegata nell'attività di ricerca.

Complicanze della MC obiettivamente istologicamente

Esistono numerose evidenze che la MC dell'adulto, a differenza di quanto avviene nel bambino, soprattutto se diagnosticata tardi e ancora di più se non trattata da una tempestiva e rigorosa dieta aglutinata, è aggravata da una mortalità superiore a quella della popolazione generale. Una dieta priva di glutine determina non solo un miglioramento del quadro clinico e biotico, ma previene anche quelle complicanze che devono essere sempre sospettate se il paziente adulto continua a stare male nonostante la dieta⁹³ e che sono:

- la sprue collagenosica caratterizzata istologicamente da fibrosi della tonaca propria a livello dello strato sottoepiteliale superficiale;
- la digiunoileite ulcerativa che si presenta con estese ulcerazioni della mucosa intestinale;
- il linfoma che è la complicanza più grave e istologicamente va sempre sospettato di fronte ad una prevalenza di elementi linfoidi monomorfi atipici. In questi casi è necessario eseguire la tipizzazione immunofenotipica della popolazione linfoide e lo studio del riarrangiamento genico del T cell receptor (TCR) per dimostrarne la clonalità. Il linfoma intestinale associato a MC origina da linfociti T ed è caratterizzato dal fenotipo CD3+ , CD5- , CD4-, CD8-/+, CD103+ e riarrangiamento clonale del TCR^{94,95}.

Diagnosi differenziale

Quanto esposto rappresenta in sintesi l'insieme delle lesioni morfologiche con cui si può manifestare la MC. Deve essere presa in considerazione anche la possibilità di un malassorbimento determinato da altre cause nelle quali l'esperienza del patologo è determinante per la diagnosi differenziale dei quadri istologici. Queste possono essere: malattie parassitarie (*Giardia Lamblia*, *Criptosporidium*, *Microsporidium*), infettive (malattia di Whipple), virali (Citomegalovirus, Herpes virus), malattie infiammatorie croniche (morbo di Crohn), neoplasie, intolleranze alimentari (latte vaccino, uova, ecc.)⁹¹.

Due condizioni, tuttavia, meritano particolare menzione:

- 1 - l'"enteropatia autoimmune" riscontrabile in bambini con deficit immunologico (immunodeficienza comune

variabile e agammaglobulinemia X-associata), in cui il quadro morfologico della biopsia intestinale può essere totalmente sovrapponibile al quadro della MC⁹⁶.

2 - il danno da farmaci: esistono numerose evidenze in letteratura che l'impiego di farmaci antinfiammatori non-steroidi è in grado di provocare alterazioni morfologiche del tutto simili a quelle della MC; questa evenienza è da tenere presente soprattutto quando si osservano casi di soggetti anziani con negatività dei marcatori sierologici.

Linee guida per la diagnosi di celiachia: sierologia e istologia

Queste linee guida vogliono offrire una base pratica per l'inquadramento diagnostico e il monitoraggio del paziente celiaco, tenendo presente l'ampia offerta di marcatori diagnostici e di metodologie analitiche attualmente disponibili. Il contributo del laboratorio alla diagnosi e al monitoraggio della MC è costituito da indagini siero-immunologiche, genetiche, istologiche e immunoistochimiche sulla base di una appropriata selezione clinica dei pazienti. L'efficacia degli interventi diagnostici e terapeutici dipende dalla stretta collaborazione tra medico di famiglia, patologo clinico, gastroenterologo e anatomo-patologo che devono necessariamente operare in modo integrato.

E' essenziale che, al di fuori di studi epidemiologici e di programmi di screening, che si pongono obiettivi diversi, gli esami di laboratorio siano richiesti solo in soggetti sintomatici o che presentino fattori di rischio⁹⁷.

Gli esami di laboratorio per la malattia celiaca devono essere richiesti qualora il paziente presenti uno o più sintomi indicativi di malattia celiaca, o appartenga ad uno dei gruppi a rischio.

