



Università Politecnica delle Marche

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

*Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata*

Studio della Malattia Celiaca nella Popolazione Pediatrica del

Verbano-Cusio-Ossola

Study of Celiac Disease in the Pediatric Population of

Verbano-Cusio-Ossola

Tesi di Laurea Magistrale di:
Mariadomenica Del Vecchio

Relatore -
Chiar.mo Prof:
Paolo Mariani

Correlatore:
Dott.ssa *Irene Paolucci*

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2019/2020

INDICE

❖ Capitolo Primo: Introduzione.

- Definizione di Malattia Celiaca;
- Eziopatogenesi della Malattia Celiaca;
- Presentazione Clinica:
 - Malattia Celiaca Maggiore;
 - Malattia Celiaca Minore;
 - Malattia Celiaca Silente o Latente;
 - Malattie Associate.
- Diagnosi;
- Saggi di Primo e Secondo Livello;
- Impostazione Terapeutica e *Follow-up* Successivo alla Diagnosi;
- Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità;
- Associazione HLA e Malattia Celiaca;
- Cenni di Epidemiologia.

❖ Capitolo Secondo: Obiettivi della Tesi.

❖ Capitolo Terzo: Materiali e Metodi.

- Casistica del Campione in Esame;
- Estrazione e Quantificazione del DNA;
- Tipizzazione dei Polimorfismi HLA di classe II:
 - *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers* (PCR – SSP);
 - *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide* (PCR – SSO) e Tecnologia Luminex;
 - Elettroforesi su Gel di Agarosio;
 - Test Sierologici.

❖ Capitolo Quarto: Risultati e Discussione.

- Valutazione dell'Appropriatezza delle Richieste HLA;
- Approccio Molecolare allo Studio degli Aplotipi HLA DQ;
- Valutazione della Concordanza tra Presenza di Anticorpi e Test Genetico HLA Suggestivo di Predisposizione alla Patologia;
- Sesso dei Pazienti e Correlazione con Altre Patologie Autoimmuni;
- Analisi Statistica e Discussione.

❖ Capitolo Quinto: Bibliografia.

Capitolo Primo

INTRODUZIONE

1.1 Definizione di Malattia Celiaca

La malattia celiaca (dal greco koilia, cavità, ventre), definita anche sprue celiaca o enteropatia da glutine, è una malattia immunomediata scatenata dall'ingestione di glutine che, in soggetti geneticamente predisposti, determina un processo infiammatorio nell'intestino tenue, conseguente malassorbimento e manifestazioni extra intestinali (1).

Ma cosa è il glutine?

Il glutine è un complesso proteico presente in alcuni cereali, quali frumento, segale, orzo, farro, spelta, grano khorasan (spesso in commercio come kamut), triticale.

La prolamina è una delle frazioni proteiche che costituiscono il glutine ed è la responsabile dell'effetto tossico nel celiaco.

Il glutine è definito come la frazione proteica di frumento, segale, orzo, avena, kamut, spelta, triticale o i loro ceppi ibridati o da essi derivati, insolubile in acqua e in 0,5 M NaCl.

Le prolamine sono definite come le frazioni del glutine che possono essere estratte da etanolo al 40 – 70%. La prolamina da frumento è la gliadina (figura 1), dalla segale è la secalina, dall'orzo è l'ordeina e dall'avena è l'avenina. Il contenuto di prolamina nel glutine è considerato generalmente del 50% circa (2).

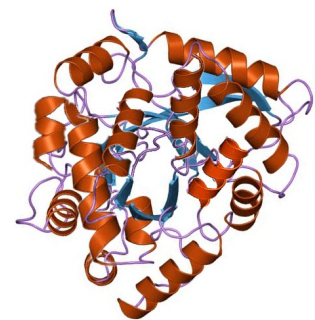


Figura 1: Struttura proteica della gliadina.

Ben diverso dai celiaci, è il gruppo degli allergici al grano, che manifestano cioè una vera e propria allergia alimentare nei confronti delle proteine del grano; tale fenomeno è mediato da immunoglobuline di classe E (IgE).

Tuttavia, esistono casi di reazione al glutine in cui non sono coinvolti né meccanismi autoimmuni, come nella celiachia, né di tipo allergico IgE-mediato: a questi casi ci si riferisce con il termine di *gluten-sensitivity*. Per *gluten-sensitivity* si intende un disturbo di recente inquadramento clinico, al momento ancora privo di traduzione italiana. Identificato maggiormente in pazienti adulti, i soggetti con tale condizione presentano disturbi (intestino irritabile, diarrea, dolore addominale, gonfiore) che si associano a stanchezza cronica, cefalea, dolori muscolari ed articolari, eczema, sonnolenza, difficoltà di concentrazione, formicolii agli arti, depressione; i soggetti in questione sperimentano la remissione della sintomatologia se sottoposti a dieta priva di glutine, e la ripresentano ogni volta che il glutine viene reintrodotta.

Si stima che tale condizione sia molto frequente, arrivando ad interessare fino al 6% della popolazione generale. Dal punto di vista anticorpale, i pazienti con *gluten-sensitivity* sono sempre anti-transglutaminasi ed anti-endomisio negativi, ma spesso anti-gliadina positivi; geneticamente, possono presentare nel 50% dei casi gli aplotipi predisponenti la celiachia (DQ2 e/o DQ8). Se sottoposti a endoscopia del tratto digerente superiore, questo gruppo di pazienti può rivelare nessuna alterazione oppure solo minime modifiche patologiche della mucosa duodenale (grado 0-1, secondo la classificazione di Marsh) (3).

1.2 Eziopatogenesi della Malattia Celiaca

La celiachia è una malattia multifattoriale, derivata da una complessa interazione tra patrimonio genetico, fattori immunologici e ambientali.

La malattia è il risultato di un'inappropriata risposta immunitaria T-mediata al glutine ingerito e alle prolamine ad esso correlate; per questo viene considerata una vera e propria malattia immunomediata.

Sembra che nelle fasi precoci della malattia sia alterata la permeabilità dell'epitelio intestinale, per cui si assiste ad un maggiore assorbimento di macromolecole, tra cui il glutine; la risposta immunitaria a questi antigeni determinerà l'inizio del danno tissutale (4).

Questa risposta sproporzionata è resa possibile dall'intervento dei geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), in particolare dal sistema HLA di classe I e II: circa il 90% dei celiaci risulta essere HLA-DQ2 positivo (DQA1*0501/DQB1*0201), il 5% è HLA-DQ8 positivo (DQA1*0301/DQB1*0302); i restanti casi possiedono almeno una delle due componenti dell'eterodimero DQ2 (più spesso il DQB1*0201).

Gli alleli HLA codificanti per gli eterodimeri DQ2 possono essere codificati sia in cis che in trans, questo spiegherebbe l'associazione sia con il DR3 che con il DR5 e il DR7.

La tipizzazione HLA ha un alto valore predittivo negativo; ne risulta che la totale assenza dei suddetti genotipi esclude la possibilità di sviluppo della malattia (5).

Per quanto riguarda i fattori immunologici, nel determinismo della malattia partecipa la risposta specifica: gli anticorpi IgA anti-endomisio (EMA), il cui bersaglio auto-antigenico è la transglutaminasi tissutale (tTG), e i linfociti T soppressori intraepiteliali (IEL) che mostrano un'abnorme attivazione (1, 6).

La componente ambientale è rappresentata dalla quantità e dalla “qualità” del glutine introdotto con gli alimenti, dall’epoca di introduzione del glutine e dalle infezioni intestinali.

La reazione immunitaria responsabile della malattia avviene in seguito al superamento da parte della gliadina dell’epitelio intestinale, fino a raggiungere la lamina propria.

In condizioni fisiologiche la presenza di giunzioni strette (tight junctions) intercellulari rende l’epitelio intestinale impermeabile al passaggio di macromolecole come il glutine, perciò solo minime quantità di frazioni antigeniche superano la barriera epiteliale. Nei soggetti con malattia celiaca l’integrità delle tight junctions, e quindi la permeabilità dell’epitelio intestinale, risulta alterata, determinando quindi un maggiore assorbimento di macromolecole e di glutine. Una volta giunta nella lamina propria, la gliadina interagisce con la tTG, un enzima che catalizza sia una reazione di deamidazione di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutammina in acido glutammico, carico negativamente, sia una reazione di crosslinking, responsabile della genesi di un complesso transglutaminasi – gliadina deamidata.

La gliadina deamidata viene così processata dalle cellule presentanti l’antigene (APC) quali le cellule dendritiche, localizzate nella mucosa intestinale, e presentata ai linfociti T CD4+ mediante le molecole HLA DQ2/8. Ciò determina l’attivazione dei linfociti T che secernono una serie di citochine che orientano la risposta immunitaria o verso la produzione di anticorpi (risposta Th2), o verso la flogosi e il rimodellamento tissutale (risposta Th1).

La risposta immunitaria T-mediata gioca un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia (7); in particolare la reazione Th2 stimola l’espansione di cloni di cellule B autoreattive e quindi la produzione di autoanticorpi diretti contro la gliadina, la tTG e i complessi tTG-gliadina deamidata. La risposta Th1, in cui ha un ruolo centrale il Tumor Necrosis Factor, stimola invece la secrezione da parte dei fibroblasti intestinali di proteine che determinano il rimodellamento tissutale. Il danno causato dall’infiammazione determina il rilascio di tTG intracellulare, con ulteriore modificazione dei peptidi della gliadina.

L'attivazione delle cellule dendritiche da parte dei peptidi del glutine determina l'up-regulation di NKG2D e MICA sui linfociti intraepiteliali (IEL) e sugli enterociti, e l'aumento della permeabilità intestinale a livello delle giunzioni intercellulari (mediato da un incremento dell'espressione intracellulare di zonulina, molecola che regola la polimerizzazione dei microfilamenti di actina e l'apertura delle giunzioni strette), con ulteriore passaggio di macromolecole (1, 6). Questi ultimi due eventi garantiscono una auto-alimentazione del processo (figura 2).

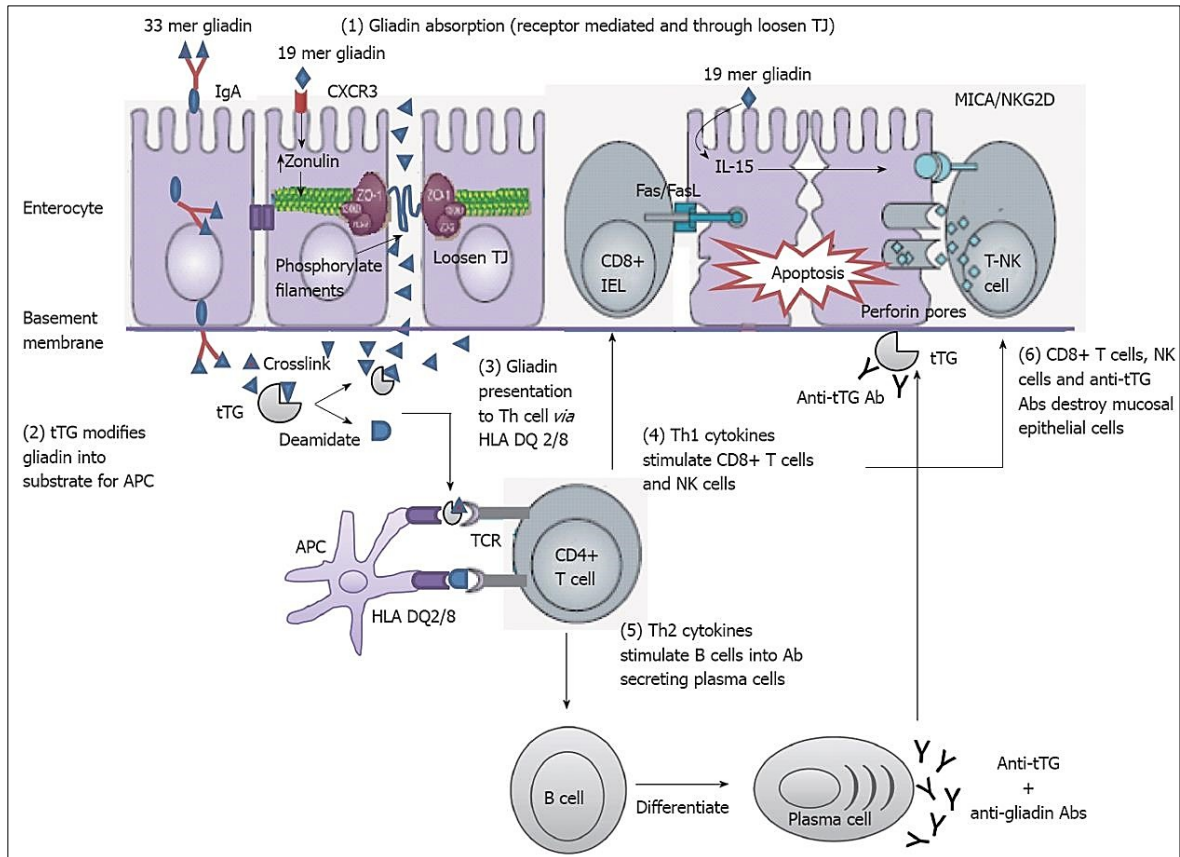


Figura 2: Patogenesi della malattia celiaca. I peptidi della gliadina attraversano l'enterocita tramite le giunzioni paracellulari strette, come conseguenza dell'aumentato rilascio di zonulina che provoca una ridotta integrità della mucosa: la gliadina 19-mer può legare il recettore 3 delle chemochine (CXCR3) e muoversi per transcitosi o per retrotranscitosi delle immunoglobuline di classe A mediata dal recettore della transferrina CD71. La transglutaminasi tissutale catalizza la deamidazione o la reazione di cross-linking della gliadina, che verrà poi riconosciuta dalle molecole HLA-DQ2 e -DQ8 delle cellule presentanti l'antigene (APC). Le cellule presentanti l'antigene presentano i peptidi tossici ai linfociti T CD4⁺. I linfociti T CD4⁺ attivati producono alti livelli di citochine pro-infiammatorie. Le citochine prodotte dai linfociti Th1 promuovono l'aumento della citotossicità dei linfociti intraepiteliali (IEL) e dei NK, che causano la morte per apoptosi degli enterociti mediata dal sistema Fas/LigandoFas, e dal pathway NKG2D-MICA. La produzione di citochine da parte dei linfociti Th2 attiva e induce l'espansione clonale delle cellule B, che si differenziano in plasmacellule secernenti anticorpi (antigliadina e anti-tTG) (8).

