

INDICE

INRODUZIONE

CAPITOLO 1 : LA CELIACHIA

1.1	Definizione.....	pag. 5
1.2	Epidemiologia.....	pag. 6
1.3.1	Genetica.....	pag. 9
1.3.2	Fattori ambientali.....	pag. 13
1.4	Eziopatogenesi.....	pag. 15
1.4.1.	Patogenesi.....	pag. 18
1.5	Presentazione clinica.....	pag. 20
1.6	Diagnosi.....	pag. 25
1.6.1	Test sierologici.....	pag. 27
1.6.2	Biopsia duodenale.....	pag. 28
1.7	Terapia.....	pag. 29
1.8	Terapie alternative alla dieta priva di glutine.....	pag. 31
1.9	Follow up.....	pag. 32

CAPITOLO 2: CONTAMINAZIONE DA GLUTINE NELLA DIETA GLUTEN-FREE

- 2.1. Contaminazione di glutine.....pag. 34
- 2.2. Determinazione del glutine negli alimenti tramite saggio ELISA R5 e G12/A1.....pag. 37

CAPITOLO 3: STUDIO SPERIMENTALE

3. Scopo della tesi.....pag. 40
- 3.1 Materiali e metodi.....pag. 40
- 3.1.1. I Pazienti.....pag. 40
- 3.1.2. Diario Alimentare.....pag. 41
- 3.1.3. Procedura del saggio ELISA R5.....pag. 43
- 3.1.4. Procedura del saggio ELISA G12/A1.....pag. 47

CAPITOLO 4: I RISULTATI.....pag. 50

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE.....pag. 58

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

Nonostante i significativi progressi nella conoscenza della epidemiologia, fisiopatologia, clinica e diagnosi della malattia celiaca, a tutt'oggi la dieta senza glutine (gluten-free diet, GFD) rimane l'unica terapia di comprovata efficacia nel trattamento di questa patologia.

Negli ultimi anni, inoltre, è stato evidenziato che i campi di applicazione di questo trattamento dietetico coinvolgono anche altri disturbi glutine-correlati, oltre la celiachia.

Sebbene sia concettualmente semplice pensare ad un trattamento che consiste nell'eliminazione del glutine dalla dieta, il cambiamento imposto ai soggetti affetti da malattia celiaca ha un profondo effetto sulle abitudini alimentari di tutta la famiglia. In particolare, le principali barriere sono rappresentate non solo dalla disponibilità e dai costi dei prodotti gluten-free, ma anche dalla sicurezza e dal rischio di contaminazione degli stessi; quest'ultimo è l'aspetto più rilevante, legato all'alimentazione fuori casa o all'assunzione involontaria di glutine con alimenti di produzione industriale, specialmente i prodotti "pronti da mangiare", ma anche alimenti naturalmente gluten-free possono essere contaminati durante il processo di raccolta, macinatura, conservazione e lavorazione.

Per tale motivo è necessaria una sorveglianza stretta della filiera produttiva, unitamente a regole stringenti sulla contaminazione e a verifiche analitiche sistematiche.

CAPITOLO 1: LA CELIACHIA

1.1. Definizione

La malattia celiaca (MC) o celiac disease (CD) è una patologia sistemica immuno-mediata scatenata dall'ingestione delle proteine del glutine, presente in molti cereali, quali frumento, farro, orzo, avena, segale, kamut, spelta e triticale¹⁻², che si manifesta in soggetti geneticamente predisposti.

Tra le frazioni proteiche che compongono il glutine, sono le prolamine che scatenano, nei soggetti predisposti, una reazione immunitaria T-linfocitaria anomala, determinando un processo infiammatorio cronico a carico della mucosa del piccolo intestino che conduce all'atrofia dei villi intestinali e conseguente malassorbimento.

Lo stato infiammatorio cronico della mucosa duodenale è reversibile con l'eliminazione del glutine dalla dieta e può recidivare con la sua reintroduzione³.

1.2. Epidemiologia

La prevalenza della malattia celiaca è aumentata significativamente negli ultimi 50 anni, l'aumento sostanziale del numero di nuovi casi è dovuto in gran parte all'impiego di tecniche diagnostiche più sensibili e specifiche, ma anche ad una maggiore conoscenza della patologia e all'applicazione di misure di prevenzione secondaria (screening delle popolazioni a rischio) ⁴⁻⁵.

L'intolleranza al glutine è ad oggi una delle patologie permanenti più frequenti in assoluto.

Nella popolazione europea e in altre aree del mondo (Nord e SudAmerica, Australia, Africa del Nord, Medio Oriente e parte del continente asiatico), la prevalenza della malattia si attesta tra 0,6-1%, (in Italia è stimata circa un 1 caso ogni 100), mentre in altre regioni, come l'Africa sub-sahariana e Giappone, sembra essere molto più bassa⁶, e comunque con un trend in aumento in molti paesi in via di sviluppo, probabilmente a causa dell'occidentalizzazione della dieta, dei cambiamenti nella produzione e nella lavorazione del frumento (Figura 1).

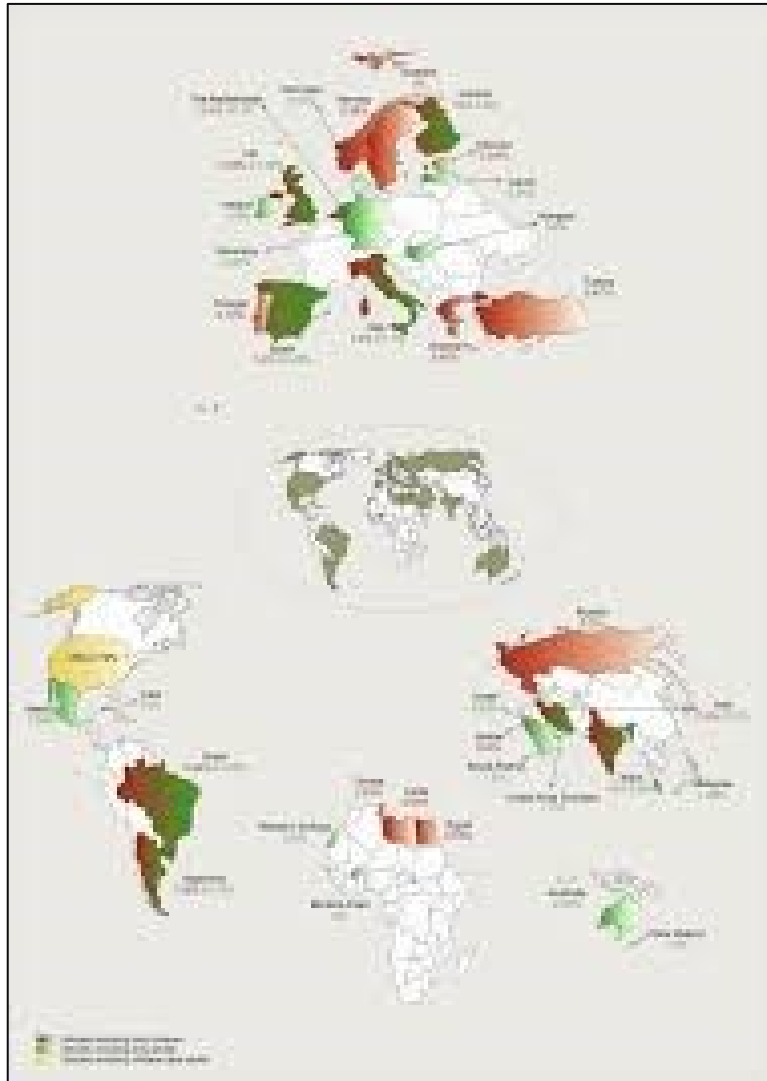


Figura 1 - Prevalenza della malattia celiaca nel mondo

La malattia celiaca sembra essere più frequente nelle donne con un rapporto femmina-maschio che va da 2:1 a 3:1 ⁷⁻⁸.

La frequenza della malattia risulta essere maggiore in alcuni gruppi di popolazione, definiti “popolazione a rischio”, come ad esempio, i familiari di primo grado del celiaco (10-15%), pazienti affetti da altre patologie

autoimmuni quali la tiroide di Hashimoto (5%) o il Diabete Mellito di tipo I (3-16%) ed i soggetti con patologie genetiche, quali la Sindrome di Down (5%), il deficit di IgA (9%) e la sindrome di Turner (3%)⁹⁻¹⁰.

La frequenza della malattia celiaca è notevolmente più elevata nei ~~figli~~ soggetti che hanno un familiare di primo grado affetto da MC.

Uno studio multicentrico ha riportato una percentuale del 5% sia nei parenti di primo grado che di secondo grado, mentre un altro studio ha mostrato addirittura una percentuale fino al 20% nei fratelli e del 10% nei parenti di primo grado. Il rischio più elevato è nei gemelli omozigoti che presentano una percentuale del 75%¹¹.

Nonostante i notevoli progressi fatti in campo diagnostico, sono numerosi ancora i casi che sfuggono alla diagnosi a causa di sintomatologia non tipica gastrointestinale, lieve o assente.

La teoria del “iceberg celiaco” (Figura 2), in cui i soggetti non diagnosticati rappresentano la porzione sommersa, esprime, in modo esaustivo, tale concetto¹².

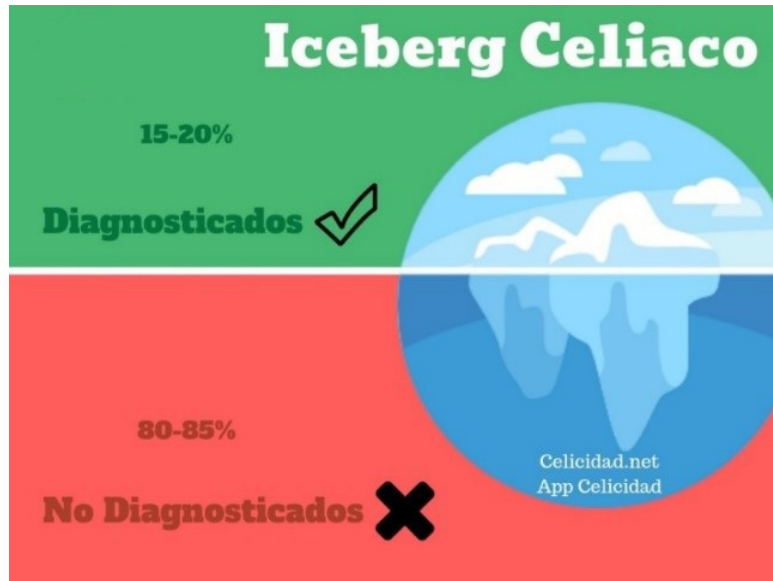


Figura 2 - Rappresentazione grafica dell'Iceberg Celiaco

1.3.1. Genetica

La malattia celiaca è una patologia multifattoriale (Figura 3) derivata da una complessa interazione tra patrimonio genetico e fattori ambientali, in presenza di cause scatenanti (infezioni, alterazioni del microbioma, alimentazione).

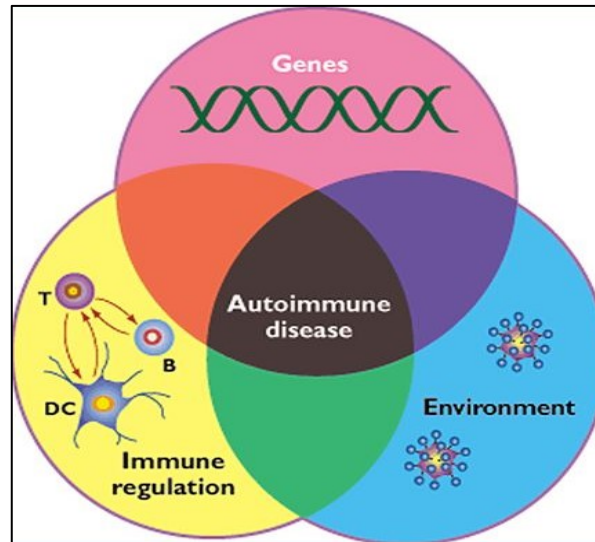


Figura 3 - Multifattorialità della malattia celiaca

Come accade per tutte le malattie autoimmuni, anche la MC ha una forte componente ereditaria, come testimoniato dall'alta ricorrenza familiare (10-15%) e dall'alta concordanza della malattia tra gemelli monozigoti (75-80%)¹³.

Il ruolo chiave dell'ereditarietà nella malattia celiaca è dovuto alla presenza dell'eterodimero HLA di classe II DQ, in particolare DQ2 e DQ8, alleli comuni ad altre malattie autoimmuni, situati sul braccio corto del cromosoma 6 (Figura 4)¹⁴⁻¹⁵.

