

EXACTITUD DIAGNÓSTICA DE ANTICUERPOS ANTI TRANSGLUTAMINASA TISULAR Y DETERMINACIÓN DEL VALOR POSITIVO ALTO EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

Raimondo, Natalia¹

Zanotti, Nelly¹

Kohn, Joaquín²

Cassinerio, Adriana¹

¹Laboratorio de Inmunología – Hospital de Niños de la Santísima Trinidad –
Córdoba – Argentina.

²Servicio de Gastroenterología – Hospital de Niños de la Santísima Trinidad –
Córdoba – Argentina.

Contacto: Raimondo, Natalia. Laboratorio de Inmunología. Ferroviarios 5014. Córdoba.
Tel: (0351-4586475). E-mail: nataliaraimondo@gmail.com.

Aceptado para su publicación: 28/7/17

RESUMEN

La Enfermedad Celíaca (EC) es un trastorno inmunitario sistémico mediado por gluten y prolaminas relacionadas en individuos genéticamente predispuestos (HLA DQ2/8). Para su diagnóstico (Dx) se evalúan anticuerpos (Acs) específicos, biopsia (Bx) duodenal y manifestaciones clínicas. En 2012, las guías Europeas recomiendan validar las pruebas utilizadas para pesquisa de EC en población pediátrica y establecer el valor positivo alto de Acs anti-Transglutaminasa tisular 2 isotipo A (IgA a-Tgt2) en relación al valor de corte. Si un paciente con sospecha clínica de EC presenta un valor positivo alto de IgA a-Tgt2 y Acs anti- Endomisio (a-Em) positivo, se podría hacer Dx sin realizar Bx.

El objetivo fue evaluar la exactitud diagnóstica de la prueba de IgA a-Tgt2 utilizada para pesquisa de EC en el Laboratorio del Hospital de Niños y determinar el valor positivo alto. Se estudiaron 217 sujetos con sospecha de EC y a todos se les realizaron a-Em por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) e IgA a-Tgt2 por ELISA. Se estableció el coeficiente de Concordancia Kappa (κ) entre IgA a-Tgt2 y a-Em. Para el valor de corte de IgA a-Tgt2 se utilizó curva ROC. El valor positivo alto de IgA a-Tgt2 fue definido como el primer valor que brinde un valor predictivo positivo (VPP) de 100%.

Presentaron serología negativa 144 pacientes, 69 fueron diagnosticados con EC (IgA a-Tgt2 y a-Em positivo más Bx con atrofia vellositaria) y 4 mostraron discordancia entre serología y Bx. Se obtuvo una concordancia del 96%. El valor de corte para IgA a-TGT2 por curva ROC fue de 11 UI/L. El valor positivo alto de IgA a-Tgt2 fue >65 UI/L.

La prueba utilizada para pesquisa de EC mostró elevada exactitud diagnóstica (98,2%). Niños y adolescentes con signos y síntomas sugestivos de EC y título de IgA a-Tgt2 >65 UI/L tienen alta probabilidad de presentar atrofia vellositaria. En estos casos el médico pediatra podría diagnosticar EC prescindiendo de la Bx.

Palabras claves: Enfermedad celíaca, biopsia duodenal, marcadores serológicos, anticuerpos anti transglutaminasa tisular.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC) es un trastorno inmunitario sistémico mediado por el gluten y otras prolaminas relacionadas en individuos genéticamente predispuestos. Se caracteriza por la presencia de una variedad de manifestaciones clínicas, anticuerpos (Acs) específicos, haplotipos HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 y enteropatía. Originalmente, se pensaba que era una patología rara que se presentaba en la niñez, pero en la actualidad es reconocida como una condición que puede ser diagnosticada a cualquier edad (1). La incidencia de EC en Argentina es muy alta (1:100-200) (2) y las manifestaciones clínicas son muy variadas, observándose tanto síntomas gastrointestinales como síntomas atípicos o extraintestinales.