In relazione alla migliore scelta dei marcatori, è utile che al laboratorio sia proposto un quesito diagnostico più che un elenco d'esami spesso inutili, obsoleti o poco appropriati; la condivisione di questi aspetti con il clinico è fondamentale per offrire un'appropriata griglia di esami in rapporto alle diverse situazioni cliniche. Il percorso è affrontato, infatti, in modo diverso a seconda che gli esami vengano richiesti: 1) a scopo diagnostico in pazienti sintomatici di età superiore ai 5 anni; 2) a scopo diagnostico in bambini di età inferiore ai 5 anni; 3) per la diagnosi in soggetti appartenenti a gruppi a rischio; 4) per il monitoraggio del paziente che segue una dieta priva di glutine; 5) per la revisione della diagnosi di MC nei casi dubbi.

La richiesta dovrebbe essere accompagnata dalla descrizione dei segni e/o sintomi, e dall'indicazione di eventuale appartenenza a gruppi a rischio; sarebbe inoltre opportuno indicare se l'indagine è prescritta con finalità diagnostica o per il monitoraggio della dieta priva di glutine.

1 - Procedura diagnostica in soggetti con manifestazioni cliniche ed età >5 anni

La recente introduzione di metodi analitici per la determinazione degli anticorpi anti-tTG, con caratteristiche di elevata sensibilità e specificità, ha posto in discussione il significato attuale dell'utilizzo di esami diagnostici quali AGA, ARA ed EMA, che nel tempo si sono aggiunti l'uno all'altro. Alla luce delle conoscenze fisiopatologiche e dell'iden-

tificazione degli epitopi antigenici bersaglio, i dati della letteratura più recente indicano ormai obsoleto l'utilizzo degli AGA in una fascia di età >5 anni, nonché priva di significato, come prima indagine diagnostica, la ricerca con metodi diversi da quello che appare sempre più essere lo stesso autoanticorpo (ARA, EMA e anti-tTG).

La determinazione con metodo EIA degli anti-tTG di classe IgA, è un test molto sensibile e specifico, quantitativo e automatizzabile, anche se al momento non sono disponibili standard internazionali.

E' necessario inoltre determinare sempre quantitativamente le IgA totali nel siero (con metodo nefelometrico o turbidimetrico), in modo da identificare i soggetti con deficit assoluto di IgA.

La determinazione degli anti-tTG di classe IgG è riservata ai casi di deficit di IgA⁹⁸ e a situazioni in cui ci sia un forte sospetto clinico di celiachia e il test anti-tTG di classe IgA sia risultato negativo.

La ricerca con metodo EIA degli anticorpi anti-tTG di classe IgA e il dosaggio delle IgA totali sieriche rappresentano la prima indagine per la diagnosi di malattia celiaca.

a) In caso di negatività per anti-tTG IgA e normali IgA sieriche vi è un'elevata probabilità che il paziente non sia affetto da MC.

a1) Nel caso in cui il titolo degli anti-tTG IgA, pur negativo, sia non lontano dal livello decisionale è necessario, in particolare nei soggetti sotto i 20 anni, che il referto di laboratorio sia accompagnato da un commento in cui si consiglia il monitoraggio clinico e sierologico del paziente.

b) In caso di positività per anti-tTG IgA si consiglia la ricerca degli EMA IgA con metodo IFI su sezione di terzo inferiore di esofago di scimmia (o sezione di cordone ombelicale umano).

In questo caso:

b1) Qualora gli EMA risultino positivi, la diagnosi di celiachia è praticamente certa e al paziente deve essere proposta la biopsia duodenale.

b2) In tutti i casi invece in cui gli EMA risultino negativi, si consiglia di ripetere gli esami a distanza di qualche mese, prima di procedere con l'indagine dell'aplotipo HLA per la identificazione degli alleli DQ2 e DQ8. Nei soggetti che risultano DQ2 e/o DQ8 positivi, è consigliata l'esecuzione della biopsia duodenale. E' sconsigliata invece l'esecuzione della biopsia duodenale nei soggetti con anti-tTG IgA positivi, EMA IgA e HLA DQ2 e DQ8 negativi.

La negatività per EMA IgA di un siero risultato anti-tTG IgA positivo è un evento non raro⁶⁸. In alcuni casi si tratta di una falsa positività degli anti-tTG che potrebbe essere transitoria^{76,99,100}. Più frequentemente si tratta di sieri di pazienti celiaci in cui la reattività anticorpale sul substrato di esofago di scimmia risulta non evidente o si manifesta con pattern atipico tale da non essere identificato dall'operatore.

c) In caso di negatività per anti-tTG IgA e deficit di classe IgA si consiglia la determinazione di anti-tTG IgG (o EMA IgG) e AGA IgG.