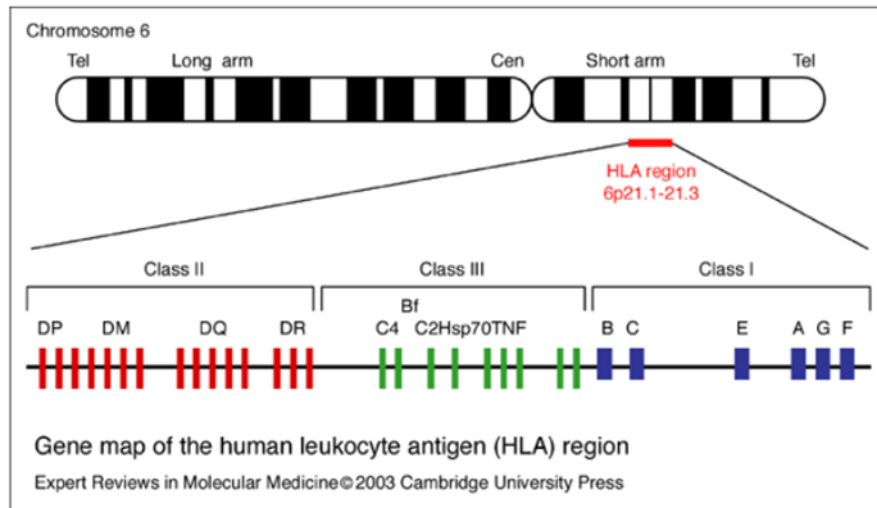


Figura 4 - Mappa della regione del cromosoma 6 che codifica gli antigeni leucocitari

La maggior parte dei soggetti affetti da MC (circa il 90%) sono portatori dell'eterodimero HLA-DQ2, codificati dagli alleli DQA1*0501/DQB1*0201, che possono essere ereditati insieme sullo stesso cromosoma (configurazione cis) o separatamente su due cromosomi omologhi (configurazione trans)¹⁶⁻¹⁷.

Mentre il 5% dei soggetti affetti sono portatori dell'eterodimero HLA-DQ8 codificati dagli alleli DQA1*0301/DQB1*0302, i restanti casi possiedono almeno una delle due componenti dell'eterodimero HLA-DQ2, più spesso il DQB1*0201¹⁷⁻¹⁸.

Soltanto l'1% dei portatori DQ2-DQ8 sviluppa malattia celiaca (Figura 5).

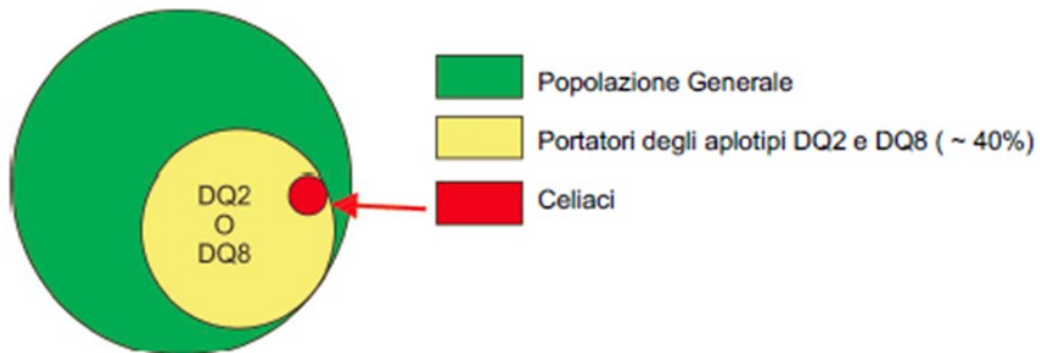


Figura 5 - Distribuzione degli aplotipi DQ2 e DQ8

La tipizzazione dell'eterodimero HLA presenta un elevato valore predittivo negativo, quindi l'assenza di questi aplotipi esclude la possibilità' di sviluppare la malattia celiaca. Tuttavia, la presenza di questi alleali è una condizione necessaria, ma non sufficienti per lo sviluppo della malattia celiaca ¹⁹.

Esistono anche altri geni, non-HLA, che potrebbero giocare un ruolo rilevante nella predisposizione alla malattia celiaca, molti dei quali implicati nei processi infiammatori ed immunitari.

I fattori immunologici sono determinati sia da una risposta linfocitaria Th2, che stimola il rilascio di autoanticorpi anti-gliadina (AGA), anti-endomisio (EMA) e anti-transglutaminasi (tTG), e sia da cellule T Helper 1 (Th1), responsabili del danno intestinale.

1.3.2. Fattori ambientali

La componente ambientale implicata nella patogenesi della MC è in primo luogo rappresentata dalla quantità e dalla qualità del glutine introdotto con la dieta.

Nonostante il suo valore nutritivo in realtà estremamente scarso, in quanto povero di aminoacidi essenziali quali la lisina e la metionina, l'esclusione del glutine dalla dieta non ha risvolti clinici degni di nota.

Il glutine presenta delle caratteristiche reologiche che facilitano la lavorazione delle farine che lo contengono, conferendo all'impasto proprietà viscoelastiche particolari e assicurando così la consistenza e la croccantezza dei prodotti derivati.

Tali caratteristiche rendono questo complesso proteico estremamente interessante e di largo utilizzo per l'industria alimentare.

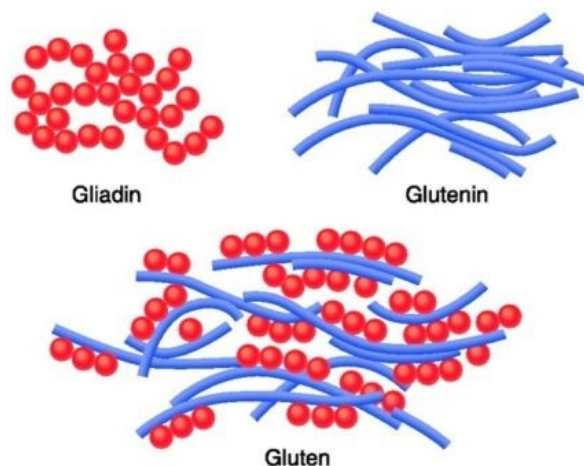


Figura 3 – Maglia glutinica data dall' interazione delle gliadine e glutenine

Il glutine è inoltre una delle poche proteine che vengono consumate cronicamente in quantità elevate, si ritiene infatti che l'assunzione giornaliera media di glutine in una dieta occidentale oscilli dai 5 ai 20 g/die; esso si caratterizza inoltre per la presenza di alcuni peptidi immunogenici non digeribili. Le due caratteristiche citate potrebbero essere la causa della perdita della tolleranza verso questo antigene alimentare ²⁰, che può verificarsi in qualsiasi momento della vita come conseguenza di altri fattori scatenanti, come infezioni, in particolare da Rotavirus, farmaci, epoca di introduzione del glutine durante il divezzamento, durata dell'allattamento ²¹⁻²².

Le gliadine, componenti chiave del glutine, sono proteine complesse particolarmente ricche di prolina e glutammina, non completamente digeribili dagli enzimi intestinali.

Il prodotto finale di questa digestione parziale è una miscela di peptidi in grado di innescare nell'ospite risposte che assomigliano molto a quelle provocate dall'esposizione a microorganismi potenzialmente dannosi.

1.4 Eziopatogenesi

I protagonisti chiave della patogenesi malattia celiaca sono i peptidi immunogenici della gliadina (contenenti glutammina), resistenti alla digestione gastrica e pancreatica, che riescono ad arrivare alla lamina propria delle cellule epiteliali intestinali, grazie all'aumentata permeabilità intestinale che si verifica in questa patologia ²³.

Traffico di glutine dal lume alla lamina propria

Sono state identificate una varietà di sequenze di gliadine e glutenine in grado di innescare le reazioni immunitarie tipiche della celiachia e si ipotizza che siano numerosissimi i peptidi di glutine in grado di scatenare la risposta mediata dai linfociti T; tuttavia, uno tra gli epitopi identificati come più tossici, è sicuramente il “33-mer”, un peptide di 33 amminoacidi dell’ α -gliadina (corrispondente alla regione 56-88 dell’ α -gliadina).

Nel meccanismo della patogenesi che porta al danno della mucosa intestinale, si ha il coinvolgimento sia dell’immunità innata che adattativa.

La risposta innata si basa sulla tossicità diretta del peptide 33-mer (LGQQQPFPPQQPY), in grado di stimolare la sintesi di Il-15, d’indurre l’espressione di molecole di stress sugli enterociti e di attivare i linfociti intraepiteliali nella mucosa intestinale. A livello degli enterociti, il peptide porta inoltre ad aumentare la permeabilità intestinale attraverso un eccessivo rilascio di zonulina, ~~una~~ una proteina che induce il disassemblamento delle giunzioni serrate, favorendo il passaggio di antigeni attraverso la via paracellulare²⁴⁻²⁵⁻²⁶.

Il coinvolgimento della via paracellulare per il traffico di glutine dalla lamina propria è stato anche confermato da diversi studi genetici che identificano un'associazione di alcuni geni della giunzione stretta con la malattia celiaca²⁷⁻²⁸.

Altri studi, invece suggeriscono che il glutine può attraversare la barriera intestinale anche attraverso la via transcellulare, quando la tolleranza al glutine viene meno²⁹⁻³⁰.

Il recettore della transferrina CD71, normalmente espresso sul lato basolaterale dell'enterocita, è sovraespresso sul lato luminale dell'epitelio intestinale dei pazienti celiaci in fase acuta della malattia, portando ad una retro-transitosi apicale-basale dei peptidi della gliadina complessati con le IgA secretorie.

Tale fenomeno sembra proteggere i frammenti di gliadina dalla degradazione lisosomiale e ne promuove il passaggio attraverso la via transcellulare alla lamina propria, aumentando così l'infiammazione intestinale³¹; in questo modo i peptidi indigeriti possono raggiungere il circolo ed essere infine escreti con le urine³².

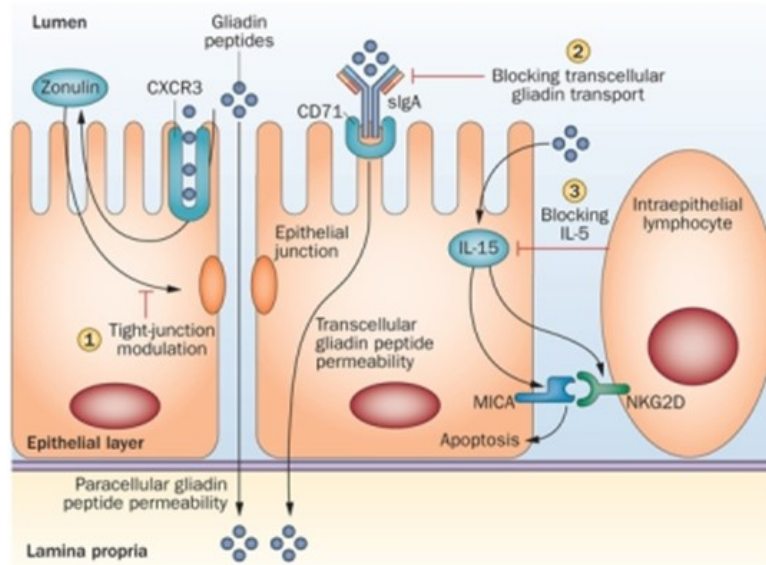


Figura 6 - Aumento della permeabilità intestinale indotta dalla zonulina e attivazione della via paracellulare e transcellulare.

1.4.1. Patogenesi

I peptici tossici della gliadina, particolarmente resistenti all'azione digestiva degli enzimi pancreatici e delle peptidasi intestinali, a causa del loro elevato contenuto in prolina e glutamina, subiscono una deamidazione a livello della sottomucosa ad opera dell'enzima transglutaminasi tissutale (t-TG), aumentando l'affinità degli stessi per i recettori specifici delle cellule presentanti l'antigene (APCs) del sistema HLA DQ2 e DQ8.

L'interazione gliadina-sistema HLA determina l'attivazione dei linfociti T CD4+ e linfociti T Helper di tipo 1; il successivo rilascio di citochine pro-infiammatorie, in particolare interleuchina-10 (IL-10) e interleuchina-15 (IL-

15), in grado di indurre l'espressione di molecole di stress sugli enterociti e attivare i linfociti intraepiteliali (IEL) nella mucosa intestinale, e di interferon-gamma (INF- γ), TNF- α , che stimolano la secrezione da parte dei fibroblasti intestinali di metalloproteinasi, enzimi che alterano alcune componenti della la matrice extracellulare, provocando modificazioni strutturali della mucosa intestinale fino all'atrofia dei villi.

Inoltre, la liberazione di tali sostanze a livello della mucosa determina un ulteriore rilascio di tTG e la produzione di autoanticorpi anti-transglutaminasi anti-gliadina (anti-tTG), anti-endomisio (EMA) e anti-gliadina deamidata (deamidated gliadin peptide, DGP).