Las cuatro herramientas para el diagnóstico (Dx) de EC son: la clínica, los autoanticuerpos, la genética y la anatomía patológica. En la biopsia (Bx) duodenal por endoscopia alta de un paciente celíaco se observa atrofia vellositaria, hiperplasia de las criptas y aumento de los linfocitos intraepiteliales. A pesar que la Bx sigue siendo considerada el estándar de oro para el Dx de EC, la distribución de la lesión intestinal es parcheada y los hallazgos histopatológicos de la mucosa duodenal pueden encontrarse en otras patologías.

La clasificación de Marsh para el informe de la anatomía patológica incluye todo el espectro de lesiones histológicas que pueden presentar estos pacientes y distingue los siguientes grados: Marsh I o enteritis linfocítica, caracterizada por un aumento en el número de linfocitos intraepiteliales (> 25%); Marsh II, cuando además se asocia una hiperplasia de las criptas; Marsh III, cuando a las lesiones anteriores se asocia atrofia vellositaria que puede ser parcial (Marsh IIIa), subtotal o moderada (Marsh IIIb) o total (Marsh IIIc) (3).

La determinación de Acs anti-gliadina (AGA) fue la primera herramienta serológica útil para el diagnóstico de EC a partir de los años 70 (4). Actualmente, su uso no es recomendado por su baja sensibilidad y especificidad comparada con otras pruebas diagnósticas (5), especialmente en pacientes asintomáticos o silentes. Con la aparición de los péptidos deaminados de gliadina (DGP) la sensibilidad y especificidad han mejorado. Sin embargo, la utilización de Acs anti DPG (a-DGP) es sugerida como una prueba adicional, especialmente en niños menores a 2 años con otros Acs específicos de EC negativos (5). Los Acs de clase IgA son los que confieren especificidad y sensibilidad; los Acs de clase IgG se reservan para los pacientes deficientes de IgA sérica (6).

La detección de los Acs anti endomisio (a-Em) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) es considerado el método de referencia serológico (7). Se basa en la identificación de un patrón reticular de fluorescencia en la *muscularis mucosae* de la porción distal del esófago de mono. A pesar de que la determinación de los a-Em es una prueba específica, sensible y reproducible, tiene una serie de inconvenientes tales como: el procesamiento manual de las muestras, la laboriosidad, la interpretación subjetiva y el costo (8).

La identificación de la enzima transglutaminasa tisular (Tgt) como el autoantígeno principal de los a-Em ha despertado gran interés, haciendo posible la detección de los Acs Tgt (a-Tgt) por la técnica de ELISA (9,10). Ésta tiene la ventaja de ser cuantitativa, estandarizable y más económica que la IFI. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de a-Em y a-Tgt son similares en población pediátrica (11-13) y en la actualidad los a-Tgt son la prueba de primera línea para la pesquisa de EC. La exactitud diagnóstica de los equipos de ELISA para la detección de a-Tgt ha sido mejorada gracias al uso de Tgt recombinante humana (Tgt2) como antígeno en lugar de los preparados de Tgt no humanos (14).

Con estos avances, la EC ha pasado de ser una rara enteropatía a ser una enfermedad frecuente, multiorgánica y con una fuerte predisposición genética. El Dx también ha cambiado como resultado de la disponibilidad de ensayos que permiten detectar los a-Tgt2. Es por ello que en el año 2012, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) estableció guías para el Dx de EC para niños y adolescentes. En la revisión se sugiere que toda prueba utilizada para Dx de EC debe ser validada en población pediátrica contra la técnica de referencia serológica, a-Em, considerándose de confianza si presentan una concordancia mayor al 95%. También se aconseja establecer el valor positivo alto para IgA a-Tgt2, que en determinadas situaciones podría evitar la realización de la Bx (15). La detección de Acs específicos debe estar acompañada del dosaje de IgA sérica. Si ésta es superior a 20 mg/dL, se deben investigar los IgA a-Tgt2, y en caso contrario el isotipo IgG (16,17).

