



Università degli Studi di Cagliari
Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie
Dottorato di Ricerca in terapia pediatrica e farmacologia dello sviluppo

Meccanismi coinvolti nel danno della mucosa celiaca.
Determinazione nel siero dell'anticorpo anti-actina: un nuovo test
diagnostico nella diagnosi di atrofia intestinale nella malattia celiaca.

Dott.ssa Maria Paola Musu

Coordinatore

Prof. Stefano De Virgiliis

Tutore

Dott.ssa Maria Grazia Clemente

XIX ciclo - Anno accademico 2005/2006

INDICE

1. Introduzione	pag.1
1.1 La celiachia: definizione e cenni storici.	pag.1
1.2 Ezio-patogenesi	pag.3
1.3 Modificazioni istologiche	pag.4
1.4 Epidemiologia della malattia celiaca	pag.5
1.5 Manifestazioni cliniche	pag.7
2. Diagnosi di celiachia	pag.8
3. Test sierologici	pag.9
4. Carta di flusso per la diagnosi di celiachia	pag.14
5. Scopo dello studio	pag.15
6. Metodi 1	pag.15
6.1 Studio prospettico	pag.16
6.2 Studio retrospettivo	pag.16
6.3 Controlli	pag.16
7. Metodi 2	pag.17
7.1 Determinazione dell'AAA-IgA	pag.17
7.2 Valutazione Istologica	pag.18

7.3 Valutazione statistica	pag.19
7.4 Esperimenti di assorbimento	pag.19
8. Risultati	pag.20
8.1 Studio prospettico	pag.20
8.2 Studio retrospettivo	pag.24
8.3 Controlli	pag.24
9 Discussione	pag.25
- Bibliografia	pag.28

1. Introduzione

1.1 La celiachia: definizione e cenni storici.

La celiachia (CD) è un' enteropatia autoimmune causata dall'ingestione di alcuni cereali contenenti glutine, quali grano, orzo e segale, che colpisce soggetti geneticamente predisposti ed è caratterizzata da una alta variabilità delle manifestazioni cliniche e delle lesioni istologiche della mucosa duodenale.

Lungo è stato il cammino prima di arrivare a questa definizione. Nel 250 a. C. Areteo di Cappadocia definisce “koiliakos” colui che soffre agli intestini. Nel 1856 F. Adams traduce il termine in inglese e per la prima volta si parla di “celiachia”. E' solo nel 1888 che il pediatra inglese S. Gee distingue la celiachia come entità clinica descrivendone le principali caratteristiche¹. Nel 1950 venne chiarito il ruolo delle proteine del grano¹ e, infine, nel 1980 e negli anni seguenti fu fatta luce sui meccanismi eziopatogenetici^{2,3,4}.

In tabella 1 sono riassunte le varie tappe evolutive delle conoscenze sulla malattia celiaca.

Tabella 1: pietre miliari nelle nostre conoscenze sulla malattia celiaca

Prima dettagliata descrizione clinica di una "coeliac affection"	Gee	1888
Prima descrizione delle lesioni mucosali caratteristiche della CD	Benecke	1910
Impostazione di un trattamento dietetico risolutivo a base di frutta, vegetali e latte in polvere	Haas	1924-1932
Identificazione del frumento e dei cereali correlati quali trigger della CD	Dicke	1950
Identificazione del glutine come agente citotossico	van de Kamer et al.	1953
Atrofia dei villi e iperplasia delle cripte come lesioni patognomoniche della CD	Paulley	1954
CD del bambino e sprue non tropicale dell'adulto condividono la stessa patogenesi; utilizzo della capsula di Waston per la biopsia duodenale	Rubin et al.	1960
Associazione genetica della CD	McDonald et al.	1965
Associazione della dermatite erpetiforme con la CD	Marks et al.	1966
CD non trattata come fattore predisponente per lo sviluppo di linfoma intestinale	Harris et al.	1967
Associazione della CD con il deficit selettivo di IgA	Mawhinney e Tomkin	1971
La gliadina scatena il rilascio di citochine da campioni biopsici intestinali di pazienti celiaci	Ferguson et al.	1975
Stretta associazione della CD con il locus HLA-D	Howell et al.	1986
La CD è associata all'HLA-DQ2 codificati in cis o in trans dai geni DQA1*0501/DQB1*0201	Sollid et al.	1989
Linfociti T- $\gamma\delta$ intraepiteliali come marker specifico di CD	Spencer et al.	1992
Teoria della progressione del danno mucosale attraverso 5 fasi	Marsh	1992
Isolamento dalla mucosa intestinale di pazienti celiaci di linfociti T specifici per la gliadina HLA-DQ2-ristretti	Lundin	1993
Scoperta degli anticorpi anti-transglutamidasi	W. Dieterich	1997

1.2 Ezio-patogenesi

La celiachia è l'unica malattia autoimmune di cui si conosce l'agente responsabile: il glutine.

La patogenesi è multi fattoriale:

- a) si tratta di una patologia immunomediata;
- b) scatenata da fattori ambientali;
- c) presente in soggetti geneticamente predisposti.

In accordo con le attuali conoscenze sui meccanismi patogenetici della malattia celiaca, alcuni peptici del glutine sarebbero resistenti alla degradazione proteolitica da parte degli enzimi digestivi presenti nel lume intestinale. Questi peptici indigeriti riuscirebbero ad oltrepassare in maniera ancora non chiara la barriera epiteliale intestinale raggiungendo la lamina propria della mucosa. La transglutaminasi tessutale nella lamina propria della mucosa è in grado di deaminare il glutine o altre prolamine togliendo dei residui di diamine. In tal modo il glutine viene reso immunogeno e presentato dalle cellule dendritiche alle cellule T Cd4 innescando sia una reazione di tipo Th1 delle cellule epiteliali sia una reazione Th2 che induce la produzione di anticorpi contro il glutine da solo o complessato con la transglutaminasi⁹. Le reazioni di tipo Th1, tramite la produzione di specifiche citochine come l'IFN- γ e il TNF- α , sono responsabili del danno tessutale che causa le caratteristiche lesioni istologiche della mucosa duodenale celiaca.

Le reazioni di tipi Th2, tramite l'attivazione dei linfociti B in plasmacellule portano alla produzione di anticorpi di tipo IgA diretti contro la gliadina, l'endomisio e la transglutaminasi tessutale. Questi anticorpi pur non avendo un definito ruolo immunopatologico sono importantissimi ed universalmente utilizzati nell'iter diagnostico per la malattia celiaca.

Per quanto riguarda gli aspetti ambientali la componente tossica responsabile della reazione autoimmune è localizzata nell'endosperma, parte del seme da cui deriva la farina. Sono state identificate due componenti: le prolamine, etanolo-solubili e, le glutenine, etanolo-insolubili. La glutamina (35% degli AA della gliadina) è l'elemento scatenante e occupa un ruolo centrale nel determinare la tossicità. La sua completa deaminazione rimuove la tossicità che risulta invece accresciuta in caso di parziale deaminazione come avviene in seguito all'azione della transglutaminasi¹⁰.

Per quanto riguarda gli aspetti genetici, la malattia celiaca è strettamente correlata ai geni HLA⁵: nel Nord Europa è associata al gene DQ2 in linkage disequilibrium con il DR3, mentre nel Sud Europa in Israele e negli Usa, vi è una certa associazione anche con il gene DQ8 in linkage disequilibrium con il DR4. In famiglie dove sono presenti soggetti che condividono lo stesso pattern HLA la concordanza è presente nel 30-50% ed arriva al 70% nei gemelli monozigoti. Questo suggerisce l'esistenza di fattori genetici non-HLA ancora non noti nella "susceptibilità genetica" alla celiachia.

1.3 Modificazioni istologiche

La continua stimolazione dei linfociti T della lamina propria comporta una serie di modificazioni che vanno dalla infiltrazione linfocitaria alla iperplasia delle cripte della mucosa sino all'atrofia dei microvilli intestinali².

1.4 Epidemiologia della malattia celiaca

La prevalenza della malattia celiaca è altamente correlata ($r= 0.85$) alla frequenza dell'eterodimero HLA di predisposizione in una determinata popolazione. Tra gli Europei si stima colpisca in media 1 su 300 abitanti con valori che oscillano da 1:500 in Germania dove il DR3 è presente nel 7.7% della popolazione a 1:109 in Sardegna⁵. Anche negli USA, per i quali vecchie stime di prevalenza riportavano dati molto distanti da quelli Europei (circa 1:2000), si sta prendendo sempre più consapevolezza di questo disordine alimentare¹¹. In realtà, la prevalenza della CD varia, oltre che secondo i Paesi considerati, anche in relazione al metodo di rilevazione che viene adottato. Quando, infatti, si tiene conto del solo dato clinico si ottengono prevalenze dell'ordine di circa 1:300 in Svezia¹², 1:1000 in Italia¹³ e, addirittura, 1:10.000 negli USA¹⁴. Quando, invece, si compie uno screening ricercando i marcatori immunologici dell'autoreattività intestinale tipica della CD (anticorpi anti-glutine, anti-endomisio, anti-transglutaminasi) le prevalenze, anche in zone geograficamente distanti, acquistano una maggiore omogeneità: ad esempio, 1:190 in Svezia¹⁵, 1:184 in Italia¹⁶ e 1:250 negli USA¹⁷. Questa discrepanza indica che probabilmente i casi di celiachia manifesta rappresentano la punta di un *iceberg* (Figura 1) e che le forme di celiachia asintomatiche ma con lesioni della mucosa intestinale di grado variabile (forme “silenti”) o, addirittura, con sintomatologia assente e architettura dei villi normale (forme “latenti”) sarebbero molto più frequenti di quanto comunemente ritenuto.