1.3 Presentazione Clinica

La malattia celiaca può presentarsi con un ampio spettro di manifestazioni cliniche che vanno da segni e sintomi di un franco malassorbimento a quadri più subdoli e sfumati (Tabella 1).

In base alla modalità di presentazione clinica e alle alterazioni istologiche ed immunologiche al momento della diagnosi, sono state a lungo riconosciute quattro forme cliniche della malattia celiaca: classica (o tipica), atipica, silente e latente o potenziale.

Questa classificazione è stata recentemente modificata ed è stata introdotta una nomenclatura più semplice e chiara con cui si distinguono tre modalità di presentazione clinica della malattia (6):

1. Malattia Celiaca Maggiore;
2. Malattia Celiaca Minore;
3. Malattia Celiaca Silente o Latente.

1.3.1 Malattia Celiaca Maggiore

L'esordio della sintomatologia si verifica in genere tra i 6 e i 24 mesi di età, ma può presentarsi in qualsiasi epoca di vita. Questa forma è caratterizzata da sintomi tipici di malassorbimento, quali diarrea, steatorrea e calo ponderale, inappetenza e distensione addominale. Altri sintomi frequentemente associati sono l'irritabilità e il vomito.

All'esame obiettivo è presente pallore, addome globoso, pannicolo adiposo scarsamente rappresentato e ipotrofia muscolare.

Gli esami di laboratorio mostrano i possibili segni del malassorbimento rappresentati da anemia sideropenica, ipoalbuminemia, ipocalcemia e deficit di vitamine. Agli inizi del secolo veniva descritta anche la cosiddetta "crisi celiaca", caratterizzata da diarrea acquosa esplosiva, marcata distensione addominale, severa ipoprotidemia, disidratazione, squilibrio idro-elettrolitico e letargia, condizione che invece attualmente risulta essere estremamente rara (9).

In questa forma i test sierologici sono positivi e c'è il tipico coinvolgimento del duodeno e del digiuno prossimale, responsabile del malassorbimento, ma l'estensione del danno mucosale è estremamente variabile.

1.3.2 Malattia Celiaca Minore

In questa forma, ad esordio più tardivo rispetto la precedente, non sono presenti chiari segni di malassorbimento, ma piuttosto manifestazioni extra-intestinali e/o vaghi disturbi intestinali, quali dolori addominali ricorrenti, nausea, vomito, gonfiore o stipsi (9).

Anche in questa forma i test sierologici sono positivi e all'esame istologico delle biopsie duodenali è presente il tipico danno mucosale rappresentato dalla atrofia dei villi, tuttavia poiché il duodeno presenta notevoli riserve funzionali molti individui possono non avere sintomi o segni clinici di malassorbimento. Numerosi organi e apparati possono essere interessati, isolati o in associazione tra loro:

- Cute: la Dermatite Erpetiforme è attualmente considerata come la variante cutanea della malattia celiaca e si osserva nel 15-25% dei soggetti celiaci; è una malattia caratterizzata da lesioni papulo-vescicolose, pruriginose, simmetricamente localizzate a gomiti, ginocchia e solco intergluteo. Patognomonici sono i depositi granulari di IgA nelle papille del derma interessato. La dermatite e il danno istologico regrediscono con la dieta priva di glutine e ricompaiono a dieta libera. La risoluzione delle lesioni cutanee potrebbe essere lenta e in alcuni pazienti si osserva la completa scomparsa della dermatite dopo 1-2 anni dall'inizio della dieta (10 – 11).
- Apparato osteoarticolare: numerosi studi clinici ed epidemiologici hanno riportato l'associazione tra malattia celiaca ed osteoporosi. La dieta priva di glutine iniziata in età pediatrica è l'unica misura efficace per ottenere la normalizzazione della densità ossea; nell'età adulta, invece, la densità della massa ossea, pur migliorando in corso di dieta, difficilmente si normalizza, con un conseguente rischio elevato di fratture. Questo sottolinea la necessità di una diagnosi precoce di malattia celiaca. Lo studio della densità ossea in tutti i pazienti alla diagnosi non sembra essere giustificato in considerazione della bassa prevalenza di osteoporosi osservata in un recente studio su una popolazione di

pazienti celiaci non ancora in trattamento dietetico; la densitometria potrebbe essere riservata ai pazienti con malattia celiaca maggiore, soprattutto se presentano pregresse fratture patologiche, ipogonadismo, concomitante intolleranza al lattosio, scarsa compliance o scarsa risposta alla dieta. Dato che il miglioramento della densità ossea si osserva dopo 1-2 anni di dieta senza glutine, è considerato questo il momento migliore per effettuare la densitometria, per valutare la necessità di una supplementazione con calcio e vitamina D (6). La malattia celiaca è stata talora associata ad artralgie, che si risolvono con la sola dieta aglutinata.

- La bassa statura può rappresentare l'unico segno clinico della malattia celiaca. In una recente revisione della letteratura è stata infatti calcolata una prevalenza di malattia celiaca in pazienti con bassa statura del 2,9-8,3% e la malattia celiaca rappresenta la causa più comune di bassa statura rispetto ad altre patologie organiche e allo stesso deficit di ormone della crescita. La patogenesi della bassa statura nella malattia celiaca non è del tutto chiara. L'alterato rilascio ipofisario dell'ormone della crescita potrebbe essere una conseguenza del malassorbimento (in particolare di zinco, che influenza il rilascio dell'ormone della crescita) oppure potrebbe essere correlata all'azione di peptidi del glutine circolanti nel sistema nervoso centrale o ad un anomalo metabolismo cerebrale di monoammine. Dopo l'inizio della dieta senza glutine si osserva un tipico scatto di crescita ed in genere il target dell'altezza viene raggiunto in 2-3 anni (12).
- Sangue: la sideropenia, con o senza anemia, scarsamente responsiva alla terapia marziale per via orale, può spesso rappresentare l'unico segno della malattia celiaca, a causa del coinvolgimento del duodeno prossimale, dove avviene l'assorbimento del ferro. Nel 10% dei celiaci alla diagnosi è presente anemia sideropenica (13).
- Cavo orale: la cavità orale, parte del sistema gastroenterico, può essere interessata da numerose anomalie nei pazienti con malattia celiaca; tra le più comuni sono riportate la stomatite aftosa ricorrente e l'ipoplasia dello smalto dentale, ma sono state osservate anche

forme aspecifiche di glossite atrofica, manifestazioni orali di dermatite erpetiforme, sindrome di Sjogren e lichen planus orale (14).

- Sistema nervoso centrale e periferico: è stato recentemente ipotizzato un coinvolgimento del sistema nervoso centrale e periferico in corso di malattia celiaca, ma la letteratura al riguardo è piuttosto controversa. La spiegazione eziopatogenetica risiede nel malassorbimento di alcune vitamine neurotrope (vitamina E, vitamina B12) o nella produzione di anticorpi diretti contro alcune strutture cerebrali per un meccanismo di mimetismo molecolare. Nell'adulto è stata riportata una elevata prevalenza di malattia celiaca in pazienti epilettici e viceversa, ed è stata descritta una sindrome caratterizzata da epilessia, calcificazioni occipitali endocraniche e malattia celiaca. L'inizio della dieta senza glutine può ridurre la frequenza delle crisi e il dosaggio dei farmaci anti-epilettici. In età pediatrica una meta-analisi degli studi effettuati non sembra supportare l'ipotesi di un'associazione tra malattia celiaca ed epilessia. L'atassia cerebellare è stata descritta come possibile manifestazione clinica della malattia celiaca; sono stati riscontrati anticorpi circolanti contro le cellule cerebrali del Purkinje e la cross-reattività con gli anticorpi anti-gliadina e con gli enterociti suggerisce una comunanza di epitopi. Tuttavia, in molti casi si tratta di una sensibilità al glutine, dimostrata dalla presenza di anticorpi anti-gliadina IgG, non patognomonicamente di malattia celiaca, in assenza di un danno intestinale. In età pediatrica, secondo un largo studio prospettico di popolazione su 835 bambini celiaci, il rischio di atassia cerebellare è nullo e nessuno dei 49 bambini con atassia (sia di origine nota che idiopatica) è risultato positivo allo screening per la malattia celiaca. La diversa prevalenza osservata nell'adulto rispetto al bambino potrebbe essere ricondotta alla minore durata di malattia in età pediatrica che potrebbe non essere sufficiente per determinare il danno neurologico. Recentemente sono state descritte nei pazienti celiaci delle lesioni a carico della sostanza bianca visualizzate tramite risonanza magnetica cerebrale localizzate in sede biparietale-occipitale, uniparietale, frontale e uniparieto-occipitale, ma il valore

prognostico di queste lesioni non è noto e dovrebbe essere chiarito con ulteriori studi. Il coinvolgimento del sistema nervoso periferico è da ricondurre a poliradiculoneuropatie periferiche monofasiche e/o ricorrenti; la forma più comune è una neuropatia cronica, simmetrica, sensoriale, anche se sono state descritte forme motorie e autonome. Sono stati riscontrati anticorpi anti-ganglioside, suggerendo l'ipotesi di una reazione immune contro antigeni dei nervi periferici. La letteratura pediatrica sembrerebbe supportare questa possibile associazione e la dieta senza glutine avrebbe un ruolo importante, considerando la regressione dei sintomi in corso di dieta e la loro ricomparsa in occasione di accidentali assunzioni di glutine. La patologia neurologica più comunemente associata alla malattia celiaca sia nell'adulto che nel bambino è la cefalea. Recentemente, è stata osservata una prevalenza di cefalea nei bambini celiaci del 25% rispetto all'8% in un gruppo di controllo di bambini sani; la dieta senza glutine portava ad un miglioramento della cefalea in più del 75% dei casi e la persistenza della sintomatologia era suggestiva di una scarsa compliance dietetica, supportando l'ipotesi di un disturbo glutine-correlato. In aggiunta, è stata riscontrata una prevalenza di malattia celiaca in bambini affetti da cefalea pari al 5%, significativamente più alta rispetto alla popolazione generale. Questo dato potrebbe essere di notevole interesse clinico, in quanto, al momento, i test per la malattia celiaca non sono inclusi tra le indagini da effettuare in presenza di cefalea e dunque alcuni casi di celiachia potrebbero rimanere non diagnosticati e i pazienti affetti da cefalea continuerebbero a non trovare una soluzione al loro disturbo. Sono state descritte recentemente altre manifestazioni neurologiche in associazione alla malattia celiaca, quali ipotonia, disturbi del comportamento, ritardo mentale o la sindrome da iperattività-deficit di attenzione. Tra i disturbi del comportamento in ambito pediatrico, l'autismo è una delle associazioni più studiate. Tuttavia, la letteratura al riguardo al momento sembra escludere una forte associazione tra malattia celiaca e autismo e sottolinea la necessità di larghi studi, sistematici, multicentrici, per stabilire il ruolo reale del glutine in questo contesto (9).

- Altri sintomi extra intestinali: ipertransaminasemia, cardiomiopatia dilatativa e miocardite autoimmune, ritardo della pubertà, infertilità e abortività ricorrente sono tutte condizioni che possono celare una malattia celiaca (6).

1.3.3 Malattia Celiaca Silente

La malattia celiaca si definisce silente in soggetti asintomatici, che presentano i test sierologici positivi e l'atrofia dei villi all'esame istologico delle biopsie duodenali. Si tratta, in genere, di familiari di pazienti celiaci che eseguono lo screening per la malattia celiaca, o di soggetti che effettuano l'endoscopia per altri motivi. Tuttavia, spesso una più accurata anamnesi clinica di questi casi silenti rivela la presenza di un basso grado di malattia, spesso associato ad uno stato di malessere psicologico. Di comune riscontro sono la sideropenia, con o senza anemia, disturbi del comportamento, quali tendenza alla depressione, irritabilità, o scarsa performance scolastica nei bambini, facile affaticamento e ridotta densità minerale ossea.

Uno studio che ha valutato adolescenti con malattia celiaca, diagnosticata tramite screening e apparentemente asintomatici alla diagnosi, dimostrava dopo un anno di *follow-up* un miglioramento delle condizioni fisiche e psicologiche seguendo una stretta dieta senza glutine.

Esiste anche una forma di malattia celiaca definita latente o potenziale, in presenza di test sierologici positivi, un genotipo HLA predisponente (DQ2 o DQ8), ma con una mucosa intestinale normale o con minime alterazioni dell'architettura (conta intraepiteliale aumentata). Questi soggetti non sono considerati celiaci e non devono seguire una dieta senza glutine, ma nel tempo potrebbero sviluppare sintomi e alterazioni istologiche intestinali, per cui devono essere seguiti nel tempo (9).