In presenza di deficit di IgA e positività di anti-tTG

IgG (o EMA IgG) e/o AGA IgG è consigliata l'esecuzione della biopsia intestinale.

Per deficit di IgA si intende un valore di IgA sieriche < 5 mg/dl; anche i deficit transitori di IgA nei bambini possono creare problemi nella determinazione di anticorpi o autoanticorpi di classe IgA. Nei soggetti con deficit di IgA, e in presenza di sintomi estremamente suggestivi di MC è consigliata comunque l'esecuzione della biopsia indipendentemente dai marcatori sierologici. Si deve inoltre tenere presente che nei soggetti con deficit di IgA è più elevata la prevalenza di forme di celiachia silente alla diagnosi³⁰. E' stato evidenziato che l'assenza di un commento ai risultati degli esami anticorpali o la sola indicazione che il risultato è coerente con la diagnosi di MC, non garantisce la corretta prosecuzione dell'iter diagnostico¹⁰¹. L'efficacia del follow-up diagnostico è invece nettamente aumentata quando i dati di laboratorio sono corredati da una chiara indicazione di quali ulteriori esami, compresa quelli biotici, dovessero essere effettuati a conferma e completamento di quelli di laboratorio.

Il referto di laboratorio deve includere, nei casi appropriati, un commento esplicativo con l'indicazione ed eventualmente la prescrizione degli esami necessari per il completamento dell'iter diagnostico (altre indagini sierologiche, indagini genetiche, la ripetizione degli esami stessi e la biopsia intestinale).

In tutti i casi in cui viene eseguita la biopsia duodenale sulla base di positività dei marcatori sierologici, è utile ricordare che:

Qualora la biopsia presenti un quadro emblematico cioè una lesione di tipo 3 di Marsh (3a, 3b o 3c), la diagnosi di celiachia è certa.

Qualora la biopsia presenti lesioni di tipo Marsh 1 o 2, è consigliato lo studio dell'aplotipo HLA II. Nel caso ci sia riscontro positivo degli alleli HLA DQ2 e/o DQ8, la diagnosi di celiachia è certa. In caso di negatività invece è consigliata la ripetizione della sierologia.

Una positività anticorpale anti-tTG in presenza di una mucosa apparentemente normale è evenienza non rara^{102,103}.

Qualora la biopsia intestinale dovesse risultare "normale" in un soggetto che presenti positività degli anticorpi anti-tTG, è consigliato lo studio dell'aplotipo HLA II. Nel caso ci sia riscontro positivo degli alleli HLA DQ2 e/o DQ8, è probabile che si tratti di "celiachia latente", nel qual caso è possibile che la lesione intestinale compaia in un'epoca successiva.

Consigliare una dieta priva di glutine in un soggetto con assenza di lesioni anche minime nella biopsia duodenale è tutt'oggi dibattuto. Il paziente deve essere monitorato clinicamente e sierologicamente per evidenziare la comparsa di quadri sintomatologici *ex novo* e in questo caso sarà utile l'esecuzione di un'altra biopsia duodenale.

In letteratura, inoltre, sono stati descritti numerosi casi di intolleranza al glutine con sierologia negativa¹⁰⁴.

Nel caso in cui il quadro sintomatologico risulti fortemente suggestivo di MC pur in assenza di marcatori sierologici ma con positività per l'aplotipo HLA DQ2 o DQ8, è consigliata l'esecuzione della biopsia

duodenale. In questi casi la diagnosi definitiva di MC verrà posta in base alla presenza di lesioni istologiche (nella prima biopsia) e alla risoluzione dei sintomi e al ripristino della normale architettura della mucosa intestinale in una seconda biopsia duodenale eseguita dopo 12-18 mesi di dieta aglutinata.

2 - Procedura diagnostica in soggetti con manifestazioni cliniche età < 5 anni

E' noto che nei bambini il sistema immunitario è in fase di maturazione per cui può essere utile, allo stato attuale delle conoscenze, prevedere un iter diagnostico differenziato nei soggetti con età inferiore ai 5 anni; in particolare è stato dimostrato che la maggiore parte dei bambini che svilupperanno la MC va prevalentemente incontro a sierconversione per anti-tTG tra i 5 e i 7 anni di età; di conseguenza è giustificabile, nella fascia di età 0-5 anni, assumere un atteggiamento flessibile per quanto concerne l'utilizzo dei marcatori sierologici. Inoltre, qualora gli esami di laboratorio siano negativi e persistano i sintomi (arresto della curva di crescita, anemizzazione, sintomi enterici importanti, etc.), ne è consigliata la ripetizione a distanza di alcuni mesi, anche più di una volta.

