

IgA anti-transglutaminase tecidular. Avaliação de um novo imuno-ensaio enzimático no diagnóstico e evolução clínica da doença celíaca

MA BODAS (1), L DELGADO (1), MC GOUVEIA (1), MG MARTINS (2), IM NOVA (1), H BARROS (3)

RESUMO

Introdução: A Doença Celíaca (DC) é uma patologia auto-imune intestinal, relacionada com a sensibilização ao glúten em indivíduos geneticamente susceptíveis. O diagnóstico baseia-se nas alterações histológicas das biópsias intestinais (atrofia das vilosidades e hiperplasia das críptas) e melhoria dos achados clínicos e histológicos com a retirada do glúten da dieta e, também, pela presença sérica de anticorpos para gliadina (AGA), endomísio (EMA) e reticulina. *Dieterich We* e col., identificaram a transglutaminase tecidular (TGt) como o principal auto-antígeno reconhecido pelos EMA nos doentes com doença celíaca e provaram que o substracto por excelência desta enzima é a gliadina. Estudos recentes para a pesquisa de anticorpos IgA para a TGt obtiveram boa correlação com os EMA.

Objectivos: Verificar as características operativas de um teste comercial baseado num imuno-ensaio enzimático (ELISA) para pesquisa e quantificação de anticorpos IgA para a TGt em doentes com doença celíaca nas diferentes fases clínicas - diagnóstico inicial, remissão clínica e recaída.

Material e Métodos: Incluímos neste estudo 80 amostras de outros tantos doentes avaliados no nosso laboratório por doença celíaca estabelecida ou suspeita. Após revisão dos dados clínicos e laboratoriais referentes a cada doente, as amostras foram classificadas em quatro grupos: 1) Primeiro diagnóstico (DCP) - 7 doentes, com média de idades $14,4 \pm 16,3$ anos, todos do sexo feminino (F), estudados pela primeira vez, com queixas gastro-intestinais com dieta

sem restrição de glúten. Estes doentes fizeram biópsia jejunal e a histologia apresentava alterações típicas da doença celíaca. 2) Doença celíaca em recaída (DCR) - 16 doentes celíacos, com $9,9 \pm 7,0$ anos (14F:2M), em fase de recaída da doença, que apresentavam sintomas gastro-intestinais e alterações do exame histológico compatíveis, após re-introdução do glúten na dieta. 3) Doença celíaca controlada (DCC) - 27 doentes celíacos, com $10,9 \pm 7,0$ anos (20F:7M) em fase de doença controlada, assintomáticos e com exame histológico da biópsia jejunal normal após terem efectuado uma dieta com restrição de glúten há pelo menos seis meses. 4) Grupo controlo (CT) - 30 doentes, com $11,2 \pm 12,5$ (16F:14M), estudados por mau desenvolvimento estato-ponderal, anemia, diarreia crónica ou patologia alérgica e cujos dados clínico-laboratoriais ou da histologia jejunal excluam a doença. Em todas as amostras foram pesquisados os anticorpos IgA anti-transglutaminase tecidular, por um método que se baseia num imuno-ensaio enzimático, os anticorpos IgA anti-endomísio, por imunofluorescência indirecta (IFI) e os anticorpos anti-gliadina (AGA) por um método de imuno-ensaio fluoro-enzimático.

Resultados: Os anticorpos IgA TGt foram positivos no grupo de doentes identificados pela primeira vez 7/7 com uma sensibilidade de 100% [56-100], negativos no grupo em remissão 27/27 com uma sensibilidade de 100% [84-100], e positivos no grupo em recidiva 16/16 com 100% de sensibilidade [76-100] e uma especificidade de 100% [86-100] para todos os grupos. Os EMA apenas detectaram positivos 10/16 no grupo em recidiva ficando com uma sensibilidade de 63% [36-84] e com uma especificidade de 100% [86-100] para todos os grupos. Os AGA foram os anticorpos que se revelaram de mais baixa sensibilidade especialmente no grupo de recidiva, onde conseguiu apenas detectar positividade no soro de um doente.