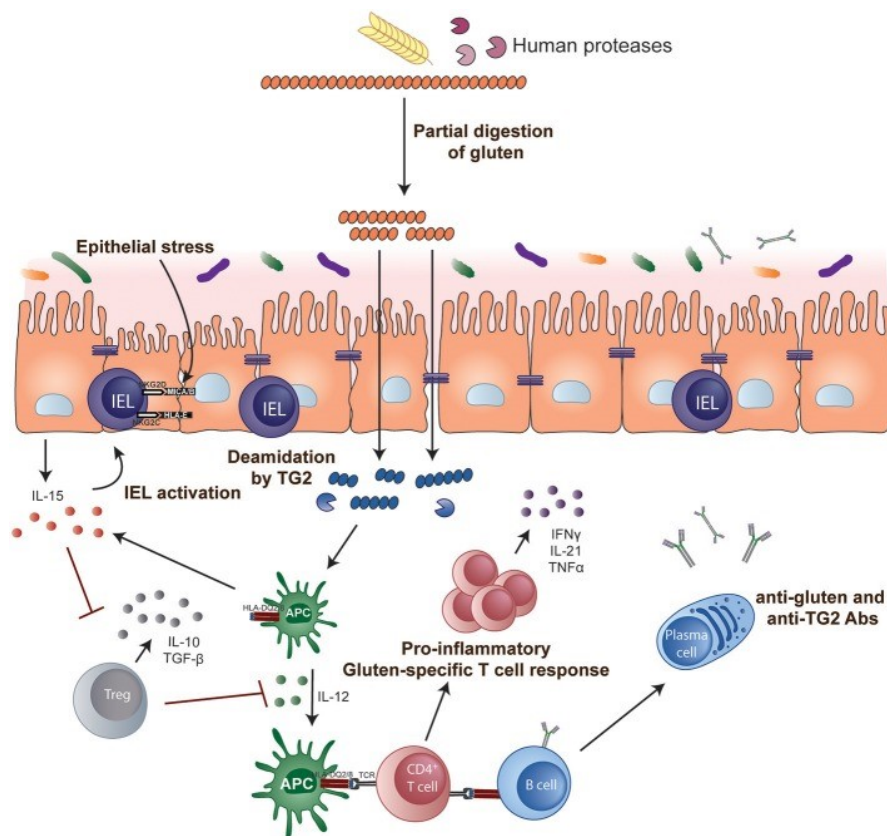


Figura 7 – Patogenesi della malattia celiaca

1.5. Presentazione clinica

La presentazione clinica della MC è caratterizzata da una estrema variabilità di segni e sintomi e può manifestarsi in qualsiasi epoca di vita ²⁹.

Nel 2011, la classificazione di Oslo della malattia celiaca ha identificato quattro diverse forme cliniche di malattia: classica, non classica, silente e potenziale ³⁰.

Invece della categorizzazione “classica” e “non classica”, che non riflette pienamente le attuali presentazioni cliniche, ci si può riferire ad una “forma

intestinale” e ad una “forma extra-intestinale”, poiché questi due termini rappresentano meglio i principali fenotipi clinici della malattia celiaca (Figura 4) ³¹.

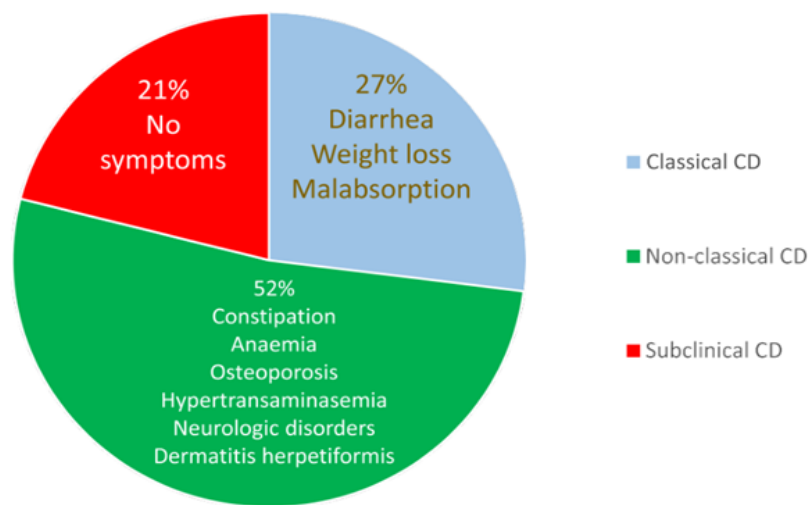


Figura 8 - Presentazioni cliniche della CD secondo la classificazione di Oslo

La **forma intestinale (o forma classica)** della MC è più comunemente riscontrata nella popolazione pediatrica e nei bambini di età inferiore ai 3 anni, i quali presentano sintomi prevalentemente intestinali come diarrea, diminuzione dell'appetito, distensione addominale, dolore addominale, ritardo o arresto della crescita staturale-ponderale ³²⁻³³⁻³⁴.

La forma **extra-intestinale (o forma non-classica)** è diffusa sia nei bambini più grandi (5-7 anni) che negli adulti ed è caratterizzata dall'assenza di sintomatologia intestinale e dalla presenza di altri segni clinici dovuti al malassorbimento, come anemia sideropenica³⁵⁻³⁶⁻³⁷, osteopenia e osteoporosi, anomalie oro-dentali (difetti dello smalto dentario, stomatite aftosa), ipertransaminasemia isolata, sintomi di carattere neurologico (cefalea, ansia e depressione), disturbi nella funzione riproduttiva (amenorrea, pubertà tardiva, aborti ricorrenti, oligospermia) e dermatite erpetiforme³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰.

La **forma silente** è la forma che viene diagnosticata in seguito a programmi di screening sui soggetti asintomatici familiari di primo grado dei pazienti celiaci o dei soggetti maggiormente esposti a rischio di celiachia (soggetti affetti da altre patologie autoimmuni, con sindrome di Down, etc) o screening di popolazione, e si caratterizza per la presenza di lesioni intestinali tipiche della mucosa intestinale e positività agli autoanticorpi, nonostante l'assenza di sintomi⁴¹.

La **forma potenziale** è caratterizzata da marcatori sierologici e genetici positivi con una normale istologia della mucosa intestinale e minimi segni di infiammazione dovuto ad un aumento dei IEL.

Nei pazienti con la forma potenziale la patologia si può manifestare con sintomatologia classica o atipica o essere completamente asintomatica; in tal caso il soggetto viene lasciato a dieta libera ma sottoposto a controllo periodico per identificare e trattare precocemente l'eventuale evoluzione in forma conclamata ⁴².

Altre forme di malattia celiaca riportate in letteratura sono la **celiachia non-responsiva**, caratterizzata dalla persistenza dei sintomi prevalentemente gastrointestinali con normalizzazione della mucosa intestinale e la celiachia **refrattaria**, caratterizzata dalla presenza di sintomi e di atrofia dei villi intestinali, nonostante una stretta dieta senza glutine per oltre 12 mesi.

Questa forma di CD è particolarmente grave perché può evolvere verso le complicanze più gravi della malattia.

La malattia celiaca può essere associata a diverse malattie autoimmuni e idiopatiche (Tabella 1), tra cui la dermatite erpetiforme, diabete mellito di tipo I, la tiroidite di Hashimoto, il deficit selettivo di IgA, malattie cromosomiche (Sindrome di Down, Turner e William), malattie neurologiche (atassia cerebellare, neuropatia periferica, epilessia con o senza calcificazione occipitale), malattie autoimmuni epatiche (colangite biliare primaria, epatite

autoimmune, colangite sclerosante primitiva) e cardiomiopatia idiopatica dilatativa⁴³⁻⁴⁴.

Autoimmune	Idiopathic	Chromosomal
Type 1 diabetes mellitus	Dilated cardiomyopathy	Down syndrome
Hashimoto's thyroiditis	Epilepsy with or without occipital calcifications	Turner syndrome
Graves' disease	Cerebellar ataxia	William's syndrome
Autoimmune hepatitis	Peripheral neuropathy	
Primary biliary cholangitis	Multiple myoclonic seizures	
Primary sclerosing cholangitis	Multiple sclerosis	
Dermatitis herpetiformis	Cerebral atrophy	
Vitiligo	Chronic inflammatory intestinal diseases	
Addison's disease	Sarcoidosis	
Alopecia	Atopy	
Psoriasis		
IgA deficiency		
Autoimmune atrophic gastritis		
Autoimmune hemolytic anemia		
Sjogren's syndrome		
Scleroderma		
Systemic erythematosus lupus		
Polymyositis		
Rheumatoid arthritis		
Myasthenia gravis		
IgA nephropathy (Berger's disease)		

Tabella 1 - Malattie associate alla celiachia

L'importanza della diagnosi della malattia celiaca associata a queste malattie concomitanti è duplice, in quanto la dieta priva di glutine è in grado sia di risolvere i sintomi e quindi prevenire le complicazioni e sia di migliorare alcune delle malattie associate alla MC³³.

1.6. Diagnosi

La corretta diagnosi di malattia celiaca è essenziale per l'inizio precoce del trattamento dietoterapico senza glutine, in modo da prevenirne le complicanze a breve e a lungo termine ad essa associate.

La diagnosi di malattia celiaca viene effettuata combinando reperti clinici (sintomatologia), sierologici (anticorpi anti-transglutaminasi (t-TG), anticorpi anti-endomisio (EmA) e anticorpi anti-peptide gliadina deamidata (DGP))⁴⁵⁻⁴⁶ e istopatologici (biopsia duodenale).

Tuttavia, secondo le recenti linee guida ESPGHAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology Hepatology and Nutrition), i pazienti pediatrici con titoli elevati di anticorpi anti-tTG (maggiore di 10 volte il cut-off), sieropositività per EMA, positività per HLA-DQ2/HLA-DQ8 e sintomatologia tipica, possono evitare di essere sottoposti alla biopsia duodenale⁴⁷.

Ad avvalorare queste nuove linee guida, ci sono diversi articoli scientifici come quello scritto da Fuchs et al. che hanno dimostrato come la combinazione di tre indicatori, quali anticorpi anti-tTG (oltre 10 volte il cut-

off), anticorpi EmA e positività al test HLA DQ2/HLA DQ8 siano dei valori altamente predettivi della malattia celiaca ⁴⁸.

La positività degli anticorpi prima dell'inizio della dieta e la loro negativizzazione durante la GFD rappresenta un altro importante supporto alla diagnosi e al successivo follow-up ⁴⁹.

Tuttavia, la biopsia duodenale rappresenta ancora un pilastro nella diagnosi di pazienti adulti con sospetto CD.

E' utile ricordare che ogni qualvolta che si parla di linee guida, non vi è una regola assoluta da seguire, infatti alcuni paesi come gli Stati Uniti la biopsia duodenale viene comunque eseguita sui pazienti pediatrici perché vi è una scarsa riproducibilità dei test anti-tTG ⁵⁰.

Nella pratica clinica risulta molto utilizzata, per formulare diagnosi di MC, la regola delle "quattro su cinque" ⁵¹, ovvero devono essere soddisfatti almeno 4 criteri tra i 5 di seguito riportati:

- I. Segni e sintomi tipici (diarrea e malassorbimento)
- II. Positività anticorpale
- III. Positività al test HLA DQ2/HLA DQ8
- IV. Danno intestinale (cioè atrofia dei villi intestinali o lesioni minori)

V. Rientro dei sintomi dopo una dieta priva di glutine.

1.6.1. Test sierologici

Negli ultimi decenni, l'impiego di test sierologici sempre più specifici e sensibili ha contribuito ad un significativo aumento delle diagnosi di malattia celiaca.

Attualmente, la diagnosi sierologica di CD si basa su test altamente predittivi e ampiamente validati, tra cui l'analisi degli anticorpi anti-transglutaminasi (t-TG), anticorpi anti-endomisio (EmA), di classe Ig-A e anticorpi anti-peptide gliadina deamidata (DGP) di classe Ig-G (Tabella 2) ⁴⁵.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Diagnostic accuracy (%)
Anti-tTG IgA	96.8	91.0	91.2	96.8	97.7
EmA IgA	93.7	100	100	94.4	96.9
DGP IgG	84.4	98.5	98.2	86.8	91.6

(*Anti-tTG* anticorpi anti-transglutaminasi, *DGP* anticorpi diretti contro i peptidi deamidati della gliadina, *EmA* anticorpi anti-endomisio, *NPV* valore predittivo negativo, *PPV* valore predittivo positivo)

Tabella 2 - Performance dei markers sierologici per la diagnosi della CD

1.6.2 Biopsia duodenale

La valutazione morfometrica del danno intestinale attraverso la biopsia duodenale rimane ad oggi il “gold standard” per la conferma diagnostica di malattia celiachia ⁴², in particolare nel soggetto adulto.

I diversi gradi di lesione della mucosa intestinale associati alla CD possono essere classificati in cinque stadi, secondo la classificazione di Marsh, modificata da Oberhuber, attualmente utilizzata in tutti i centri di riferimento per la diagnosi di CD (Figura 9) ⁵², che dimostra la presenza delle caratteristiche alterazioni della mucosa: iperplasia delle cripte, atrofia dei villi e infiltrato infiammatorio (conta dei IEL) a livello della lamina propria.