Figura 1.



Differenze nell'epoca di esposizione al glutine potrebbero influenzare la presentazione clinica e spiegare la variabilità osservata in differenti popolazioni¹⁸. Una precoce introduzione del glutine, in paesi come la Svezia, si accompagnerebbe ad un numero superiore di casi con sindrome clinica manifesta e ad una diagnosi più precoce¹⁹. In altri paesi, come l'Italia, con l'introduzione ritardata del glutine, si avrebbe invece un numero elevato di individui con presentazione più tardiva, atipica e per questo con diagnosi più difficoltosa¹⁸.

1.5 Manifestazioni cliniche

In relazione all'alta variabilità clinica che caratterizza questa patologia la CD può manifestarsi in diverse modalità.:

- *Classica*, con sintomatologia prevalentemente intestinale: quindi con diarrea, acuta e cronica, vomito, arresto della crescita, distensione addominale, anoressia.
- *Atipica*, con sintomatologia prevalentemente extraintestinale : quindi con anemia, bassa statura, pubertà ritardata, epatite, rachitismo, artrite, afte orali ricorrenti.

Esistono inoltre forme silenti e forme latenti.

- *Silente*, nel caso in cui si giunga alla diagnosi istopatologica solo occasionalmente, a seguito di accertamenti sierologici effettuati per familiarità o per presenza di una o più patologie associate alla malattia celiaca, come il diabete mellito insulino dipendente o l'ipertiroidismo o la sindrome di Down.;
- *Latente*, che consiste nella positività dei marcatori sierologici di malattia con un quadro bioptico duodenale pressoché normale. Questi casi di CD latente devono essere seguiti nel tempo in quanto possono sviluppare, anche a distanza di anni, una tipica enteropatia celiaca.

2. Diagnosi di celiachia

L'iter diagnostico della CD ha subito diversi stravolgimenti nel corso del tempo, soprattutto in relazione all'avvento della sierologia, ma essenziale ai fini di una diagnosi definitiva rimane sempre la biopsia intestinale. Essa permette di rilevare le tipiche alterazioni istopatologiche della mucosa duodenale rappresentate da:

- a) totale o parziale atrofia dei villi con perdita dell'orletto a spazzola;
- b) ipertrofia delle cripte con un aumentato indice mitotico nelle cripte;
- c) aumentato numero dei linfociti intraepiteliali;
- d) infiltrazione nella lamina propria di plasmacellule, linfociti, eosinofili, mastcellule;
- e) perdita della polarità nucleare con pseudostratificazione delle cellule epiteliali.

I vecchi criteri diagnostici formulati dal 'ESPGHAN nel 1970 prevedevano l'esecuzione di tre biopsie intestinali:

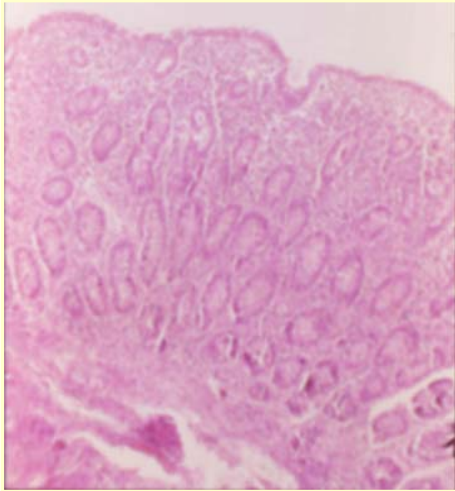
- a dieta libera;
- a dieta priva di glutine;
- dopo riesposizione al glutine.

Tali biopsie avevano lo scopo di confermare la glutine-dipendenza di:

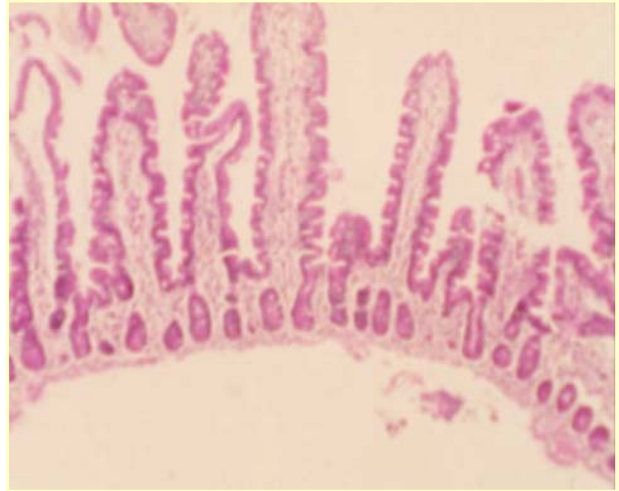
- lesioni intestinali;
- sintomatologia clinica.

Nel 1990, dopo la scoperta dei marcatori sierologici, l'ESPGHAN modificò tali criteri stabilendo che la diagnosi di CD poteva ritenersi attendibile se alla prima biopsia intestinale a dieta libera faceva seguito la completa remissione clinica a dieta priva di glutine e la normalizzazione dei tests sierologici. (Figura 2)

Celiachia alla diagnosi



Celiachia a dieta senza glutine



3. Tests sierologici

Rappresentano il primo passo verso la diagnosi di CD sia in caso di sospetto clinico sia di screening di celiachia. Nella pratica clinica corrente ci si avvale della ricerca di diversi markers sierologici. Essi sono rappresentati fondamentalmente dagli anticorpi IgA anti-endomisio (EMA) e IgA anti-trasglutaminasi tissutale (anti-TTG) aventi come bersaglio l'antigene TTG e degli anticorpi IgA e IgG anti-gliadina (AGA) rivolti invece contro l'antigene gliadina⁶⁷.

Nella tabella 2 sono indicati i valori approssimativi di sensibilità e specificità di questi tests.

Tabella 2:

TEST SIEROLOGICO	SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
IgA anti-endomisio	85-98%	97-100%
IgA anti-tTG	90-98%	94-97%
IgA anti-gliadina	75-90%	82-95%
IgG anti-gliadina	69-85%	73-90%

La variabilità di tali dati che sono stati ottenuti dai diversi laboratori dipendono dalla prevalenza della CD nelle popolazioni testate e dal grado di severità della malattia⁶⁷.

Anticorpi anti-gliadina (AGA) – sono rivolto contro l'antigene α -gliadina, comprendono tutte le classi immunologiche presenti nel siero, nella saliva e nel succo-gastrointestinale, quelle che hanno significato diagnostico sono le IgA. Fanno eccezione i soggetti con deficit di IgA e i bambini al di sotto dei due anni nei quali, per la momentanea carenza maturativa nella sintesi della immunoglobuline, vengono ricercati anticorpi della classe IgG. Gli anticorpi IgA sono i primi a comparire e sono presenti nella fase attiva della malattia. La loro ricerca viene effettuata in prima istanza per la diagnosi della CD e anche nel monitoraggio della dieta priva di glutine. Sfortunatamente, questi tests hanno solo modeste sensibilità e specificità^{67,68,69,70}. La sensibilità delle AGA di classe IgA è lievemente superiore a quella degli AGA di classe IgG. In molte cliniche si testano

entrambe le classi di AGA (IgA e IgG), approccio questo che porta ad un piccolo incremento nella sensibilità ma riduce ulteriormente la specificità. Per rilevare gli AGA sierici sono disponibili metodiche ELISA che utilizzano gliadina purificata. I risultati dei tests degli AGA vengono riportati come titolo; un titolo elevato è più specifico che un titolo basso⁷⁰. Gli AGA-IgA sono molto sensibili alla presenza di glutine nella dieta scomparendo rapidamente dal siero con l'inizio della dieta senza glutine e riapparendo immediatamente quando si riprende una dieta con glutine. Per questa caratteristica il dosaggio del titolo degli AGA-IgA rappresenta ancora oggi il test più utile e pratico per monitorizzare l'andamento della dieta senza glutine.