Nei soggetti di età inferiore ai 5 anni è consigliata la ricerca con metodi EIA degli anticorpi anti-tTG di classe IgA e, nello stesso tempo, la determinazione delle IgA totali sieriche e degli AGA IgG e IgA. In caso di positività per anti-tTG IgA si adotterà la medesima strategia proposta per i soggetti con età superiore ai cinque anni così come in presenza di deficit di IgA.

In caso di positività isolata di AGA IgG e/o IgA, si consiglia la ricerca dell'aplotipo HLA DQ2 e DQ8. In presenza di positività per l'aplotipo è indicata l'esecuzione della biopsia duodenale.

In caso di negatività degli esami di laboratorio e qualora persistano o compaiano quadri clinici associati a celiachia, è consigliata la ripetizione dei marcatori sierologici anche più di una volta, fino all'età di 5 anni.

3 - Procedura diagnostica in soggetti appartenenti a gruppi a rischio

Non è chiaro quando la MC possa insorgere nei soggetti geneticamente predisposti; questo aspetto risulta importante in quanto l'esito negativo dei marcatori sierologici non esclude che in futuro il paziente possa comunque sviluppare la patologia. Ciò è ancora più rilevante nei soggetti appartenenti a gruppi a rischio dove la presenza di una condizione predisponente aumenta in maniera significativa il rischio di MC. In questi soggetti un risultato sierologico negativo dovrebbe essere approfondito con la determinazione degli antigeni HLA di classe II. **Nei soggetti appartenenti a gruppi a rischio (familiari di primo grado di celiaci, diabetici tipo 1, Down, etc.) è consigliata l'esecuzione degli anti-tTG di classe IgA e il dosaggio delle IgA totali anche senza evidenti e chiari sintomi correlati alla celiachia.**

a) In caso di positività per anti-tTG IgA o deficit di IgA si procede come già descritto per i soggetti con manifestazioni cliniche.

b) In caso di negatività per anti-tTG IgA si consiglia

comunque di ripetere il test qualora compaiano quadri clinici o segni di MC. Per quanto riguarda i pazienti pediatrici con diabete tipo 1 è indicato eseguire, indipendentemente dalla insorgenza di nuovi sintomi, la ricerca degli anti-tTG ripetutamente.

c) In caso di persistente negatività per anti-tTG IgA e in presenza di segni e sintomi celiachia associati è giustificabile l'esecuzione dell'aplotipo HLA II, e in caso di positività per DQ2 o DQ8 è proponibile l'esecuzione della biopsia duodenale.

Il caso del gruppo a rischio con deficit di IgA è già stato affrontato nel precedente paragrafo 1-c.

4 - Monitoraggio dei soggetti celiaci in dieta priva di glutine

Anche nel monitoraggio dei pazienti in dieta priva di glutine, effettuato allo scopo di verificare la aderenza alla prescrizione dietetica, la determinazione degli anti-tTG si è dimostrata più efficace rispetto a quella degli EMA, AGA e ARA. Si deve comunque ricordare che la negatività di marcatori sierologici in un paziente in dieta, non è indicativa di un'assoluta aderenza alla dieta stessa e non correla con la perfetta ricomposizione del quadro istologico¹⁰⁵. Il riscontro di una persistente positività dei marcatori sierologici può avere due significati importanti: a) una consapevole o meno non aderenza alla dieta da parte del paziente, che quindi necessita di una rivisitazione del regime dietetico; b) il sospetto diagnostico di sprue refrattaria associata a celiachia. Questa è una manifestazione di impatto clinico rilevante in quanto è una condizione linfomatosa o pre-linfomatosa.

In un soggetto in dieta che presenti negativizzazione degli anticorpi anti-tTG e persistenza di sintomi gastroenterici deve essere sospettata una patologia concomitante come insufficienza pancreatica, colon irritabile, infezione batterica, intolleranza alimentare diversa da MC o neoplasia⁹³.