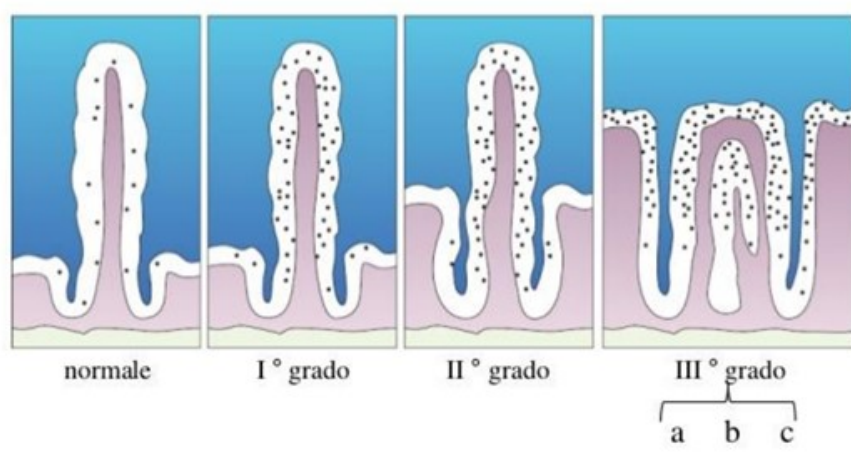


Figura 9 - Classificazione di Marsh-Oberhuber

E' opportuno ricordare che non sempre le lesioni intestinali sono associate alla malattia celiachia, ma anzi, molto spesso vi sono delle minime lesioni dei villi intestinali a causa di allergie alimentari, morbo di Crohn, colite linfocitaria, infezioni batteriche e parassitarie, utilizzo di farmaci FANS, etc

53-54

1.7. Terapia

E' oramai noto che l'unico trattamento terapeutico della malattia celiaca di comprovata efficacia è la dieta priva glutine (GFD), rigorosa e permanente ⁵⁵⁻

56

I soggetti affetti da MC devono quindi escludere dalla loro dieta tutti i cereali che contengono questo complesso proteico (frumento, orzo, farro, segale, spelta, kamut) e tutti i prodotti derivati dalla lavorazione degli stessi, comprese le bevande (es. birra, superalcolici), mentre possono essere utilizzati tutti i cereali e pseudocerali naturalmente privi di glutine (riso, mais, grano saraceno, amaranto, quinoa, miglio), patate e legumi, frutta e verdura e tutti gli alimenti proteici (latte e derivati, carne, pesce, uova).

La notevole limitazione nelle scelte alimentari, soprattutto per quanto riguarda i farinacei e i prodotti da forno, può essere soddisfatta, almeno in parte, dall'utilizzo di prodotti appositamente formulati privi di glutine (contenuto di glutine inferiore alle 20 parti per milione (ppm)), riconoscibili dal marchio "spiga barrata" o dal claim "senza glutine" riportati sulla confezione.

La stretta osservanza di una dieta priva di glutine nella maggior parte dei pazienti celiaci (75% dei casi) porta ad una significativa riduzione degli anticorpi e una normalizzazione dell'architettura dei villi intestinali entro 12-24 mesi dalla diagnosi ⁵⁷⁻⁵⁸⁻⁵⁹.

I test che vengono utilizzati per monitorare l'aderenza alla dieta senza glutine sono gli anticorpi anti-IgA e anticorpi anti-DGP, ma trasgressioni più o meno volontarie possono sfuggire a queste metodiche; è tuttavia opportuno ricordare che la negativizzazione dei marcatori durante la dieta senza glutine non garantisce la normalizzazione della mucosa intestinale ⁶⁰.

1.8. Terapie alternative alla dieta priva di glutine

Le più frequenti e ricorrenti difficoltà riscontrate nella gestione della GFD vanno da quelle di natura strettamente nutrizionale a quelle che implicano la sfera psicologica e sociale del paziente; alcuni studi riportano una scarsa soddisfazione della qualità della vita dovuta alla GFD ⁶¹, soprattutto in relazione alla ridotta disponibilità di scelte alimentari e dei costi più elevati rispetto ai prodotti standard ⁶²⁻⁶³.

Il soggetto celiaco incontra difficoltà nell'aderenza alla dieta specialmente in occasione dei pasti consumati fuori casa, poiché ancora molti esercizi pubblici non sono preparati a soddisfare le esigenze nutrizionali del celiaco.

La maggior parte di queste problematiche possono essere superate informando il paziente sulle gravi complicanze a lungo termine della MC non adeguatamente trattata e istruendolo, attraverso un counselling nutrizionale, alla corretta gestione della dieta ⁶⁴⁻⁶⁵.

Negli ultimi anni, la ricerca si sta muovendo verso lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici, come la degradazione dei peptidi della gliadina mediante proteasi glutine-specifiche di origine microbica, la riduzione della permeabilità intestinale per inibizione del rilascio di zonulina, l'induzione

della tolleranza orale al glutine mediante vaccino; alcuni studi clinici sono attualmente in corso, ma solo pochi sono in fase di sperimentazione ⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁸.

1.9. Follow up

I test utilizzati per monitorare l'aderenza alla dieta senza glutine sono il dosaggio degli anticorpi anti-tTG-IgA e anti-DGP-IgG ⁶⁹, ma trasgressioni volontarie minori o involontarie possono sfuggire a questa metodica.

La negativizzazione di questi marcatori durante la dieta senza glutine non garantisce la normalizzazione della mucosa intestinale ⁷⁰, mentre la persistenza delle positività anticorpali a titoli elevati è, con certezza quasi assoluta, espressione di mancata aderenza alla dieta e di persistenza di severe lesioni della parete intestinale.

A volte, un valore normale di tTG-IgA può essere ottenuto solo dopo un anno o più di dieta rigorosa, specialmente se il valore alla diagnosi è molto elevato; ciò che conta maggiormente, tuttavia, è che il titolo diminuisca costantemente nel tempo.

Attualmente non esistono regole ben definite per il monitoraggio della celiachia.

Un controllo entro 6-12 mesi dalla diagnosi e successivamente ogni 1-2 anni (salvo complicanze) sembra essere sufficiente per verificare la compliance

alla dieta senza glutine, verificare la comparsa di malattie autoimmuni e/o alterazioni metaboliche (che possono comparire anche in soggetti celiaci trattati) e diagnosticare precocemente l'insorgenza delle complicanze a medio e lungo termine.

CAPITOLO 2: CONTAMINAZIONE DI GLUTINE NELLA DIETA GLUTEN-FREE

2.1 Contaminazione di glutine

Nonostante l'ampia gamma di prodotti GF reperibili in commercio, la completa esclusione del glutine dalla dieta può essere difficile da raggiungere per una volontaria non aderenza alla terapia dietetica, o molto più spesso, a causa di esposizioni accidentali e non consapevoli al glutine ⁷¹.

Tali casi sono caratterizzati da uno stato infiammatorio persistente di grado variabile, con linfocitosi intraepiteliale, con o senza iperplasia delle cripte (Marsh 1-2), riscontrato alla biopsia di follow-up dopo 12-18 mesi di dieta aglutinata ⁷²⁻⁷³.

Le contaminazioni accidentali consistono quindi nel consumo involontario di glutine aggiunto a prodotti alimentari che ne sono privi, a causa di eventi non voluti, quindi non controllabili; esse sono quantitativamente presenti in tracce, al limite della rilevabilità strumentale (parti per milione, ppm o parti per bilione, ppb).

Anche se esiste sicuramente un elevato grado di variabilità della risposta individuale all'esposizione al glutine, Catassi *et al.*, evidenzia come il limite sicuro nell'assunzione giornaliera di glutine sia compreso tra 10 e 50 mg,

quantitativo quest'ultimo che, con assunzione continuativa per 90 giorni, ha un effetto tossico riscontrabile istologicamente ⁷⁴.

Sulla base di tali evidenze, la normativa vigente (Codex Alimentarius Commission, Food and Drug Administration FDA, European Food Safety Agency, EFSA, Regolamento CE 41/2009 , Regolamento UE 828/2014) stabilisce che gli alimenti etichettati come “senza glutine” devono obbligatoriamente contenere un quantitativo di glutine minore di 20 mg/kg o ppm ⁷⁴⁻⁷⁵ e sono ritenuti sicuri per il celiaco anche in caso di ampio consumo giornaliero.

Si possono distinguere due tipi di contaminazione:

Contaminazione crociata (cross-contamination): possibili contaminazioni dovute agli “incroci” del prodotto senza glutine con quello con glutine, lungo tutta la filiera di produzione;

Contaminazione accidentale: aggiunta involontaria di glutine al prodotto alimentare che ne è privo, a causa di eventi accidentali e non voluti e pertanto non controllabili.

Grazie ai progressi nel campo della biologia molecolare, è stata possibile la sintesi di anticorpi monoclonali specifici (moAbs) G12 e A1 contro i peptidi tossici della α -gliadina di grano, segale, orzo e alcune varietà di avena ⁷⁹.

Recentemente sono stati sviluppati test utili a determinare in maniera indiretta il consumo di glutine nascosto attraverso il dosaggio quali-quantitativo dell'escrezione dei peptidi immunogenici del glutine (GIP) nelle urine e nelle feci, che permettono di monitorare, soprattutto in autonomia da parte del paziente, eventuali trasgressioni involontarie al regime GF.

La contaminazione da glutine negli alimenti invece viene determinata attraverso metodi immunoenzimatici (ELISA), come il saggio Ridascreen Gliadin R5 R-7001 (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) e il saggio GlutenTox Sandwich ELISA G12/A1 (Biomedal Diagnostic, Spain).

2.2. Determinazione del glutine negli alimenti tramite saggio ELISA R5- e G12 /A1

Ridascreen R5 è una metodica certificata dall'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ed approvata dalla commissione del Codex Alimentarius ed altre agenzie internazionali ⁸⁰.

È un test immunologico basato sull'anticorpo monoclonale R5 (mAb) che riconosce potenziali epitopi delle gliadine (prolammine del frumento), ordeine (prolammine dell'orzo), secaline (prolammine della segale), tossici per il celiaco. L'anticorpo R5 riconosce e lega gli epitopi QQFPF (glutamine-glutamine-proline-phenylalanine-proline) collocati nella regione N-terminale della molecola di glutine (Figura 10) ⁸¹⁻⁸²⁻⁸³⁻⁸⁴.

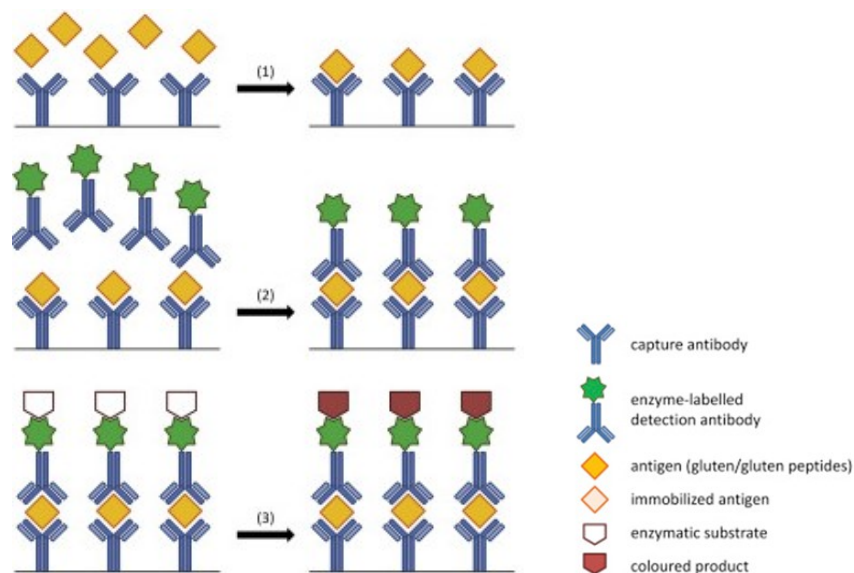


Figura 10 - Rappresentazione grafica del complesso antigene-anticorpo dei saggi R5/G12

In alternativa al Saggio R5 vi è un altro metodo utile per l'analisi e la quantificazione della concentrazione di glutine, il GlutenTox Sandwich ELISA G12/A1 che risulta essere paragonabile precedente, tuttavia non è riconosciuto come metodo ufficiale.

Questo metodo riconosce la frazione tossica della gliadina attraverso due anticorpi monoclonali, chiamati rispettivamente G12 e A1, i quali hanno un'elevata affinità per il peptide tossico 33-mer della gliadina⁸⁵ e riconoscono due sequenze diverse del peptide 33-mer, rispettivamente le sequenze QPQLPY e QLPYPQP.

L'anticorpo G12 possiede inoltre un'affinità 8 volte maggiore rispetto all'anticorpo A1.

Un'importante differenza tra questi due metodi è il limite di rilevazione: G12 ha un limite di rilevazione di 0,6 ppm di glutine, mentre R5 di 0,5 ppm di gliadina, corrispondenti ad 1 ppm di glutine.

Le principali differenze e similarità tra i due metodi sono riportate in Tabella 3.

	R5 Method	G12 Method
Addition of standard/samples to wells	100 µL of each standard solution or sample	Add 100 µL of each standard solution or sample
1st incubation	30 min at room temperature (RT)	20 min at room temperature (RT)
Washing	Empty the contents of the microwell strips Wash by filling each microwell with 250 µL diluted wash buffer, and then emptying the buffer from the microwell strips. Repeat this step a total of 3 times.	Empty the contents of the microwell strips Wash by filling each microwell with 300 µL diluted wash buffer, and then emptying the buffer from the microwell strips. Repeat this step a total of 5 times.
Addition of conjugate and 2nd incubation	Add 100 µL of the diluted enzyme conjugate to each well and incubate for 30 min at room temperature (20–25 °C/68–77 °F).	Add 100 µL of the diluted enzyme conjugate to each well and incubate for 20 min at room temperature.
Washing	Repeat washing step as described above	Repeat washing step as described above
Addition of substrate and 3rd incubation	Add 50 µL of substrate and 50 µL of chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20–25 °C/68–77 °F) in the dark.	Pipette 100 µL of the Substrate into each microwell and incubate at room temperature for 20 min in the dark.
Additions of stop solution and measurement	Add 100 µL of the stop reagent to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 30 min after addition of stop solution.	Pipette 100 µL of Stop Solution into each microwell. The color should change from blue to yellow. Read the strips with a microwell reader using a 450 nm filter. Record OD readings for each microwell.