(1) Serviço de Imunologia, Hospital de S. João e Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

(2) Serviço de Patologia Clínica, Instituto Português de Oncologia do Porto

(3) Serviço de Higiene e Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Conclusões: 1) O teste ELISA para a detecção dos anticorpos IgA TGt apresentou uma especificidade de 100% (0% de falsos positivos) e uma sensibilidade de 100% (0% de falsos negativos). 2) Embora ligeiramente inferior, a pesquisa dos EMA por IFI foi semelhante aos IgA TGt. 3) A sensibilidade dos AGA é inferior, nomeadamente na capacidade de detectar recidivas. Este teste apresenta-se fácil para efectuar, de modo prático e amplo, o seguimento dos doentes celiacos e efectuar estudos em larga escala de prevalência da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Doença Celiaca, anticorpos IgA anti-transglutaminase tecidular, anti-gliadina, anti-endomísio.

ABSTRACT

IGA ANTI-TISSUE TRANSGLUTAMINASE. EVALUATION OF A NEW ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY IN CELIAC DISEASE DIAGNOSIS AND FOLLOW-UP

Introduction: *Celiac Disease (DC) is an auto-immune intestinal disorder, related to gluten sensitivity in genetically susceptible individuals. The diagnosis is based on an abnormal intestinal biopsy (villous atrophy with hyperplasia of the crypts), clinical and histological improvement when on a gluten free diet and also the presence of anti-gliadin (AGA), anti-endomysium (EMA), and anti-reticulín antibodies. Dieterich W et al., identified tissue transglutaminase (TGt) as the auto-antigen recognized by EMA in patients with celiac disease, showing that gliadin is an excellent substrate for the enzyme. Recent studies demonstrated a good correlation between IgA anti-TGt and EMA.*

Objective: *To evaluate a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of IgA antibodies to TGt in sera of patients with celiac disease in different phases - initial diagnosis, clinical remission and relapse.*

Material and Methods: *We studied sera from 80 patients evaluated in our lab for suspected or established celiac disease. After revision of the clinical and laboratory data from each patient, the samples were classified in four groups: 1) initial diagnosis (DCP) - 7 patients, mean age 14.4 ± 16.3 years, all female (F) and evaluated for the first time due to gastro-intestinal complaints with an unrestricted diet. All had typical histological changes in the jejunal biopsy. 2) Relapsing celiac disease (DCR) - 16 patients, with 9.9 ± 7.0 years (14F:2M), with a noticeable clinical relapse and histological changes after resuming a gluten containing diet. 3) Controlled celiac disease (DCC) - 27 patients, with 10.9 ± 7.0 years (20F:7M) asymptomatic and with a normal jejunal biopsy after a gluten-free diet, for at least six months. 4) Control group (CT) - 30 patients, with 11.2 ± 12.5 years (16F:14M), studied due to growth problems, anemia,*

chronic diarrhea, or allergy, in which the clinical, laboratory and histological data excluded celiac disease. All samples were analyzed for IgA antibodies to TGt (IgA TGt) with an enzyme-linked immunosorbent assay, IgA anti-endomysium by indirect immunofluorescence (IFI), and IgA anti-gliadin (AGA) with a fluoroenzyme-immunoassay.

Results: *IgA TGt was positive in 7/7 patients at the initial diagnosis, with a sensitivity of 100% [56-100], negative in 27/27 patients in remission (DCC) with a sensitivity of 100% [84-100], and positive in 16/16 patients in relapse (DCR) with 100% sensitivity [76-100] and a specificity of 100% [86-100] for all groups. EMA were positive in 10/16 patients in relapse with a sensitivity of 63% [36-84] and a specificity of 100% [86-100] for all groups. AGA showed the lowest sensitivity, specially in the relapsing group where only one patient was positive.*

