

Umestitev laboratorijskih preiskav v nove smernice za diagnostiko celiakije pri otrocih in mladostnikih

Laboratory testing according to the new guidelines for the diagnosis of paediatric celiac disease

Tinka Hovnik^{1,2}

¹ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

Avtor za korespondenco:

doc. dr. Tinka Hovnik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana, e-pošta: tinka.hovnik@kclj.si

POVZETEK

Napredek laboratorijskega testiranja v zadnjih letih je spremenil diagnostični algoritem in spremljanje celiakije. Dokončna potrditev diagnoze je kompleksna in osnovana na kombinaciji kliničnih, seroloških in histopatoloških izsledkov. Smernice ESPHGAN za potrditev celiakije iz leta 2012 so prvič predvidele opustitev biopsije sluznice tankega črevesa pri skupini simptomatskih otrok z zelo povišanimi vrednostmi serumskih protiteles (TGA-IgA \geq 10-krat nad zgornjo mejo normale). Smernice so bile leta 2020 ponovno revidirane in posodobljene v skladu z dokazi podprte medicine (EBM). Kot osnovni presejalni test pri otrocih s sumom na celiakijo in asimptomatskih bolnikih s povišanim tveganjem za celiakijo se priporoča določanje celokupnih protiteles IgA in specifičnih protiteles TGA-IgA. Pri pristopu brez biopsije se priporoča testiranje protiteles EMA-IgA v sekundarnem serumskem vzorcu. Molekularno-genetsko določanje HLA-DQ2 in HLA-DQ8 pri bolnikih s pozitivno serologijo ni več potrebno, ima pa visoko negativno napovedno vrednost pri skupini asimptomatskih bolnikov.

Ključne besede: celiakija, diagnostika, serološke preiskave, genetske preiskave, TGA, EMA

ABSTRACT

Advances in laboratory testing in recent years have changed the diagnostic algorithm and monitoring of celiac disease (CD). The diagnosis of CD is complex and based on combination of clinical, serological and histopathological information. ESPHGAN guidelines for CD diagnosis in 2012 considered omission of duodenal biopsies in a subgroup of symptomatic children with very high auto antibody levels in serum (TGA-IgA \geq 10x upper limit of normal). In 2020, guidelines were revised and updated according to evidence-based medicine (EBM). They recommend testing for total IgA and TGA-IgA as initial screening in children with clinical suspicion of CD and asymptomatic children with higher risk. The CD diagnosis following the no-biopsy approach should be confirmed by a positive EMA-IgA testing in secondary serum sample. Molecular-genetic testing for HLA-DQ2 and HLA-DQ8 is not required in patients with positive serological tests, but has a high negative predictive value in a group of asymptomatic patients.

Key words: celiac disease, diagnostics, serological tests, genetic tests, TGA, EMA

»

CELIAKIJA

Celiakija je kronična, večorganska, avtoimuna bolezen, ki najpogosteje prizadene tanko črevo pri genetsko predisponiranih posameznikih (1). Ob uživanju gliadina in ostalih prolaminov v žitih se sprožita humoralni imunski odziv z nastajanjem značilnih protiteles (TGA, EMA, DGP) in celični imunski odziv (IFN- γ , TNF- α , IL), ki povzročita atrofijo resic in okvaro sluznice tankega črevesa (2). Klinična slika celiakije je zelo raznolika in se lahko kaže z nespecifičnimi znaki in simptomi (3). Med bolj specifičnimi je klasična slika malabsorpcije, pogoste so tudi bolečine v trebuhu in kronična diareja (4).

EPIDEMIOLOŠKI PODATKI

Prevalenca celiakije se je v zadnjih 50 letih močno povečala predvsem na račun sodobnejših diagnostičnih pristopov in presejalnih testov pri posameznikih s povišanim tveganjem za celiakijo. Ocenjujejo, da ima celiakijo nekje med 0,6 in 1 % splošne populacije, zato je ena najpogostejših genetsko pogojenih boleznih na svetu (6, 7). Pogostost pojavljanja celiakije je višja med sorodniki v prvem kolenu (5–10 %) ter pri bolnikih z avtoimunimi obolenji, kot so sladkorna bolezen tipa 1, bolezen ščitnice, avtoi-