Nel monitoraggio dei soggetti celiaci in dieta priva di glutine è consigliata la sola determinazione degli anticorpi anti-tTG di classe IgA, in quei casi che alla diagnosi avevano una positività per questa classe autoanticorpale, e della sola classe IgG nei casi con deficit di IgA (o nei pazienti positivi alla diagnosi solo per classe IgG).

La ricerca di anticorpi anti-tTG può essere effettuata a sei mesi-un anno dall'introduzione della dieta. In pazienti asintomatici che seguono una dieta priva di glutine, nei quali si riscontri positività per anti-tTG, è opportuno ripetere il dosaggio per conferma. Nel monitoraggio dei soggetti celiaci in dieta, si deve ricordare che la negativizzazione degli anti-tTG IgG (ad es. in un soggetto con deficit di IgA) può avvenire in tempi più lunghi (fino a due anni) rispetto agli anti-tTG IgA, anche se i pazienti seguono una dieta assolutamente priva di glutine.

5) Pazienti che necessitano di revisione diagnostica

In alcuni pazienti che seguono dieta priva di glutine, può essere presa in considerazione la necessità di una revisione della diagnosi; in particolare in quei soggetti che presentavano sierologia dubbia o basata su marcatori di non elevata specificità (come AGA IgG), o nei quali la valutazione istologica era non definitiva o comunque non conforme ai

criteri necessari. In questi casi può essere proposta una riesposizione al glutine e consigliata la ricerca dell'aplotipo HLA di classe II DQ2 e DQ8.

Ai pazienti che necessitano di revisione diagnostica si consiglia di eseguire l'HLA II e quindi di proporre la reintroduzione del glutine nella dieta. Il dosaggio degli anticorpi anti-tTG deve essere eseguito dopo 3 e 6 mesi dall'inizio del challenge dietetico. La scelta di eseguire la biopsia intestinale va valutata caso per caso, in base alla risposta clinica e sierologica alla reintroduzione del glutine nella dieta.

Bibliografia

- 1) Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl* 1996; Suppl 412: 29-35.
- 2) Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 343:200-3.
- 3) Mitt K, Uibo O. Low cereal intake in Estonia infants: the possible explanation for the low frequency of celiac disease in Estonia. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52:85-8.
- 4) Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttune T, et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348: 2517-24.
- 5) Tommasini A, Not T, Kiren V, Baldas V, Santon D, Trevisiol C, et al. Mass screening for coeliac disease using anti-human transglutaminase antibody assay. *Arch Dis Child* 2004; 89:512-5.
- 6) Volta U, Bellentani S, Bianchi FB, Brandi G, De Franceschi L, Miglioli L, et al. High prevalence of celiac disease in Italian general population. *Dig Dis Sci* 2001; 46:1500-5.
- 7) Carlsson AK, Axelsson IE, Borulf SK, Bredberg AC, Ivarsson SA. Serological screening for celiac disease in healthy 2.5-year-old children in Sweden. *Pediatrics* 2001; 107:42-5.
- 8) Hill I, Fasano A, Schwartz R, Counts D, Glock M, Horvath K. The prevalence of celiac disease in at-risk groups of children in the United States. *J Pediatr* 2000; 136:86-90.
- 9) Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999; 354:647-8.
- 10) Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Gabrelli F, Di Cello T, Anania MC, et al. Immunologic evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:137-40.
- 11) Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of celiac disease. *Gut* 1993; 34:150-1.
- 12) Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997; 349:1755-9.
- 13) Swinson CM, Levi AJ. Is celiac disease underdiagnosed? *Br Med J* 1980; 281:1258-60.
- 14) Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3:797-801.
- 15) van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Pena S, Mearin L, Papadopoulos G, et al. Cutting edge: Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 1998;161:1585-8.
- 16) Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AV. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 2000; 6:337-42.
- 17) Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 1992; 102:330-54.
- 18) Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115:551-63.
- 19) Godkin A, Jewell D. The pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115:206-10.
- 20) Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JH. Revised criteria for the diagnosis of celiac disease. Report of a working group. *Arch Dis Child* 1990; 65:909-11.
- 21) Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50:624-8.
- 22) Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105:910-22.
- 23) Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Ann Rev Immunol*. 2000; 18:53-81.
- 24) Vidales MC, Zubillaga P, Zubillaga I, Alfonso-Sanchez MA. Allele and haplotype frequencies for HLA class II (DQA1 and DQB1) loci in patients with celiac disease from Spain. *Hum Immunol* 2004; 65:352-8.
- 25) Catassi C, Fabiani E. The spectrum of coeliac disease in children. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1997; 11:485-507.
- 26) Corazza GR, Gasbarrini G. Celiac disease in adults. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1995; 9:329-50.
- 27) Kasarda DD, Okita TW, Bernardin JE. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of α -type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*). *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 1981:4712-6.
- 28) Troncone R, Greco L, Auricchio S. Gluten sensitive enteropathy. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43:355-73.
- 29) Page SR, Lloyd CA, Hill PG, Peacock I, Holmes GK. The prevalence of celiac disease in adult diabetes mellitus. *Q J Med* 1994; 87:631-7.
- 30) Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR, and the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP), and "Club del Tenue" Working groups on Coeliac disease. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 1998; 42:362-5.
- 31) Collin P, Reunala T, Pukkala E, Laippala P, Keyrilainen