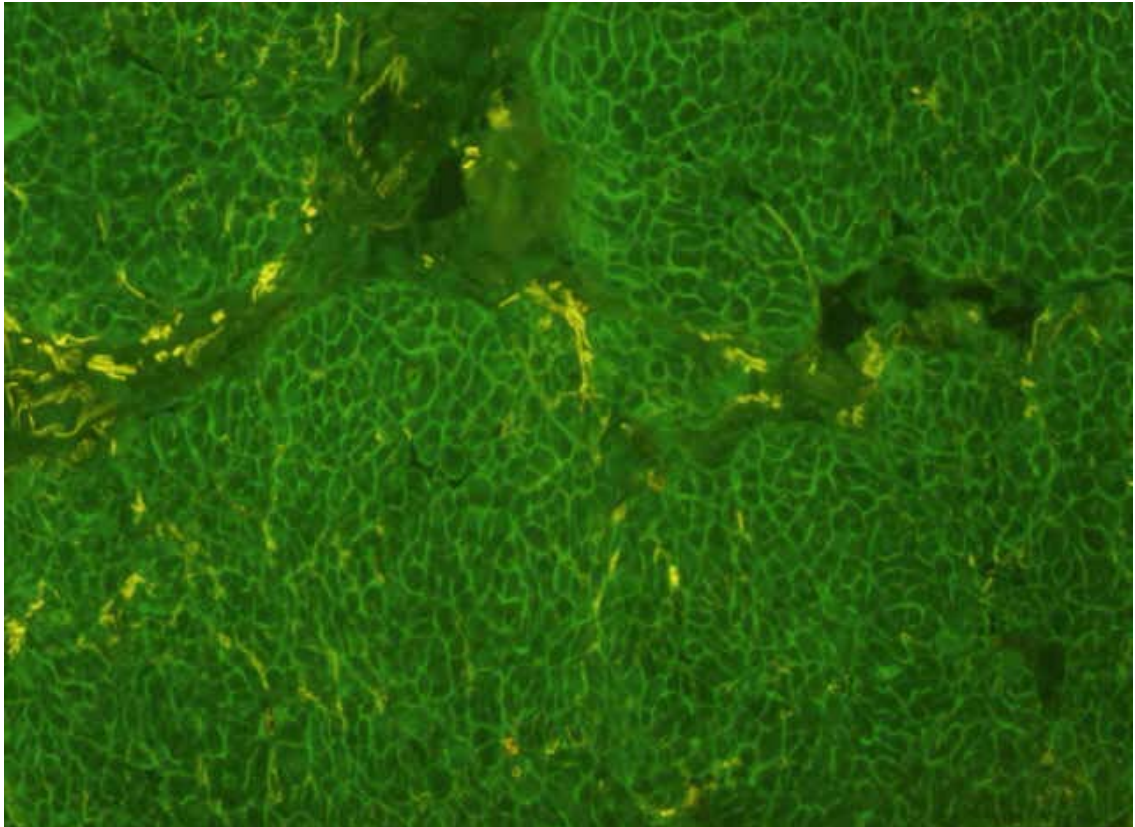
In condizioni normali infatti il titolo serico degli AGA-IgA declina immediatamente dopo l'inizio di una dieta senza glutine fino a negativizzarsi totalmente nel 60% dei celiaci dopo 3 mesi e nel 90% dopo sei mesi di dieta senza glutine. Per gli AGA-IgG occorre un tempo più lungo che va dai dodici ai diciotto mesi.

Anticorpi anti-endomisio (EMA) – Sono autoanticorpi rivolti contro l'endomisio, ovvero contro il rivestimento di fibre reticolari che circondano le cellule muscolari^{67,72}. La produzione degli EMA, è legata, nei celiaci in fase conclamata, alla presenza del glutine nella dieta. L'allontanamento dalla dieta di quest'ultimo porta alla negativizzazione degli EMA in circa sei-dodici mesi⁷⁴. Per questo motivo la ricerca degli EMA viene utilizzata più nella diagnosi che nel monitoraggio dei pazienti in dieta priva di glutine.

Per testare la presenza di questi anticorpi si utilizza il metodo IFA su sezioni del terzo inferiore di esofago di scimmia (figura 3), di cordone ombelicale umano, e di digiuno di scimmia. Il risultato del test viene

riportato semplicemente come positivo o negativo, in quanto persino un basso titolo di EMA-IgA sierico è altamente specifico per la CD. Gli EMA-IgA hanno, nella CD non trattata, una sensibilità del 90% o superiore e una specificità molto vicina al 100%^{67,72,73}.

Figura 3: campione positivo



Anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (TTG) – L'epitopo contro cui sono rivolti gli EMA è stato identificato nella TTG⁷⁵. La ricerca delle IgA anti-TTG si è dimostrata altamente sensibile e specifica per la diagnosi di CD^{76,77}. In un recente studio, gli anticorpi anti-TTG sono presenti nel 98% dei pazienti con biopsia intestinale diagnostica di CD e nel 5% dei controlli⁷⁷. Un altro studio, che include 136 pazienti celiaci e 207 controlli, riporta valori di sensibilità e specificità di tali anticorpi pari rispettivamente, al 95% e al 94%⁷⁶. Attualmente la ricerca degli anticorpi anti-TTG viene effettuata mediante la metodica ELISA (Enzime-Linked

ImmunoSorbent Assay), utilizzando come proteina antigenica la TTG umana al posto della guinea pig (gp-TTG) utilizzata in passato. Questo perché come dimostra un nostro studio i dati forniti dalla gp-TTG davano risultati di specificità e sensibilità controversi⁷⁸.

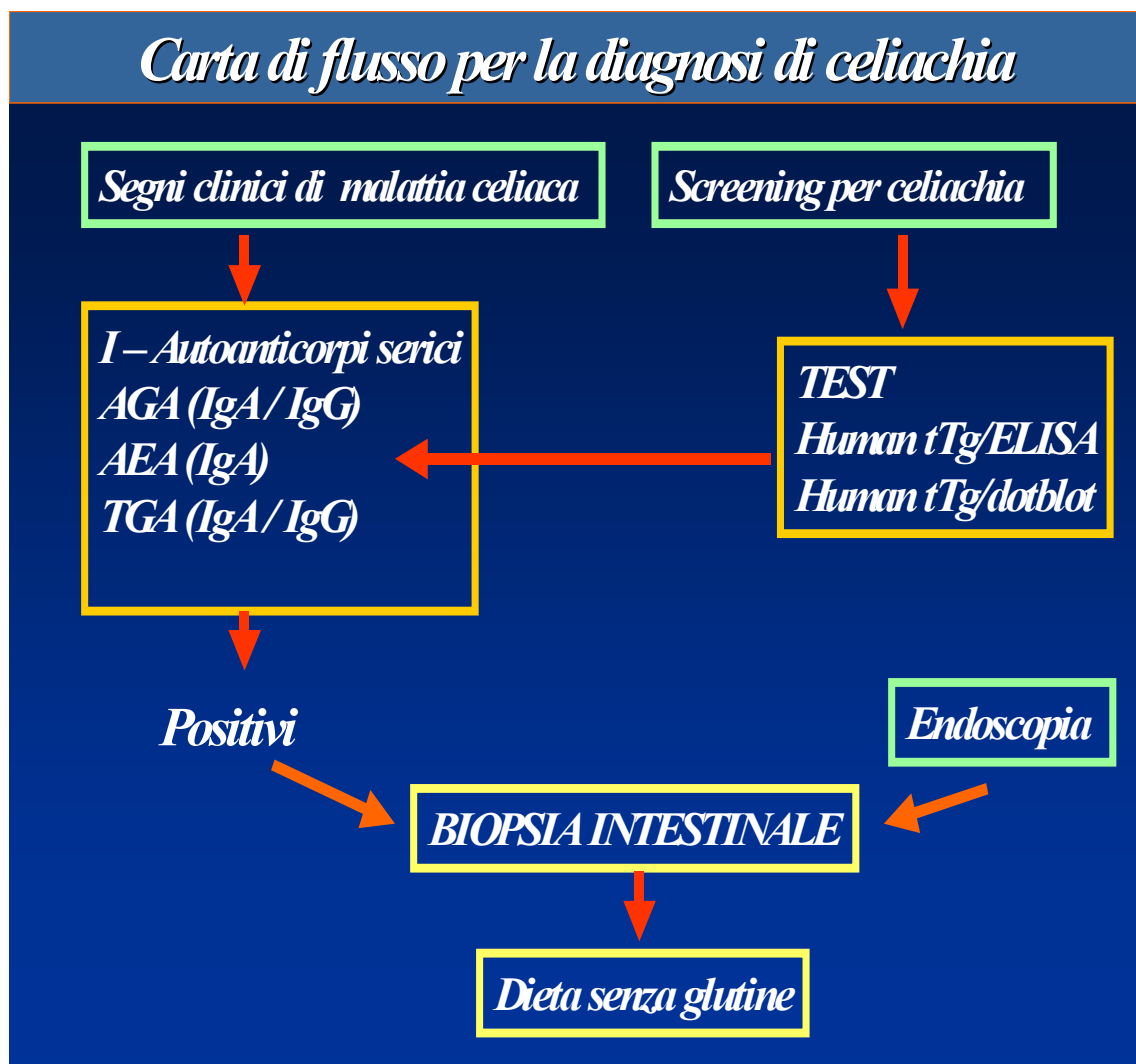
La metodica ELISA è di più facile esecuzione rispetto alle metodiche di immunofluorescenza utilizzate per rilevare le IgA EMA.