Se han redefinido los protocolos para el Dx estableciendo dos grandes grupos de pacientes: sintomáticos y asintomáticos o de riesgo. En niños y adolescentes con signos o síntomas sugestivos de EC el marcador serológico para la pesquisa son los IgA a-Tgt2 (15). Los pacientes con valores altos de anticuerpos IgA a-Tgt2, según ESPGHAN mayor a 10 veces el valor de corte, tienen elevada probabilidad de presentar atrofia vellositaria (Marsh 3). En estos casos, el gastroenterólogo pediatra puede discutir con los padres y

los pacientes, la opción de realizar otras pruebas de laboratorio (a-Em, HLA) para hacer el Dx de EC prescindiendo de la biopsia (16). La dieta libre de gluten puede ser instaurada, y en caso de no mejorar los síntomas debe realizarse la Bx para confirmar el Dx (18).

Cuando se trata de niños y adolescentes asintomáticos con alto riesgo de padecer EC, como en el caso de pacientes con Diabetes Mellitus, Síndrome de Down, Tiroiditis Autoinmune, Síndrome de Turner, Síndrome de Williams, Deficiencia de IgA, Hepatitis Autoinmune y familiares de primer grado, deben investigarse en primera instancia los HLA. Si esto no es posible, se debe realizar IgA a-Tgt2, pero preferentemente no antes de los 2 años de edad. La presencia de Acs específicos (a-Tgt2 y a-DGP) puede ser fluctuante en este grupo, por lo cual siempre debe realizarse la Bx duodenal (15).

OBJETIVOS

Establecer la exactitud diagnóstica de IgA a-Tgt2 en la población pediátrica que concurre al Hospital de Niños de la Santísima Trinidad y determinar el valor positivo alto para IgA a-Tgt2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Fueron considerados para el estudio todos los pacientes que en forma consecutiva concurren al Laboratorio de Inmunología del Hospital de Niños de la Provincia de Córdoba, entre abril de 2013 y octubre de 2016, derivados por el Servicio de Gastroenterología. Se incluyeron todos los pacientes que presentaban signos o síntomas sugestivos de EC con solicitud de Acs específicos. Los síntomas por los cuales los pacientes consultaron al médico gastroenterólogo incluyeron: dolor abdominal, pérdida de peso, diarrea, constipación, falla de crecimiento y baja estatura. En algunos casos hubo más de dos manifestaciones descriptas en un mismo individuo.

Se excluyeron aquellos individuos con diagnóstico previo de EC, tratamiento con dieta libre de gluten, familiares de primer grado de pacientes con EC que no presenten signos y síntomas de EC, pacientes con valores de IgA menor a 20 mg/dL, y pacientes

asintomáticos considerados de alto riesgo por padecer alguna enfermedad con fuerte asociación a EC. A todos ellos se les realizó IgA a-Tgt2 y a-Em.

Se seleccionaron 217 pacientes, entre 4 meses y 15 años de edad. A los pacientes con niveles de IgA a-Tgt2 superiores al valor del corte se les realizó endoscopia gastrointestinal con Bx duodenal. Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas y los sueros conservados a -20°C hasta su procesamiento. El intervalo de días entre la serología y la realización de la Bx varió de 1 a 5 meses. En los pacientes que tenían más de un valor de IgA a-Tgt2, sólo fue tenido en cuenta el más próximo al momento de la Bx.

El Dx de EC se basó en la presencia de Acs específicos y los resultados de las Bx gastrointestinales, utilizando la clasificación de Marsh.

El protocolo del presente estudio fue aprobado por la Comisión Científica dependiente del Comité Interdisciplinario de Capacitación, Docencia e Investigación del Hospital de Niños.

Métodos

Anticuerpos IgA anti transglutaminasa tisular recombinante humana: fueron determinados utilizando un ELISA comercial (ORGENTEC, Mainz, Alemania). El ensayo fue realizado siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Las muestras con concentraciones superiores a 10 UI/mL fueron consideradas positivas.