Conclusions: *1) ELISA for measurement of IgA antibodies to TGt showed a specificity of 100% (0% of false positives) and a sensitivity of 100% (0% of false negatives). 2) Although slightly lower the detection of EMA by IFI was similar to IgA TGt. 3) AGA has the lowest sensitivity, namely for detection of relapsing cases. This new test - IgA TGt - seems to be a practical method to use on a wider scale for the study of disease prevalence, and also in the follow-up of celiac patients.*

KEY WORDS: *Celiac disease, IgA antibodies anti-tissue transglutaminase, anti-gliadin, anti-endomysium.*

A Doença Celiaca (DC) é uma doença auto-imune com manifestações intestinais, relacionada com a sensibilização ao glúten em indivíduos geneticamente susceptíveis (HLA-DQ2 ou DQ8).

Clínicamente predominam as perturbações gastro-intestinais (diarreia, dor, distensão abdominal, má absorção) e anemia, mas pode ter sintomatologia atípica ou ser assintomática.¹ O diagnóstico baseia-se nas alterações histológicas das biópsias intestinais (atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas), na resposta clínica e histológica à retirada do glúten da dieta e, também, na presença sérica de anticorpos para gliadina (AGA), endomísio (EMA) e reticulina (ARA).² Dieterich e colaboradores³ identificaram em 1997 a transglutaminase tecidular (TGt) como o principal auto-antígeno reconhecido pelos anticorpos anti-endomísio nos doentes com doença celiaca e demonstraram que a gliadina é o substrato por excelência desta enzima. Estudos recentes com a pesquisa de anticorpos IgA para a TGt obtiveram boa relação com os EMA em doentes celiacos.^{4,5}

O objectivo do nosso estudo foi avaliar as características operativas de um teste recentemente comercializado, baseado num imuno-ensaio enzimático (ELISA) para pesquisa e quantificação de anticorpos IgA para a TGt, em doentes com doença celiaca e nas suas diferentes fases clínicas - diagnóstico inicial, remissão clínica e recaída.

MATERIAL E MÉTODOS

Incluimos neste estudo 80 amostras de outros tantos doentes avaliados no nosso laboratório por doença celíaca estabelecida ou suspeita. Após revisão dos dados clínicos e laboratoriais referentes a cada doente, as amostras foram classificadas em quatro grupos: 1) Primeiro diagnóstico (DCP) - 7 doentes, com média de idades $14,4 \pm 16,3$ anos, todos do sexo feminino (F), estudados pela primeira vez, com queixas gastro-intestinais com dieta sem restrição de glúten. Estes doentes fizeram biópsia jejunal e a histologia apresentava alterações típicas da doença celíaca. 2) Doença celíaca em recaída (DCR) - 16 doentes celíacos, com $9,9 \pm 7,0$ anos (14F:2M), em fase de recaída da doença, que apresentavam sintomas gastro-intestinais e alterações do exame histológico compatíveis, após re-introdução do glúten na dieta. 3) Doença celíaca controlada (DCC) - 27 doentes celíacos, com $10,9 \pm 7,0$ anos (20F:7M) em fase de doença controlada, assintomáticos e com exame histológico da biópsia jejunal normal após terem efectuado uma dieta com restrição de glúten há pelo menos seis meses. 4) Grupo sem doença celíaca (CT) - 30 doentes, com $11,2 \pm 2,5$ anos (16F:14M), estudados por mau desenvolvimento estato-ponderal, anemia, diarreia crónica ou patologia alérgica e cujos dados clínico-laboratoriais ou da histologia jejunal excluíram a doença.

Em todas as amostras foram pesquisados os anticorpos IgA anti-transglutaminase tecidual, por um método que se baseia num imuno-ensaio enzimático, os anticorpos IgA anti-endomísio, por imunofluorescência indirecta e os anticorpos anti-gliadina por um método de imunofluoro-ensaio enzimático. Para cada prova diagnóstica foram calculadas a sensibilidade, a especificidade e os respectivos intervalos de confiança a 95% quando aplicado aos diferentes grupos de diagnóstico clínico. A comparação entre variáveis quantitativas foi feita através da prova de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, quando havia mais de dois grupos. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$ e os resultados apresentados como média \pm desvio-padrão, independentemente da natureza da distribuição, por razões de simplificação da leitura.