Diagnosticiranje celiakije je kompleksno, zato bolezen pogosto ostaja neodkrita. Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN) je leta 1970 sprejelo enotna diagnostična merila za celiakijo, tako imenovana klasična merila, ki so temeljila na endoskopskem odvzemu vzorca sluznice tankega črevesa (biopsija). Šele revidirana merila ESPGHAN iz leta 2012 prvič ne temeljijo izključno na biopsiji. Od letošnjega leta so v veljavi nove, posodobljene ESPGHAN smernice 2020. Njihova priporočila so plod sistematičnega pregleda literature in ocene klinične uporabnosti (5).

muni hepatitis, selektivno pomanjkanje IgA ali revmatoidne bolezni (8). Zaradi raznolike klinične slike in številnih spremljajočih simptomov ostaja velik delež bolnikov neodkrit oziroma so tudi v srednji Evropi diagnosticirani z zamudo (9). Teorija ledene gore ponazarja manjši delež ustreznopoznanih bolnikov znotraj mnogo večje množice nediagnosticiranih s tiho oziroma latentno celiakijo in poudarja pomen presejalnih testov pri klinično asimptomatskih bolnikih (10).

LABORATORIJSKI TESTI ZA DOKAZOVANJE CELIAKIJE

Laboratorijska diagnostika celiakije je raznolika ter osnovana na kombinaciji serološkega testiranja, molekularno-genetske tipizacije in histopatološkega pregleda biopsije sluznice tankega črevesa. Nobeden od navedenih testov samostojno ne zadošča za potrditev diagnoze (4). Osnovni in izključno pri otrocih tudi samozadostni laboratorijski test je serologija, pri čemer morajo biti potrditveni serološki testi in biopsija opravljena v času normalnega prehranjevanja (11). Hkrati s tehnološkim razvojem metod se je spremenil nabor diagnostičnih testov, s katerimi potrjujemo celiakijo v laboratoriju.

Serološko testiranje za celiakijo značilnih protiteles

Serološko testiranje je neinvazivno in cenovno ugodno, zato se uporablja za potrjevanje celiakije in kot presejalni test pri

bolnikih s sumom na celiakijo. Pri otrocih in mladostnikih lahko s stopenskim določanjem protiteles v dveh različnih vzorcih seruma diagnozo dokončno potrdimo, medtem ko pri odraslih ostaja zlati standard endoskopska preiskava in histopatološki pregled biopsije črevesne sluznice (12). Prvotno v serumu bolnikov s sumom na celiakijo vedno določamo **celokupno koncentracijo imunoglobulinov IgA**, da izključimo lažno negativen rezultat v primeru selektivnega pomanjkanja IgA protiteles (13). Če je njihova koncentracija znižana, določamo protitelesa razreda IgG (14,15).

Med specifična protitelesa, ki so najbolj značilna za celiakijo, uvrščamo protitelesa proti tkivni transglutaminazi (TGA) razreda IgA in IgG, protitelesa proti endomiziju (EMA) razreda IgA in IgG ter protitelesa proti deamidiranim gliadinskim peptidom (DGP) razreda IgA in IgG. Določanje pro-

titeles proti gliadinu (AGA) se zaradi nizke specifičnosti in občutljivosti testa za potrjevanje diagnoze v klinični praksi ne priporoča več (16). Vsi serološki testi imajo visoko pozitivno napovedno vrednost – PNV, kar pomeni, da pozitiven rezultat z veliko verjetnostjo potrjuje diagnozo. Spodnja tabela prikazuje občutljivost in specifičnost seroloških testov različnih, za celiakijo značilnih protiteles (Tabela 1).

Največjo specifičnost izkazujejo protitelesa EMA (99 %), zato so najprimernejša za potrjevanje bolezni, medtem ko je visoka občutljivost protiteles TGA (98 %) primernejša za presejanje (4). Občutljivost testov lahko povečamo s kombinacijo več različnih, vendar se ob tem zniža specifičnost, zato to ni priporočljivo pri preiskovancih z nižjo verjetnostjo za celiakijo (11).