Nella tabella 3 vengono schematicamente illustrati vantaggi e limiti dei markers sierologici appena descritti.

Tabella3: DIAGNOSI DI CELIACHIA	
Vantaggi e limiti dei marcatori sierologici	
VANTAGGI	LIMITI
<ul style="list-style-type: none"> • AGA - Monitoraggio terapia • EMA - Alta sensibilità - Alta specificità • TTG - Facile esecuzione - Alta sensibilità - Alta specificità - Monitoraggio terapia 	<ul style="list-style-type: none"> • AGA - Bassa sensibilità • EMA - Difetto di IgA - età < 2 anni - Difficile interpretazione • TTG - Tipo di preparazione commerciale

4. Carta di flusso per la diagnosi di celiachia

La carta di flusso che viene oggi seguita per la diagnosi di malattia celiaca prevede l'esecuzione dei test sierologici in tutti i pazienti che presentino segni clinici di malattia celiaca o in corso di screening per celiachia. La positività per i test sierologici è indicativa per l'esecuzione della biopsia intestinale. Occasionalmente la biopsia intestinale viene eseguita prima dei test sierologici in corso di esame gastroduodenoscopico. A questo punto se la biopsia risulta positiva il paziente viene messo a dieta senza glutine per tutta la vita.(figura 4)



5. Scopo dello studio

Le attuali metodiche sierologiche consentono solamente di avere un sospetto diagnostico di malattia celiaca e costituiscono l'indicazione ad eseguire una biopsia intestinale per una conferma diagnostica definitiva.

Abbiamo così cercato di disporre di un marcatore sierologico di lesione intestinale da glutine offrendo così la possibilità di evitare un esame invasivo strumentale come la biopsia intestinale e di ridurre gli errori diagnostici legati alle difficoltà che possono esserci nella interpretazione delle lesioni istologiche. Così abbiamo effettuato un primo studio in cui dimostravamo la presenza di anticorpi serici anti-F actina (AAA-IgA) nella celiachia⁷⁹. Questa positività risulta correlata con la presenza di atrofia dei villi intestinali in pazienti affetti da malattia celiaca. Abbiamo così continuato includendo nel nostro studio un numero maggiore di pazienti celiaci per rendere ancora più veritiera la presenza di questi anticorpi e modificando la metodica per aumentare la sensibilità in quanto nel primo studio circa il 20% dei pazienti venivano perduti. Per questo abbiamo condotto uno studio in doppio cieco che ha coinvolto nove centri italiani di gastroenterologia (sei dei quali pediatrici) e un centro americano (Centro di Ricerca per la Malattia Celiaca di Baltimora, Maryland USA).

6. Metodi 1

I requisiti per l'inserimento nello studio sono stati la positività sierologia per gli EMA e/o TTG e la diagnosi istologica di malattia celiaca con il grado di atrofia dei villi della mucosa intestinale.

Per condurre lo studio in doppio cieco al nostro laboratorio di Cagliari è stato inviato il campione di siero per la determinazione degli AAA-IgA, mentre al dipartimento di Napoli è stata inviata la valutazione istologica del grado di atrofia dei villi intestinali.

Sono stati studiati 307 pazienti celiaci di cui 223 prospettivamente e 84 retrospettivamente. Come controlli 78 pazienti con sierologia negativa per la celiachia, in cui la diagnosi di celiachia è stata esclusa anche per l'assenza delle caratteristiche lesioni istologiche alla biopsia intestinale.

6.1 Studio prospettico

Sono stati collezionati in totale 223 celiaci, 104 adulti (età media $33,4 \pm 11,8$ anni, con un range di 18-70) e 119 bambini (età media $6,2 \pm 4,3$ anni, con un range di 9 mesi – 17,6 anni) da 7 (3 dei quali pediatrici) dei 10 centri che hanno partecipato allo studio.

6.2 Studio retrospettivo

Sono stati analizzati 84 campioni di siero di pazienti celiaci provenienti da 3 ulteriori centri pediatrici.

6.3 Controlli

Sono stati presi in considerazione 78 soggetti che erano stati sottoposti ad endoscopia digestiva e biopsie del piccolo intestino per la persistenza di significativi sintomi gastrointestinali. Tutti questi controlli avevano sierologia negativa sia per gli EMA che per TTG. Inoltre sono stati presi in considerazione 2000 campioni di siero provenienti da pazienti non

sottoposti a biopsia. Questi erano soggetti sani che erano stati sottoposti a tests sierologici di screening e nei quali la diagnosi di malattia celiaca era stata esclusa.

7. Metodi 2

7.1 Determinazione dell'AAA-IgA tramite immunofluorescenza indiretta (IF).

a) Colture cellulari con substrato cellule IEC6.

Cellule intestinali epiteliali di ratto (ATCC CRL-1592, American Type Culture Collection, Massassas, VA, USA), sono state fatte crescere in fiasche per colture cellulari a 37°C in un'atmosfera composta dal 95% di aria e 5% di anidride carbonica. Il medium di crescita è costituito da un Dulbecco modificato da Eagle (Life technologies Ltd, Paisley, Scotland) contenente 4,500mg/l di d-glucosio, idrocloridrato di piridossina, 5% di siero fetale bovino, 0,1 U/ml di insulina bovina, 4 mM di L-glutamina, 50 U/ml di penicillina e 50 mcg/ml di streptomina (Life Technologies Ltd).

b) Colture cellulari con substrato cellule IEC6 su vetrini a pozzetti multipli in presenza di colchicina.

Dopo un certo numero di cicli di crescita nelle fiasche, le cellule vengono staccate dal fondo (in quanto crescono in monostrato) utilizzando per 2-3 minuti una soluzione di tripsina (0,25%) ed EDTA (1mM) (Life Technologies Ltd).

A questo punto le cellule (2×10^4 cellule/ml) vengono risospese nel medium e poi seminate nei vetrini a pozzetti multipli (ICN, Aurora, OH, USA) alla concentrazione finale di 0,1 mM per 2 ore di incubazione.

c) Metodica di immunofluorescenza.

I vetrini con le cellule IEC6 sono stati lavati tre volte in PBS, fissati in paraformaldeide al 2% per 20 minuti a temperatura ambiente, lavati tre volte e permeabilizzati con Triton-X 100 allo 0,5% per 15 minuti a temperatura ambiente. Sono stati fatti altri tre lavaggi in PBS e le cellule sono state incubate con il siero del paziente diluito in PBS/BSA al 1% per $\frac{1}{2}$ ora in una camera umida a temperatura ambiente (diluizioni seriali da 1:5 a 1:1280).

Dopo altri tre lavaggi in PBS le cellule sono state incubate per $\frac{1}{2}$ ora al buio in una camera umida con il siero anti IgA umane coniugato con fluorescina (BioRad, Marnes-La-Coquette, France), diluito 1:100 in PBS/BSA al 1%. E' stato fatto un lavaggio e poi le cellule sono state incubate 10minuti in una soluzione PBS con Evans blue e dopo lavate altre due volte in PBS. I vetrini copri-oggetto sono stati montati usando una soluzione di glicerolo /PBS al 50% e i risultati sono stati osservati al microscopio a fluorescenza (Olympus). Il titolo delle AAA-IgA è stato considerato come il punto finale diluizione dei sieri positivi per AAA ottenuta con diluizioni seriali da 1:5 a 1:1280.

7.2 Valutazione istologica

L'istopatologia della mucosa intestinale è stata valutata, in accordo con la classificazione di Marsh modificata come segue: enterite linfocitaria (I

grado), enterite linfocitaria con iperplasia della cripte (II grado) e atrofia dei villi, suddivisa in atrofia parziale dei villi (III A), atrofia subtotale dei villi (III B) e totale atrofia dei villi o mucosa piatta (III C).

7.3 Valutazione statistica

Le correlazioni sono state misurate usando il coefficiente di correlazione (rs) di Spearman e il test statistico di Goodmann-Kruskal. Il rischio relativo (RR) è stato calcolato col metodo Mantel. I tests sono stati considerati significativi se $p < 0,05$. Il valore predittivo positivo (PPV) e il valore predittivo negativo (NPV) sono stati definiti come segue: veri positivi/numero totale di tests positivi (PPV), e veri negativi/numero totale di tests negativi (NPV).

7.4 Esperimenti di assorbimento

Per investigare se le cellule IEC6 esprimono la TTG in vitro, esperimenti di IF sono stati eseguiti come sopra usando come primo anticorpo un monoclonale anti-TTG (Neo Markers, Union City, California, USA) ad una diluizione di 1:50 nella prima incubazione, poi nella seconda incubazione usando in antimouse coniugato con fluoresceina anti-IgG alla diluizione di 1:100 con PBS.