Os anticorpos IgA anti-transglutaminase tecidual (ATGt) foram determinados com um ensaio comercial - *Quanta Lite® tTG ELISA (INOVA)*. Abreviadamente, o ensaio usa como substracto a transglutaminase tecidual de fígado de cobaio, purificada e inactivada, revestindo os poços da microplaca. As amostras, diluídas 1/100, e os controlos em duplicado, incubam com o substracto por 30 minutos, permitindo que os anticorpos específicos, se presentes na amostra, se liguem. Após lavagem da placa com solução de lavagem, há um segundo período de incubação com o conjugado de imunoglobulinas anti-IgA humana, marcadas com a enzima HRP por 30 minutos. Após nova lavagem junta-se um substracto cromogénico TMB, desenvolvendo-se um produto corado. Findo o tempo de incubação (30 minutos) a reacção é parada com

H_2SO_4 , e as absorbâncias são lidas num fotómetro com o filtro de 450 nm. A média das densidades ópticas das amostras é comparada com a média do poço do controlo positivo cujo valor é conhecido. As amostras são classificadas em negativas, fracamente positiva e moderada a fortemente positivas se o valor for < 20 unidades, 20-30 e > 30 unidades, respectivamente.

Os anticorpos IgA anti-endomísio (EMA) foram pesquisados sobre cortes de esófago de macaco, como substracto, e com um conjugado de anticorpos anti-IgA humana, marcado com isotiocianato de fluoresceína (*Euroimmun*). Os soros a ensaiar são diluídos 1/10 num tampão salino de fosfato (PBS) e incubam por 30 minutos sobre o substracto em câmara húmida. Se as amostras forem positivas, os anticorpos específicos ligam-se às estruturas do endomísio do esófago de macaco. Após uma lavagem com PBS para remoção do excesso que não reagiu, os anticorpos ligados são marcados com a junção do conjugado fluorescente. As amostras observam-se ao microscópio de epifluorescência (250-400x) e são consideradas positivas quando aparece fluorescência na zona da *muscularis mucosa* e na túnica externa da *muscularis*. Os resultados são confirmados por comparação com os controlos positivo e negativo ensaiados em paralelo. Os anticorpos anti-gliadina (AGA) foram determinados com um teste comercial, cujo princípio é um imunofluoro-ensaio enzimático - IgA específica *Unicap* e equipamento *Unicap 100 (Kabi Pharmacia)*, que processa todos os passos do ensaio automaticamente. O antigénio de interesse (gliadina) está ligada covalentemente a uma fase sólida de celulose, e vai reagir com os anticorpos IgA específicos presentes na amostra diluída 1/100. Após lavagem, é adicionado um conjugado de imunoglobulinas anti-IgA humana marcado com uma enzima. Após um período de incubação, segue-se nova lavagem e o complexo ligado vai reagir com uma solução de desenvolvimento por um determinado tempo, findo o qual a reacção é parada e o composto fluorescente formado é medido automaticamente. Os resultados das amostras são calculados por comparação com a resposta dos calibradores usados durante a sessão. Os resultados são expressos em mgA/l (anticorpos específicos de antigénio); até 3 os soros são negativos e se > 3 são positivos.

RESULTADOS

Para a análise dos resultados as amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com os dados clínico-laboratoriais e histopatológicos dos doentes.

Os anticorpos IgA anti-TGt foram positivos no grupo de doentes identificados pela primeira vez (DCP) e em recaída (DCR). No grupo com doença controlada e no grupo controlo encontramos valores abaixo do *cut-off* de positividade ($< 20U$), apresentando no entanto o grupo com doença controlada uma média significativamente mais elevada ($p < 0,005$) (Fig. 1).