1.4 Malattie Associate

Nell'ambito della presentazione clinica della malattia celiaca, uno degli argomenti più dibattuti è l'associazione con altre malattie autoimmuni. Sono due le teorie più accreditate:

- La presenza di un insieme di geni che predispone ai fenomeni autoimmunitari in genere, per cui è più facile un'associazione di più malattie autoimmunitarie;
- La malattia celiaca favorisce l'esordio di altre malattie autoimmuni in soggetti geneticamente predisposti.

Il possibile ruolo preventivo del trattamento precoce della malattia celiaca sullo sviluppo delle complicanze autoimmuni è una questione ancora dibattuta. È stato dimostrato che ritardare la diagnosi, e quindi aumentare il tempo di esposizione al glutine in bambini celiaci, comporta una più alta prevalenza di anticorpi organo-specifici (apparentemente glutine-dipendenti) che tendono a scomparire dopo l'inizio del trattamento. Questi dati suggeriscono l'ipotesi che la dieta senza glutine iniziata precocemente possa prevenire le altre malattie autoimmuni.

D'altro canto, altri studi hanno riportato recentemente che la durata di esposizione al glutine in adulti celiaci, non correla con il rischio di malattie autoimmuni. La forte associazione con la tiroidite autoimmune è confermata da uno studio che ha riscontrato una prevalenza di malattia celiaca del 7,8% in bambini con tiroidite autoimmune o ipertiroidismo. La prevalenza media di malattia celiaca nel diabete mellito di tipo I riscontrata nei 26 studi effettuati è del 4,5%.

La malattia celiaca può associarsi a cromosomopatie (Sindrome di Turner, Sindrome di Down) e a malattie geneticamente determinate (deficit assoluto di IgA, Sindrome di Williams) (9).

<i>Malattia Celiaca Maggiore</i>	<i>Malattia Celiaca Minore</i>	<i>Malattie Autoimmuni Associate</i>	<i>Malattie Genetiche Associate</i>
Diarrea cronica	Anemia sideropenica	Diabete mellito tipo I	Sindrome di Down
Calo ponderale o arresto della crescita	Tiroidite autoimmune	Epatite autoimmune	Sindrome di Turner
Distensione addominale	Bassa statura	Sindrome di Sjogren	Sindrome di Williams
Ipotrofia muscolare	Osteoporosi	Morbo di Addison	Difetti cardiaci congeniti
Inappetenza	Artralgie	Gastrite atrofica autoimmune	Deficit di IgA
Irritabilità	Dermatite erpetiforme	Malattie emocitopeniche autoimmuni	
	Stomatite aftosa	Psoriasi	
	Dolori addominali	Miocardite autoimmune	
	Ipertransaminasemia		
	Cefalea		
	Atassia		
	Epilessia		

	Polineuropatie		
	Cirrosi biliare primaria		
	Pericardite ricorrente		

Tabella 1: Possibili manifestazioni cliniche della malattia celiaca.

1.5 Diagnosi

Il Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (C.N.S.A.) ha approvato un protocollo (pubblicato in G.U. n° 32 S.O. del 7 febbraio 2008), che stabilisce linee guida per la diagnosi e il *follow-up* della celiachia, e che risponde alla necessità di essere semplice, basato su pochi ma essenziali test diagnostici, applicabile su tutto il territorio nazionale e in grado di identificare il maggior numero di celiaci, riducendo al minimo le diagnosi mancate e quelle sbagliate (15).

Gli esami che devono essere sempre eseguiti per giungere alla diagnosi in modo corretto, sono i markers anticorpali sierologici e la biopsia intestinale. La diagnosi di celiachia dovrebbe sempre passare attraverso queste due indagini, fermo restando che il “gold standard” per la diagnosi è la biopsia intestinale e l’individuazione delle tipiche lesioni istologiche (16).

Per quanto riguarda la sierologia, essa è altrettanto importante per la conferma della diagnosi, dato che la positività dei suddetti anticorpi conferma la glutine-dipendenza dell’atrofia dei villi con ragionevole sicurezza.

L’enzima transglutaminasi di tipo 2 (TG2) svolge un ruolo cruciale nella patogenesi della celiachia, non solo perché è l’autoantigene principale obiettivo degli anticorpi anti-transglutaminasi (TG2A), ma anche per la sua capacità di deamidare la gliadina, processo che genera epitopi che si legano in modo più efficiente alle molecole di istocompatibilità locus HLA-DQ2/DQ8 (17).

I linfociti T CD4⁺ mucosali, a loro volta, vengono attivati da questi epitopi immunodominanti, con conseguente sviluppo di una reazione immunitaria in cui sono coinvolti interleuchina 15 (17 – 18) e interferone- α (19).

Sembra che la transglutaminasi tissutale sia solo uno degli autoantigeni coinvolti in reazioni autoimmuni glutine-dipendente. Altri antigeni che normalmente sono “nascosti” possono essere smascherati e causare una risposta immunologica autoimmune a seguito del processo infiammatorio indotto dalla gliadina (20).

L'attivazione di questi complessi meccanismi patogenetici porta a vari gradi di alterazione della mucosa del piccolo intestino con conseguente malassorbimento (21). Attualmente, l'unico trattamento efficace disponibile è una rigorosa dieta aglutinica per tutta la vita, che migliora i sintomi, lo stato nutrizionale (22 – 23), le condizioni sierologiche e i cambiamenti istologici (22).

L'introduzione dei test sierologici ha consentito quindi di selezionare i soggetti da sottoporre all'esame istologico, riducendo il numero delle biopsie di conferma e limitandone l'utilizzo per la verifica dell'efficacia della dieta priva di glutine; inoltre, ha consentito di estendere la ricerca a soggetti con manifestazioni extra intestinali, ai gruppi a rischio e alla popolazione asintomatica per verificare la prevalenza reale della malattia (24 – 25).

È possibile individuare tre diversi percorsi diagnostici a seconda che ci si trovi di fronte ad un forte sospetto clinico di celiachia, a pazienti con bassa probabilità di celiachia e a genitori e fratelli di celiaci.

Secondo le ultime linee guida emanate dall'American College of Gastroenterology è raccomandata l'esecuzione di test per verificare una eventuale condizione di celiachia per:

- I pazienti con sintomi, segni o prove di laboratorio indicative di malassorbimento, come diarrea cronica con perdita di peso, steatorrea, dolore addominale postprandiale e gonfiore (Forte raccomandazione, alto livello di prova);
- I pazienti con un parente di primo grado che abbia una diagnosi confermata di celiachia, dovrebbero essere testati, se mostrano i possibili segni, sintomi o prove di laboratorio (Forte raccomandazione, ad alto livello di evidenza);
- La malattia celiaca dovrebbe essere cercata come possibile causa di elevati livelli sierici di aminotransferasi, se non si trova altra eziologia (Forte raccomandazione, alto livello di prova);

- I pazienti con diabete mellito di tipo I dovrebbero essere testati per celiachia, se ci sono sintomi digestivi, o segni, o prove di laboratorio indicativi di malattia celiaca (Forte raccomandazione, ad alto livello di evidenza).

La celiachia è ampiamente riconosciuta come una delle cause più comuni di malassorbimento cronico (6). Questo è il risultato di una serie di lesioni al piccolo intestino, con conseguente perdita di superficie di assorbimento e riduzione degli enzimi digestivi, che può potenzialmente indurre un alterato assorbimento di micronutrienti, come vitamine liposolubili, ferro, acido folico e vitamina B12 (26).

Il mancato assorbimento di calorie sufficienti conduce a perdita di peso, dolore addominale e gonfiore (26). Questi sono i sintomi più comuni associati con la malattia celiaca (27 – 28).

Attualmente, essendo la celiachia una malattia estremamente eterogenea, l'attività di screening su individui classificati nelle categorie a rischio, è la strategia più utilizzata per aumentare la capacità di diagnosi, anche se non permette di diagnosticare la totalità dei pazienti celiaci (29 – 30).

Gli scenari clinici più frequenti in caso di celiachia variano da sintomi moderati, come il colon irritabile, a sintomi severi, come anemia da carenza di ferro (31 – 32 – 33), aumento delle transaminasi (34 – 35), che si normalizza in seguito a dieta aglutinica (36 – 37 – 38) (raramente la celiachia si associa a gravi danni epatici).

La malattia celiaca è sostanzialmente più comune nei pazienti con diabete (39 – 40 – 41 – 42), soprattutto diabete mellito di tipo I, rispetto alla popolazione caucasica generale. Le stime variano tra il 3% e il 10%.

Si è evidenziata anche la correlazione con la tiroidite autoimmune (43), in particolar modo la tiroidite di Hashimoto e il morbo di Graves sono i più frequenti disturbi immuno-mediati riscontrabili nei pazienti adulti (44 – 45).

Secondo le ultime linee guida emanate dall'American College of Gastroenterology i saggi da utilizzare per la diagnosi di celiachia, suddivisi in saggi di I livello e di II livello, sono:

- Anticorpi anti-transglutaminasi IgA tissutale, che è il test singolo preferito per la rilevazione della malattia celiaca in soggetti di età superiore ai due anni;
- Quando esiste una elevata probabilità di malattia celiaca la possibilità di carenza di IgA deve essere sempre verificata. Un approccio alternativo è di includere un test basato sia su IgA che IgG, come ad esempio la ricerca di anticorpi IgG anti peptidi deamidati della gliadina;
- Nei pazienti in cui è identificato un basso livello delle IgA o deficit selettivo delle IgA, devono essere eseguiti i test anticorpi anti-gliadina IgG e antitransglutaminasi tissutale IgG.
- Se il sospetto di malattia celiaca è alta, la biopsia intestinale dovrebbe essere eseguita anche nel caso di sierologia negativa;
- Tutti i test sierologici dovrebbero essere eseguiti durante una dieta che preveda il glutine;
- Gli anticorpi diretti contro la gliadina nativa non sono raccomandati come test di primo livello per malattia celiaca;
- La combinazione di diversi test per la diagnosi di malattia celiaca, al posto del solo test Ig transglutaminasi tissutale, può aumentare marginalmente la sensibilità per l'individuazione della malattia celiaca, ma riducono la specificità, pertanto non sono raccomandati in soggetti a basso rischio;
- Per lo screening su bambini di età inferiore ai due anni viene consigliato il test IgA transglutaminasi tissutale, che dovrebbe essere sempre combinato con il peptide gliadina deamidato (IgA e IgG), e il dosaggio delle IgA totali.

È ampiamente dimostrata l'utilità del test IgA anti-transglutaminasi tissutale nella diagnosi primaria (test di primo livello) della malattia celiaca (46). Essendo però abbastanza comune un deficit di IgA nei pazienti con malattia celiaca rispetto alla popolazione generale (47 – 48), è sempre consigliato il dosaggio delle IgA totali e un deficit di IgA deve indurre la valutazione per altre malattie che possono causare atrofia dei villi, come la giardiasi, la proliferazione batterica nel piccolo intestino o forme di immunodeficienza (49).

La sensibilità del test IgA transglutaminasi tissutale per la malattia celiaca non trattata è di circa il 95%; la specificità è del 95% o superiore. Maggiore è il titolo del test, maggiore è la probabilità di un vero risultato positivo (50).

Gli anticorpi anti-gliadina sono stati utilizzati per decenni, e sono ragionevolmente precisi quando vi è una elevata prevalenza di malattia celiaca (51).

L'avvento dei test per auto-anticorpi anti-endomisio (EMA) e gli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale è stato un punto di svolta per la diagnosi (di primo livello) della malattia celiaca (52).

Nonostante i progressi diagnostici offerti dalla disponibilità di test sierologici, l'esecuzione della biopsia intestinale rimane il *gold standard* per la diagnosi di malattia celiaca, anche se nel caso di pazienti pediatrici non può essere eseguita. La biopsia duodenale per la diagnosi di malattia celiaca è comunemente eseguita dopo un riscontro sierologico positivo.

Una sierologia negativa è stata descritta in pazienti con IgA normali (53), questa evidenza rende molto meno probabile la presenza di malattia celiaca, ma non si può escluderne completamente la diagnosi; per questa ragione la biopsia dovrebbe essere eseguita anche nel caso di riscontro di sierologia negativa, ma presenza di segni e sintomi altamente sospetti di malattia celiaca.

La biopsia può essere utile anche nel comune scenario in cui un paziente abbia già iniziato una dieta priva di glutine, prima dell'effettuazione delle opportune indagini specialistiche; in questo caso la sierologia si normalizza dopo sei-dodici mesi di aderenza alla dieta priva di glutine, ma i cambiamenti istopatologici possono persistere molto più a lungo (54).

Inoltre, anche quei pazienti con guarigione della mucosa confermata, hanno spesso persistente linfocitosi intraepiteliale nel contesto di un rapporto normale cripte-villi (55). Pertanto, un paziente con malattia celiaca che è già aderente alla dieta, può avere sierologia normale, ma persistente evidenza istopatologica di malattia.

Dal momento che le modificazioni istopatologiche possono essere irregolarmente distribuite nelle aree del duodeno e possono presentare gradi di gravità diversi, è necessario il prelievo di più campioni biotici (le Linee Guida emanate dall'American Gastroenterology Association prevedono il prelievo di almeno 4-6 campioni) (56).

Questa raccomandazione si basa sulla comprensione dei ricercatori sulla natura frammentaria della malattia, e da studi che hanno dimostrato che la sensibilità della biopsia diminuiva quando venivano effettuate meno di quattro campionature (57).

Si considera la presenza di sierologia positiva specifica nei pazienti con atrofia dei villi, confermata da multipli prelievi biotici, indicativa di malattia celiaca (58).