- O, Pasternack A. Celiac disease: associated disorders and survival. *Gut* 1994; 35:1215-8.
- 32) Collin P, Salmi J, Haallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Autoimmune thyroid disorders and coeliac disease. *Eur J Endocrinol* 1994; 130:137-40.
 - 33) Komatireddy GR, Marshall JB, Aqel R, Spollen LE, Sharp GC. Association of systemic lupus erythematosus and gluten enteropathy. *South Med J* 1995; 88:673-6.
 - 34) Marai I, Shoenfeld Y, Bizzaro N, Villalta D, Doria A, Tonutti E, et al. IgA and IgG tissue transglutaminase antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13:241-4.
 - 35) Iltanen S, Collin P, Korpela M, Holm K, Partanen J, Polvi A, et al. Celiac disease and markers of celiac disease latency in patients with primary Sjögren's syndrome. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1042-6.
 - 36) Villalta D, Girolami D, Bidoli E, Bizzaro N, Tampoia M, Liguori M, et al. High prevalence of celiac disease in autoimmune hepatitis detected by anti-tissue transglutaminase autoantibodies. *J Clin Lab Anal* 2005; 19:6-10.
 - 37) Volta U, De Franceschi L, Molinaro N, Cassani F, Muratori L, Lenzi M, et al. Frequency and significance of anti-gliadin and anti-endomysial antibodies in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43:2190-5.
 - 38) Corazza GR, Andreani ML, Ventura N, Bernardi M, Tosti A, Gasbarrini G. Celiac disease and alopecia areata: report of a new association. *Gastroenterology* 1995; 109:1333-7.
 - 39) Hakanen M, Luotola K, Salmi J, Lappala P, Kaukinen K, Collin P. Clinical and subclinical autoimmune thyroid disease in adult celiac disease. *Dig Dis Sci* 2001; 46:2631-5.
 - 40) Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Doria A, Tampoia M, Bassetti D, et al. IgA and IgG transglutaminase antibody prevalence and clinical significance in connective tissue diseases, inflammatory bowel disease, and primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003; 48:2360-5.
 - 41) O'Leary C, Walsh CH, Wieneke P, O'Regan P, Buckley B, O'Halloran DJ, et al. Coeliac disease and autoimmune Addison's disease: a clinical pitfall. *Q J Med* 2002; 95:79-82.
 - 42) Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *J Pediatr* 2000; 137:263-5.
 - 43) Ventura A, Magazzù G, Greco L, for the SIGEP study group for autoimmune disorders in celiac disease. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1999; 117:297-303.
 - 44) Holmes GKT. Celiac disease and malignancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24:20-4.
 - 45) Holmes GKT. Non malignant complications of celiac disease. *Acta Pediatr* 1996; 412:68-75.
 - 46) Holmes GKT. Neurological and psychiatric complications in celiac disease. In: Gobbi G, Andermann F, Naccarato S, Banchini G. (eds). *Epilepsy and other neurological disorders in celiac disease*. London: John Libbey, 1997: 251-64.
 - 47) Sigurgeirsson B, Agnarsson BA, Lindelof B. Risk of lymphoma in patients with dermatitis herpetiformis. *Br Med J* 1994; 308:13-5.
 - 48) Sher KS, Mayberry JF. Female infertility, obstetric and gynecological history in celiac disease. A case control study. *Digestion* 1994; 55:243-6.
 - 49) Lewis HM, Reunala TL, Garioch JJ, Leonard JN, Fry JS, Collin P, et al. Protective effect of gluten-free diet against development of lymphoma in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1996; 135:363-7.
 - 50) Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al. The role of anti-tissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of celiac disease: a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56:389-93.
 - 51) Berger R, Schmidt G. Evaluation of six anti-gliadin antibody assays. *J Immunol Methods* 1996; 191:77-86.
 - 52) Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, Eisembarth GS, Bao F, Haas JE, et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr* 2003; 143:308-14.
 - 53) Lock RJ, Gilmour JE, Unsworth DJ. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies-the antibody trinity of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:258-62.
 - 54) Volta U, Molinaro M, de Franceschi L, Fratangelo D, Bianchi FB. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. Save both money and monkeys. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1902-5.
 - 55) Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR. IgG (1) antiendomysium and IgG anti-tissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue. *Gut* 2000; 47:366-9.
 - 56) Sblattero D, Florian F, Azzoni E, Zyla T, Park M, Baldas V, et al. The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments. *Eur J Biochem* 2002; 269:5175-81.
 - 57) Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. Disappearance of endomysial antibodies in treated celiac disease does not indicate histological recovery. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:712-4.
 - 58) Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115:1322-8.
 - 59) Lock RJ, Pitcher MCL, Unsworth DJ. IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol* 1999; 52:274-7.
 - 60) Collin P. New diagnostic findings in coeliac disease. *Ann Med* 1999; 31:399-405.
 - 61) Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminase. Multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissue. *FASEB J* 1991; 5:3071-7.
 - 62) Melino G, Piacentini M. "Tissue" transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector? *Febs Lett* 1998; 430:59-63.
 - 63) Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in

- assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res* 2000; 41:1-27.
- 64) Esposito C, Paparo F, Caputo I, Rossi M, Maglio M, Sblattero D, et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut* 2002; 51:177-81.
 - 65) Salmaso C, Ocmant A, Pesce G, Altrinetti V, Montagna P, Descalzi D, et al. Comparison of ELISA for tissue transglutaminase autoantibodies with antiendomysium antibodies in pediatric and adult patients with celiac disease. *Allergy* 2001; 56:544-7.
 - 66) Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, et al. Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1253-7.
 - 67) Bonamico M, Tiberti C, Picarelli A, Mariani P, Rossi D, Cipolletta E, et al. Radioimmunoassay to detect anti-transglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1536-40.
 - 68) Van Meensel B, Hiele M, Hoffman I, Vermeire S, Rutgeerts P, Geboes K, et al. Diagnostic accuracy of ten second-generation (human) tissue transglutaminase antibody assays in celiac disease. *Clin Chem* 2004; 50:2125-35.
 - 69) Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A, et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30:379-84.
 - 70) Martini S, Mengozzi G, Aimo G, Pagni R, Sategna-Guidetti C. Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody test using human antigen. *Clin Chem* 2001; 47:1722-5.
 - 71) 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.
 - 72) Wong RCW, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. *J Clin Pathol* 2002; 55:488-94.
 - 73) Baldas V, Not T, Tommasini A, Ansaldi F, Demarini S, Sblattero D, et al. Anti-transglutaminase antibodies and age. *Clin Chem* 2004; 50:1856-60.
 - 74) Dahele A, Kingstone K, Bode J, Anderson D, Ghosh S. Anti-endomysial antibody negative celiac disease: does additional serological testing help? *Dig Dis Sci* 2001; 46:214-21.
 - 75) Picarelli A, Di Tola M, Sabatella L, Mastracchio A, Trecca A, Gabrielli F, et al. Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in absence of selective IgA deficiency. *J Intern Med* 2001; 249:181-8.
 - 76) Villalta D, Crovatto M, Stella S, Tonutti E, Tozzoli R, Bizzaro N. False positive reactions for IgA and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies in liver cirrhosis are common and method-dependent. *Clin Chim Acta* 2005; 356:102-9.
 - 77) Trevisiol C, Ventura A, Baldas V, Tommasini A, Santon D, Martelossi S, et al. A reliable screening procedure for coeliac disease in clinical practice. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:679-84.
 - 78) Clemente MG, Musu MP, Troncone R, Volta U, Congia M, Ciacci C, et al. Enterocyte actin autoantibody detection: a new diagnostic tool in celiac disease diagnosis: results of a multicentre study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:1551-6.
 - 79) Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. HLA types in coeliac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on celiac disease. *Hum Immunol* 2003; 64:469-77.
 - 80) Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Mäki M, et al. HLA DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol* 1998; 59:169-75.
 - 81) Obermayer-Straub P, Strassburg C, Manns M. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 32:181-97.
 - 82) Boberg K, Spurkland A, Rocca G, Egeland T, Saarienen S, Mitchell S, et al. The HLA DR3, DQ2 heterozygous genotype is associated with an accelerated progression of primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:886-90.
 - 83) Obermayer-Straub P, Manns M. Autoimmune polyglandular syndromes. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1998; 12:293-315.
 - 84) Clerici N, Fernandez M, Saiz I, Polanco I. Human leukocyte antigen alleles and haplotypes associated with selective immunoglobulin A deficiency in Spanish paediatric patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16:381-6.
 - 85) Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, et al. HLA-DQ relative risk for celiac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004; 63:562-7.
 - 86) Scoglio R, Di Pasquale G, Pagano G, Lucanto MC, Magazzù G, Sferlazzas C. Is intestinal biopsy always needed for diagnosis of celiac disease? *Am J Gastroenterol* 2003; 98:1325-31.
 - 87) Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, Korponay-Szabó I, Sommer R, Schreier E, et al. Anti-endomysial and anti-human recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17:85-91.
 - 88) Hayat M, Cairns A, Dixon MF, O'Mahony S. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *J Clin Pathol* 2002; 55:393-4.
 - 89) Marsh MN, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1995; 9:273-93.
 - 90) Obberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:1185-94.
 - 91) Antonioli DA. Celiac disease: a progress report. *Mod Pathol* 2003; 16:342-6.
 - 92) Patey-Mariaud De Serre N, Cellier C, Jabri B, Dela-