Tabella 3 - Confronto tra test ELISA R5 e G12/A1

CAPITOLO 3: STUDIO SPERIMENTALE

2. Scopo della tesi

L'obiettivo dello studio è quello di determinare analiticamente la quantità di glutine consumato accidentalmente da pazienti celiaci a dieta GF, attraverso la quantificazione di micro-contaminazioni da glutine nei campioni di alimenti consumati nelle 24 h.

Tali contaminazioni potrebbero avvenire durante la preparazione casalinga dei pasti o durante la somministrazione degli stessi in ambienti diversi da quello domestico (scuola, ristorante, bar, etc.).

3.1 Materiali e metodi

3.1.1. I Pazienti

Lo studio, di tipo prospettico-osservazionale, è stato proposto a tutti i soggetti pediatrici, con diagnosi di malattia celiaca secondo i criteri ESPGHAN e a dieta GF da almeno 5 mesi, seguiti presso l'ambulatorio di Celiachia della Clinica Pediatrica UNIVPM tra ottobre 2018 e dicembre 2019.

Sono stati considerati criteri di esclusione dall'arruolamento: 1) età inferiore a 12 mesi; 2) età superiore a 16 anni; 3) presenza di altre patologie concomitanti.

Sierologia

Non tutti i soggetti al momento dell'arruolamento risultavano essere completamente negativizzati per gli anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA, poiché a dieta aglutinata da meno di 24 mesi. Si è scelto di reclutare comunque anche tali pazienti in modo da aumentare la numerosità campionaria.

3.1.2. Diario Alimentare

Ai soggetti partecipanti allo studio è stato chiesto di consegnare i campioni dei pasti consumati in una giornata e di compilare, contestualmente alla raccolta, un diario alimentare, indicando la quantità di alimento consumata ed il luogo di preparazione/consumo (Figura 11).

codice	alimento	Quantità (gr o ml)	Dove ha mangiato
COLAZIONE			
01	biscotti	160 gr	casa
SPUNTINO			
02	Pane e prosciutto cotto	120 gr	scuola
PRANZO			
03	Pasta + salsa al pomodoro + olio extravergine di oliva + parmigiano	90gr	casa della nonna
MERENDA			
04	yogurt	125 gr	casa
CENA			
05	Fettina di vitello + olio extravergine di oliva	80gr	casa
06	Patate + olio extravergine di oliva	70gr 5ml	casa

Figura 11 - Diario Alimentare: esempio già precompilato

Le informazioni riportate nel diario alimentare, in particolare la grammatura e il luogo di preparazione/consumo, risultano estremamente utili per valutare:

- 1) L'eventuale quota di assunzione di glutine con il singolo pasto e giornaliera e superamento della soglia di tossicità;

2) Identificare i luoghi in cui la probabilità di incorrere in una micro-contaminazione da glutine fosse maggiore.

I campioni di alimenti da analizzare, raccolti a domicilio o presso altra ristorazione, venivano riposti in buste o contenitori sterili, conservati a 5°C se consegnati entro le 24 ore successive o a -20°C se consegnati successivamente; dopo la consegna al personale del Laboratorio, questi sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

3.1.3. Procedura del saggio ELISA R5

Dopo lo scongelamento dei campioni, a 0,25g di ogni alimento sono aggiunti 2.5 mL di una soluzione (cocktail solution Ridascreen R-7001) per estrarre la porzione glutinica dagli alimenti; il sistema è mantenuto in bagnomaria a 50°C per 40 minuti.

Si aggiunge etanolo 80% , si agita al vortex per 1 ora a temperatura ambiente, si centrifuga per 10 minuti a 2500 rpm, e il sovrantante viene diluito (1:12.5) con apposita soluzione (sample dilution).

In una piastra microtiter da 96 pozzetti (FIGURA 28), , vengono caricati, in doppio, 100 μ L di campione, delle soluzioni standard già opportunamente diluite (0-5-10-20-40-80 ng/mL gliadina).

In una piastra da 96 pozzetti, ai quali è già adeso l'anticorpo specifico per la gliadina, (Figura 12) vengono caricati in doppio 100 μ L delle soluzioni standard, dei campioni in cui determinare l'eventuale presenza di glutine e delle soluzioni di controllo positivo e negativo;

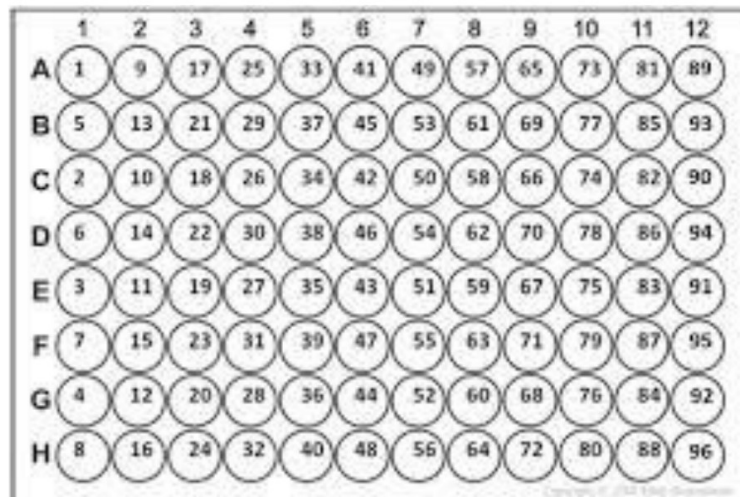


Figura 12 - Piastra ELISA R5

Dopo 30 minuti di incubazione al buio, l'eccesso di antigene non legato viene rimosso con una serie di lavaggi e si aggiungono 100 μ L di un secondo anticorpo coniugato con una perossidasi che lega il complesso antigene-

anticorpo, formando una struttura a “sandwich” da cui deriva il nome della metodica; si attendono altri 30 min e a seguire ulteriori 3 lavaggi.

Si aggiungono quindi il substrato enzimatico per la perossidasi ed il cromogeno sia nei campioni che nei rispettivi controlli, incubando per 30 min a temperatura ambiente.

Se vi è presenza di glutine, il legame che avviene tra l'enzima e il coniugato trasforma il cromogeno incolore in un prodotto di colore blu, come mostrato in Figura 13.

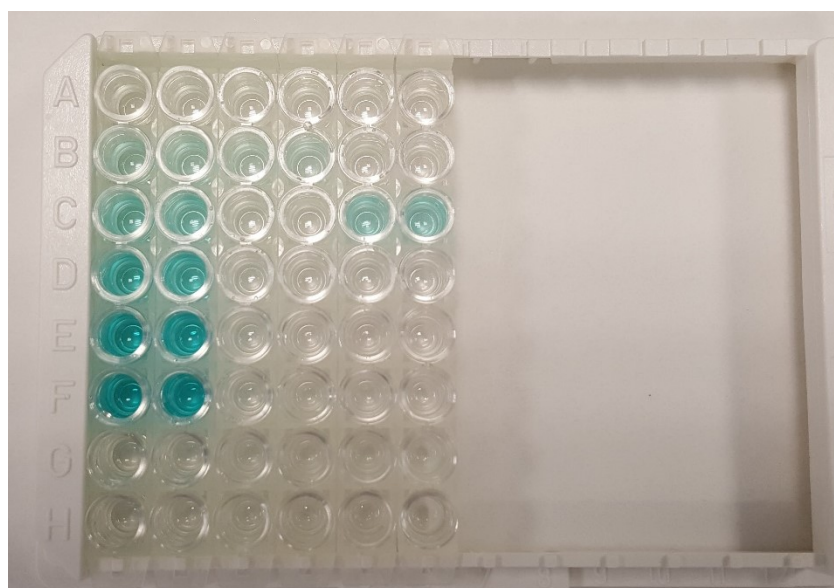


Figura 13- Campioni positivi dopo l'aggiunta dell'enzima

Infine si aggiunge la “Stop Solution” che blocca la reazione determinando il viraggio del colore, da blu a giallo.

Si procede quindi, entro 30 min dall’aggiunta della stop solution, alla lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d’onda (λ) di 450 nm.

I risultati sono stati calcolati mediante la curva standard, in cui sull’asse delle ascisse vi è la concentrazione di glutine espressa in ppm e sull’asse delle ordinate vi è l’assorbanza (Figura 14).

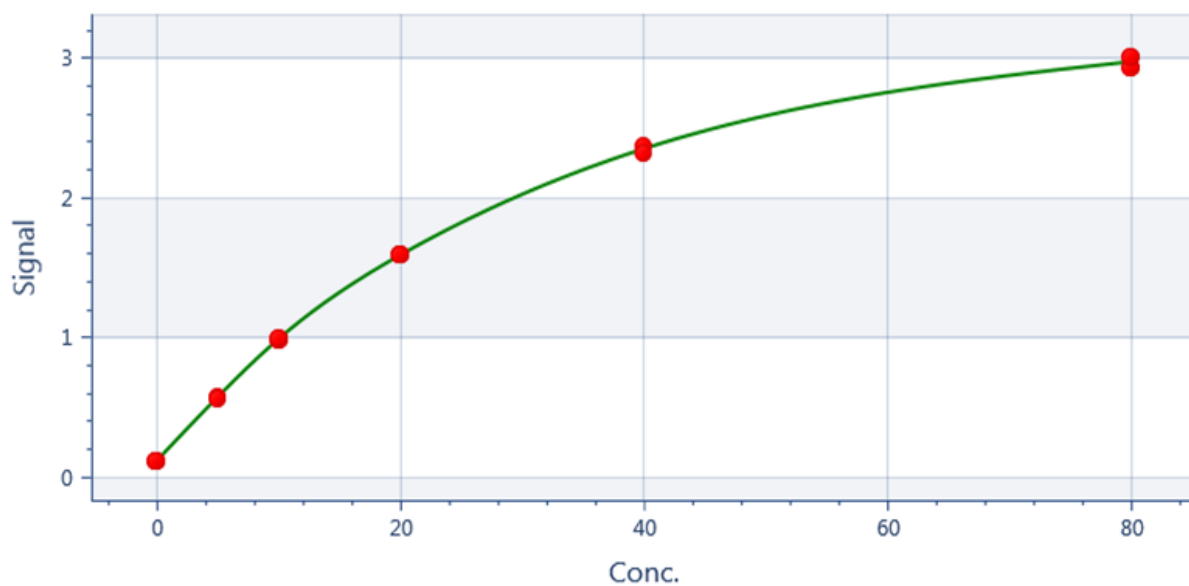


Figura 14 - Curva Standard Test ELISA R5

3.1.4. Procedura del saggio ELISA G12/A1

Dopo aver pesato il campione di alimento nella quantità descritta dal protocollo e aggiunto la soluzione di estrazione, i campioni solidi sono incubati a 50°C per 40 min, centrifugati per 10 min a 2500 rpm. Il sovranatante è diluito con la soluzione di diluizione secondo le indicazioni fornite dal protocollo.

Dopo aver preparato gli standards e i controlli come riportato in Figura 15, questi sono caricati, assieme ai campioni (diluiti 1:50), in doppio in un volume pari a 100 µL in una piastra microtiter di 96 pozzetti, la quale contiene già l'anticorpo specifico contro la gliadina adeso al fondo di ogni pozzetto; il sistema è lasciato al buio per 1 ora a temperatura ambiente.

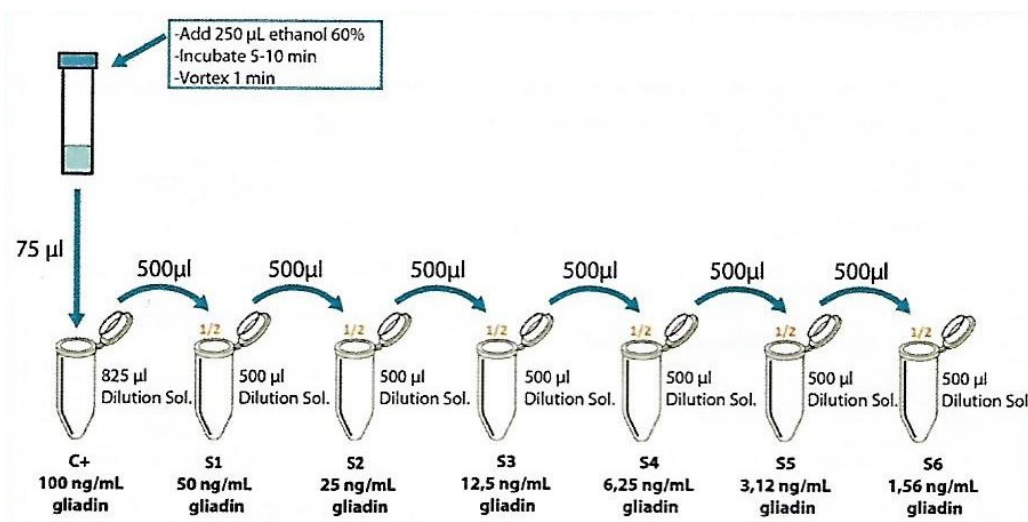


Figura 15 - Schema della preparazione degli Standard

Dopo aver lavato più volte i pozzetti così da allontanare l'antigene non legato, si aggiunge l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi e si lascia incubare 1 ora. Si ripetono 5 lavaggi e si aggiunge il substrato per la perossidasi attendendo poi 30 min. Infine la soluzione di stop blocca la reazione e si procede alla lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm.