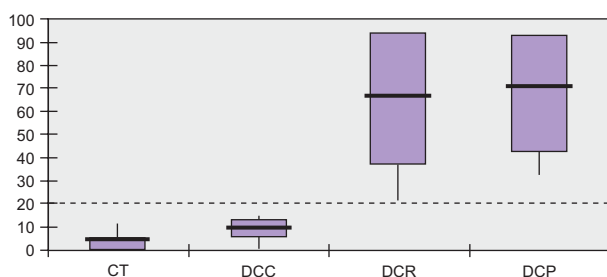


Fig. 1 - Anticorpos IgA anti-transglutaminase tecticular nos diferentes grupos estudados. A figura apresenta a média (traço cheio) \pm o desvio padrão (traço fino, horizontal) e valores extremos (traço vertical). Os níveis médios IgA anti-TGt na Doença Celíaca no primeiro diagnóstico (DCP) e em recaída (DCR), são significativamente mais elevados do que nos doentes controlados (DCC) e nos controles (CT) ($p < 0,005$). Estes dois últimos grupos apresentam valores abaixo do cut-off ($< 20U$ representado por traço horizontal) se bem que mais elevados nos doentes controlados (DCC versus CT $p < 0,005$).

Os anticorpos IgA anti-TGt foram positivos em todos (7/7) os doentes identificados pela primeira vez (DCP), com uma sensibilidade de 100% [intervalo de confiança a 95%: 56-100%], negativos no grupo com doença controlada (27/27 casos) com uma sensibilidade de 100% [intervalo de confiança a 95%: 84-100%], positivos no grupo em recidiva (16/16) com 100% de sensibilidade [intervalo de confiança a 95%: 76-100%] apresentando uma especificidade global de 100% [intervalo de confiança a 95%: 86-100%] (Tabela 1).

Todos os resultados positivos na imunofluorescência foram detectados pelo ensaio ELISA da IgA anti-TGt (Fig. 2). No entanto, os anticorpos IgA anti-endomísio (EMA) apenas detectaram como positivos 10/16 doentes em recidiva, apresentando uma sensibilidade de 63% [intervalo de confiança a 95%: 36-84%]. A especificidade dos EMA foi de 100% [intervalo de confiança a 95%: 86-100%] para todos os grupos (Tabela 1).

	IgA anti-TGt		IgA anti-endomísio (EMA)	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
Primeiro diagnóstico (n=7)	100% [56-100]	100% [86-100]	86% [42-99]	100% [86-100]
Recaída (n=16)	100% [76-100]	100% [86-100]	63% [36-84]	100% [86-100]
Controlada (n=27)	100% [84-100]	100% [86-100]	100% [84-100]	100% [86-100]

Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade diagnóstica dos anticorpos IgA anti-TGt e anti-endomísio (EMA) no grupo global dos doentes celíacos nas diferentes fases da doença.

Os anticorpos IgA anti-gliadina (AGA) foram os anticorpos que se revelaram de mais baixa sensibilidade, particularmente no grupo em recidiva onde apenas conseguiu detectar positividade no soro de um doente (DCP n.º positivos= 4/7 doentes, DCC= 25/27, DCR=1/16).

DISCUSSÃO

A doença celíaca é uma síndrome de malabsorção desencadeada pela exposição através da alimentação ao glúten do trigo e de outros cereais.

A base imunológica da doença é suportada pela evidência de associação a determinados haplótipos do HLA (DQ2 e DQ8),⁶ ao isolamento de linfócitos T nas lesões intestinais e que proliferam *in vitro* em resposta à gliadina quando apresentada por células HLA-DQ2/8⁷ e à associação da doença a anticorpos IgA anti-gliadina e anti-endomísio séricos.⁸ Mais recentemente, a TGt foi identificada como o auto-antígeno reconhecido pelos anticorpos anti-endomísio³ e que esta enzima está envolvida na desamidação da gliadina.⁹ Desta acção enzimática resultam peptídeos carregados negativamente, que se associam melhor às moléculas HLA-DQ2 e DQ-8 e que têm maior capacidade de estimular *in vitro* linfócitos T específicos da gliadina.^{9, 10}