Nei casi dubbi è d'aiuto la genetica: essa gioca un ruolo fondamentale nella predisposizione alla malattia celiaca, indicato dall'alta concordanza di malattia in gemelli monozigoti. Quasi tutti i pazienti con malattia celiaca presentano positività HLA DQ2 e/o DQ8 (59 – 60).

Il test genetico tuttavia non è utilizzato per confermare la diagnosi, bensì per escluderla nei casi dubbi (61), nei casi in cui non vi sia concordanza tra risultato sierologico e biotico, o nella valutazione di persone con forte sospetto di presenza di celiachia ma che stiano già seguendo una dieta priva di glutine. Infatti, anche se la quasi totalità dei pazienti affetti da celiachia

risulti essere positiva per HLA DQ2 e/o DQ8, si deve tenere presente che circa il 25% - 30% della popolazione europea presenta gli eterodimeri DQ2 e/o DQ8 (62 – 63).

1.5.1 Saggi di Primo e Secondo Livello

I test di primo livello per porre diagnosi di celiachia sono:

- Gli anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) di classe IgA e IgG;
- Gli anticorpi anti-endomisio (EMA) di classe IgA;
- Gli anticorpi anti-gliadina (AGA) di classe IgA e IgG.

Gli anticorpi anti-transglutaminasi e gli anticorpi anti-endomisio presentano una sensibilità e specificità diagnostica praticamente sovrapponibili e molto elevate.

Gli anticorpi anti-transglutaminasi presentano il vantaggio di essere identificati mediante la tecnica ELISA automatizzata, non operatore dipendente, a differenza della ricerca degli anticorpi anti-endomisio che avviene mediante immunofluorescenza.

Inoltre gli anticorpi anti-transglutaminasi sono anticorpi sia di classe IgA che IgG, utili in presenza di deficit di IgA (64).

Esiste la possibilità, inoltre, di ricercare gli anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina (IgA e IgG), che nei casi di malattia celiaca in soggetti giovanissimi, sono rilevabili ancora più precocemente rispetto agli anticorpi anti-transglutaminasi e agli anticorpi anti-gliadina tradizionali. Specie se di classe IgG sembrano avere sensibilità e specificità simili agli IgA anti-TTG (65).

Nei casi positivi, la diagnosi deve essere confermata dalla biopsia intestinale; la biopsia è poco gradita dal paziente e dai suoi familiari, poiché richiede l'esecuzione di una esofagogastroduodenoscopia, un esame invasivo, costoso e non del tutto immune da possibili rischi.

Questa procedura potrebbe essere omessa, senza alcuna perdita di accuratezza diagnostica, nei casi in cui sia applicabile la cosiddetta “regola dei 4/5”, cioè in presenza di 4 dei seguenti 5 elementi: enteropatia celiaca, presenza di predisposizione HLA, sintomi tipici, alto titolo anticorpale e risposta alla dieta senza glutine.

Per contro, la biopsia intestinale rimarrà un’indagine fondamentale nei casi dubbi, situazioni nelle quali l’applicazione di tecniche istologiche avanzate, quali la ricerca mediante immuno-istochimica dei depositi di IgA a livello sub-epiteliale, può addirittura migliorare la resa diagnostica di questa procedura (6).

Il *gold standard* per la diagnosi di malattia celiaca è la biopsia duodenale, in grado di dimostrare la presenza delle caratteristiche alterazioni (66).

Il danno istologico, a livello del piccolo intestino, si caratterizza per un sovvertimento architetturale dei villi, associato a iperplasia delle cripte, infiltrato infiammatorio a livello della lamina propria costituito prevalentemente da plasmacellule e aumento dei linfociti intraepiteliali.

La sequenza delle lesioni che intervengono nella progressione del danno alla mucosa intestinale è stata descritta da Marsh (67).

La classificazione di Marsh identifica tre distinte entità:

- Tipo 1 (o infiltrativa), in cui i villi sono normali, ma vi è un incremento patologico del numero di linfociti intraepiteliali (>25/100 cellule epiteliali);
- Tipo 2 (o iperplastica), in cui all’incremento del numero di linfociti intraepiteliali si associa anche un’iperplasia delle cripte ghiandolari;
- Tipo 3 (o distruttiva), in cui all’incremento del numero di linfociti intraepiteliali ed alla iperplasia delle cripte ghiandolari, si associa un’atrofia dei villi di grado variabile.

Oberhuber et al. hanno proposto una modifica alla classificazione di Marsh, proponendo che la lesione di tipo 3 venga ulteriormente suddivisa in tre sottogruppi, in base all'entità dell'atrofia (68):

- 3a con atrofia di grado lieve;
- 3b con atrofia di grado moderato;
- 3c con atrofia di grado severo.

Tipo	Alterazioni istologiche
Marsh	
Marsh 0	Normale architettura della mucosa e dei villi
Marsh I	Infiltrativa: normale architettura della mucosa e dei villi, aumentato numero di linfociti intraepiteliali (>25/100 enterociti)
Marsh II	Iperplastica: ipertrofia e iperplasia delle cripte
Marsh IIIa	Parziale atrofia dei villi (riduzione altezza dei villi, infiltrazione linfocitaria lieve, iperplasia delle cripte)
Marsh IIIb	Atrofia subtotale dei villi (villi chiaramente atrofici ma ancora riconoscibili, cripte allargate con cellule immature, iniziale infiltrato infiammatorio)
Marsh IIIc	Totale atrofia dei villi (completa perdita dei villi, severa iperplasia delle cripte, infiltrato infiammatorio)

Tabella 2: classificazione istologica delle lesioni intestinali nella malattia celiaca secondo Marsh-Oberhuber.

Il ruolo dell'HLA: la genetica non è sufficiente per lo sviluppo della malattia, infatti circa il 30% della popolazione condivide il genotipo HLA-DQ2, ma di questi solo l'1% svilupperà celiachia (69 – 70 – 71).

<i>Anticorpi Transglutaminasi</i>	<i>Anti-</i>	<i>Esito Intestinale</i>	<i>Biopsia DQ2/DQ8</i>	<i>Diagnosi di Malattia Celiaca</i>
Positivi		Marsh I, II, III	Non indicata	Certa
Positivi		Marsh I, II*	Eseguire → se positivi	Certa
			Eseguire → se negativi	Improbabile
Positivi		Marsh 0	Eseguire → se positivi	Possibile
			Eseguire → se negativi	Improbabile
Negativi		Marsh I, II, III	Eseguire → se positivi	Possibile
			Eseguire → se negativi	Improbabile
Negativi		Marsh 0	Non indicata	Esclusa

*Alcuni autori pongono certezza diagnostica solo in presenza di lesioni istologiche Marsh III

Tabella 3: Interpretazione diagnostica dopo biopsia (tratta dalle linee guida del National Institute for Health and Care Excellence 2015).

1.5.2 Impostazione Terapeutica e Follow-up Successivo alla Diagnosi

Dopo la diagnosi di celiachia, è importante definire e controllare periodicamente lo stato nutrizionale del paziente, ricercare la presenza di eventuali patologie concomitanti (patologie autoimmuni) o complicanze della malattia celiaca stessa (anemia, osteoporosi, ecc.), fornire al soggetto e ai familiari tutte le informazioni concernenti la patologia celiaca necessarie per affrontare e gestire una corretta dieta priva di glutine, valutare periodicamente la regressione, permanenza o recrudescenza della sintomatologia, valutare l'andamento dei test sierologici anticorpali.

Alla prima visita e alle visite di *follow-up* si raccomanda una corretta valutazione clinica (indici antropometrici e auxologici) e la ricerca di indici di malassorbimento e/o di patologie a esso associate (anemia sideropenica o da deficit di acido folico, osteoporosi, osteomalacia, ipocolesterolemia, deficit di vitamine liposolubili) (Tabella 4).

Gli stati carenziali (vitaminici, minerali, calorico-proteici, ecc.) devono essere necessariamente corretti.

<i>Follow-up</i>	<i>Valutazione ed esami</i>	<i>Specifiche</i>
Prima visita	<p>Anamnesi, valutazione stato nutrizionale, stile di vita, indici antropometrici e auxologici (età pediatrica);</p> <p>Anamnesi familiare per individuare soggetti a rischio;</p> <p>Emocromo, sideremia, ferritina, transferrina, folati, vitamina B12, elettroforesi delle proteine, ALT, AST, GGT, fosfatasi acida, calcio, fosforo, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, TSH;</p>	Alla diagnosi
Visite di controllo	<p>Anamnesi, valutazione stato nutrizionale, stile di vita, indici antropometrici e auxologici (età pediatrica);</p> <p>Ricerca di patologie correlate a dieta scorretta (obesità, steatosi epatica);</p> <p>Anticorpi anti-transglutaminasi, anticorpi anti-endomisio (se necessari), emocromo, sideremia, ferritina, transferrina, folati, vitamina B12, elettroforesi delle proteine, ALT, AST, GGT, fosfatasi acida, calcio, fosforo, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, TSH;</p> <p>Densitometria ossea (MOC, DEXA scan), da eseguire soprattutto nei soggetti a rischio di fratture da osteoporosi;</p> <p>In età pediatrica a giudizio del pediatra (non ancora</p>	<p>Dopo sei mesi dall'inizio della dieta priva di glutine, in seguito ogni 1-2 anni se anticorpi negativi;</p> <p>In età pediatrica a 3 e 6 mesi, in seguito ogni 1-2 anni se anticorpi negativi;</p> <p>Dopo un anno di dieta priva di glutine e in seguito in relazione al risultato della prima;</p>

	disponibili parametri di riferimento certi per questa fascia di età);	
--	---	--

Tabella 4: *follow-up* del paziente celiaco.

La dieta senza glutine (GFD), che è il trattamento di elezione della malattia celiaca, non deve essere iniziata prima di completare le indagini diagnostiche (test sierologici anticorpali e biopsia).

Al momento della diagnosi è raccomandabile effettuare una adeguata informazione ai pazienti, affinché possano acquisire le conoscenze e le competenze necessarie per attuare correttamente la dieta priva di glutine, e di predisporre a questo scopo opportuno materiale illustrativo.

È inoltre raccomandata un'accurata anamnesi nutrizionale e un'attenta valutazione dello stile di vita (andamento ponderale, abitudini e comportamento alimentare, attività fisica e lavorativa, ecc.).

In alcuni casi può essere necessario un programma dietetico personalizzato, che soddisfi necessità nutrizionali specifiche (malnutrizione, diabete, ecc.).

Una corretta dieta senza glutine si basa sull'esclusione di tutti i prodotti che contengono glutine in quantità superiore a 20 ppm (alimenti vietati) o che sono a rischio di contaminazione (alimenti a rischio).

L'assunzione degli alimenti naturalmente privi di glutine o non contaminati (alimenti permessi) e di alimenti dieto-terapeutici (sostitutivi dei prodotti contenenti glutine) garantisce l'equilibrio nutrizionale della dieta priva di glutine.

Sono **alimenti vietati**:

- Il grano o frumento, la segale, l'orzo, l'avena, il farro, la spelta, il kamut, il triticale, il frik o grano egiziano, le loro farine e i loro derivati. L'avena è tollerata da quasi tutti i soggetti con malattia celiaca, tuttavia è prudente evitarla poiché può essere contaminata con altri cereali durante i processi di lavorazione e confezione;
- I cibi nella cui preparazione siano utilizzati, come addensanti, i derivati del frumento o di altri cereali, oppure che durante la lavorazione o la confezione siano soggetti a contaminazione (ad esempio dadi, condimenti, salse, confetture, dessert, salumi, piatti pronti, bevande, ecc.).

Sono **alimenti permessi**:

- Il riso, il mais, il grano saraceno, la soia, la tapioca, i legumi, le patate, la frutta, la verdura e i derivati di origine animale (carni in genere, uova, latte, formaggio), quando non sottoposti a particolari processi di lavorazione che possano provocare contaminazione con glutine.

Gli alimenti vietati possono essere sostituiti da prodotti dieto-terapeutici, autorizzati dal Ministero della Salute e inseriti nel *Registro Nazionale degli Alimenti senza Glutine*, erogabili gratuitamente dal Sistema Sanitario Nazionale.

Le scelte alimentari dei soggetti affetti da malattia celiaca possono essere facilitate dal *Prontuario degli Alimenti AIC*, che fornisce un elenco aggiornato dei prodotti a minore rischio di contaminazione.

La necessità e la periodicità dei controlli possono variare in base alle condizioni cliniche, all'età del paziente e all'anamnesi alimentare.

Nel *follow-up* dei soggetti affetti da malattia celiaca (Tabella 4) è raccomandata un'attenta rivalutazione clinica (indici antropometrici e auxologici) e dell'aderenza alla dieta priva di

glutine, nonché la valutazione di indici di malassorbimento ancora presenti, la ricerca di condizioni patologiche associate ad una dieta non corretta (obesità, steatosi epatica, ecc.), la valutazione di possibili comportamenti alimentari patologici, la ricerca dell'eventuale presenza di sintomi o segni clinici di patologie associate e la valutazione dei test sierologici anticorpali (anticorpi anti-transglutaminasi ed eventualmente anti-endomisio) 6-12 mesi dopo l'inizio della dieta senza glutine. Per una corretta aderenza alla dieta senza glutine si ritengono fondamentali momenti di verifica, rinforzo e/o aggiornamento.

Per quanto riguarda la cadenza dei controlli, le linee guida suggeriscono un primo controllo a 6 mesi dall'inizio della dieta senza glutine, e in seguito ogni anno se la sierologia anticorpale è negativa. Il periodo di *follow-up* può essere anticipato o posticipato in relazione alle variazioni della sintomatologia e della sierologia.