- besse E, Verkarre V, Roche B, et al. Distinction between coeliac disease and refractory sprue: a simple immunohistochemical method. *Histopathology* 2000; 37:70-7.
- 93) Abdulkarim AS, Burgart LJ, See J, Murray JA. Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systematic approach. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2016-21.
- 94) Cellier C, Delabesse E, Helmer C, Patey N, Matuchansky C, Jabri B, et al. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Lancet* 2000; 356:203-8.
- 95) Cerf-Bensussan N, Brousse N, Cellier C. From hyperplasia to cell lymphoma. *Gut* 2002; 51:304-5.
- 96) Washington K, Stenzel TT, Buckley RH, Gottfried MR. Gastrointestinal pathology in patients with common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1240-52.
- 97) Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *JPGN* 2005; 40:1-19.
- 98) Korponay-Szabó IR, Dahlbom I, Laurila K, Koskinen S, Wooley N, Partanen J, et al. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for celiac disease in selective IgA deficiency. *Gut* 2003; 52:1567-71.
- 99) Granito A, Muratori L, Muratori P, Petrolini N, Bianchi FB, Volta U. Antitransglutaminase antibodies and giardiasis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2505-6.
- 100) Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Tampona M, Bassetti D, Tozzoli R. Association of celiac disease with connective tissue diseases and autoimmune diseases of the digestive tract. *Autoimmun Rev* 2003; 2:358-63.
- 101) Sinclair D, Duncan H. What happens to patients with positive tissue transglutaminase and endomysium antibody results in general practice? *J Clin Pathol* 2004; 57:943-5.
- 102) Collin P, Helin H, Mäki M, Hallstrom O, Karvonen AL. Follow-up of patients positive in reticulín and gliadin antibody tests with normal small bowel biopsy findings. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28:595-8.
- 103) Kaukinen K, Mäki M, Partanen J, Sievanen H, Collin P. Celiac disease without villous atrophy. Revision of criteria called for. *Dig Dis Sci* 2001; 46:879-87.
- 104) Abrams JA, Diamond B, Fotherdam H, Green PH. Seronegative celiac disease: increased prevalence with lesser degrees of villous atrophy. *Dig Dis Sci* 2004; 49:546-50.
- 105) Vahedi K, Mascart F, Mary JY, Laberenne JE, Bouhnik Y, Morin MC, et al. Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:1079-87.