8. Risultati

8.1 Studio prospettico

Sono risultati positivi per AAA-IgA (titolo da 1:5 a >1:1280) 184 dei 223 (82,5%) soggetti positivi per EMA e/o TTG. L'AAA-IgA è stata trovata in 89 dei 104 adulti (85,5%), ed in 95 dei 119 bambini (79,8%).

Figura 5a

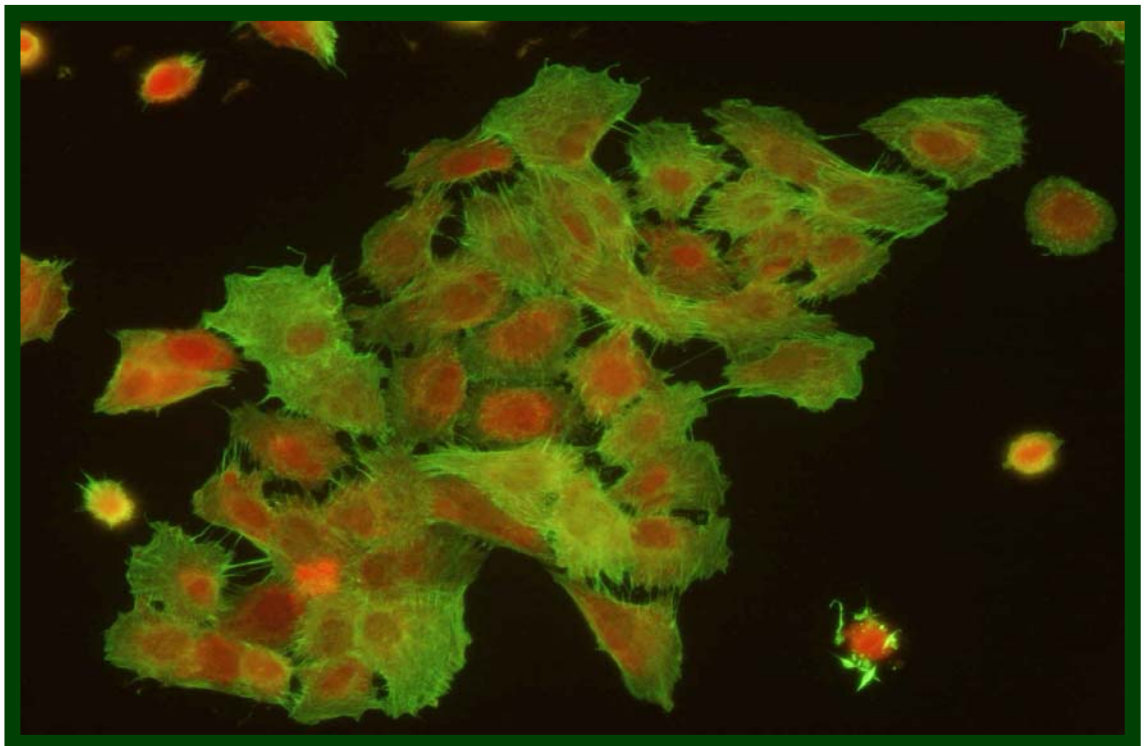


Figura 5b

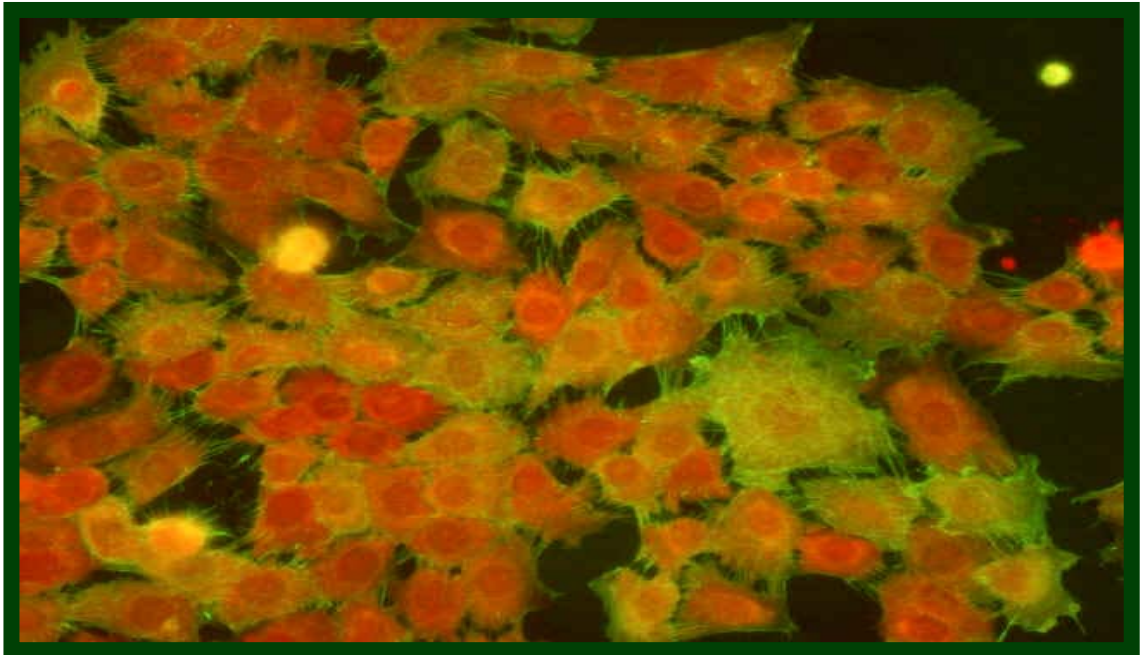
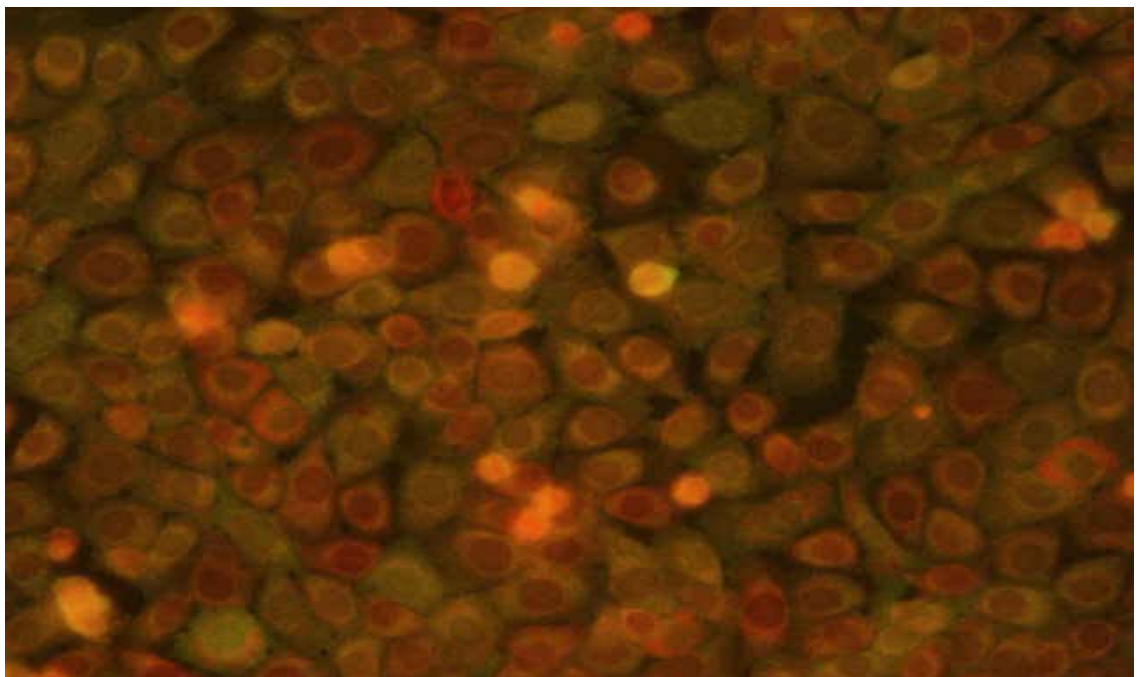