Anticuerpos IgA anti endomisio: se realizaron por IFI en improntas comerciales de esófago de mono (ORGENTEC, Mainz, Alemania). Los sueros fueron diluidos previamente 1/5 en PBS pH 7,2.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Med-Calc 10.2.0.0 (Versión Demo). La sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y exactitud diagnóstica fueron calculadas utilizando fórmulas convencionales. Para determinar el punto de corte óptimo se empleó una curva ROC, se determinó el área bajo la curva (ABC) y las razones de verosimilitud positiva (RV+) y negativa (RV-). Las variables se acompañan con sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 95%.

La concordancia entre a-Em e IgA a-Tgt2 se estableció utilizando el índice de concordancia κ ; una concordancia excelente es definida con un coeficiente $\kappa \geq 0,80$.

Definimos el valor positivo alto de IgA a-Tgt2 como el valor que nos brinde una probabilidad del 100% de que el paciente tenga EC.

RESULTADOS

De los 217 pacientes estudiados, 94 (43%) fueron masculinos y 123 (57%) femeninos, con un rango de edades entre 4 meses a 15 años (edad media 6 años).

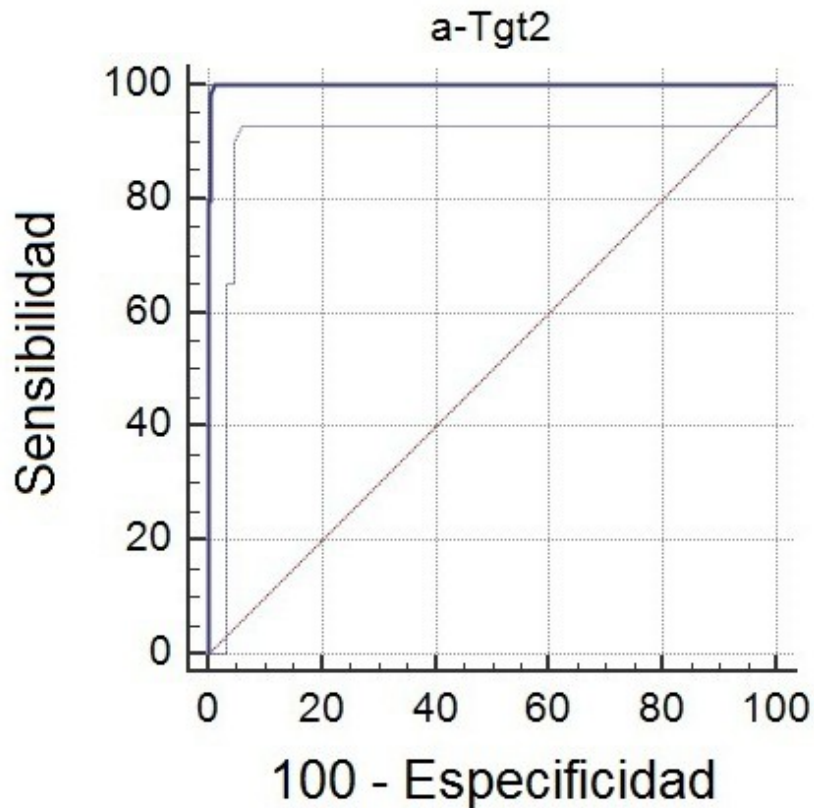
Las Bx gastrointestinales fueron realizadas en pacientes con IgA a-Tgt2 positivos. Presentaron serología negativa 144 pacientes, 69 fueron diagnosticados con EC (IgA a-Tgt2 y a-Em positivo más Bx con atrofia vellositaria) y 4 mostraron discordancia entre serología y Bx (Tabla 1). Se encontró atrofia vellositaria grado III de la clasificación Marsh en las Bx duodenales de todos los pacientes con diagnóstico de EC. Se obtuvo un índice de concordancia κ de 0,96 entre IgA a-Tgt2 y a-Em.

Tabla 1: Resultado de serología y biopsia gastrointestinal en los pacientes con anticuerpos positivos.