Tabela 1: Občutljivost in specifičnost različnih seroloških testov (povzeto po Al-Toma et al., 2019)

Table 1: Sensitivity and specificity of different serological tests (according to Al-Toma et al., 2019)

Antigen	Tip protiteles	Občutljivost,%(rang)	Specifičnost,%(rang)
Gliadin	IgA	85 (57-100)	90 (47-94)
	IgG	80 (42-100)	80 (50-94)
Endomizij	IgA	95 (86-100)	99 (97-100)
	IgG	80 (70-90)	97 (95-100)
Tkivna transglutaminaza	IgA	98 (78-100)	98 (90-100)
	IgG	79 (45-95)	95 (94-100)
Deamidirani gliadinski peptidi	IgA	88 (74-100)	90 (80-95)
	IgG	80 (70-95)	98 (95-100)

Tkivna transglutaminaza (tTG) je encim velikosti 76 kD, sestavljen iz 686 aminokislin in v telesu opravlja različne fiziološke funkcije, katalizira kovalentno prečno povezavo proteinov z glutaminskimi ostanki, sodeluje pri regulaciji celične proliferacije, diferenciacije in apoptoze (17, 18). Encim tTG ima poglavito vlogo v patogenezi celiakije, deamidira glutaminske ostanke gliadina ter s tem olajša njegovo vezavo na molekule histokompatibilnostnega kompleksa na antigen predstavitvenih celicah (19). Imunogeni gliadin prepoznajo limfociti CD4, katerih aktivacija sproži tako celični imunski odziv preko tvorbe inflamatornih citokinov kot tudi humoralni imunski odziv z nastajanjem različnih protiteles (20). Določanje protiteles proti tkivni transglutaminazi razreda IgA (TGA-IgA) je najbolj razširjen in uporabljen test pri diagnosticiranju celiakije, občutljivost in specifičnost testa pri nezdravljenih bolnikih je nad 98 %. Protitelesa TGA-IgA/IgG do-

ločamo z encimsko-immunskim testom (ELISA) ali redkeje radio-immunskim testom (RIA). Višji kot je titer protiteles TGA, večja je verjetnost za resnično pozitiven rezultat (4). Za neinvazivno testiranje večjih populacij so na voljo tudi hitri presejalni testi za kakovostno določanje specifičnih protiteles, ki temeljijo na imunokromatografski metodi.

Protitelesa proti endomiziju (EMA) so bila prvi pomembnejši diagnostični test za potrjevanje celiakije, še posebej pa je bilo pomembno odkritje leta 1997, da je TGA tarčni antigen za endomizijska protitelesa (21). Protitelesa EMA določamo na osnovi indirektno imunofluorescence (IIF) na antigenem substratu (tkivo opičjega požiralnika, človeške popkovnice ali celične linije). Avtoprotitelesa iz seruma se vežejo na antigene na objektnem steklu, dodamo sekundarno protitelo, označeno s fluorescentnim barvilom, nato pod fluorescenčnim mikroskopom pri valovni »

dolžini 515 nm opazujemo različne tipe in jakosti imunofluorescence. Številne študije so potrdile, da je določanje protiteles TGA najbolj občutljiv in določanje protiteles EMA najbolj specifičen test za potrjevanje celiakije (10, 22).

Deamidirani gliadinski peptidi (DGP) nastajajo po deamidaciji gliadina s TGA v sluznici tankega črevesa samo v primeru celiakije. Test DGP-IgA ima sprejemljivo, vendar nižjo pozitivno napovedno vrednost (70 %) kot določanje protiteles TGA-IgA. Določamo ga z encimsko-immunskim testom. Določanje protiteles DGP in TGA razreda IgG skupaj je najboljši pristop za potrjevanje celiakije pri osebah s selektivnim pomanjkanjem IgA (4, 16).

Molekularno-genetsko testiranje celiakije – HLA-DQ2 in HLA-DQ8 tipizacija

Celiakija je multifaktorska bolezen, pri njenem nastanku sodelujejo tako okoljski (gliadin in ostali prolamini v žitih) kot tudi genetski dejavniki. Glavno vlogo pri razvoju celiakije pripisujejo genom poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa, pri človeku HLA (humani levkocitni antigeni) (23).