I risultati sono stati calcolati costruendo una curva standard sulla base dei valori delle assorbanze degli standard noti (concentrazione della gliadina sull'asse y e valori di assorbanza sull'asse x (Figura 16)).

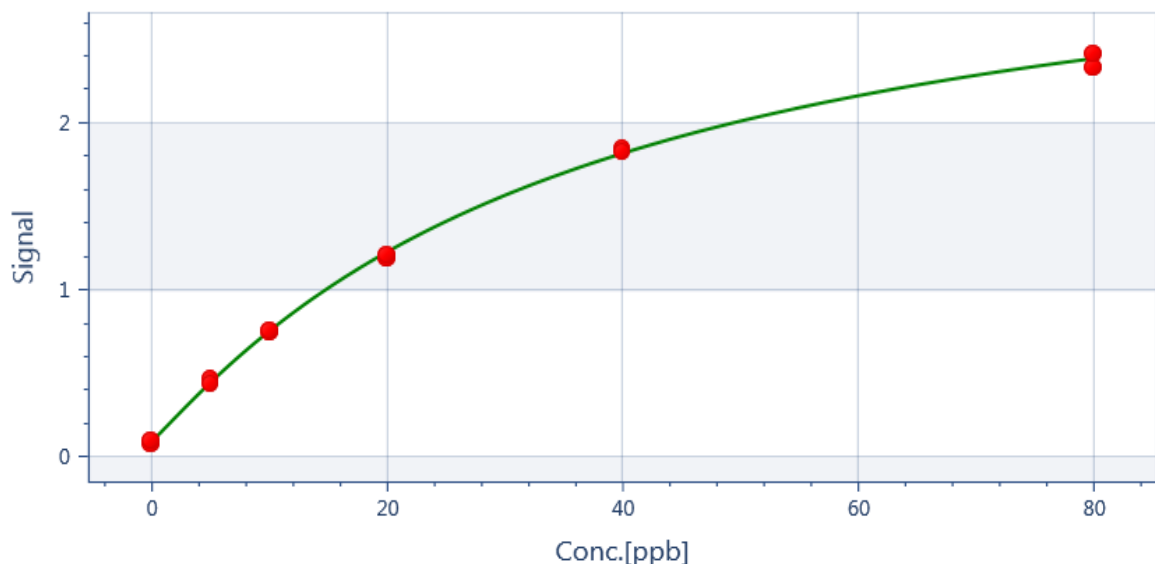


Figura 16 - Curva Standard Test ELISA G12

Classificazione dei campioni sulla base del contenuto di glutine rilevato

Sono stati considerati “gluten-free” quei prodotti la cui concentrazione di glutine risulta essere inferiore ai 20 ppm (equivalente a 10 mg/Kg di gliadina), “a bassa contaminazione da glutine” quei campioni aventi valori compresi tra 20 e 100 ppm.

Per valori superiori ai 100 ppm, i campioni sono classificati come “significativamente contaminati”.

Quantificazione giornaliera della contaminazione da glutine

Il contenuto di glutine in ogni pasto è stato calcolato moltiplicandone la concentrazione trovata in ogni campione ($1 \text{ ppm} = 0,001 \text{ mg/g}$) per i grammi del pasto. Si è effettuata poi la somma di tutti i milligrammi di glutine contenuti in ogni pasto consumato nell’arco della giornata, ottenendo così il quantitativo di glutine assunto nella giornata in esame, espresso in mg/die.

CAPITOLO 4: RISULTATI

Sono stati arruolati 50 pazienti pediatrici affetti da malattia celiaca, di cui 21 maschi (42%) e 29 femmine (58%), rapporto maschio femmina 1:1,4, di età compresa tra 2 e 16 anni (mediana 9 anni), a dieta senza glutine da almeno 5 mesi (mediana 13 mesi, range 5 mesi- 9 anni) (Figura 17).

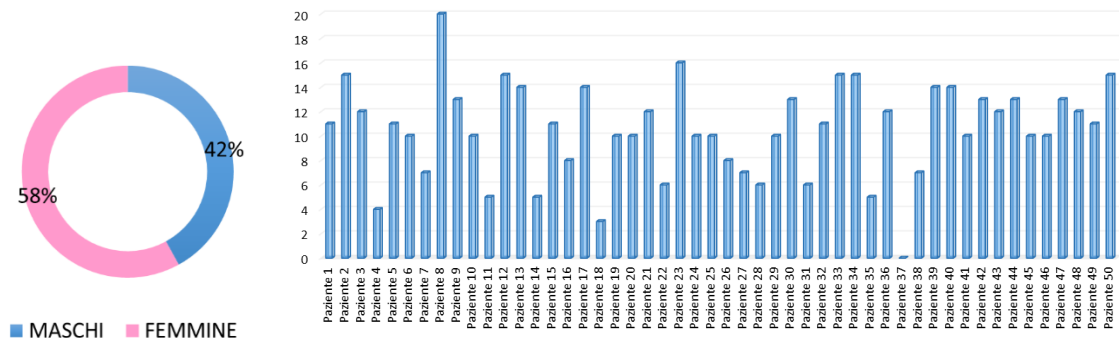


Figura 17 - Pazienti aderenti allo studio

Il 42% dei soggetti (Figura 18 e Tabella 4) al momento dell'arruolamento mostrava sieropositività agli autoanticorpi tTG-IgA, nonostante l'avvio della dieta aglutinata; tale parametro, che viene riportato per completezza dei dati clinici, non condiziona in nessun modo il risultato delle analisi sugli alimenti.

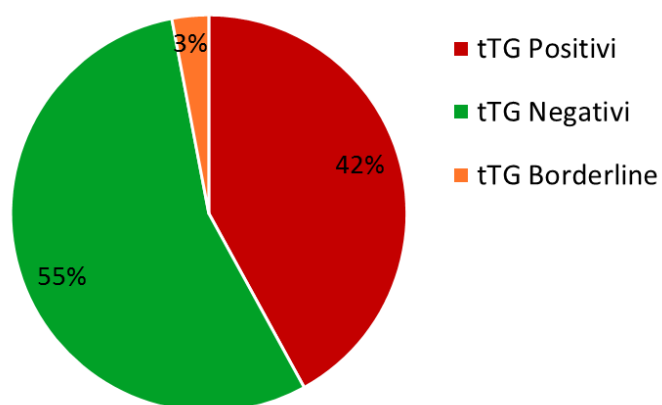


Figura 18 – Sierologia del gruppo di studio

<i>VARIABILE</i>		<i>PAZIENTI CELIACI</i> <i>n=50</i>
età	mediana (range)	9 anni (1-16)
maschi	n (%)	21 (42)
femmine	n (%)	29 (58)
durata GFD	mediana (range)	13 mesi (5 mesi - 9 anni)
tTG IgA		
	<i>Positivi</i> n (%)	16 (42)
	<i>Negativi</i> n (%)	21 (55)
	<i>Borderline</i> n (%)	1 (3)

Tabella 4- Caratteristiche del gruppo di studio

E' interessante notare come la maggior parte dei pazienti che avevano valori dei tTG positivi seguivano la dieta priva di glutine (GFD) da meno di un anno.

Come riportato nella Figura 19, tra i soggetti ancora sieropositivi per t-TG, 4 erano in dieta aglutinata da meno di 6 mesi, 6 da 6 mesi ad 1 anno ed altri 6 da più di un anno.

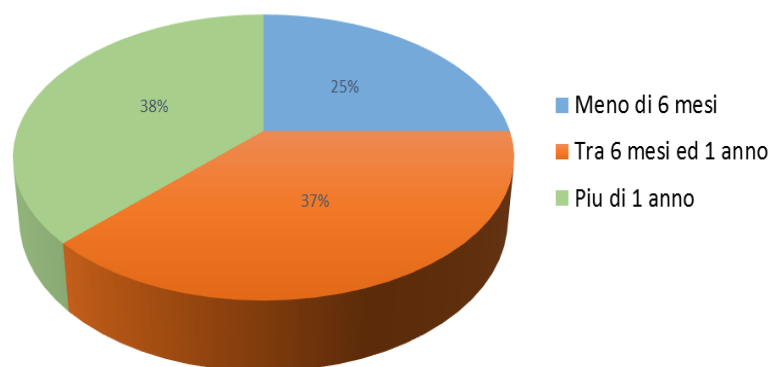


Figura 19 – Tempo di aderenza alla dieta gluten-free nei pazienti con tTG positivi

Sono stati analizzati 345 campioni di alimenti (Tabella 5 e Figura 20) classificati in quattro differenti categorie:

- Prodotti farinacei
- Prodotti dolciari
- Prodotti di origine animale
- Prodotti di origine vegetale/legumi

Alimenti	N° Campioni
Prodotti farinacei	177
Prodotti dolciari	72
Prodotti di origine animale	72
Prodotti di origine vegetale	24

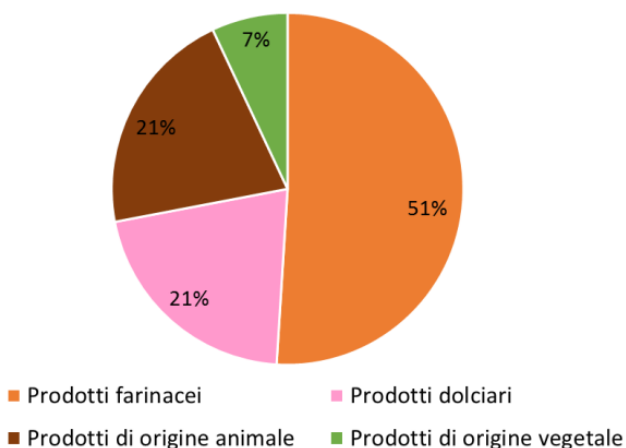


Tabella 5 e Figura 20 - Alimenti analizzati suddivisi nelle quattro categorie

La Tabella 6 e la Figura 21 riportano il luogo dove i pasti sono stati consumati.

Luoghi	N° Campioni
Casa	223
Casa Nonni	58
Scuola	25
Mensa scuola	9
Comunità	9
Ristoranti	2
Pizzeria	5
MC Donald's	2
Gelateria	1
Piscina	2
Casa Baby Sitter	3
Non riportato	6

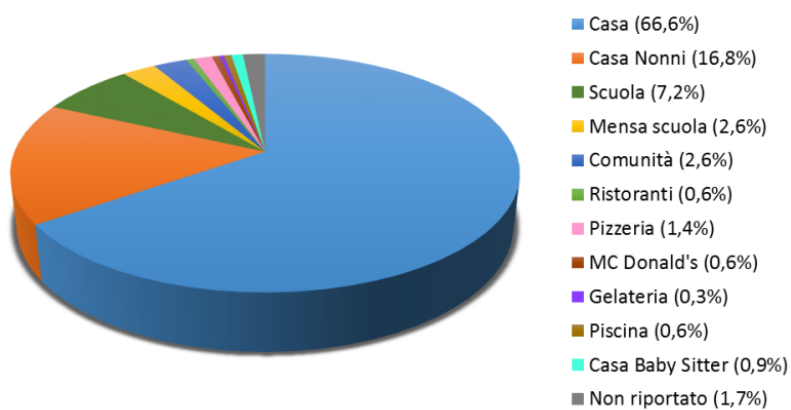


Tabella 6 e Figura 21 – Luogo di consumo dei pasti

Solo 1 alimento su 345 presentava una concentrazione di glutine maggiore di 20 ppm (Figura 22), dato ottenuto con entrambe le metodiche (R5/G12).

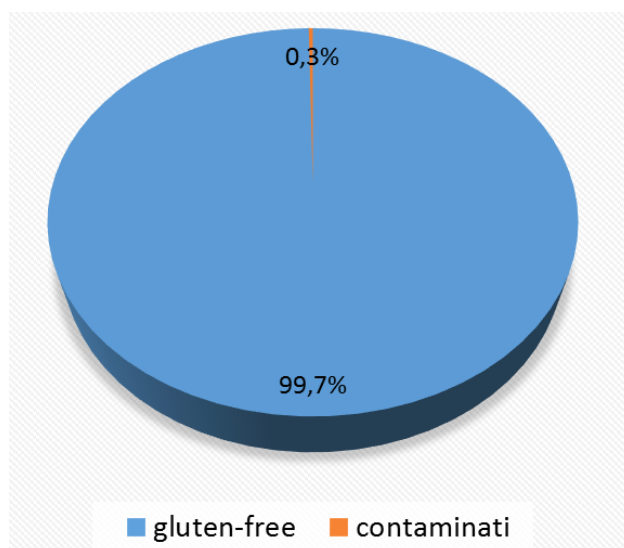


Figura 22 – Percentuali dei campioni gluten-free contaminati

La concentrazione di glutine nell'alimento in questione era pari a 74.2 ppm (metodica R5), e il consumo di glutine del paziente è stato stimato essere, in base alla grammatura consumata, di 1.6 mg/die; tale valore risulta comunque inferiore alla soglia di tossicità (10 mg/die).