N	a-Tgt2	a-Em	Biopsia Gastrointestinal
69	+	+	Patológica
2	+	+	Normal
2	+	-	Normal

El valor de corte para IgA a-Tgt2 por curva ROC fue de 11 UI/L (Sensibilidad= 100%; Especificidad= 98,5%); el ABC fue de 0,999 (IC 95%: 0,977-1,000). Figura I. La RV+ fue de 74 (IC: 18,7 - 293,1) y RV- de 0. La exactitud diagnóstica fue de 98,2%.

Figura I: Curva ROC para IgA a-Tgt2.



El valor de corte fue de 11 UI/L con un ABC de 0,999 (IC 95%: 0,977 – 1,000). La sensibilidad y especificidad para el valor de corte fue de 100% y 98,5% respectivamente; (RV+: 74 y RV-: 0). ABC, área bajo la curva (IC 95%).

La Tabla 2 muestra los datos acumulados de cada uno de los límites de los IgA a-Tgt2 expresados en VPP para el diagnóstico de EC. A partir de esta información, se determina el valor positivo alto de IgA a-Tgt2 >65 IU/L. Con este valor tenemos un 100% de probabilidades de que el paciente sea celíaco presidiendo de la Bx.

TABLA 2: Valores Predictivos Positivos (VPP) para diferentes puntos de cortes de IgA a-Tgt2 en 73 pacientes.

Valor de corte de IgA a-Tgt2*		Nº de Pacientes		VPP (%)
UI/L	Múltiplos del valor de corte	Pacientes con EC	Pacientes sin EC	
>11	1,0	69	4	97,2
>20	1,8	65	1	98,5
>30	2,7	63	1	98,4
>55	5,0	56	1	98,2
>65	5,9	55	0	100
>100	9,1	50	0	100
>200	18,2	36	0	100

*IgA a-Tgt2 es expresado en valores de UI/L y como múltiplos del valor de corte.

DISCUSIÓN

Según recomendaciones de las guías ESPGHAN, toda prueba utilizada para Dx de EC debe presentar una concordancia >95% con la prueba serológica de referencia a-Em (15). En nuestro caso, la prueba de IgA a-Tgt2 utilizada para pesquisa mostró una concordancia de 96%. Por curva ROC se estableció el valor de corte en 11 UI/L, el cual no difiere significativamente del valor sugerido por el fabricante (10 UI/L). La técnica de IgA a-Tgt2 utilizada en nuestro laboratorio presenta una exactitud diagnóstica elevada (98,2%). Además, los valores de RV indican que IgA a-Tgt2 es una prueba con gran utilidad diagnóstica.

Van Meensel et al. evaluaron la exactitud diagnóstica de 10 equipos comerciales de ELISA para la detección de IgA a-Tgt2 y observaron que todos mostraron un buen rendimiento. La linealidad fue buena y la interferencia de hemoglobina, bilirrubina y lipemia fue ausente o mínima. Encontraron una alta correlación entre los métodos de los diferentes fabricantes, pero la concordancia fue baja. Lo que significa que el valor de IgA a-Tgt2 no es intercambiable entre distintos equipos de ELISA. Los autores sugieren que tanto la comunidad científica como el sector privado comercial deberían comprometerse a los efectos de armonizar los distintos ensayos (19).

La Bx gastrointestinal es considerada el estándar de oro para el Dx de EC, pero con la llegada de pruebas serológicas más sensibles y específicas, esta situación está siendo cuestionada ya que con Acs específicos positivos y clínica clara, la biopsia no sería mandatoria (20,21). En una cohorte, 48 de 49 niños con niveles de IgA a-Tgt2 superiores

a 5 veces el valor de corte tuvieron Bx con atrofia total (19). En nuestro estudio observamos que en niños y adolescentes con sospecha clínica de EC, un resultado de IgA a-Tgt2 > 65 UI/mL (>5,9 veces el valor de corte) es absolutamente predictivo de EC, siendo este valor más bajo que lo sugerido en las guías ESPGHAN. Dos de los cuatro pacientes con Bx normales, tuvieron a-Em negativos, siendo los valores de IgA a-Tgt2 cercanos al valor del corte. Los dos pacientes restantes con Bx normales mostraron positividad para a-Em, con valores de IgA a-Tgt2 elevados; es posible que estos paciente desarrollen EC en un futuro o hayan sido falsos negativos de las Bx gastrointestinales (22).