Avstralska študija na skupini 356 bolnikov s celiakijo je pokazala, da je HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 pozitivnih skupno kar 99,6 % bolnikov, ter da je proizvodnja TGA ali EMA protiteles odvisna od prisotnosti genov HLA-DQ2/DQ8. Večina bolnikov (95 %) ima prisotno alelni varianti HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02), redki (cca. 5 %) pa varianto HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) (24). Prav tako je velika vseevropska študija na 1008 preiskovancih potrdila izjemno nizko stopnjo odsotnosti nosilcev DQ2 ali DQ8 alelov med bolniki s celiakijo (61/1008) (25). Posamezniki, ki imajo dvojno kopijo DQB1*02 (DR3-DQ2 homozigoti ali DR3-DQ2/DR7-DQ2 heterozigoti), imajo izrazito povečano tveganje za razvoj celiakije (24, 25). Glede na dejstvo, da so aleli HLA DQ2/DQ8 pogosto prisotni tudi v splošni populaciji, ima test nizko specifičnost in se zato ne uporablja za potrjevanje bolezni. Kljub nizki specifičnosti pa ima tipizacija HLA-DQ2 in HLA-DQ8 zelo visoko negativno napovedno vrednost (99 %), zato so genetski

testi uporabni za izključevanje celiakije pri ljudeh z visokim tveganjem (SBT1, ostala avtoimuna obolenja) in pri bolnikih, pri katerih težko postavimo diagnozo zaradi nasprotujočih si izvidov (5).

Prisotnost alelov HLA-DQ2 in HLA-DQ8 določamo z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (real-time PCR ali qPCR) s hidrolizirajočimi sondami za detekcijo specifičnih zaporedij (TaqMan). Sonde sestavljajo oligonukleotidna zaporedja z dušilnim in reporterskim barvilom, pri čemer dušilno barvilo zaradi bližine ne omogoča absorpcije in emisije reporterskega. Med pomnoževanjem polimeraza v realnem času s svojo eksonukleazno aktivnostjo razgradi sondo za detekcijo specifičnih zaporedij, ki se nahaja sredi matrične DNA med začetnima oligonukleotidoma. Pri razgradnji sond se sprosti reportersko barvilo, ki tako ni več v bližini dušilnega in zato fluorescira pri značilni valovni dolžini ter omogoča spremljanje pomnoževanja produkta ter s tem prisotnost specifičnega alela. Obstajajo različni diagnostični kompleti za detekcijo HLA, vendar nobeden ne omogoča določitve vseh možnih alelnih variant (26, 27).

Histopatološka analiza sluznice tankega črevesa

Biopsija sluznice tankega črevesa je dolga leta veljala za **zlati standard v diagnostiki celiakije**. Pri bolnikih se na sluznici pojavljajo značilne morfološke spremembe, ki se kažejo z atrofijo črevesnih resic, poglobitvijo kript v črevesni sluznici in pomnožitvijo limfocitov med epitelnimi celicami (28). Za ocenjevanje stopnje okvare sluznice se uporablja modificirana Marsh-Oberhuberjeva klasifikacija, s katero spremembe sluznice tankega črevesa razvrstimo v stopnje od 0 do 3 (Tabela 2) (29, 30, 31). Za celiakijo so najznačilnejše spremembe 3. stopnje, ki jih delimo še na podskupine 3a, 3b in 3c. Ključno merilo pri opredelitvi celiakije je atrofija oziroma krajšanje črevesnih resic. Za dokončno potrditev celiakije je treba opraviti vsaj štiri biopsije distalnega dela dvanajstnika in vsaj eno biopsijo začetnega bulbosa dvanajstnika v času normalnega vnosa glutena (31, 32).

Tabela 2: Modificirana Marsh-Oberhuberjeva klasifikacija histopatoloških sprememb pri celiakiji (povzeto po Oberhuber et al., 2000)**Table 2:** Modified Marsh-Oberhuber classification of histopathological changes in celiac disease (adopted from Oberhuber et al., 2000)

Stopnja po Marshu	Število intraepitelnih limfocitov / 100 enterocitov dvanajstnika	Hiperplazija kript	Črevesne resice oz. vilusi
0	<40	Ni prisotna	Normalne
1	>40	Ni prisotna	Normalne
2	>40	Prisotna	Normalne
3 a	>40	Prisotna	Blaga atrofija
3 b	>40	Prisotna	Zmerna atrofija
3 c	>40	Prisotna	Popolna atrofija