Il campione risultato positivo alla contaminazione di glutine appartiene alla classe dei farinacei; nello specifico si tratta di un prodotto confezionato

(crackers salati, di marca non riportata sul diario alimentare), consumato dal paziente a casa dei nonni.

Cinque campioni presentano un livello di glutine compreso tra 10 e 20 ppm. Di questi, 4 erano stati consumati a casa e uno dai nonni. Uno di questi campioni era un prodotto di origine animale (polpette di macinato di carne, uova, parmigiano e pan grattato preparate in casa), uno dolciario (biscotti fatti in casa) e tre farinacei (1-pan grattato, 2-pane e prosciutto, 3-pasta di mais con salsa al pomodoro, olio e parmigiano).

Complessivamente, la dose di glutine assunta giornalmente in tutti i 50 pazienti arruolati era significativamente inferiore alla soglia di tossicità (Figura 23).

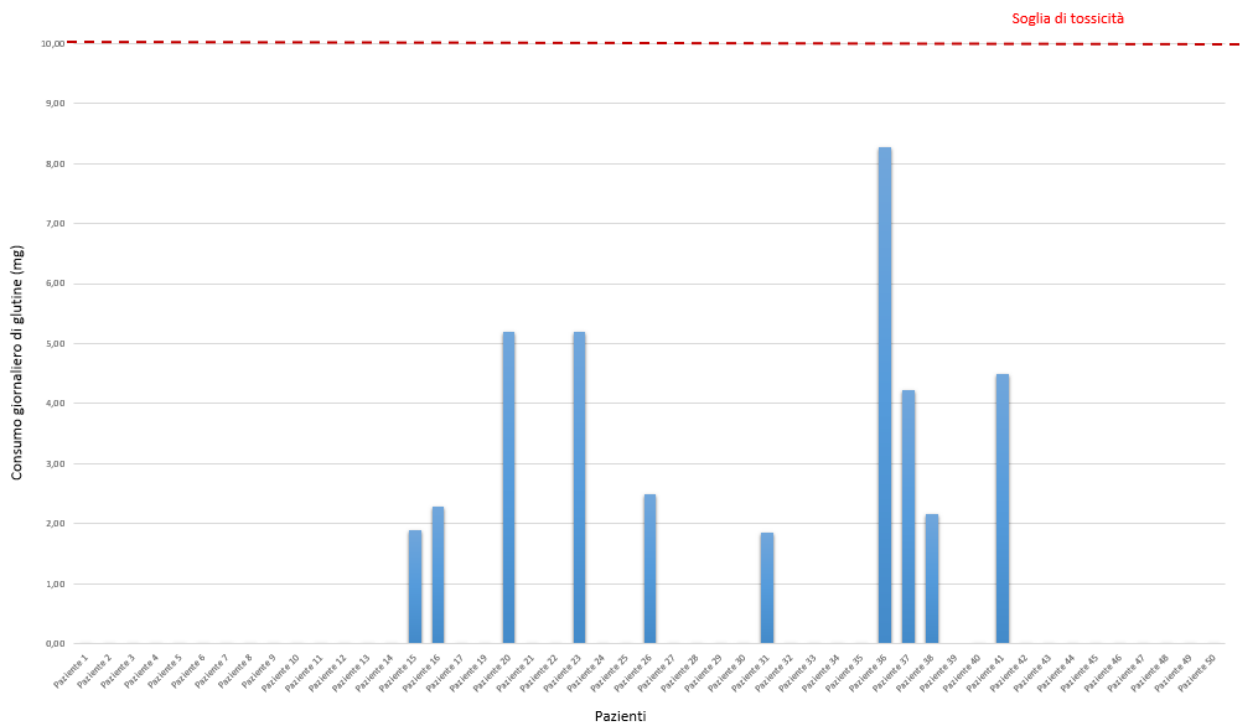


Figura 23 - Consumo giornaliero di glutine nei 50 pazienti CD

La Figura 24 mostra infine la relazione tra età l'età del celiaco e il grado di contaminazione degli alimenti, che sembrerebbe essere maggiore per quantità e frequenza nelle fasce d'età più grandi.

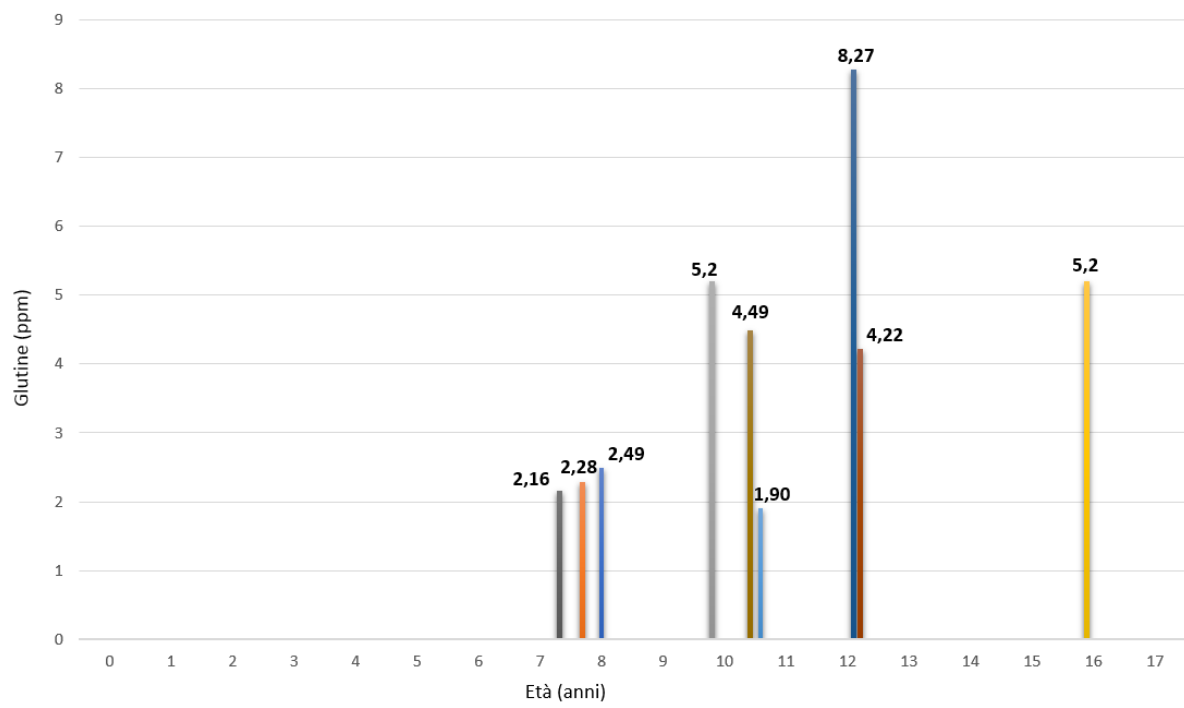


Figura 24 - Tracce di glutine presenti nei campioni alimentari in funzione dell'età del paziente

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE

Nonostante i progressi della ricerca scientifica sulle possibili terapie alternative alla GFD, ad oggi l'unica terapia efficace per il trattamento della malattia celiaca è una rigorosa dieta priva di glutine per tutta la vita.

Per perseguire questo obiettivo il paziente deve eliminare dalla dieta tutti quei alimenti che contengono glutine, e sostituirli con alimenti alternativi, quali i prodotti naturalmente privi di glutine oppure alimento dieto-terapeutici, ovvero sostitutivi degli alimenti contenenti glutine con altri cereali che ne sono privi (pasta di mais, pasta di riso, etc).

La principale causa di “non risposta” al trattamento dietoterapico della MC è stata fino ad oggi prevalentemente legata ad una scarsa compliance alla GFD, ma studi recenti evidenziano che la assunzione involontaria e inconsapevole di alimenti contaminati da glutine è invece un rischio frequente ⁸⁶ e potenzialmente dannoso per il celiaco, che si manifesta nella persistenza dello stato infiammatorio intestinale ⁸⁷.

In letteratura sono ancora pochi dati riguardo al problema della contaminazione da glutine nella dieta del celiaco, con particolare riferimento alla determinazione analitica della quantità di glutine giornaliera accidentalmente consumata.

Uno studio condotto da Verma *et al.* ⁸⁸ ha dimostrato come la contaminazione da glutine negli alimenti gluten -free (naturalmente privi di glutine o etichettati come tali) commercializzati in Italia sia molto bassa; i prodotti maggiormente contaminati risultavano essere prodotti a base di avena, grano saraceno e lenticchie. Inoltre i prodotti senza glutine certificati e a costo più elevato erano meno contaminati rispetto a quelli con costo più basso.

Altri studi riportano invece percentuali di contaminazione dei prodotti permessi nell'alimentazione del celiaco, maggiori ⁸⁹⁻⁹⁰.

Alla luce dei contrastanti dati riportati in letteratura, la finalità dello studio è stata quella di apportare nuovi spunti di riflessione sulla questione della contaminazione, verificando l'introito di glutine nei bambini celiaci tramite l'analisi dei pasti consumati nell'arco di una giornata.

Dai dati ottenuti emergono forti evidenze sulla sicurezza degli alimenti preparati e consumati dai celiaci, sia in ambiente domestico che presso altra ristorazione.

Infatti, la quasi totalità dei campioni analizzati (99,7%) risulta essere privo di glutine come da definizione (<20 ppm), in particolare al di sotto del limite di

quantificazione (< 5 ppm), mentre solo 1 campione risulta contaminato da una quantità di glutine pari a 74.2 ppm, nello specifico crackers, appartenente alla categoria dei farinacei, la quale è notoriamente più esposta a rischio contaminazione.

Non essendo stato riportato nel diario alimentare il nome commerciale del prodotto, non è stato possibile verificare se in etichetta fosse riportata la dicitura “senza glutine” o meno; tuttavia gli altri alimenti consumati dallo stesso paziente hanno mostrato la completa assenza di glutine (< 5ppm), pertanto l’ipotesi più probabile potrebbe essere quella di un isolato e raro caso di assunzione involontaria di glutine.

Da questi risultati si può comunque evincere che la quantità di glutine alla quale i soggetti a dieta aglutinata sono accidentalmente esposti è molto bassa e la presenza di tracce di glutine non arriva comunque a superare la soglia di tollerabilità (10 mg/die), a dispetto di quanto emerso dalla meta analisi di Syage et al.⁹¹.

Per alcuni tra i campioni non contaminati, veniva invece quantificata una quota di glutine tra 10 e 20 ppm, consumati da soggetti con diagnosi di malattia celiaca recente.

Sulla base di tale dato si potrebbe ipotizzare un maggiore rischio di esposizione accidentale al glutine da parte di pazienti a dieta GF da minor tempo forse dovuto alla non completa capacità di gestione delle strategie atte ad evitare la contaminazione da glutine, mentre i pazienti a DSG da più tempo sembrano essere più esperti nel riconoscere eventuali fonti di contaminazione ed nell'evitare errori nella quotidianità.

I soggetti che hanno consumato quegli alimenti contenenti glutine in modo quantificabile risultavano essere tra quelli ancora positivi ai marcatori sierologici della celiachia; ciò potrebbe essere la conseguenza della stessa contaminazione quotidiana, oppure potrebbe essere legato alla breve durata della GFD, per cui fisiologicamente non si è ancora raggiunta la negativizzazione sierologica.

Altrettanto interessante è la correlazione che si osserva tra l'età dei soggetti arruolati e il consumo di alimenti con quantità di glutine rilevabile (5-20 ppm), infatti aumentando la fascia di età aumenta il numero dei pasti con glutine quantificabile, probabilmente dovuto ad una sempre maggiore autonomia nella scelta e nelle modalità di consumo degli alimenti, che possono a volte sfuggire, volontariamente o involontariamente, al controllo parentale.

Infine, tra alcuni dei soggetti che hanno consumato alimenti contenenti glutine in modo quantificabile (5-20 ppm) il pasto era stato consumato a casa dei nonni. Questo dato può rappresentare la spia di una maggiore disattenzione da parte di familiari non direttamente coinvolti nella gestione quotidiana della GFD ed è pertanto importante da considerare, in occasione del counselling familiare, per educare altri caregivers, oltre ai genitori, sulla corretta gestione della GFD.

Lo studio presentato tuttavia mostra alcuni limiti che sono rappresentati dalla numerosità dei celiaci che hanno partecipato, dal timing di osservazione di sole 24 ore e dal possibile effetto "Hawthorne", secondo cui ci potrebbe essere una modificazione transitoria del comportamento di chi è osservato per effetto della presenza di osservatori, che potrebbe aver influito su una maggior attenzione nella preparazione / somministrazione dei cibi.

Dal presente studio emerge che il rischio contaminazione da glutine nei cibi consumati dai celiaci in età pediatrica a dieta GF è molto basso.