De los 217 pacientes estudiados, 73 resultaron con IgA a-Tgt2 positivos; el 75% de ellos con IgA a-Tgt2 superiores al valor positivo alto obtenido. La demora entre los resultados serológicos y la confirmación diagnóstica por Bx varió de 1 a 5 meses. Utilizando el valor positivo alto de IgA a-Tgt2 serían evitados casi dos tercios de endoscopías, procedimiento invasivo y costoso, y además el tratamiento podría ser instaurado con mayor rapidez.

Cabe destacar que 6 pacientes \leq 2 años con valores de IgA a-Tgt2 mayores al valor positivo alto, mostraron Bx confirmatorias de EC y a-Em positivo, a pesar de reportes previos de problemas por la utilización de IgA a-Tgt2 como pesquisa en este grupo etario (23).

Nuestros datos confirman, que la Bx no es requerida cuando los niveles de IgA a-Tgt2 son superiores a 5,9 veces el valor de corte. Sin embargo, sí es necesaria cuando los valores de los IgA a-Tgt2 sean menores a este corte, para excluir el Dx de EC en pacientes con falsos positivos serológicos a pesar que una proporción de ellos pueden tener una EC potencial o desarrollarla a futuro (24).

Por otro lado, las Bx con lesiones histológicas parcheadas son difíciles de interpretar a pesar de que la cuantificación de los linfocitos intraepiteliales y la inmunohistoquímica pueden ayudar a indicar EC; siendo que la mayoría de los laboratorios no cuentan con estas técnicas disponibles. En los casos de valores de IgA a-Tgt2 cercanos al valor de corte, el VPP de la prueba es de 97-98%, siendo necesaria la Bx. La importancia de este estudio es que establece el valor de IgA a-Tgt2 que determina qué pacientes mostrarán lesiones intestinales características de EC.

Gidrewicz et al. concluyen que la prueba de detección de IgA a-Tgt2 es de alta sensibilidad para la detección de EC con un VPN del 99,4%.

Además, demuestran que si un valor positivo de IgA a-Tgt2 es acompañado de a-Em positivo mejora el VPP de la prueba y recomiendan evaluar el rendimiento del ensayo antes de que un centro aplique los criterios de no realizar Bx de las guías ESPGHAN (25). Es por ello que varios grupos han definido sus valores positivos altos (18,26), mostrando la importancia de definir el propio valor positivo alto en la población de trabajo y con el equipo utilizado.

Otros autores comprueban que distintos equipos de ELISA para IgA a-Tgt2 tienen un rendimiento superior a las pruebas serológicas que detectan a-Em y a-DGP. Con estos datos, sugieren que no es necesario confirmar un valor de IgA a-Tgt2 positivo con a-Em. Existen trabajos que señalan que los a-Em reconocen otros antígenos además de la Tgt (27,28). En nuestro caso, no detectamos IgA a-Tgt2 negativos con a-Em positivos; por el contrario, el ensayo detectó dos muestras con IgA a-Tgt2 positivas con a-Em negativos. Esto indica que los ensayos de segunda generación de IgA a-Tgt2 son más sensibles que los a-Em, además de ser una técnica más objetiva. Por otro lado, realizando IgA a-Tgt2 y a-Em obtuvimos buenos resultados, sin necesidad de hacer genotipificación HLA, técnica que no es factible de realizar en nuestro centro, reservando esta metodología solo para aquellos casos en los que la serología y la Bx resultan no concluyentes.