Nei bambini è consigliato un primo controllo a breve periodo (2-3 settimane) per valutare solo la risposta iniziale e l'aderenza alla dieta priva di glutine.

I controlli successivi (valutazione clinico-auxologica e di laboratorio, valutazione dei test anticorpali, valutazione dell'aderenza alla dieta priva di glutine) si devono effettuare a tre e sei mesi, e in seguito ogni 12/24 mesi in relazione alla clinica e alla sierologia anticorpale.

Nei pazienti per i quali vi sia un sospetto di malattia celiaca refrattaria, cioè con permanenza (malattia celiaca refrattaria primaria) o recidiva dei sintomi (malattia celiaca refrattaria secondaria) è raccomandata una indagine adeguata sull'aderenza alla dieta priva di glutine, attraverso un'attenta anamnesi alimentare e con il dosaggio anticorpale (il dosaggio degli anticorpi specifici è positivo, se la dieta priva di glutine si rivela non corretta).

In caso fosse confermata una corretta e rigorosa osservanza della dieta priva di glutine, si raccomanda di escludere altre possibili patologie responsabili dei sintomi (colite microscopica,

IBD, insufficienza pancreatica, enteropatia autoimmune, deficit di disaccaridasi, polluzione batterica, sindrome da immunodeficienza, sprue tropicale, gastroenterite eosinofila, ecc.).

La diagnosi di malattia celiaca refrattaria è certa solo nei soggetti che attuano una corretta dieta priva di glutine, dopo esclusione di altre patologie gastrointestinali.

1.6 Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità

Il sistema HLA (Human Leukocyte Antigens) è composto da una serie di geni i cui prodotti svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria acquisita; sono le molecole che presentano i peptidi ai linfociti T consentendo la discriminazione del sé dal diverso dal sé (72 – 73).

Nell'uomo i geni HLA sono localizzati su una regione del braccio corto del cromosoma 6 (6p21) denominata Complesso Maggiore di Istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC).

Il sistema MHC comprende geni HLA classici (Classe I: HLA-A, HLA-B, HLA-C; Classe II: HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DQA1, HLA-DPB1, HLA-DPA1), e numerosi geni implicati nella elaborazione dei peptidi e nella loro presentazione ai linfociti T. L'importante ruolo delle molecole HLA nel riconoscimento e nella risposta nei confronti del trapianto di organi solidi e di cellule staminali emopoietiche è ben nota (74), e circa 40 anni fa comparvero i primi lavori sulla associazione HLA con alcune malattie (75 – 76).

Le conoscenze sul sistema HLA sono notevolmente aumentate negli ultimi decenni, sia sul piano della geografia del MHC, sia sulla definizione del polimorfismo dei geni HLA, sia sulla comprensione degli aspetti molecolari di interazione tra HLA-peptide-recettore di linfociti T (T cell receptor, TCR).

Inoltre gli avanzamenti del progetto genoma umano suggeriscono di ampliare la nostra visione, studiando le interazioni tra i geni HLA ed i restanti geni del genoma umano (77).

Con oltre 200 loci genici in 3.6 Mb, questa è una delle regioni a più elevata densità genica di tutto il genoma umano e alcuni geni di questa regione (HLA di classe I e II) codificano le proteine più polimorfiche conosciute.

I geni HLA classici di classe I e II sono stati associati a più di 100 malattie/condizioni (78). Un gene presente nel MHC (HLA o non HLA) è associato ad una malattia/condizione quando la frequenza di uno o più alleli è aumentata o diminuita in maniera significativa nei pazienti affetti rispetto ad un gruppo di controllo ben definito.

Oltre il 60% delle patologie associate ad HLA hanno una componente immunitaria. Va sottolineato comunque che, se è vero che un certo numero di geni candidati sono oggi conosciuti, il meccanismo con cui essi influenzano la malattia è tuttora poco noto (77).

È utile fare una distinzione di partenza; nelle associazioni HLA e malattia vi sono alcune patologie nelle quali l'HLA svolge un ruolo primario nella presentazione di peptidi ai linfociti T (generalmente le malattie con componente autoimmune), mentre vi sono altre patologie nelle quali l'associazione con HLA è dovuta a *linkage disequilibrium* con il gene che svolge un ruolo primario; ad esempio l'emocromatosi ereditaria (79) o nel caso della sarcoidosi (80).

1.7 Associazione HLA – Malattia Celiaca

L'importanza dei fattori genetici nella celiachia è confermata dall'alta concordanza della malattia tra gemelli monozigoti (80%) (82 – 83) e la prevalenza nei familiari degli affetti risulta almeno 10 volte maggiore di quella della popolazione generale (81).

La celiachia insorge in seguito ad ingestione di glutine (84) in soggetti geneticamente predisposti, in particolare HLA-DQ2 o -DQ8 positivi; raramente la celiachia compare in assenza di specifici alleli HLA-DQ (85).

Approssimativamente il 90% dei celiaci condivide il DQ2 (86 – 87 – 88 – 89) e il 5% il DQ8 (90 – 91 – 92).

Si tratta di un raro esempio di una malattia complessa e multifattoriale, nella quale è noto il fattore ambientale scatenante, ed è stata compresa la sua interazione con il principale fattore genetico. Infatti soltanto eterodimeri HLA -DQ2 e -DQ8 sono in grado di legare peptidi derivati dalla digestione della gliadina del glutine e di presentarli ai linfociti T presenti nel lume intestinale. Questo passaggio è indispensabile per l'attivazione di cellule T, che inducono da un lato la produzione di anticorpi e dall'altro, attraverso la secrezione di citochine, determinano l'atrofia della mucosa intestinale. Dato che le tasche di legame delle molecole DQ2 e DQ8 sono ricche di aminoacidi con carica positiva, i peptidi della gliadina per potersi legare devono essere modificati dall'enzima transglutaminasi (tTG) che trasforma residui di glutammina in acido glutammico (93).

I primi studi HLA nella celiachia risalgono al 1972, quando si conosceva soltanto la classe I e le tipizzazioni venivano eseguite mediante l'uso di anticorpi. La prima associazione ad essere descritta è stata quella con l'antigene HLA-B8; quando sono state scoperte le molecole di classe II è apparso evidente che l'associazione con DR3 era più forte e anche DR7 risultava associato (94).

Quando si è chiarito che gli aplotipi DR3 e DR7 condividono l'allele DQB1*02, che codifica il determinante sierologico DQ2, e gli aplotipi DR5 e DR7 condividono l'allele DQA1*05, è risultato evidente che l'associazione primaria della celiachia era con un particolare eterodimero alfa/beta DQ codificato dagli alleli DQA1*05 e DQB1*02, in posizione cis sull'aplotipo DR3-DQ2 o in trans nell'eterozigote DR5-DQ7/DR7-DQ2. DR5 è stato successivamente diviso in DR11, più frequente, e DR12.

Dati funzionali sul ruolo di queste molecole nella presentazione di peptidi del glutine hanno poi confermato i dati genetici.

La maggior parte dei celiaci che non erano né DR3-DQ2 né DR5/7-DQ2 risultavano DR4-DQ8. Più recentemente, uno studio europeo ha dimostrato che la quasi totalità dei celiaci negativi per gli eterodimeri DQ2 (DQA1*05, DQB1*02) e DQ8 (DQA1*03, DQB1*0302) hanno "mezzo dimero" DQ2 essendo positivi per uno solo degli alleli che lo codificano. Numerosi studi hanno dimostrato che l'omozigosi per l'allele DQB1*02 aumenta ulteriormente il rischio della malattia (95).

Nella pratica della celiachia viene inteso come DQ2 l'eterodimero a rischio, a5, b2, codificato dagli alleli DQA1*05 e DQB1*02, anche se in realtà DQ2 è un determinante sierologico della catena beta DQ ed è determinato dalla presenza di DQB1*02 indipendentemente dall'allele per la catena alfa.

Per analogia, da qui in poi il termine DQ2 verrà utilizzato soltanto per indicare eterodimeri a5, b2, mentre la presenza di una sola delle due catene a rischio verrà riferita come a5 (DQA1*05 positivo/DQB1*02 negativo) o b2 (DQA1*05 negativo/DQB1*02 positivo).

1.8 Cenni di Epidemiologia della Malattia Celiaca

L'intolleranza al glutine è una delle patologie permanenti più frequenti in assoluto. Grazie a diversi studi epidemiologici condotti nelle ultime decadi, si è potuto evidenziare come la distribuzione geografica della celiachia nel mondo, sembra aver seguito, nel corso della storia dell'umanità, la diffusione del consumo del grano e il maggior uso di cereali contenenti glutine.

In Italia la prevalenza è di un caso ogni 100 individui; sia in Europa che in altre aree del mondo (Nord e Sud America, Australia, Africa del Nord, Medio Oriente e parte del continente asiatico) (96).

La malattia colpisce maggiormente i caucasici e le donne, con un rapporto F/M di 2:1.

La maggior parte della letteratura riporta tassi di prevalenza non particolarmente discordanti tra loro; tuttavia quasi tutti gli studi pongono l'accento sul carattere silente della malattia, spesso non diagnosticata o individuata tardivamente, alludendo alla possibile sottostima del tasso di prevalenza.

Infatti, la malattia celiaca è estremamente polimorfa: il paziente può presentarsi asintomatico, con sintomi gastrointestinali, o con sintomi extra-intestinali. Spesso la presentazione clinica della malattia celiaca viene paragonata ad un iceberg, il cosiddetto "iceberg celiaco", ad indicare che solo una porzione dei casi di celiachia viene attualmente diagnosticata e trattata, mentre una buona parte è sommersa e non viene riconosciuta, per il fatto che i sintomi di presentazione possono essere atipici, molto sfumati o assenti.

La celiachia, che è considerata oggi tra le patologie più frequenti al mondo, continua ancora a rimanere spesso misconosciuta e non diagnosticata. Complice la presentazione clinica multiforme, spesso asintomatica, le diagnosi effettive sottostimano la sua dimensione epidemiologica.

Numerosi studi suggeriscono come l'incidenza di diagnosi di celiachia sia in aumento (97); sulla base di diversi studi, si ritiene che la celiachia riguardi una fetta della popolazione mondiale compresa tra lo 0,5% e l'1% (98).

Uno studio internazionale (98) ha permesso di calcolare con maggiore precisione quanto la celiachia sia realmente frequente in Europa, e come la sua frequenza vari a seconda della nazione. La prevalenza di celiachia riscontrata in Europa è dell'1%: per ogni celiaco diagnosticato si stima che ce ne siano almeno 4 non diagnosticati. Tuttavia notevoli differenze sono state registrate da nazione a nazione: la prevalenza maggiore è stata riscontrata tra gli adulti finlandesi (2%), la più bassa invece tra gli adulti tedeschi (0,3%). In Italia è stata confermata una prevalenza dello 1,1% negli adulti, e dello 0,7% nella popolazione pediatrica. Le ragioni di questa variabilità tra paese e paese non sono ancora chiare, ma di sicuro fattori genetici ed ambientali giocano un ruolo in questa differente distribuzione.

Capitolo Secondo

OBIETTIVI DELLA TESI

La malattia celiaca o enteropatia da glutine è una malattia immuno-mediata scatenata dall'ingestione di glutine che, in soggetti geneticamente predisposti, determina un processo infiammatorio nell'intestino tenue, conseguente malassorbimento e manifestazioni extra intestinali.

Il *follow-up* del paziente che presenti segni e sintomi di malattia celiaca prevede, come esami di primo livello, l'esecuzione di test sierologici per la ricerca di anticorpi anti-gliadina e anti-transglutaminasi, e l'esecuzione della biopsia intestinale per evidenziare la presenza di atrofia dei villi intestinali, che riflette il deficit di assorbimento tipico della malattia.

Nella diagnosi della celiachia si sta sempre più confermando l'importante ruolo del sistema HLA e in particolar modo l'associazione molto forte con la regione HLA DQ.

Le linee guida per la diagnosi e il *follow-up* della celiachia prevedono la tipizzazione HLA come test di secondo livello, da utilizzare nei casi dubbi, quando i dosaggi anticorpali e/o la biopsia intestinale abbiano dato risultati incerti o discrepanti tra loro. Il test genetico è consigliato, inoltre, a parenti di primo grado di soggetti celiaci o a individui affetti da altre patologie autoimmuni.

Lo scopo di questo studio è:

- Verificare, in pazienti pediatrici con sospetta celiachia, l'appropriatezza della richiesta di tipizzazione HLA;
- Valutare, sempre negli stessi, la concordanza tra presenza di anticorpi e genetica HLA suggestiva di predisposizione alla patologia;
- Verificare, inoltre, la presenza di altre patologie autoimmuni nei pazienti pediatrici.

Capitolo Terzo

MATERIALI E METODI

3.1 Casistica del Campione in Esame

Il gruppo di studio è costituito da 192 pazienti pediatriche con sospetta celiachia, di età media di 12,2 anni \pm 5,6 di cui 91 di sesso maschile e 101 di sesso femminile.

Per il campione di controllo sono stati selezionati in modo random 391 donatori tra la popolazione di donatori di midollo osseo afferenti al Centro Donatori di Midollo di Verbania, avente sede presso il laboratorio di tipizzazione HLA, anche iscritti come donatori AVIS del nostro Servizio Trasfusionale. Questo doppio criterio ci ha permesso di selezionare persone costantemente sottoposte a controlli, per i quali non siano stati individuati segni di possibile malattia celiaca.