Figura 5c



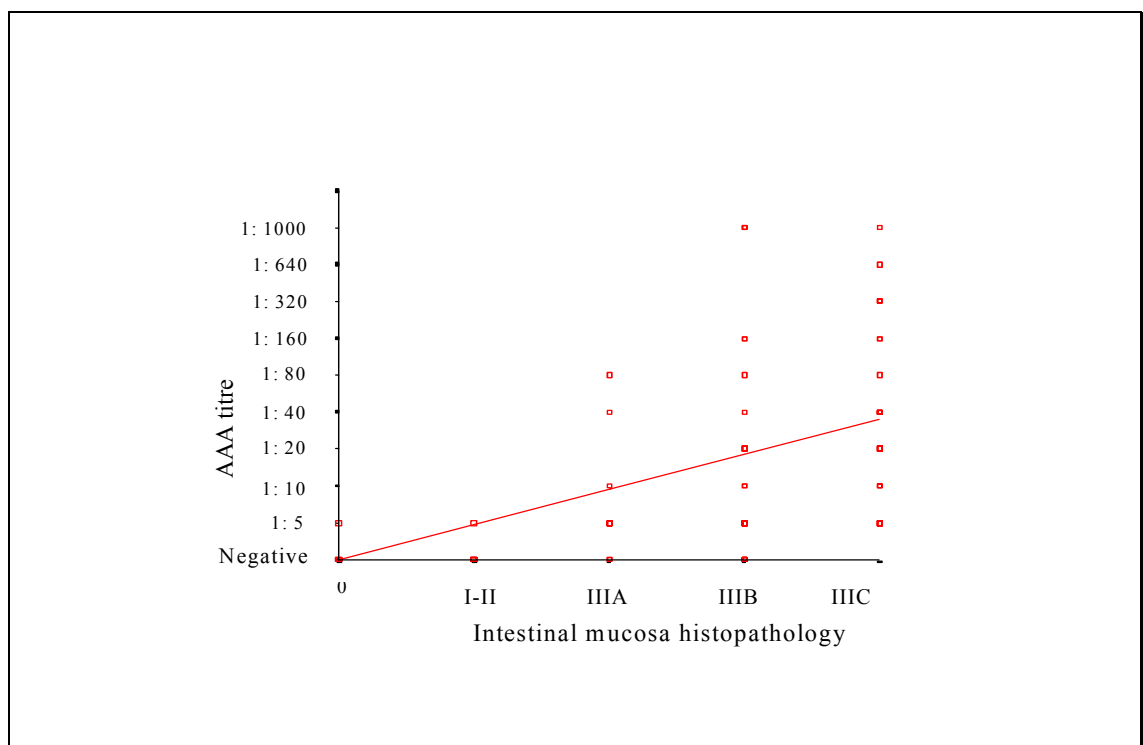
Nelle figure 5a-b si vede la distribuzione dei filamenti dentro le cellule intestinali epiteliali, o come filamenti paralleli intracellulari o come filamenti tra cellula e cellula. La specificità dell'antigene è confermata dagli esperimenti di assorbimento, come si vede nelle figura 5c il pattern positivo in immunofluorescenza per AAA-IgA scompare completamente dopo assorbimento con actina, mentre rimane stabile dopo assorbimento con TTG. Per di più usando l'anticorpo monoclonale anti-TTG negli esperimenti di immunofluorescenza nessun segnale positivo veniva fuori. Tutti i pazienti con positività per AAA-IgA sono stati tenuti sotto controllo durante il follow-up e, si è visto che questi anticorpi scomparivano nel giro di sei mesi dall'inizio della dieta senza glutine. Tre dei 78 pazienti non celiaci sono risultati positivi per AAA-IgA ma a basso titolo (1:5). La diagnosi di celiachia è stata esclusa dalla negatività dei test sierologici (EMA, TTG) e dalla biopsia intestinale normale.

Quando siamo andati a controllare i gradi di atrofia della mucosa intestinale con la positività per gli AAA-IgA, abbiamo visto che erano positivi 115 su 117 (98,2%) pazienti con atrofia totale, 57 dei 64 (89%) pazienti con atrofia subtotale, 11 dei 37 pazienti con atrofia parziale e 1 su 5 dei pazienti con architettura dei villi normale e, 3 dei 78 controlli biopsiati.

Tabella 4: risultati complessivi sulla positività per IgA-AAA nei pazienti celiaci e nei controlli in rapporto al grado di lesione istologica.

Grado istologico di lesione	0	I-II	IIIA	IIIB	IIIC
Test sierologici ⇒ (EMA e/o TGA)	Negativi	Positivi	Positivi	Positivi	Positivi
Studio prospettivo	3/75 4%	1/5 20%	11/37 30%	57/64 89%	115/117 98.2%
Studio retrospettivo		1/5 20%	2/12 16.6%	17/41 41.4%	16/26 61.5%

La positività per le AAA-IgA (range di titolazione da 1:5 fino a > 1:1280) è risultato altamente correlato al grado di IVA ($p < 0,000$), con un PPV del 99,4% e un NPV dell'87,5% (figura 6).



Una correlazione significativa (r_s 0,56, $p < 0,0001$) è stata trovata tra il titolo del siero AAA-IgA e il grado di atrofia. Tutti i celiaci con titolo $> 1:5$ avevano un grado di atrofia parziale (III A), mentre quelli con titolo $> 1:80$ avevano un grado di atrofia severo (III B -C).

8.2 Studio retrospettivo

In confronto ai risultati ottenuti con lo studio prospettico, in questo studio la positività per gli AAA-IgA è stata trovata ma a più basso titolo. Tuttavia una correlazione significativa ($p=0.005$) tra positività per AAA-IgA e istopatologia della mucosa intestinale è stata osservata anche in questo studio retrospettivo, infatti sono risultati positivi 16 dei 26 (61,5%) pazienti con atrofia totale (III C), 17 dei 41 (41,4%) pazienti con atrofia subtotale (III B), 2 dei 12 (16,6%) pazienti con parziale atrofia (III A) e, 1 dei 5 (20%) pazienti con sierologia positiva ma biopsia negativa.

8.3 Controlli

Nessuno dei 2000 pazienti con sierologia negativa e biopsia non eseguita è risultato positivo.

9 Discussione

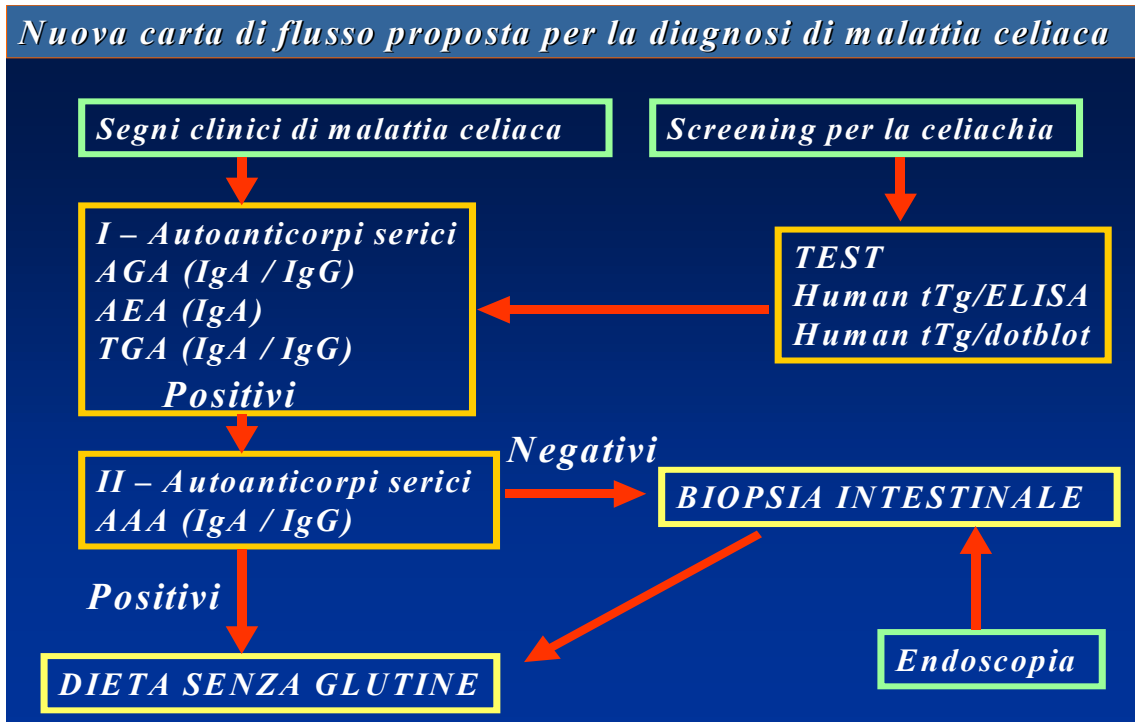
Sebbene la diagnosi di celiachia può essere sospettata dai dati clinici o laboratoristici come risultato dei test sierologici, all'istologia della mucosa di piccolo intestino rimane l'ultima parola. La biopsia intestinale rimane però un esame strumentale invasivo ed inoltre non sempre si riesce ad interpretare correttamente le lesioni intestinali o per il non corretto orientamento del tessuto endoscopico o per l'esiguità del frammento bioptico o perché la lesione intestinale non è uniformemente distribuita.

Per questi motivi la positività degli EMA e TTG è stata valutata per stabilire una correlazione tra la loro presenza e le lesioni intestinali della mucosa del piccolo intestino. Tuttavia questi test sierologici sono costantemente positivi, ricoprendo l'ampio spettro clinico ed istologico della malattia celiaca, includendo pazienti sintomatici, quadri silenti e forme latenti o potenziali di malattia celiaca ed indipendentemente dall'aspetto istologico della mucosa del piccolo intestino.