NOVE SMERNICE ZA DIAGNOSTIKO CELIAKIJE PRI OTROCIH IN MLADOSTNIKI

Klasične smernice Evropskega združenja za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano so bile revidirane leta 1990, leta 2012 pa so doživele temeljito prenovu. Glavna novost smernic ESPGHAN iz leta 2012 je bila, da lahko gastroenterolog pri otrocih in mladostnikih z znaki ali simptomi, ki kažejo na celiakijo, postavi diagnozo brez biopsije sluznice tankega črevesa (12, 15, 33). Pri tem pristopu morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

- v serumu morajo biti vrednosti TGA-IgA ≥ 10 -krat nad zgornjo mejo normalnih vrednosti;
- protitelesa EMA morajo biti pozitivna v sekundarnem serumskem vzorcu;
- genetski testi za HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 morajo biti pozitivni.

V letu 2019 sta obe največji evropski strokovni združenji za celiakijo, ESPGHAN (primarno za otroško populacijo) in Evropsko združenje za preučevanje celiakije, EScCD (primarno za odrasle) izkazali potrebo po posodobitvi obstoječih smernic za vodenje celiakije ter ostalih z glutenom povezanih bolezni (4, 5). Delovna skupina za celiakijo, imenovana pri ESPGHAN, je temeljito preučila klinična in diagnostična vprašanja ter v skladu z dokazi podprte medicine izdala

nove posodobljene smernice za diagnostiko celiakije 2020 pri otrocih in mladostnikih (5).

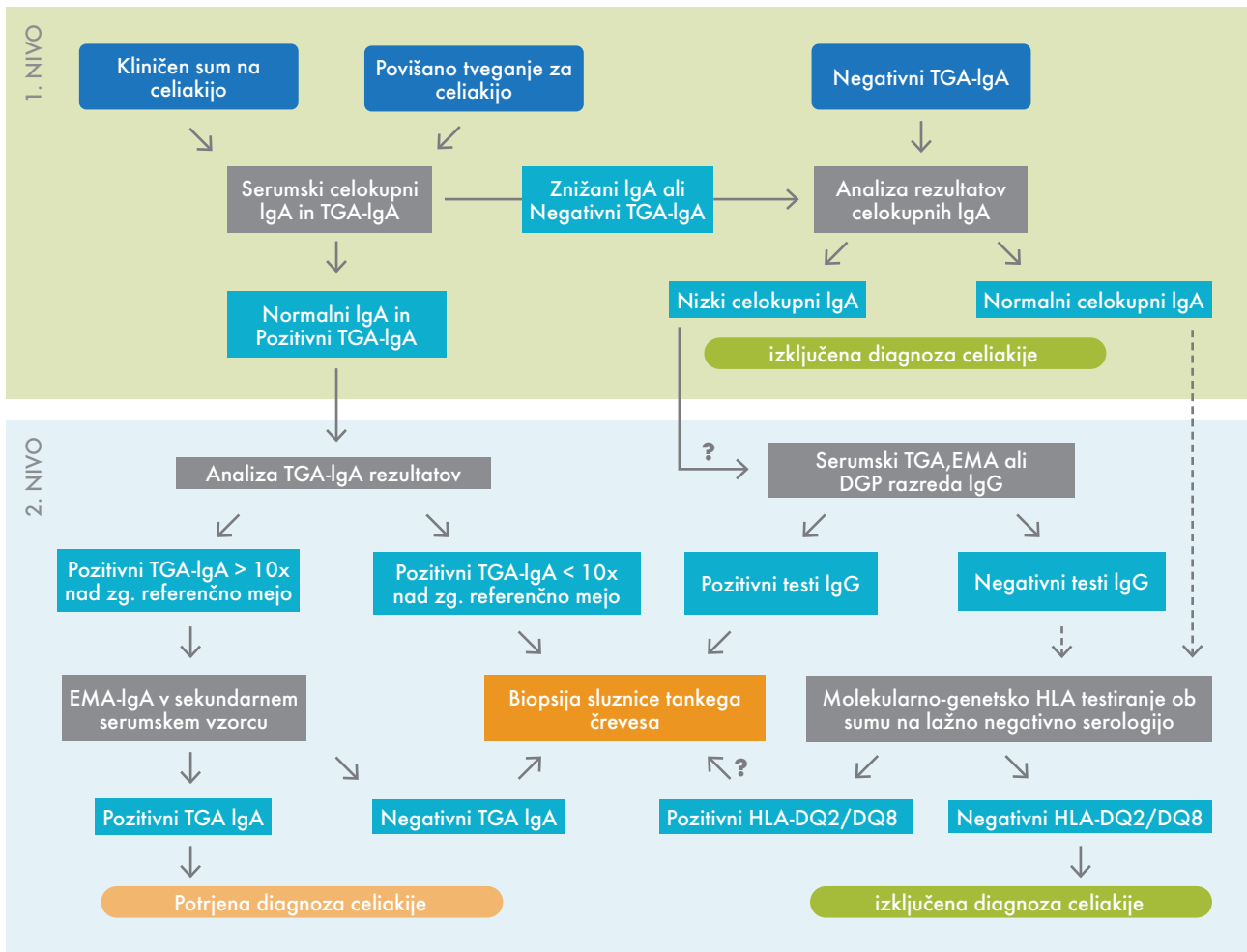
Klinična slika celiakije je zelo raznolika, zato je po novih smernicah testiranje na celiakijo priporočeno ob naslednjih kliničnih znakih in simptomih (5, 34):