Il gruppo di controllo è rappresentato da 391 donatori sani dell'AVIS di Verbania, di cui 190 di sesso maschile e 201 di sesso femminile.

I pazienti risultati omozigoti per DQ2 o DQ8 sono stati testati con due diverse metodiche per poter confermare l'effettiva omozigosi.

3.2 Estrazione e Quantificazione del DNA

Dopo aver verificato la conformità del campione ematico e della richiesta (corrispondenza tra anagrafica della provetta e dell'impegnativa, provetta corretta, quantità di sangue corretta e qualità del campione) si procede con l'estrazione del DNA, che viene effettuata tramite lo strumento MAXWELL 16 PROMEGA.

Il sangue venoso periferico, prelevato in provette di tipo vacutainer da 7 ml con anticoagulante EDTA, è aggiunto in quantità di 350 µl nella prima camera di reazione della cartuccia del kit Promega.

I passaggi eseguiti da Maxwell 16 System includono:

- Lisi delle cellule, in presenza di detergente e agente caotropico;
- Legame degli acidi nucleici a particelle di silice magnetizzata;
- Separazione delle particelle dagli altri componenti cellulari;
- Eluizione degli acidi nucleici in una formulazione che può essere aggiunta direttamente alla reazione a catena della polimerasi (PCR).

Il programma di estrazione ha una durata di 35 minuti; possono essere processati 16 campioni per volta.

La resa totale di DNA genomico proveniente dai campioni di sangue intero dipende dal volume del campione e dal numero di globuli bianchi per ml; generalmente si attesta intorno a 25-35 ng/ml. Possono essere utilizzati campioni di sangue intero raccolti in provette con EDTA, eparina o sodio citrato. I campioni di sangue devono essere conservati a +4 °C ed estratti entro sette giorni dalla raccolta.

Prima di analizzare o archiviare il campione estratto, viene effettuata una lettura spettrofotometrica, al fine di rilevare la qualità e la quantità del DNA estratto (espressa in µg/µl).

A tal fine, 100 μl di estratto sono caricati in cuvette monouso: la concentrazione ideale di DNA finale deve essere compresa tra 15-35 $\mu\text{g/ml}$; se il campione risulta essere più concentrato si procede alla sua diluizione con acqua distillata o con l'eluente utilizzato nella procedura di estrazione.

Il rapporto A260/A280, che fornisce un'indicazione sulla purezza dell'estrazione, deve essere inferiore a 1,8. Un valore superiore indica una contaminazione da proteine, che potrebbe interferire con le successive analisi.

Si deve tener presente che in una soluzione contenente acidi nucleici, il valore di una assorbanza a lunghezza d'onda di 260 nm corrisponde approssimativamente:

- 1 A260 di dsDNA = 50 $\mu\text{g/ml}$;
- 1 A260 di ssDNA = 37 $\mu\text{g/ml}$;
- 1 A260 di ssRNA = 40 $\mu\text{g/ml}$.

3.3 Tipizzazione dei Polimorfismi HLA di classe II

3.3.1 Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers (PCR-SSP)

La tecnica PCR-SSP è stata messa appunto nel 1992 da Olerup e Zattequist; è basata sull'amplificazione specifica di singoli gruppi di alleli o di alleli, mediante coppie di primers oligonucleotidici sintetici, disegnati in modo tale da riconoscere in maniera univoca singole sequenze o singoli gruppi di sequenze del secondo e terzo esone dei geni HLA depositati in banca dati.

Questo metodo di tipizzazione si basa sul principio che un primer perfettamente matched sarà più efficace nelle reazioni di PCR rispetto a quelli con uno o più mismatch, specie se localizzati al 3' terminale.

Le coppie di primers sono state studiate in modo da essere perfettamente complementari solo ad un allele o ad un gruppo di alleli. In condizioni di PCR rigidamente controllate, tali coppie di primers consentono l'amplificazione di sequenze specifiche (risultato positivo), mentre coppie di primers non complementari non consentono alcuna amplificazione (risultato negativo).

Dopo la fase di PCR, i frammenti di DNA amplificati sono separati tramite elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio ed esposizione alla luce ultravioletta.

Gli alleli sono assegnati semplicemente sulla base della presenza o assenza del prodotto di amplificazione.

Poiché l'amplificazione, durante la reazione di PCR, può essere influenzata sfavorevolmente da vari fattori (ad esempio DNA di scarsa qualità, presenza di inibitori, ecc.), per ogni reazione viene inclusa una coppia di primers di controllo interno.

La coppia di primers di controllo amplifica una regione conservata del gene della beta – globina umana, che è presente in tutti i campioni di DNA.

In presenza di una banda di tipizzazione positiva (amplificazione specifica di un allele HLA), il prodotto della coppia di primers del controllo interno potrebbe risultare debole o assente, a causa delle differenze di concentrazione e di temperatura di fusione tra le coppie di primers specifici e la coppia di primers del controllo interno.

I frammenti del DNA amplificato dalle coppie di primers HLA specifici sono più piccoli rispetto al prodotto della coppia di primers del controllo interno, ma più grandi della banda di primers diffusi, non incorporati. In questo modo la reazione positiva per uno specifico allele o gruppo di alleli HLA è visualizzata sul gel come un frammento di DNA amplificato tra la banda del prodotto del controllo interno e la banda di primers non incorporati.

I termociclatori sono settati con diversi programmi di amplificazione a seconda del kit utilizzato.

I kit in uso presso il nostro laboratorio sono suddivisi in kit a bassa e alta risoluzione; sono conservati a -20 °C (kit in uso) e a -40 °C (kit di scorta). Per ogni tipologia di esame sono previsti due diversi kit secondo le regole Efi.

- Kit PCR-SSP (INVITROGEN)

I componenti inclusi in ogni kit sono i seguenti:

- ✓ Piastre di analisi contenenti, in ogni provetta per PCR, una soluzione di primers SSP costituita da primers allele e/o gruppo specifici;
 - ✓ Aliquote di buffer contenenti dNTPs;
 - ✓ Pellicole di chiusura per PCR;
 - ✓ CD ROM contenente le istruzioni d'uso, il certificato di analisi e i documenti di interpretazione specifici per lotto.
- Allestimento della reazione di PCR

L'allestimento della reazione di amplificazione viene eseguito nella stanza pre-PCR. Successivamente alla verifica della corrispondenza tra kit, buffer e DNA (conservati a -20 °C), essi sono portati a temperatura ambiente. La preparazione della miscela di amplificazione (Tabella 5) tiene conto del numero di pozzetti dei vari kit.

Ad ogni buffer pre-aliquotato vengono aggiunte acqua deionizzata e TAQ polimerasi; le provette vengono chiuse e vortexate, per mescolare bene tutti i reattivi; vengono quindi dispensati 8 µl nel pozzetto del controllo negativo. Eseguito questo passaggio viene aggiunta alla mix di reazione il DNA da testare. Dopo aver vortexato di nuovo la miscela di reazione, essa viene dispensata in ogni pozzetto del kit (tranne nel pozzetto del controllo negativo) in quantità di 8 µl per pozzetto.

N° pozzetti	Buffer (μl)	Acqua deionizzata (μl)	DNA (μl)	Taq (μl)
96	580	268	80	9,3
48	300	120	50	4,8
32	200	80	34	3,2
24	150	60	25	2,4
16	120	48	20	1,9
8	75	30	14	1,2

Tabella 5: miscela di amplificazione per metodo PCR-SSP Invitrogen.

La piastra viene successivamente chiusa con la cover adesiva assicurandosi che sia ben sigillata; viene portata poi nella stanza post-PCR e inserita nel termociclatore. Il programma di amplificazione è uguale per tutti i kit della ditta (Tabella 6).

Fasi	Temperatura (°C)	Tempo (sec)	Azione
Denaturazione	96	60	Denaturazione
5 cicli	96	25	Denaturazione
	70	50	Annealing
	72	45	Estensione
21 cicli	96	25	Denaturazione
	65	50	Annealing
	72	45	Estensione
4 cicli	96	25	Denaturazione
	55	60	Annealing
	72	120	Estensione
Hold	4	Fino a rimozione	

Tabella 6: programma di amplificazione PCR-SSP Invitrogen.

Terminata la corsa, gli amplificati vengono rimossi e caricati su gel di agarosio al 2%.

- Kit PCR-SSP (ONELAMBDA)

I componenti inclusi in ogni kit sono i seguenti:

- ✓ Piastre di analisi contenenti, in ogni provetta per PCR, una soluzione di primers SSP costituita da primers allele e/o gruppo specifici;
 - ✓ Aliquote di buffer contenenti dNTPs;
 - ✓ Pellicole di chiusura per PCR;
 - ✓ CD ROM contenente le istruzioni d'uso, il certificato di analisi e i documenti di interpretazione specifici per lotto.
- Allestimento della reazione di PCR

L'allestimento della reazione di amplificazione viene eseguito nella stanza pre-PCR. Successivamente alla verifica della corrispondenza tra kit, buffer e DNA (conservati a -20 °C), essi sono portati a temperatura ambiente. La preparazione della miscela di amplificazione (Tabella 7) tiene conto anche in questo caso del numero di pozzetti dei vari kit.

Ad ogni buffer pre-aliquotato viene aggiunta la TAQ polimerasi; le provette vengono chiuse e vortexate, per mescolare bene tutti i reattivi; vengono quindi dispensati 10 µl nel pozzetto del controllo negativo. Eseguito questo passaggio viene aggiunta alla mix di reazione il DNA da testare in una concentrazione di 20-30 ng/µl. Dopo aver vortexato di nuovo la miscela di reazione, essa viene dispensata in ogni pozzetto del kit (tranne nel pozzetto del controllo negativo) in quantità di 10 µl per pozzetto.

N° pozzetti	Buffer (μl)	DNA (μl)	Taq (μl)
96	1000	111	5,6
48	540	59	3
32	360	39	2
24	270	29	1,5
16	180	19	1

Tabella 7: miscela di amplificazione per metodo PCR-SSP OneLambda.

La piastra viene successivamente chiusa con la cover adesiva assicurandosi che sia ben sigillata; viene portata poi nella stanza post-PCR e inserita nel termociclatore. Il programma di amplificazione è uguale per tutti i kit della ditta (Tabella 8).

Fasi	Temperatura (°C)	Tempo (sec)	Azione
1 ciclo	96	130	Denaturazione
	63	60	
9 cicli	96	10	Annealing
	63	60	Estensione
20 cicli	96	10	Denaturazione
	59	50	Annealing
	72	30	Estensione
Hold	4	Fino a rimozione	

Tabella 8: programma di amplificazione PCR-SSP OneLambda.

Terminata la corsa, gli amplificati vengono rimossi e caricati su gel di agarosio al 2%.

3.3.2 Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide (PCR-SSO) e Tecnologia Luminex

La PCR-SSO è una metodica di tipizzazione molecolare che prevede l'uso di oligonucleotidi sequenza specifici; in appropriate condizioni, viene sfruttata la caratteristica di un oligonucleotide di riconoscere ed ibridarsi ad un filamento di DNA che presenta un segmento complementare alla sua sequenza.

In questa metodica, il processo della PCR è usato come procedimento di amplificazione, allo scopo di ottenere quantità elevate del DNA bersaglio contenente tutti i loci HLA di interesse. La tipizzazione HLA richiede una fase di post-amplificazione per discriminare i diversi alleli.

I campioni di DNA che devono essere tipizzati per un certo locus, vengono dapprima amplificati con PCR, utilizzando dei primers locus specifici biotinilati. Questi sono scelti per riconoscere un tratto di DNA non polimorfico, in modo che tutti i campioni possano essere amplificati, indipendentemente dall'allele posseduto.

Successivamente il prodotto della reazione viene denaturato e fatto ibridare a sonde di DNA complementari coniugate a microsfere di materiale plastico (polistirene) fluorescenti, e successivamente marcato, usando streptavidina coniugata a R-ficoeritrina (SAPE), al fine di consentirne la rilevazione.

Un analizzatore a flusso, il LABScan™ 100, identifica l'intensità di fluorescenza della ficoeritrina su ciascuna microsfera.

L'assegnazione della tipizzazione HLA si basa sul pattern della reazione di fluorescenza confrontato ai pattern associati alle sequenze note dei geni HLA.

In particolare, la procedura prevede che al campione di DNA, da amplificare mediante PCR, venga aggiunta una miscela di reagenti contenente un eccesso di deossinucleotidi 5' trifosfato (D-Mix), primers biotinilati e Taq polimerasi.

A seconda del numero di campioni da testare, verranno aggiunti volumi diversi di reattivi. La tabella seguente riporta i volumi dei reattivi da dispensare per n° 1 campione.

Tabella Labtype – Volumi Pre-PCR			
N° Campioni	Primers	D-Mix µl	Taq µl
	µl		
1	4	13,8	0,2

Tabella 9: miscela di amplificazione per il kit PCR-SSO.

L'ultimo passaggio prevede lo spin della piastra a 1300 rpm per 30 secondi, in modo che tutti i componenti della reazione si concentrino sul fondo di ciascun pozzetto; si avvia quindi l'amplificazione (Tabella 10).

Fasi	Temperatura (°C)	Tempo (sec)	Azione
Denaturazione	96	3 minuti	Denaturazione
5 cicli	96	20	Denaturazione
	60	20	Annealing
	72	20	Estensione
30 cicli	96	10	Denaturazione
	60	15	Annealing
	72	20	Estensione
1 ciclo	72	10	
Hold	4	Fino a rimozione	

Tabella 10: programma di amplificazione PCR-SSO.