Il risultato di questo studio multicentrico mostra che la positività dell'AAA-IgA è chiaramente correlata con i gradi più severi di atrofia dei villi intestinali in un largo numero di pazienti celiaci. Inoltre il cambiamento del metodo con l'introduzione di cellule epiteliali normali di piccolo intestino al posto delle cellule epiteliali di carcinoma laringeo così come l'aggiunta di una fase dell'incubazione con colchicina ha significativamente migliorato la sensibilità del test per la determinazione delle AAA-IgA in immunofluorescenza. Infatti le cellule intestinali sono quelle responsabili *in vivo* della produzione di AAA-IgA, mentre con l'induzione della polimerizzazione dell'actina, la colchicina aumenta la quantità disponibile di antigene e permette la determinazione di AAA-IgA a titoli più bassi.

E' risultato molto interessante il fatto che sono risultati positivi non solo i pazienti celiaci (95%) con atrofia subtotale o totale dei villi intestinali, ma anche il 30% dei pazienti con atrofia parziale e 2 dei 10 pazienti con sierologia positiva ma biopsia normale. Questi soggetti hanno risposto con successo alla dieta priva di glutine, quindi abbiamo sospettato che essi avessero una distribuzione a macchia di leopardo delle lesioni della mucosa intestinale non individuate dai prelievi biotici intestinali. Se questo è vero la positività per gli AAA-IgA potrebbe essere indicativa di una distribuzione non omogenea delle lesioni intestinali e potrebbe rappresentare uno strumento utile in tutti quei casi con sintomi clinici classici e sierologia positiva ma biopsia normale. Un altro dato interessante di questo studio è stato trovare che a più alto titolo anticorpale corrispondeva un alto grado di atrofia intestinale. Il PPV è risultato molto alto con range dal 99,4 al 100% in base al cut-off utilizzato. Con un cut-off di diluizione 1:5 del siero la correlazione è maggiore del 95% nei pazienti con EMA e/o TTG positivi. Quindi a tutti questi pazienti verrebbe evitata la biopsia intestinale mentre resterebbe da eseguirla solo al restante 5%. Quindi in conclusione noi proponiamo una nuova carta di flusso per la diagnosi di malattia celiachia con l'introduzione della determinazione del nuovo anticorpo AAA-IgA.

Figura 7



Bibliografia

1. Van Berge-Henegouwen GP, Mulder CJ. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut*. 1993; 34(11):1473-5.
2. Paulley JW. Determinants of adult celiac disease. *N Engl J Med*. 1971 Apr 15;284(15):916. **Vedi Bibliografie anni 50**
3. Mc Neish AS, Harms HK, Rey J, Shmerling DH, Visakorpi JK, Walker-Smith JA.. The diagnosis of coeliac disease. A commentary on the current practices of members of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). *Arch Dis Child*. 1979 Oct;54(10):783-6.
4. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909-11.
5. Tosi R, Vismara D, Tanigaki N, Ferrara GB, Cicimarra F, Buffolano W, Follo D, Auricchio S. Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clin Immunol Immunopathol*. 1983 Sep;28(3):395-404.
6. Ellis HJ, Pollock EL, Engel W, Fraser JS, Rosen-Bronson S, Wieser H, Ciclitira PJ. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut*. 2003 Feb;52(2):212-7.
7. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;420:325-34.
8. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):797-801.
9. Molberg O, Mcadam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjostrom H, Sollid LM. Tissue transglutaminase selectively modifies

- gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*. 1998 Jun;4(6):713-7. Erratum in: *Nat Med* 1998 Aug;4(8):974.
10. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002 Sep 27;297(5590):2275-9.
 11. Trier J.S. Celiac sprue. *N Engl J Med*, **325**, 1709 ;(1991)
 12. Ascher H., Krantz I. & Kristiansson B. (1991) Increasing incidence of coeliac disease in Sweden. *Arch Dis Child*, **66**, 608.
 13. Auricchio S., Greco L. & Troncone R. (1988) Gluten-sensitive enteropathy in childhood. *Pediatr Clin North Am*, **35**, 157.
 14. Fasano A. (1996) Where have all the American celiacs gone? *Acta Paediatr Suppl*, **412**, 20.
 15. Ivarsson A., Persson L.A., Juto P., Peltonen M., Suhr O. & Hernell O. (1999) High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults: a Swedish population-based study. *J Intern Med*, **245**, 63.
 16. Catassi C., Fabiani E., Ratsch I.M., Coppa G.V., Giorgi P.L., Pierdomenico R., Alessandrini S., Iwanejko G., Domenici R., Mei E., Miano A., Marani M., Bottaro G., Spina M., Dotti M., Montanelli A., Barbato M., Viola F., Lazzari R., Vallini M., Guariso G., Plebani M., Cataldo F., Traverso G., Ventura A. & et al. (1996) The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl*, **412**, 29.

17. Not T., Horvath K., Hill I.D., Partanen J., Hammed A., Magazzu G. & Fasano A. (1998) Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol*, **33**, 494.
18. Challacombe D.N., Mecrow I.K., Elliott K., Clarke F.J. & Wheeler E.E. (1997) Changing infant feeding practices and declining incidence of coeliac disease in West Somerset. *Arch Dis Child*, **77**, 206.
19. Weile B., Cavell B., Nivenius K. & Krasilnikoff P.A. (1995) Striking differences in the incidence of childhood celiac disease between Denmark and Sweden: a plausible explanation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **21**, 64.
20. Meloni G., Dore A., Fanciulli G., Tanda F. & Bottazzo G.F. (1999) Subclinical coeliac disease in schoolchildren from northern Sardinia. *Lancet*, **353**, 37.
21. Songini M., Bernardinelli L., Clayton D., Montomoli C., Pascutto C., Ghislandi M., Fadda D. & Bottazzo G.F. (1998) The Sardinian IDDM study: 1. Epidemiology and geographical distribution of IDDM in Sardinia during 1989 to 1994. *Diabetologia*, **41**, 221
22. Coraddu F., Sawcer S., D'Alfonso S., Lai M., Hensiek A., Solla E., Broadley S., Mancosu C., Pugliatti M., Marrosu M.G. & Compston A. (2001) A genome screen for multiple sclerosis in Sardinian multiplex families. *Eur J Hum Genet*, **9**, 621.
23. Cucca F., Lampis R., Frau F., Macis D., Angius E., Masile P., Chessa M., Frongia P., Silveti M., Cao A. & et al. (1995) The distribution of DR4 haplotypes in Sardinia suggests a primary association of type I diabetes with DRB1 and DQB1 loci. *Hum Immunol*, **43**, 301.

24. Damen G.M., Boersma B., Wit J.M. & Heymans H.S. (1994) Catch-up growth in 60 children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **19**, 394
25. Ansaldi N., Tavassoli K., Dell'Olio D., Bramante L., Faussone D., Balocco L. & Oderda G. (1991) [Clinical data on celiac disease with an early or late onset]. *Minerva Pediatr*, **43**, 377
26. Ascher H., Krantz I., Rydberg L., Nordin P. & Kristiansson B. (1997) Influence of infant feeding and gluten intake on coeliac disease. *Arch Dis Child*, **76**, 113.
27. Vuoristo M. & Miettinen T.A. (1987) The role of fat and bile acid malabsorption in diarrhoea of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, **22**, 289
28. Rhodes R.A., Tai H.H. & Chey W.Y. (1978) Impairment of secretin release in celiac sprue. *Am J Dig Dis*, **23**, 833.
29. Maton P.N., Selden A.C., Fitzpatrick M.L. & Chadwick V.S. (1985) Defective gallbladder emptying and cholecystokinin release in celiac disease. Reversal by gluten-free diet. *Gastroenterology*, **88**, 391.
30. Beaumont D.M. & Mian M.S. (1998) Coeliac disease in old age: 'a catch in the rye'. *Age Ageing*, **27**, 535.
31. Corrao G., Corazza G.R., Bagnardi V., Brusco G., Ciacci C., Cottone M., Sategna Guidetti C., Usai P., Cesari P., Pelli M.A., Loperfido S., Volta U., Calabro A. & Certo M. (2001) Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet*, **358**, 356
32. O'Grady J.G., Stevens F.M., Harding B., O'Gorman T.A., McNicholl B. & McCarthy C.F. (1984) Hyposplenism and gluten-sensitive enteropathy. Natural

history, incidence, and relationship to diet and small bowel morphology.
Gastroenterology, **87**, 1326