- **gastrointestinalni znaki:** kronična ali občasna diareja, kronično zaprtje, abdominalne bolečine, ponavljajoča se slabost in bruhanje;
- **ekstraintestinalni znaki:** izguba teže, zaostanek v rasti, pozna puberteta in amenoreja, nevropatija, artritis, kronična anemija zaradi pomanjkanja železa, zmanjšana kostna gostota (osteopenija, osteoporoz), kronična utrujenost, artritis, kronična anemija zaradi pomanjkanja železa, ponavljajoče se razjede v ustih, kožni izpuščaj, nepravilnosti zobne sklenine;
- **specifična stanja:** sorodnik v prvem kolenu s celiakijo, avtoimunska obolenja (SBT1, bolezni ščitnice, jetrne bolezni), pomanjkanje IgA, Downov sindrom, Turnerjev sindrom, Williams-Beuren sindrom.

Dokončna potrditev celiakije je kompleksna in osnovana na kombinaciji kliničnih, seroloških in histopatoloških izsled- »

kov. Medtem ko pri odraslih ostaja zlati standard endoskopska preiskava s histopatološkim pregledom biopsije, lahko pri pediatričnih bolnikih postavimo diagnozo tudi brez biopsije tankega črevesa samo na podlagi serološkega testiranja (34,

35). Posodobljeni so tudi algoritmi, ki se v osnovi razlikujejo med bolniki s kliničnimi znaki oziroma bolniki s povišanim tveganjem za celiakijo (asimptomatski bolniki) ter bolniki s selektivnim pomanjkanjem IgA (Slika 1).



Slika 1: Diagnostični algoritem laboratorijskih testov pri potrjevanju celiakije (prirejeno po Husby et al., 2020). 1. Primarni nivo: osnovni testi. 2. Specialistični nivo: potrditveni testi

Figure 1: Diagnostic algorithm of laboratory testing in celiac disease (adopted and simplified after Husby et al., 2020). 1. Primary care: initial testing, 2. Specialist care: confirmatory testing

Legenda:

-> ob ponovljenih normalnih celokupnih IgA in kliničnem sumu je treba upoštevati možnost lažno negativne serologije ter razmisliti o izvedbi molekularno-genetskega HLA testiranja

? potreben je posvet med bolnikom, starši in pediatričnim gastroenterologom

»