CONCLUSIÓN

El reactivo utilizado para pesquisa de EC en nuestra población mostró una elevada exactitud diagnóstica. Los niños y adolescentes con signos y síntomas sugestivos de EC que presenten IgA a-Tgt2 > 5,9 veces el valor de corte tienen alta probabilidad de presentar atrofia vellositaria. En estos casos el médico pediatra podría diagnosticar EC confirmando con a-Em, sin necesidad de realizar la Bx duodenal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burgin-Wolf A, Hadziselimovic F. Coeliac disease. *Lancet* 2003; 362: 1418–9.
2. Ministerios de Salud de la Nación, Enfermedad Celíaca, ¿Qué es?, <http://www.msal.gov.ar/index.php/component/content/article/48/125-enfermedad-celiaca>, 22 de Diciembre de 2016.
3. Ponce García J, Vivas Alegre S y Santolaria Piedrafita S. Tratamiento de las enfermedades gastrointestinales. Enfermedad Celíaca. 3º Edición. Editorial Elsevier 2011. España.
4. Arranz Bravo E, Garrote J A. Enfermedad celíaca: Introducción al conocimiento actual de la Enfermedad Celíaca. Diagnóstico de Enfermedad Celíaca. 2º Edición. Editorial Ergon 2011. España.
5. Prause C, Ritter M, Probst C. et al. Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49:52-8.
6. Lewis N, Scott B. Meta-analysis: Deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for celiac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31:73-81.
7. Lock RJ, Gilmour JE, Unsworth DJ. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulín autoantibodies - The antibody trinity of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:258-62.
8. Polanco Allué. Enfermedad celíaca presente y futuro - Utilidad de los marcadores serológicos: Anticuerpos antiendomiso. Editorial Ergón 2013.
9. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3:797-801.
10. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115:1322-8.
11. Dieterich W, Laag E, Schopper H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease *Gastroenterology* 1998;115:1317-21.
12. Abdulkarim AS, Murray JA. Review article: the diagnosis of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:987-95.

13. Chan AW, Butzner D, Mc Kenna R et al. Tissue transglutaminase enzyme linked immunosorbent assay as a screening test for celiac disease in pediatric patients. *Pediatrics* 2001; 107:1-8.
14. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N et al. The role of antitissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56:389-93.
15. Husby S, Koletzko S, Korponay- Szabó IR et al. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of celiac disease. *JPGN* 2012; 54: 136-160.
16. Dahlbom P, Olsson M, Kazemi Forooz N et al. Immunoglobulin G (IgG) anti tissue transglutaminase antibodies used as markers for IgA deficient celiac disease patients. *Clin and Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 254-8.
17. Korponay- Szabó IR, Dahlbom I, Laurila K et al. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut* 2003; 52:1567-71.
18. Barker C, Mitton C, Jevon G et al. Can tissue transglutaminase antibody titers replace small bowel biopsy to diagnose celiac disease in select pediatric populations? *Pediatrics* 2005; 115:1341-6.
19. Van Meensel B, Hiele M, Hoffman I, et al. Diagnostic accuracy of ten second generation (human) tissue transglutaminase antibody assays in celiac disease. *Clin Chem* 2004; 50: 2125–35.
20. Scoglio R, Di Pasquale G, Pagano G et al. Is intestinal biopsy always needed for diagnosis of celiac disease? *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1325–31.
21. Barker CC, Mitton C, Jevon G et al. Can tissue transglutaminase antibody titers replace small-bowel biopsy to diagnose celiac disease in select pediatric populations? *Pediatrics* 2005; 115:1341–6.
22. Holmes GKT. Potential and latent coeliac disease. *Eur J Gastroenterol* 2001; 13: 1057–60.
23. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease: report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65:909 –11.
24. Hill PG, Holmes GK. Coeliac disease: a biopsy is not always necessary for Diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27, 572–7.

25. Gidrewicz D, Potter K, Trevenen C et al. Evaluation of the ESPGHAN Celiac Guidelines in a North American Pediatric Population. *Am J Gastroenterol* 2015; 110:760–7.
26. Mubarak A, Wolters VM, Gmelig-Meyling FH et al. Tissue transglutaminase levels above 100 U/mL and celiac disease: a prospective study. *World J Gastroenterol* 2012; 18:4399-403.
27. 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.
28. Uhlig HH, Lichtenfeld J, Osman AA, et al. Evidence for existence of coeliac disease autoantigens apart from tissue transglutaminase. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:1017–20.