La metodica PCR-SSO prevede, a differenza della metodica SSP, una fase post-PCR di trattamento del campione (Tabella 11), per poter eseguire successivamente la lettura. Il materiale utile per questa fase comprende:

- Nuova piastra da PCR ed etichette adesive;
- Piastra di lettura vuota;
- Vaschette usa e getta pulite;
- Provette da 1,5 ml;
- Amplificati;
- Reattivi a temperatura ambiente (ad esclusione del reattivo SAPE e del SAPE buffer);
- Blocchetto refrigerato a -20 °C;
- Denaturante e neutralizzante;
- Beads Mixture (specifica per il locus/loci in esame);
- Miscela di ibridazione;
- Wash buffer.

Dopo aver portato a temperatura ambiente tutti i reattivi (ad esclusione del reattivo SAPE e del SAPE buffer), si procede dispensando 5 µl di ciascun amplificato nella piastra da PCR; a ciascun amplificato vengono aggiunti 2,5 µl di denaturante. Si esegue lo spin della piastra e si incuba per 10 minuti a temperatura ambiente.

Successivamente, ad ogni amplificato vengono aggiunti 5 µl di soluzione neutralizzante, e la piastra viene poi posizionata sul blocchetto freddo; a questo punto ad ogni campione vanno aggiunti 34 µl di miscela di ibridazione e 4 µl di beads mixture, mantenendo sempre i campioni nella piastra refrigerata, per evitare che si inneschino reazioni anticipate.

Segue l'incubazione dei campioni a 60 °C per 15 minuti. Dopodiché si eseguono tre lavaggi da 100 µl ciascuno con wash buffer:

- Si aggiungono con la multicanale 100 µl di wash buffer;
- Si chiude la piastra con l'etichetta adesiva;
- Si centrifuga la piastra per 5 minuti a 1300 g;
- Si elimina il surnatante con movimento deciso, capovolgendo la piastra verso il basso (flick);
- Si asciuga la piastra picchiettandola per cinque volte su uno strato di carta assorbente (tap);
- Si vortexa a secco;
- Si ripete la sequenza delle fasi appena descritte a partire dall'aggiunta di 100 µl di wash buffer.

Completati i lavaggi, vengono aggiunti 50 µl di SAPE (SAPE 1X diluita con SAPE buffer) ad ogni campione; si vortexa la piastra, e si incuba per altri 5 minuti a 60 °C; terminata l'incubazione, la piastra viene estratta dal termociclature e si esegue un lavaggio, procedendo come per i tre precedenti.

Si procede, quindi, a dispensare 70 µl di wash buffer in ogni pozzetto; infine, si procede al trasferimento del contenuto dei pozzetti nella piastra di lettura ottica, da inserire nella piattaforma di lettura del Luminex® 100™.

Tabella Labtype – Volumi Post-PCR				
N° Campioni	Tampone di ibridazione µl	Beads µl	SAPE µl	SAPE buffer µl
1	34	4	0,5	49,5

Tabella 11: volume dei reattivi per la procedura PCR-SSO Post-amplificazione.

Lo strumento leggerà i campioni in modo sequenziale, secondo la lista precaricata dall'operatore.

La metodologia Luminex si basa sull'impiego di microsfele di polistirolo (5,6 μm di diametro), tinte internamente con una combinazione unica di colorante nel rosso e nell'infrarosso. La combinazione di diverse intensità dei due coloranti consente l'identificazione di ciascuna sfera quando viene eccitata da un raggio laser.

Le sfere possono essere chimicamente rivestite con un numero di sequenze target differenti, comprese le sequenze di DNA HLA e gli antigeni HLA interi; esse possono pertanto essere utilizzate per analizzare i campioni saggiando la presenza o assenza di analiti specifici.

La piattaforma Luminex utilizza i principi della citometria a flusso: le biglie sono convogliate lungo un canale, dove, in fila, passano davanti a due differenti laser. Un laser rosso è utilizzato per eccitare ed identificare le biglie, determinando l'analita. Il secondo laser verde determina la grandezza del segnale PE-derivato, che è direttamente proporzionale alla quantità di analita legato.

Poiché sia l'identificazione delle biglie, sia la lettura dell'intensità di fluorescenza sono effettuate su ogni singola biglia, un sistema multiplex può utilizzare, tipicamente, fino a 100 biglie. Le sonde utilizzate per rivestire le 100 biglie sono accuratamente selezionate, in modo tale che i singoli analiti di interesse possano essere identificati da reazioni uniche delle biglie.

La tipizzazione HLA che utilizza la tecnologia Luminex è una reazione a catena della polimerasi che sfrutta oligonucleotidi sequenza specifici, in grado di amplificare regioni mirate all'interno dell'MHC di classe I e II, seguita da un processo di identificazione mediante sonde dell'amplicone con biglie Luminex, ciascuna rivestita con sonde oligonucleotidiche sequenza specifiche, per identificare la presenza o l'assenza di alleli specifici.

L'assegnazione del typing HLA è basata sul pattern di reazione osservato, rispetto ai pattern associati alle sequenze pubblicate.

Il DNA amplificato si ibrida al DNA complementare sondato sulle biglie; dopodiché esso viene rilevato mediante reazione con streptavidina – ficoeritrina (SAPE) coniugata. La streptavidina lega la biotina utilizzata per marcare i primers.

La piattaforma Luminex è utilizzata per identificare qualsiasi sonda rilevabile con metodo che utilizza la SAPE.

L'analisi di typing è eseguita con il software Fusion; il file di lettura Luminex viene importato nel programma Fusion attraverso l'abbinamento tra il lotto di biglie utilizzate per la lettura e il catalogo di interpretazione abbinato ad ogni lotto.

3.3.3 *Elettroforesi su Gel di Agarosio*

Al termine del saggio PCR viene effettuata la valutazione del prodotto di reazione. Uno dei metodi utilizzati per la rilevazione dell'avvenuta amplificazione del DNA è la corsa elettroforetica su gel di agarosio, effettuata mediante un campo elettrico ad intensità e direzione costante.

La rilevazione dei prodotti di amplificazione avviene mediante l'utilizzo di gel di agarosio al 2,5%. Si utilizza agarosio dedicato alla biologia molecolare, adatto a separare amplificati dell'ordine di grandezza di 1000 paia di basi.

Il tampone Tris-Borato-EDTA 0,5 X viene preparato aggiungendo 4,5 l di acqua sterile a 500 ml di tampone TBE 5 X.

La preparazione del gel di agarosio avviene nel laboratorio post-PCR:

- ✓ Si pesano 2,5 gr di agarosio, che verranno sciolti in 100 ml di tampone TBE 0,5 X;
- ✓ Si porta ad ebollizione per 2 minuti nel forno a microonde;
- ✓ Sotto cappa chimica, si aggiunge alla soluzione il bromuro di etidio (12 µl);
- ✓ La soluzione, resa omogenea, viene versata in quantità di 50 ml in 2 gel-caster preventivamente allestiti nel vassoio con i pettini; si attende la solidificazione (sotto cappa chimica).

Una volta pronto il gel, si procede al caricamento dei campioni, in quantità di 10 µl per ogni mix di reazione. Nel primo pozzetto del gel vengono caricati 10 µl di size markers come controllo dei pesi molecolari.

Si procede con la corsa elettroforetica per 15 minuti a 190 volt (10 volt per cm di distanza dagli elettrodi).

Per la tecnica PCR-SSP l'elettroforesi è indispensabile per l'interpretazione del risultato, e per la successiva lettura su software delle bande positive; per la tecnica PCR-SSO l'elettroforesi ha il solo scopo di verificare che sia avvenuta correttamente la reazione di amplificazione.

Terminata la migrazione elettroforetica del gel, le bande di DNA sono visualizzate mediante l'esposizione del gel a luce UV.

Il gel viene inserito in un sistema chiuso per lettura UV (UVITEC Fire Reader), dotato di una fotocamera che permette di fotografare il prodotto di amplificazione.

3.3.4 Test Sierologici

I test sierologici, di primo livello, per la diagnosi di celiachia, comprendono una sequenza di test, eseguiti a cascata in modalità reflex. La cascata prevede prima di tutto il dosaggio delle IgA totali, per individuare eventuali deficit di IgA. In assenza di deficit di IgA, si procede con il dosaggio degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA, poiché le IgA sono gli anticorpi primari presenti nelle secrezioni gastrointestinali.

Nell'adulto, se la ricerca di anticorpi anti-transglutaminasi IgA è negativa, non saranno eseguiti altri esami; se la ricerca di anticorpi anti-transglutaminasi IgA è positiva, sarà eseguito il dosaggio degli anticorpi anti-endomisio.

Nel bambino di età inferiore ai 2 anni, se la ricerca di anticorpi anti-transglutaminasi IgA è negativa, sarà eseguito anche il dosaggio degli anticorpi anti-gliadina deamidata sia IgA che IgG; se la ricerca di anticorpi anti-transglutaminasi IgA è positiva, sarà eseguito il dosaggio degli anticorpi anti-endomisio.

In caso di deficit di IgA, saranno eseguiti i dosaggi degli anticorpi anti-transglutaminasi IgG e anti-gliadina IgG, indipendentemente dall'età.

Gli anticorpi anti-transglutaminasi IgA e IgG e gli anticorpi anti-gliadina IgA e IgG sono stati dosati mediante il metodo C.L.I.A., *Chemiluminescent Immunoassay*. Questo metodo è una variazione dei classici saggi E.I.A.; l'enzima utilizzato nel saggio converte un substrato in un prodotto di reazione, che emette un fotone, invece di sviluppare un colore particolare. La luce è emessa dal prodotto di reazione quando dallo stato eccitato, torna allo stato fondamentale.

Gli anticorpi anti-endomisio di classe IgA sono stati dosati mediante immunofluorescenza indiretta, partendo da una diluizione del siero di 1:10.

Capitolo Quarto

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Valutazione dell'Appropriatezza delle Richieste HLA

Sono state esaminate 192 richieste di tipizzazione HLA, pervenute al laboratorio per sospetta celiachia, incrociando i dati di laboratorio relativi ad esami comprovanti la presenza di autoanticorpi (Prima di tutto anticorpi antitransglutaminasi IgA, anticorpi anti-gliadina deamidata di classe IgA e IgG, anticorpi anti-endomisio IgA; poi anticorpi anti-tireoglobulina, anticorpi anti-perossidasi, anti-insulina esogena, anticorpi anti-insula pancreatica, anticorpi anti-GAD (glutammico decarbossilasi), anticorpi anti-IA2).

Di queste 192, 77 richieste rappresentano pazienti risultati negativi per suscettibilità genetica a malattia celiaca.

Da questi dati, si evidenzia come spesso non vengano seguite le linee guida, che prevedono l'esecuzione del test HLA come ultimo test da effettuare per escludere la presenza di celiachia.

La non corretta prescrizione del test genetico HLA è dovuta a molteplici cause, prima tra tutte la poca disponibilità da parte di molti pazienti a sottoporsi ad esami invasivi, come la biopsia duodenale.

Tipologia di pazienti	N° pazienti	% pazienti
Pazienti risultati positivi per suscettibilità genetica a malattia celiaca	115	59,89
Pazienti risultati negativi per suscettibilità genetica a malattia celiaca	77	40,10
Totale richieste	192	100%

Tabella 12: Valutazione dell'appropriatezza delle richieste di tipizzazione HLA.

4.2 Approccio Molecolare allo Studio degli Aplotipi HLA-DQ

Gruppi di eterodimeri			
DQ	Aplotipo HLA-DQA1*, DQB1*	N°	%
DQ2 Omozigote (n° 9)	DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01	5	55,6
	DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02	4	44,4
DQ2 Eterozigote (n° 70)	DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 / X	37	52,8
	DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 / DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02	8	11,4
	DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 / X	25	35,7
DQ8 Omozigote (n° 6)	DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02 / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	1	16,7
	DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02 / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	3	50
	DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	2	33,3
DQ8 Eterozigote (n° 20)	DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02 / X	14	70
	DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02 / X	6	30
DQ2/DQ8 (n° 9)	DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 / DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02	4	44,4
	DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	1	11,1
	DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 / DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02	3	33,3
	DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	1	11,1
Non DQ2/DQ8 (n° 77)			

Tabella 13: distribuzione degli alleli DQA1* e DQB1* che codificano per gli eterodimeri DQ2 e

DQ8, nella popolazione di pazienti pediatrici con predisposizione genetica a Malattia Celiaca.

La tabella 13 mostra la distribuzione degli alleli DQA1* e DQB1* nella popolazione di pazienti pediatrici con predisposizione genetica a malattia celiaca.

Gli eterodimeri DQ2 sono identificabili tramite gli alleli HLA **DQA1* 05:01, DQB1* 02:01 e DQA1* 02:01, DQB1* 02:02.**

Gli alleli **DQB1* 02:01** e **DQB1* 02:02** sono identici, ad eccezione per l'aminoacido 155 localizzato nel dominio più prossimo alla membrana del dominio DQ β , che non influenza la sequenza amminoacidica della tasca di presentazione delle molecole. Pertanto, la presenza sulla membrana delle catene β codificate dai due alleli attribuisce alle cellule che le espone la stessa efficacia nel presentare i peptidi della gliadina ai linfociti T.

Gli eterodimeri DQ8 sono identificabili tramite gli alleli HLA **DQA1* 03:01, DQB1* 03:02 e DQA1* 03:03, DQB1* 03:02.**

Una recente scoperta è il cosiddetto effetto dose, per cui un individuo omozigote per il DQ2 (e quindi con due catene beta *02) ha un rischio 5 volte maggiore di celiachia rispetto all'eterozigote. Questo effetto dose è stato correlato all'intensità della risposta T cellulare stimolata. Infatti gli individui omozigoti hanno un maggior numero di tasche sulle cellule presentanti l'antigene, in grado di legare peptidi di glutine da presentare alle cellule T rispetto agli eterozigoti (99).