O diagnóstico da Doença Celíaca é com frequência complexo, levando por vezes à necessidade de ainda recorrer a provocações digestivas com o glúten e subsequente avaliação histológica,^{2, 11} sendo o exame histológico o principal critério para uma afirmação da doença.² A presença de IgA específica para a gliadina, reticulina e endomísio na altura da apresentação inicial, e o seu desaparecimento quando o doente faz uma dieta sem glúten, reforçam o diagnóstico.² Apesar do diagnóstico definitivo necessitar de comprovação histológica, os anticorpos IgA específicos são eficientes no rastreio da doença, dada a sua elevada sensibilidade e especificidade,^{12, 13} que pode atingir os 100% em particular os IgA anti-endomísio (EMA).^{12, 13}

O facto dos EMA serem pesquisados por imunofluorescência sobre um substrato de primata (esófago de macaco) levanta algumas dificuldades na sua obtenção e comercialização. As alternativas até agora propostas - cordão umbilical humano - não são completamente satisfatórias, o que se alia, na prática, a alguns dos inconvenientes do método da imunofluorescência (subjectividade na observação, laborioso, custos importantes envolvidos). Uma etapa importante na pesquisa laboratorial dos EMA, foi a identificação por Dieterich e colaboradores³ da transglutaminase tecticular (TGt) como o principal auto-antígeno reconhecido pelos anticorpos anti-endomísio e a adaptação da TGt a um método de ELISA. Recentemente a pesquisa de IgA anti-TGt por ELISA tem vindo a ser considerada o teste ideal para o rastreio laboratorial da Doença Celíaca e outras entidades associadas à sensibilização imunológica ao glúten.¹³⁻¹⁵

Os resultados obtidos na avaliação deste ensaio vêm nesse sentido, pois obtivemos como anteriormente uma elevada concordância (89%) entre IgA anti-TGt e EMA (Fig. 2).^{16, 17} Na nossa série, a discordância entre estes dois testes (7/80 amostras) observou-se essencialmente no grupo dos doentes celíacos em recaída (6 casos só

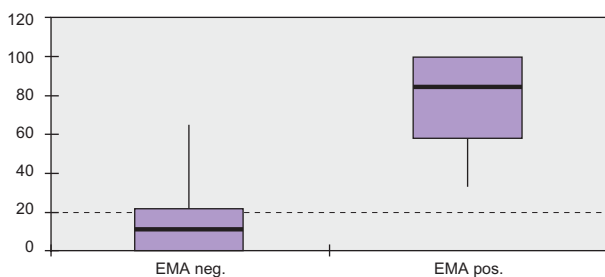


Fig. 2 - Relação dos anticorpos IgA anti-endomísio (EMA) e anti-transglutaminase tecidual. A figura apresenta a média de TGt (traço cheio) \pm o desvio padrão (traço fino, horizontal) e valores extremos (traço vertical). Todas as amostras positivas (pos.) no ensaio dos EMA têm uma IgA anti-TGt positiva ($>20U$ representado por tracejado horizontal).

positivos na IgA anti-TGt), o que reforça o interesse clínico deste novo teste para a identificação de doença em recaída. A elevada sensibilidade por nós encontrada, foi também sobreponível à de casuísticas recentes de doentes adultos.^{16, 17}

A razão pela qual estes doentes poderão formar auto-anticorpos IgA contra a TGt, face a uma exposição alimentar a um antigénio distinto - a gliadina - poderá parecer paradoxal.¹⁸ No entanto, sabe-se hoje que a transglutaminase é uma enzima que se liga electivamente à gliadina, cooperando na sua degradação e apresentação aos linfócitos T auxiliares específicos da gliadina, presentes na mucosa intestinal destes doentes. A activação local destes linfócitos T, face à ingestão contínua de gliadina, poderá levar à cooperação imunológica com linfócitos B que reconhecem a TGt nos complexos gliadina-TGt. Deste modo, linfócitos T anti-gliadina contribuem para a quebra da tolerância imunológica B a nível das mucosas que, como é sabido, se associa à produção de anticorpos IgA.