33. Kemppainen T., Kroger H., Janatuinen E., Arnala I., Kosma V.M., Pikkarainen P., Julkunen R., Jurvelin J., Alhava E. & Uusitupa M. (1999) Osteoporosis in adult patients with celiac disease. *Bone*, **24**, 249.
34. Cellier C., Flobert C., Cormier C., Roux C. & Schmitz J. (2000) Severe osteopenia in symptom-free adults with a childhood diagnosis of coeliac disease. *Lancet*, **355**, 806.
35. Vasquez H., Mazure R., Gonzalez D., Flores D., Pedreira S., Niveloni S., Smecuol E., Maurino E. & Bai J.C. (2000) Risk of fractures in celiac disease patients: a cross-sectional, case-control study. *Am J Gastroenterol*, **95**, 183.
36. Hadjivassiliou M., Grunewald R.A., Chattopadhyay A.K., Davies-Jones G.A., Gibson A., Jarratt J.A., Kandler R.H., Lobo A., Powell T. & Smith C.M. (1998) Clinical, radiological, neurophysiological, and neuropathological characteristics of gluten ataxia. *Lancet*, **352**, 1582
37. Pallis C.A. (1974) Neurological manifestations of nutritional disorders. *Practitioner*, **212**, 509
38. Gobbi G., Bouquet F., Greco L., Lambertini A., Tassinari C.A., Ventura A. & Zaniboni M.G. (1992) Coeliac disease, epilepsy, and cerebral calcifications. The Italian Working Group on Coeliac Disease and Epilepsy. *Lancet*, **340**, 439.
39. Ferroir J.P., Fenelon G., Billy C., Huon R. & Herry J.P. (1997) [Epilepsy, cerebral calcifications and celiac disease]. *Rev Neurol (Paris)*, **153**, 354

40. Collin P., Vilska S., Heinonen P.K., Hallstrom O. & Pikkarainen P. (1996) Infertility and coeliac disease. *Gut*, **39**, 382
41. Martinelli P., Troncone R., Paparo F., Torre P., Trapanese E., Fasano C., Lamberti A., Budillon G., Nardone G. & Greco L. (2000) Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy. *Gut*, **46**, 332.
42. Farthing M.J., Rees L.H. & Dawson A.M. (1983) Male gonadal function in coeliac disease: III. Pituitary regulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **19**, 661.
43. Sjoberg K., Eriksson K.F., Bredberg A., Wassmuth R. & Eriksson S. (1998) Screening for coeliac disease in adult insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med*, **243**, 133
44. Collin P., Reunala T., Pukkala E., Laippala P., Keyrilainen O. & Pasternack A. (1994) Coeliac disease--associated disorders and survival. *Gut*, **35**, 1215.
45. Cronin C.C., Feighery A., Ferriss J.B., Liddy C., Shanahan F. & Feighery C. (1997) High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol*, **92**, 2210.
46. Counsell C.E., Taha A. & Ruddell W.S. (1994) Coeliac disease and autoimmune thyroid disease. *Gut*, **35**, 844.
47. Collin P. & Maki M. (1994) Associated disorders in coeliac disease: clinical aspects. *Scand J Gastroenterol*, **29**, 769.
48. Rustgi A.K. & Peppercorn M.A. (1988) Gluten-sensitive enteropathy and systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med*, **148**, 1583.

49. Iltanen S., Collin P., Korpela M., Holm K., Partanen J., Polvi A. & Maki M. (1999) Celiac disease and markers of celiac disease latency in patients with primary Sjogren's syndrome. *Am J Gastroenterol*, **94**, 1042
50. Henriksson K.G., Hallert C., Norrby K. & Walan A. (1982) Polymyositis and adult coeliac disease. *Acta Neurol Scand*, **65**, 301
51. Ventura A., Magazzu G. & Greco L. (1999) Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*, **117**, 297
52. Collin P., Maki M., Keyrilainen O., Hallstrom O., Reunala T. & Pasternack A. (1992) Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, **27**, 367.
53. O'Donoghue D.J. (1986) Fatal pneumococcal septicaemia in coeliac disease. *Postgrad Med J*, **62**, 229.
54. Shah A., Mayberry J.F., Williams G., Holt P., Loft D.E. & Rhodes J. (1990) Epidemiological survey of coeliac disease and inflammatory bowel disease in first-degree relatives of coeliac patients. *Q J Med*, **74**, 283
55. Freeman H.J. (1997) Hepatobiliary tract and pancreatic disorders in celiac disease. *Can J Gastroenterol*, **11**, 77.
56. Fornasieri A., Sinico R.A., Maldifassi P., Bernasconi P., Vegni M. & D'Amico G. (1987) IgA-antigliadin antibodies in IgA mesangial nephropathy (Berger's disease). *Br Med J (Clin Res Ed)*, **295**, 78
57. Smith M.J., Benson M.K. & Strickland I.D. (1971) Coeliac disease and diffuse interstitial lung disease. *Lancet*, **1**, 473.

58. Reading R., Watson J.G., Platt J.W. & Bird A.G. (1987) Pulmonary haemosiderosis and gluten. *Arch Dis Child*, **62**, 513
59. Simila S. & Kokkonen J. (1990) Coexistence of celiac disease and Down syndrome. *Am J Ment Retard*, **95**, 120.
60. DuBois R.N., Lazenby A.J., Yardley J.H., Hendrix T.R., Bayless T.M. & Giardiello F.M. (1989) Lymphocytic enterocolitis in patients with 'refractory sprue'. *Jama*, **262**, 935.
61. Moayyedi P., O'Mahony S., Jackson P., Lynch D.A., Dixon M.F. & Axon A.T. (1997) Small intestine in lymphocytic and collagenous colitis: mucosal morphology, permeability, and secretory immunity to gliadin. *J Clin Pathol*, **50**, 527.
62. Wolber R., Owen D. & Freeman H. (1990) Colonic lymphocytosis in patients with celiac sprue. *Hum Pathol*, **21**, 1092.
63. Loft D.E., Marsh M.N. & Crowe P.T. (1990) Rectal gluten challenge and diagnosis of coeliac disease. *Lancet*, **335**, 1293.
64. McCashland T.M., Donovan J.P., Strobach R.S., Linder J. & Quigley E.M. (1992) Collagenous enterocolitis: a manifestation of gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Gastroenterol*, **15**, 45.
65. Fine K.D., Do K., Schulte K., Ogunji F., Guerra R., Osowski L. & McCormack J. (2000) High prevalence of celiac sprue-like HLA-DQ genes and enteropathy in patients with the microscopic colitis syndrome. *Am J Gastroenterol*, **95**, 1974.

66. Fine K.D., Lee E.L. & Meyer R.L. (1998) Colonic histopathology in untreated celiac sprue or refractory sprue: is it lymphocytic colitis or colonic lymphocytosis? *Hum Pathol*, **29**, 1433
67. Maki M. (1995) The humoral immune system in coeliac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol*, **9**, 231.
68. Kelly C.P., Feighery C.F., Gallagher R.B., Gibney M.J. & Weir D.G. (1991) Mucosal and systemic IgA anti-gliadin antibody in celiac disease. Contrasting patterns of response in serum, saliva, and intestinal secretions. *Dig Dis Sci*, **36**, 743.
69. Kelly C.P., Feighery C.F., Gallagher R.B. & Weir D.G. (1990) Diagnosis and treatment of gluten-sensitive enteropathy. *Adv Intern Med*, **35**, 341.
70. Kilander A.F., Nilsson L.A. & Gillberg R. (1987) Serum antibodies to gliadin in coeliac disease after gluten withdrawal. *Scand J Gastroenterol*, **22**, 29
71. Uibo O., Uibo R., Kleimola V., Jogi T. & Maki M. (1993) Serum IgA anti-gliadin antibodies in an adult population sample. High prevalence without celiac disease. *Dig Dis Sci*, **38**, 2034.
72. Chorzelski T.P., Beutner E.H., Sulej J., Tchorzewska H., Jablonska S., Kumar V. & Kapuscinska A. (1984) IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br J Dermatol*, **111**, 395.
73. Ferreira M., Davies S.L., Butler M., Scott D., Clark M. & Kumar P. (1992) Endomysial antibody: is it the best screening test for coeliac disease? *Gut*, **33**, 1633

74. Kapuscinska A., Zalewski T., Chorzelski T.P., Sulej J., Beutner E.H., Kumar V. & Rossi T. (1987) Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **6**, 529
75. Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E.O. & Schuppan D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, **3**, 797.
76. Sulkanen S., Halttunen T., Laurila K., Kolho K.L., Korponay-Szabo I.R., Sarnesto A., Savilahti E., Collin P. & Maki M. (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*, **115**, 1322.
77. Dieterich W., Laag E., Schopper H., Volta U., Ferguson A., Gillett H., Riecken E.O. & Schuppan D. (1998) Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, **115**, 1317
78. Clemente M.G., Musu M.P., Frau F., Cicotto L., De Virgiliis S. (2002) Antitissue Transglutaminase Antibodies Outside Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **34**, 31-34
79. Clemente M.G., Musu M.P., Frau F., Brusco G., Corazza G.R., De Virgiliis S (2000) Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. *Gut*, **47**, 520-526
80. Clemente M.G., Musu M.P., et al. (2004) Enterocyte actin autoantibody detection: a new diagnostic tool in celiac disease diagnosis: results of a multicenter study. *Am.J.Gastroenterol*. **99**, 1551-1556

81. Barone M.V., Gimigliano A., Castoria G., Paoletta G., et al. (2006) Growth factor- like activity of gliadin, an alimentary protein: implication for celiac disease (CD). *Gut*, **4**
82. De angelis M., Rizzello C. G., Fasano A., Clemente M.G., et al. (2006) VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762(1)**, 80,-93.