Kot osnovni presejalni test pri bolnikih s sumom na celiakijo in asimptomatskih bolnikih s povišanim tveganjem za celiakijo se priporoča določanje celokupnih IgA in protiteles TGA-IgA (36). Pri tem se diagnostični postopek ne razlikuje med simptomatskimi in asimptomatskimi bolniki (4). Pri skupini otrok in mladostnikov, ki kažejo značilne klinične znake za celiakijo ter serološka testiranja pokažejo normalne vrednosti celokupnih IgA in hkrati zelo povišane vrednosti protiteles TGA-IgA (več kot 10-krat nad zgornjo mejo normale), lahko postavimo diagnozo brez biopsije sluznice tankega črevesa (37). Prisotnost specifičnih protiteles EMA-IgA moramo v tem primeru potrditi v drugem serumskem vzorcu, medtem ko se genetsko testiranje ne priporoča več (5, 33, 35). Pogojno priporočilo je, da lahko celiakijo diagnosticiramo brez biopsije črevesne sluznice tudi pri asimptomatskih otrocih, če so upoštevana enaka merila kot pri otrocih s simptomi. Ob tem je treba upoštevati, da je raven TGA-IgA pri simptomatskih otrocih višja kot pri asimptomatskih. Če so rezultati začetnega serološkega testiranja pozitivni, morajo biti bolniki napoteni na specialistično obravnavo na sekundarnem/terciarnem nivoju, kjer imajo možnost multidisciplinarnе obravnave (gastroenterolog, dietetik, psiholog ter ostali specialisti po potrebi) (5).

ZAKLJUČEK

V prihodnjih letih bo ključno spremljanje implementacije novih smernic za določanje celiakije in natančno upoštevanje priporočil v sklopu laboratorijskih testov. Pojavlja se potreba po enotnem standardu, ki bo omogočil neposredno primerjavo različnih seroloških testov za določanje

Pri posameznikih z normalno vrednostjo celokupnih IgA je najprimernejši serološki test za diagnozo celiakije določanje protiteles TGA-IgA ne glede na starost. Drugačen je diagnostični postopek pri bolnikih z nizkimi celokupnimi vrednostmi IgA (pomanjkanje IgA), kjer se kot sekundarni test priporoča določanje protiteles proti TGA, EMA in/ali DGP razreda IgG. Ti testi pa niso primerni za osnovno presejalno testiranje v klinični praksi (13, 14, 15).

Če so vrednosti protiteles TGA-IgA nižje kot 10-krat nad zgornjo mejo, nove smernice priporočajo odvzem vsaj štirih bioptov distalnega dela dvanajstnika in vsaj enega biopta bulbosa dvanajstnika. Histološki pregled mora biti opravljen na optimalnih vzorcih. Če se rezultati serologije in histopatologije ne ujemajo, je priporočena ponovna ocena histopatoloških vzorcev. Bolnike z blagimi histološkimi spremembami (Marsh stopnje 0 ali 1) ali brez njih in pozitivnimi TGA-IgA in EMA-IgA je treba natančneje spremljati (4).

Molekularno-genetsko testiranje HLA-DQ2/DQ8 po novih smernicah 2020 pri potrjevanju celiakije brez biopsije ni več obvezno. Pogojno se priporoča pri skupini asimptomatskih bolnikov v povišanim tveganjem za celiakijo. Določanje značilnih alelov HLA-DQ2/DQ8 ima visoko negativno napovedno vrednost, če so rezultati negativni, je tveganje za celiakijo zelo nizko (4).

protiteles TGA-IgA. Nadaljnje klinične študije, predvsem na skupini asimptomatskih otrok s SBT1 in višjim tveganjem za razvoj celiakije, bodo potrdile pravilnost in uporabnost priporočil pri diagnosticiranju brez biopsije sluznice tankega črevesa.

LITERATURA

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013 Jan;62(1):43-52.
2. Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr*. 2018;6:350.
3. Riznik P, De Leo L, Dolinsek J, Gyimesi J, Klemenak M, Koletzko B, et al. Clinical Presentation in Children With Coeliac Disease in Central Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2021;72(4):546-551.
4. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders DS, Cellier C, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterol J*. 2019;7(5):583-613.
5. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020;70(1):141-156.

»

6. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(10):1538-44; quiz 1537, 1545.
7. Altobelli E, Paduano R, Petrocelli R, Di Orio F. Burden of celiac disease in Europe: a review of its childhood and adulthood prevalence and incidence as of September 2014. *Ann Ig*. 2014;26(6):485-98.
8. Riznik P, De Leo L, Dolinsek J, Gyimesi J, Klemenak M, Koletzko B et al. Diagnostic Delays in Children With Coeliac Disease in the Central European Region. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2019;69(4):443-448.
9. Ludvigsson JF, Murray JA. Epidemiology of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019;48(1):1-18..
10. Costa Gomes R, Cerqueira Maia J, Fernando Arrais R, Nunes Jarobá CA, Carvalho Rocha MA, Felinto Brito ME, The celiac iceberg: from the clinical spectrum to serology and histopathology in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and Down syndrome. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(2):178-85.
11. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA; American College of Gastroenterology. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656-76.
12. Meis M, Adamiak T. Pediatric Celiac Disease - A Review. *S D Med*. 2018;71(12):559-564.
13. Rittmeyer C, Rhoads JM. IgA deficiency causes false-negative endomysial antibody results in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996;23(4):504-6.
14. Kumar V, Jarzabek-Chorzelska M, Sulej J, Karnewska K, Farrell T, Jablonska S. Celiac disease and immunoglobulin a deficiency: how effective are the serological methods of diagnosis? *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(6):1295-300.
15. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(1):136-60.
16. Leffler DA, Schuppan D. Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(12):2520-4.
17. Amantea G, Cammarano M, Zefferino L, Martin A, Romito G, Piccirillo M, Gentile V. Molecular mechanisms responsible for the involvement of tissue transglutaminase in human diseases: Celiac Disease. *Front Biosci*. 2006;11:249-55.
18. Martin A, De Vivo G, Iannaccone M, Stefanile A, Serrettiello E, Gentile V. Pathophysiological roles of transglutaminase - catalyzed reactions in the pathogenesis of human diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(4):278-84.
19. Molberg O, McAdam SN, Sollid LM. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30(3):232-40.
20. Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):746-53.
21. 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;3(7):797-801.
22. Yagil Y, Goldenberg I, Arnon R, Ezra V, Ashkenazi I. Serologic testing for celiac disease in young adults--a cost-effect analysis. *Dig Dis Sci*. 2005;50(4):796-805.
23. Taylor AK, Lebowitz B, Snyder CL, Green PHR. Celiac Disease. 2008 [updated 2019 Jan 31]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.
24. Anderson RP, Henry MJ, Taylor R, Duncan EL, Danoy P, Costa MJ, et al. A novel serogenetic approach determines the community prevalence of celiac disease and informs improved diagnostic pathways. *BMC Med*. 2013;11:188.
25. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003;64(4):469-77.
26. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YK. Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. *Arq Gastroenterol*. 2015;52(2):143-6.
27. Fasano ME, Dametto E, D'Alfonso S. HLA Genotyping: Methods for the Identification of the HLA-DQ2,-DQ8 Heterodimers Implicated in Celiac Disease (CD) Susceptibility. *Methods Mol Biol*. 2015;1326:79-92.
28. Siriweera A, Zhengyan Qi and Yong J. Validity of Intraepithelial Lymphocyte Count in the Diagnosis of Celiac Disease: A Histopathological Study. *International Journal of Celiac Disease*. 2015; 3(3 4):156-158.
29. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(10):1185-94.
30. Marsh MN. Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut* 1990;31:111-4.
31. Corazza GR, Villanacci V. Coeliac disease. *J Clin Pathol* 2005;58:573-4.
32. Villanacci V, Magazzù G, Pellegrino S, Gambarotti M, Sferlazzas C, Tuccari G, Bassotti G. Comparison of the Marsh-Oberhuber classification with a new grading system in identifying patients with latent celiac disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2010;56(4):371-5.
33. Janša R, Zavrtnik M, Siuka D et al. Slovenian standards for the diagnosis and treatment of patients with celiac disease. *Gastroenterolog*. 2017;21(1): 4-11.
34. Khatib M, Baker RD, Ly EK, Kozielski R, Baker SS. Presenting Pattern of Pediatric Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(1):60-3.
35. Wolf J, Petroff D, Richter T, Auth MKH, Uhlig HH, Laass MW, et al. Validation of Antibody-Based Strategies for Diagnosis of Pediatric Celiac Disease Without Biopsy. *Gastroenterology*. 2017;153(2):410-419.e17.
36. Ediger TR, Hill ID. Celiac disease. *Pediatr Rev*. 2014;35(10):409-15.
37. Werksstetter KJ, Korponay-Szabó IR, Popp A, Villanacci V, Salemme M, Heilig G, et al; ProCeDE study group. Accuracy in Diagnosis of Celiac Disease Without Biopsies in Clinical Practice. *Gastroenterology*. 2017;153(4):924-935.