Em conclusão, do estudo das características operativas do teste ELISA da IgA anti-TGt para o rastreio de doença celíaca, que efectuamos num grupo de 80 doentes avaliados no nosso laboratório, verificamos que com a utilização de um método ELISA para a pesquisa de anticorpos IgA anti-TGt aumentamos claramente a sensibilidade de detecção de auto-anticorpos associados a Doença Celíaca em fase activa (primeiro diagnóstico e recidiva clínica) (Tabela 1). Em termos de especificidade, este teste é sobreponível aos métodos já utilizados no laboratório (anticorpos IgA anti-endomísio por Imunofluorescência indirecta e IgA anti-gliadina por Imunofluoro-ensaio enzimático), mas a sua maior sensibilidade na detecção de recidivas constitui uma vantagem adicional no seguimento clínico da Doença Celíaca. A facilidade de execução e de interpretação, nomeadamente em comparação com os ensaios de imunofluorescência (EMA), apontam também para a sua utilidade em estudos mais alargados à comunidade para o rastreio da Doença Celíaca e em futuros estudos prospectivos com avaliação regular dos doentes até ao seu controlo clínico.

BIBLIOGRAFIA

1. Sollid LM. Molecular Basis of Celiac Disease. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 53-81
2. Walker-Smith JÁ, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-11
3. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine* 1997; 3 (7): 797-801
4. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabó IR et al. Tissue Transglutaminase Autoantibodies Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in detecting Celiac Disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 1322-1328
5. Dieterich W, Laad E, Schöpfer H, Volta U, Ferguson A, et al. Autoantibodies to Tissue Transglutaminase as Predictors of Celiac Disease. *Gastroenterology* 1998; 115:1317-1321
6. Sollid L, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169: 345-350
7. Lundin KEA, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, et al. Gliadin-specific, HLA-DQ ($\alpha 1^*0501, \beta 1^*0201$) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 1993; 178: 187-196
8. Lerner A, Kumar V, Iancu TC. Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between antigliadin, antireticulin, antiendomysial antibodies. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 78-83
9. van de Wal Y, Yvonne Kooy Y, van Veelen P, Pena S, Mearin L et al. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T Cell reactivity. *Journal of Immunology* 1998; 1585-1588
10. Quarsten H, Molberg O, Fugger L, McAdam SN, Sollid LM. HLA binding and T cell recognition of a tissue transglutaminase - modified gliadin epitope. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2506-2514
11. Lahteenoja H, Maki M., Viander M, Toivanen V, Yrjanen S. Local challenge of oral mucosa with gliadin in patients with celiac disease. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 38-45
12. Biagi F, Ellis HJ, Yiannakou JY, Brusco G, Swift GL, et al. Tissue Transglutaminase Antibodies in Celiac Disease. *The Journal of Gastroenterology* 1999; 94(8): 2188-2192
13. Sollid LM, Scott H. New tool to predict Celiac Disease on its way to the clinics. *Gastroenterology* 1998; 115: 1584-1585
14. Dieterich W, Laag E, Bruckner-Tuderman L, Reunala T, Kárpáti S et al. Antibodies to Tissue Transglutaminase as Serologic Markers in Patients with *Dermatitis Herpetiformis*. *J Invest Dermatology* 1999; 113 (1): 134-136
15. Fasano A. Tissue transglutaminase: the Holy Grail for the diagnosis of celiac disease, at last? *Journal of Pediatrics* 1999; 134:134-135
16. Trancone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, et al. IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for coeliac disease. *The Journal of Pediatrics* 1999; 134: 166-171
17. Lock RJ, Pitcher MCL, Unsworth DJ. IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol* 1999; 52: 274-277
18. Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase-guilt by association? *Gut* 1997; 41:851-852