Le evidenze emerse costituiscono un segnale di ottima aderenza alla dieta priva di glutine e dimostrano la corretta applicazione di semplici norme igieniche e comportamentali che permettono una compliance ottimale alla GFD.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Jabri B, Sollid LM, Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Gastroenterol Hepatol.* 2006;3(9):516-525.
- ² Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms, *Gut*, 2013;62(1):43-52.
- ³ Fasano, A. & Catassi, C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum, *Gastroenterology*, 2001;120, 636–651
- ⁴ Ludvigsson JF, Murray JA, Epidemiology of Celiac Disease, *Gastroenterol Clin North America*, 2019; 48(1):1-18.
- ⁵ Catassi C, Gatti S, Fasano A, The New Epidemiology of Celiac Disease, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59: S7-S9.
- ⁶ Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study, *Arch Intern Med*, 2003; 163(3):286-292.
- ⁷ Fasano A, Catassi C. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2012; 367:2419–26.
- ⁸ Volta U, Caio G, Stanghellini V, De Giorgio R. The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center. *BMC Gastroenterol.* 2014 ;14:194.

⁹ Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Lahr BD, et al. Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study, *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008 ;6(9):983-987.

¹⁰ Book L, Zone JJ, Neuhausen SL, Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families, *Am J Gastroenterol*, 2003; 98 (2): 377-381.

¹¹ Lundin KE, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015; 12:507–15.

¹² Fasano, A. & Catassi, C. Coeliac disease in children. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, 2005; 19, 467–478

¹³ Nisticò L, Fagnani C, Coto I et al., Concordance, disease progression and heritability of celiac disease in Italian twins. *Gut* 2006; 55(6):803.

¹⁴ Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, et al. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children, *N Engl J Med*, 2014;371:1295–303.

¹⁵ Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, et al. Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease, *N Engl J Med*, 2014;371:1304–15.

- ¹⁶ Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer, *J Exp Med*, 1989; 169(1):345-350.
- ¹⁷ Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B., Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis, *Annu Rev Immunol*, 2011; 29(1):493-525.
- ¹⁸ Megiorni F, Pizzuti A., HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing, *J Biomed Sci*, 2012; 19(1):88
- ¹⁹ Sollid, L. M. & Lie, B. A. Celiac disease genetics: Current concepts and practical applications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*, 2005; 3, 843–851.
- ²⁰ Silano M, Vincentini O, De Vincenzi M., Toxic, immunostimulatory and antagonist gluten peptides in celiac disease, *Curr Med Chem*, 2009; 16:1489–1510.
- ²¹ Welander A, Tjernberg AR, Montgomery SM, et al., Infectious disease and risk of later celiac disease in childhood, *Pediatrics*, 2010; 125(3): 530-6.
- ²² Kahrs CR, Chuda K, Tapia G, et al., Enterovirus as trigger of coeliac disease: nested casecontrol study within prospective birth cohort, *BMJ*, 2019; 364:231.

- ²³ Hausch F, Shan L, Santiago NA, et al. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002; 283(4): G996–G1003
- ²⁴ Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al., Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function, *Gut*, 2003; 52:218–23.
- ²⁵ Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A., Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions, *J Cell Sci*, 2000; 113:4435–40.
- ²⁶ Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, et al. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 26:757–66.
- ²⁷ Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease. *J Immunol.* 2006; 176:2512–21.
- ²⁸ Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, et al. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet.* 2005;37:1341–4.

- ²⁹ Loeff T, Araya M, Pérez-Bravo F. Frequency of MYO9B polymorphisms in celiac patients and controls. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012; 104:566–71.
- ³⁰ Wapenaar MC, Monsuur AJ, van Bodegraven AA, et al. Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2008; 57:463–7.
- ³¹ Schumann M, Richter JF, Wedell I, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 2008; 57:747–54.
- ³² Moreno ML, Cebolla Á, Muñoz-Suano A, et al. Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut.* 2017; 66:250–7.
- ²⁹ Fasano A. Celiac disease: how to handle a clinical chamaleon. *N Engl J Med.* 2003; 348:2568–70.
- ³⁰ Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013; 6:43–52.
- ³¹ Leonard MM, Sapone A, Catassi C, Fasano A. Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: a review. *JAMA.* 2017; 318:647–56.

- ³² Vivas S, Ruiz de Morales JM, Fernandez M, et al. Age-related clinical, serological, and histopathological features of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103:2360–5.
- ³³ Reilly NR, Aguilar K, Hassid BG, et al. Celiac disease in normal-weight and overweight children: clinical features and growth outcomes following a gluten-free diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 53:528–623.
- ³⁴ Volta U, Caio G, Stanghellini V, De Giorgio R. The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center. *BMC Gastroenterol*. 2014; 14:194
- ³⁵ Reilly NR, Aguilar K, Hassid BG, et al. Celiac disease in normal-weight and overweight children: clinical features and growth outcomes following a gluten-free diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; 53:528–31.
- ³⁶ Baydoun A, Maakaron JE, Halawi H, et al. Hematological manifestations of celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2012; 47:1401–11.
- ³⁷ Krzywicka B, Herman K, Kowalczyk-Zajac M, Pytrus T. Celiac disease and its impact on the oral health status – review of the literature. *Adv Clin Exp Med*. 2014 ;23:675–81.
- ³⁸ Volta U, De Franceschi L, Lari F, et al. Coeliac disease hidden by cryptogenic hypertransaminasaemia. *Lancet*. 1998; 352:26–9.

- ³⁹ Volta U, Caio G, Tovoli F, De Giorgio R. Gut-liver axis: an immune link between celiac disease and primary biliary cirrhosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 7:253–61.
- ⁴⁰ Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, et al., ESSCD guideline fo celiac disease and othe gluten-related disorders. *United European gastroentrol J* 2019;7(5):583
- ⁴¹ Sabatino, A. Di & Corazza, G. R. Coeliac disease. TL - 373. *Lancet*, 2009; 373 VN-, 1480–1493).
- ⁴² Sabatino, A. Di & Corazza, G. R. Coeliac disease. TL - 373. *Lancet*, 2009; 373 VN-, 1480–1493.
- ⁴³ Leffler DA, Green PH, Fasano A. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015; 12:561–71
- ⁴⁴ Caio G, De Giorgio R, Volta U. Coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Lancet.* 2018; 392:916–7.
- ⁴⁵ Volta U, Caio G, Boschetti E, et al. Seronegative celiac disease: shedding light on an obscure clinical entity. *Dig Liver Dis.* 2016; 48:1018–22.
- ⁴⁶ Mooney PD, Evans KE, Singh S, Sanders DS. Treatment failure in coeliac disease: a practical guide to investigation and treatment of non-responsive and refractory coeliac disease. *J Gastrointest Liver Dis.* 2012; 21:197–203.

- ⁴⁷ Volta U, Granito A, Fiorini E, et al. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci*. 2008; 853:1582–8.
- ⁴⁸ Volta U, Tovoli F, Piscaglia M, et al. Old and new serological test for celiac disease screening. *Exp Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 4:31–5.
- ⁴⁹ Pietzak, M. M. Follow-up of patients with celiac disease: Achieving compliance with treatment. *Gastroenterology*, 2005; 128.
- ⁵⁰ Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 54:136–156
- ⁵¹ Catassi C, Fasano A. Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *Am J Med*. 2010; 123:691–3.
- ⁵² Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999; 11:1185–94.
- ⁵³ Brown I, Mino-Kenudson M, Deshpande V, Lauwers GY. Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130:1020–5.

- ⁵⁴ Kakar S, Nehra V, Murray JA, et al. Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosa architecture. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:2027–33.
- ⁵⁵ Fuchs, V. et al. Factors associated with long diagnostic delay in celiac disease. *Scand. J. Gastroenterol*. 2014; 49, 1304–1310.
- ⁵⁶ Ukkola, A. et al. Patients' experiences and perceptions of living with coeliac disease - implications for optimizing care. *J. Gastrointest. Liver Dis*. 2012; 21, 17–22.
- ⁵⁷ Wahab PJ, Meijer JWR, Mulder CJJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol*. 2002; 118(3):459-463.
- ⁵⁸ Aziz I, Evans KE, Hopper AD, et al. A prospective study into the aetiology of lymphocytic duodenosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; 32(11-12):1392-1397.
- ⁵⁹ Green PH, Rostami K, Marsh MN. Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005; 19(3):389-400.
- ⁶⁰ Koskinen O, Collin P, Lindfors K, et al. Usefulness of Small-bowel Mucosal Transglutaminase-2 Specific Autoantibody Deposits in the

Diagnosis and Follow-up of Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol*. September 2009;64

⁶¹ Shah S, Akbari M, Vanga R et al., Patient Perception of Treatment Burden is High in Celiac Disease Compared to Other Common Conditions *Am J Gastroenterol*. 2014; 109(9): 1304–1311.

⁶² Singh J, Whelan K Limited availability and higher cost of GFD. *J Hum Nutr Diet* 2011; 24:479

⁶³ MacCulloch K, Rashid M Factors affecting adherence to a GFD in children with celiac disease. *Paediatr Child Health* 2014;19: 305

⁶⁴ Roos S, Kärner A, Hallert C. Psychological well-being of adult coeliac patients treated for 10 years. *Dig Liver Dis*. 2006; 38:177–80.

⁶⁵ Aziz I, Evans KE, Papageorgiou V, Sanders DS. Are patients with coeliac disease seeking alternative therapies to a gluten-free diet? *J Gastrointest Liver Dis*. 2011; 20:27–31.

⁶⁶ Leffler DA, Kelly CP, Green PH, et al. Larazotide acetate for persistent symptoms of celiac disease despite a gluten-free diet: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2015; 148:1311–9.

⁶⁷ Murray JA, Kelly CP, Green PHR, et al. No difference between latiglutenase and placebo in reducing villous atrophy or improving symptoms

in patients with symptomatic celiac disease. *Gastroenterology*. 2017; 152:787–98.

⁶⁸ Anderson RP, Jabri B. Vaccine against autoimmune disease: antigen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25:410–7.

⁶⁹ Volta U, Tovoli F, Piscaglia M, et al. Old and new serological test for celiac disease screening. *Exp Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 4:31–5

⁷⁰ Dipper CR, Maitra S, Thomas R, et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies in the follow-up of adult coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009; 30: 236–4

⁷¹ Hall NJ, Rubin GP, Charnock A. Intentional and inadvertent non-adherence in adult celiac disease. A cross sectional survey. *Appetite* 2013; 68:56-62

⁷² Hollon JR, Cureton PA, Marin ML, et al. Trace gluten contamination may play a role in mucosal and clinical recovery in a subgroup of diet-adherent non-responsive celiac disease patients. *BMC Gastroenterol* 2013; 13:40

⁷³ See JA, Kaukinen K, Makharia GK, et al. Practical insights into gluten-free diets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015,12(10), 580–91

⁷⁴ Catassi C, Fabiani E, Iacono G, et al. A prospective double-blind placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2007;85(1):160-6

⁷⁵ US Food and Drug Administration Report, “Guidance for Industry; Gluten-Free Labeling of Foods,” June 2014.

⁷⁶ Gibert A, Espadaler M, Angel Canela M, et al. Consumption of gluten free products: should the threshold value for trace amount of gluten be at 20,100 or 200 ppm? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18(11):1187-95

⁷⁷ Gibert A, Kruizinga AG, Neuhold S, et al. Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population based probabilistic approach to risk estimation. *Am J Clin Nutr* 2013;97(1):109-16

⁷⁹ Comino I, Fernández-Bañares F, Esteve M, Ortigosa L, Castillejo et al. Gluten Peptides Reveal Limitations of Serological Tests and Food Questionnaires for Monitoring Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *Am J Gastroenterol* 2016; 111: 1456-1465.

⁸⁰ Codex Stan, A. Codex standard for foods for special dietary use for person intolerant to gluten. *Codex Aliment. Codex Stan 118-1979. Amendment: 1983 and 2015. Rev (2015). doi:10.1017/CBO9781107415324.004*

⁸¹ Valdés I, Garcia E, Liorente M, Méndez E. Innovative approach to low-level gluten determination using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003 May; 15(5):465-74.

- ⁸² Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, et al. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001 Oct; 13(10):1189–93.
- ⁸³ Sturgess R, Day P, Ellis Hi, Lundin KE, Gjertsen HA, Kontakou M, Ciclitira P1 Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet* 1994; 343:758-781.
- ⁸⁴ Anderson RP, Degano P, Godkin A, Jewell DP, Hill AV. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 2000; 6: 337-342.
- ⁸⁵ Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005; 40(1):1–19.
- ⁸⁶ Syage, J. A. et al. Determination of gluten consumption in celiac disease patients on a gluten-free diet. *Am. J. Clin. Nutr*, 2018; 107, 201–207.
- ⁸⁷ Catassi, C. et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr*. 2007; 85, 160– 166

⁸⁸ Verma A.K, Gatti S, Galeazzi T, Monachesi C. et al. Gluten Contamination in Naturally or Labeled Gluten-Free Products Marketed in Italy, *Nutrients* 2017; 9,115

⁸⁹ Codex Alimentarius Commission. Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten Codex STAN 118-1979; Codex Alimentarius Commission: Rome, Italy, 2008.

⁹⁰ Lee, H.J.; Anderson, Z.; Ryu, D. Gluten contamination in foods labeled as “gluten free” in the United States. *J. Food Prot.* 2014, 77, 1830–1833.

⁹¹ Syage, J. A. et al. Determination of gluten consumption in celiac disease patients on a gluten-free diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 2018; 107, 201–207.