Eterodimero									
DQ	N°	%	RR	Aplotipi HLA DQA1*, DQB1*	N°	%			
DQ2	79	41, 4	1,2	DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 (DQ2.5)	42	53,1			
				DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 (DQ2.2)	29	36,7			
				DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 (DQ2.5) / DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 (DQ2.2)	8	10,1			
				DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02	15	57,7			
DQ8	26	13, 6	1,9	DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	8	30,7			
				DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02 / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	3	11,5			
				DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 (DQ2.5) / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	1	11,1			
DQ2/DQ8	9	4,7	1,7	DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 (DQ2.2) / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02	1	11,1			
				DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 (DQ2.2) / DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02	3	33,3			
				DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 (DQ2.5) / DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02	4	44,4			
				Aplotipi HLA non predisponenti					
				Aplotipi HLA non predisponenti					
Non DQ2/DQ8	77	40, 3	0,7 1						

Tabella 14: stima del rischio relativo (RR) nella popolazione pediatrica studiata in base agli eterodimeri DQ2 e DQ8.

Dalla tabella 14 si evince che il 41,4% della popolazione in studio presenta l'eterodimero DQ2 con un RR di 1,2; il 53,1% della popolazione DQ2 presenta l'aplotipo DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 (DQ2.5) (con allele DQ2 espresso in posizione cis su un cromosoma), mentre il 36,7% presenta l'allele DQB1* 02:02 ma è negativo per l'allele DQA1* 05:01 (DQ2.2). Il 10,1% della popolazione DQ2 presenta gli aplotipi in eterozigosi DQA1* 05:01 – DQB1* 02:01 (DQ2.5) / DQA1* 02:01 – DQB1* 02:02 (DQ2.2).

Il 13,6% della popolazione in studio presenta il DQ8 con un RR di 1,9: il 57,7% presenta l'aplotipo HLA DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02, mentre il 30,7% presenta l'aplotipo DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02. L'11,5% presenta gli aplotipi in eterozigosi DQA1* 03:01 – DQB1* 03:02 / DQA1* 03:03 – DQB1* 03:02.

Il 4,7% della popolazione in studio presenta l'aplotipo DQ2/DQ8 con un RR di 1,7.

Il 40,3% presenta aplotipi HLA non predisponenti.

Nella popolazione in studio, il fattore di rischio più elevato per malattia celiaca (1,9) è rappresentato dall'eterodimero DQ8 (DQA1* 03 – DQB1*03:02), seguito dal valore di 1,7 per i possessori dell'eterodimero DQ2/DQ8, e da un valore di 1,2 dell'eterodimero DQ2, meno patogenetico.

4.3 Valutazione della Concordanza tra Presenza di Anticorpi e Test Genetico HLA Suggestivo di Predisposizione alla Patologia

<i>Eterodimeri DQ</i>	Anti-tTG		DPG-AGA		DPG-AGA		EMA	
	N°	IgA	N°	IgA	N°	IgG	N°	IgA
		% +		% +		% +		% +
<i>DQ2*</i>	77	33,6%	70	21,4%	62	27,4%	30	76,7%
<i>DQ8^</i>	25	36%	24	25%	22	45,5%	11	72,7%
<i>DQ2/DQ8</i>	7	28,6%	6	16,7%	6	33,3%	2	100%

Anti-tTG = Anticorpi anti-transglutaminasi

DPG-AGA = Anticorpi anti-gliadina deamidata

EMA = Anticorpi anti-endomisio

**Un paziente con: 1) Hb glicata 9%; 2) Anti insulina esogena 5.2%; 3) Anticorpi anti insula pancreatica 3.6%; 4) Anticorpi anti glutammico decarbossilasi 4.2 U/ml; 5) Anticorpi anti IA2 3.10 U/ml.*

**Un paziente con lieve aumento di anticorpi anti perossidasi.*

^Un paziente con alto titolo di anticorpi anti tireoglobulina.

^Un paziente con aumento di anticorpi anti perossidasi.

Tabella 15: percentuali dei test sierologici positivi riferiti ai gruppi di pazienti pediatrici appartenenti rispettivamente al DQ2, DQ8, DQ2/DQ8.

I pazienti pediatrici appartenenti al gruppo DQ2 presentano gli anticorpi anti-transglutaminasi IgA positivi con una percentuale minore rispetto al gruppo DQ8 (33,6% vs 36%) ma maggiore rispetto al gruppo DQ2/DQ8 (33,6% vs 28,6%).

Per quanto riguarda gli anticorpi anti-gliadina deamidata IgA positivi, il gruppo DQ2 presenta ancora una percentuale minore rispetto al gruppo DQ8 (21,4% vs 25%) ma maggiore rispetto al gruppo DQ2/DQ8 (21,4% vs 16,7%).

Anche il confronto degli anticorpi anti-gliadina deamidata IgG positivi dimostra una percentuale minore del gruppo DQ2 rispetto al gruppo DQ8 (27,4% vs 45,5%) ma una minore percentuale rispetto al gruppo DQ2/DQ8 (27,4% vs 33,3%).

Per quanto riguarda il confronto degli anticorpi anti-endomisio IgA positivi, le percentuali tra il gruppo DQ2 e il gruppo DQ8 sono quasi sovrapponibili (76,7% vs 72,7%).

La determinazione degli anticorpi antitransglutaminasi (IgA e IgG) rimane il caposaldo della diagnosi sierologica della malattia celiaca, insieme agli anticorpi anti-endomisio IgA, data la loro elevata sensibilità e specificità.

La presenza degli anticorpi antitransglutaminasi nei pazienti celiaci è un dato dimostrato: questi anticorpi hanno un parziale effetto inibitorio dose-dipendente nei confronti dell'attività della transglutaminasi tissutale umana; la presenza di questi anticorpi determina inoltre una mancata attivazione del TGF- β , il fattore stimolante il differenziamento degli enterociti (attivato da una modificazione indotta dalla stessa tTG), determinando il mancato differenziamento dell'epitelio, con conseguente appiattimento dei villi.

4.4 Sesso dei Pazienti e Correlazione con Altre Patologie Autoimmuni

La popolazione di pazienti pediatrici presa in considerazione nel nostro studio, risulta essere costituita da 101 pazienti di sesso femminile e 91 di sesso maschile (di questi 61 femmine e 54 maschi con predisposizione genetica a malattia celiaca).

L'associazione tra malattie autoimmuni e celiachia è attribuita alla condivisione di fattori genetici predisponenti, principalmente di alcuni antigeni HLA. Uno studio italiano ha dimostrato come la prevalenza di malattie autoimmuni in adolescenti celiaci è effettivamente molto più elevata che nella popolazione coetanea generale; ciò che è più interessante, è la dipendenza dall'età della diagnosi, ovvero dalla durata di esposizione al glutine (100).

Nel presente studio è stata presa in esame la correlazione spesso presente tra celiachia e altre patologie autoimmuni; nel campione in esame un paziente di sesso maschile è affetto da Diabete Mellito di Tipo 1, mentre tre pazienti di sesso femminile presentano una Tiroidite Autoimmune.

Le malattie autoimmuni hanno in genere una maggiore prevalenza nelle donne rispetto agli uomini; la Relazione del Parlamento sulla celiachia 2018 descrive un rapporto M/F di pazienti celiaci di 1:2, arrivando in alcune regioni a 1:3. Disturbi della tiroide, inoltre, sono presenti nelle donne 5-8 volte in più che negli uomini.

4.5 Analisi Statistica e Discussione

Il calcolo del Rischio Relativo o RR degli eterodimeri DQ è stato eseguito come rapporto, tra l'incidenza negli esposti alla malattia, e l'incidenza nei non esposti, attraverso la formula: $a / (a + b) / c (c + d)$, utilizzando tabelle di contingenza 2 x 2; il calcolo di test genetici e sierologici è mostrato in percentuali, ed è stato eseguito per conta diretta.

I dati mostrati precedentemente sottolineano l'importanza di seguire un iter diagnostico che preveda l'esecuzione del test genetico HLA come esame di secondo livello per escludere la patologia, e non come esame di screening o come esame per confermare l'eventuale presenza di celiachia.

L'appropriatezza delle richieste diagnostiche gioca un ruolo fondamentale nel ridurre al minimo sprechi di risorse per l'esecuzione di esami non necessari, e nel ridurre al minimo il numero di pazienti falsi negativi.

Capitolo Quinto

BIBLIOGRAFIA

1. Farrell RJ, Kelly CP. Celiac sprue. *N Engl J Med* 2002; 346:180-8.
2. Associazione Italiana Celiachia. “Cosa è il glutine?” (2020).
3. Sapone A., Lammers K.M., Casolaro V., Cammarota M., Giuliano M.T., De Rosa M., Stefanile R., Mazzarella G., Tolone C., Russo M.I., Esposito P., Ferraraccio F., Carteni M., Riegler G., De Magistris L., Fasano A., Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Medicine* 2011; 9:23.
4. Van de Wal Y., Kooy Y., et al. Coeliac disease. *Gut* 2000; 46:734-737.
5. Sollid L.M., Lie B.A. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3:843-51.
6. Di Sabatino A., Corazza G.R., Coeliac disease. *Lancet*. 2009; 373:1480-93.
7. Godkin A., Jewell D. The pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*. 1998; 115(1):206-10.
8. Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* 2012; 18(42): 6036-6059.
9. Fasano A., Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology* 2005; 128(4 Suppl 1): S68-73.
10. Fasano A., Catassi C., Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120:636-51.

11. Ciacci C., et al., The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *United European Gastroenterol J.* 2015; 3(2):121-135.
12. Marsh M.N., Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut* 1990; 31:111-4.
13. Carroccio A., et al., Sideropenic anemia and celiac disease: one study, two points of view. *Dig Dis Sci* 1998; 43(3):673-8.
14. Dewar D.H., Ciclitira P.J., Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128(4 Suppl 1): S19-24.
15. Associazione Italiana Celiachia. "Vademecum del celiaco". Ed. C&D. (2008).
16. Tonutti E., Visentini D., Bizzaro N., et al., "Proposte di linee guida per la diagnosi di laboratorio della celiachia". Gruppo di studio in autoimmunologia della società italiana di medicina di laboratorio (2002).
17. Molberg O., et al., Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat. Med.* 1998; 4:713-717.
18. Di Sabatino A., et al., Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut.* 2006; 55:469-477.
19. Monteleone G., et al., Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut.* 2001; 48:425-429.
20. Fasano A., Catassi C., Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology.* 2001; 120:636-651.
21. Du Pre M.F., Sollid L.M., T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2015; 29:413-423.

22. Haines M.L., et al., Systematic review: the evidence bases for long-term management of coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008; 28:1042-1066.
23. Smecuol E., et al., Longitudinal study on the effect of treatment on body composition and anthropometry of celiac disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 1997; 92:639-643.
24. Rubio-Tapia A., et al., Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008; 6:983-7.
25. Murray J.A., Celiac disease in patients with an affected member, type 1 diabetes, iron-deficiency, or osteoporosis? *Gastroenterology.* 2005; 128: S52-6.
26. Reilly N.R., Fasano A., Green P.H., Presentation of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N.* 2012; 22:613-21.
27. Murray J.A., et al., Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79:669-73.
28. Rostom A., et al., American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 2006; 131:1981-2002.
29. Catassi C., et al., Detection of celiac disease in primary care: a multicentred case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102:1454-60.
30. Lebwohl B., et al., Diagnosis of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012; 22:661-77.
31. Van der Windt D.A., et al., Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *Jama.* 2010; 303:1738.

32. Ford A.C., et al., Yield of diagnostic tests for celiac disease in individuals with symptoms suggestive of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2009; 169:651-8.
33. Aziz I., Sanders D.S. The irritable bowel syndrome-celiac disease connection. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012; 22:623-37.
34. Korpimaki S., et al., Gluten-sensitive hypertransaminasemia in celiac disease: an infrequent and often subclinical finding. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106:1689-96.
35. Rubio-Tapia A., Murray J.A., The liver in celiac disease. *Hepatology.* 2007; 46:1650-8.
36. Sainsbury A., et al., Meta-analysis: coeliac disease and hypertransaminasaemia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 34:33-40.
37. Kaukinen K., et al., Celiac disease in patients with severe liver disease: gluten-free diet may reverse hepatic failure. *Gastroenterology.* 2002; 122:881-8.
38. Rubio-Tapia A., et al., Celiac disease autoantibodies in severe autoimmune liver disease and the effect of liver transplantation. *Liver Int.* 2008; 28:467-76.
39. Dube C., et al., The prevalence of celiac disease in average-risk and at risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology.* 2005; 128: S57-67.
40. Holmes G.K., Screening for coeliac disease in type 1 diabetes. *Arch Dis Child.* 2002; 87:495-8.
41. Trigoni E., Celiac disease in adult patients: specific autoantibodies in the diagnosis, monitoring, and screening. *Autoimmun. Dis.* 2014; 2014:623514.
42. Kakleas K., et al., Associated autoimmune diseases in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Autoimmun. Rev.* 2015; 14:781-797.

43. Berti I., et al., Usefulness of screening program for celiac disease in autoimmune thyroiditis. *Dig. Dis. Sci.* 2000; 45:403-406.
44. Sharma B.R., et al., Celiac autoimmunity in autoimmune thyroid disease is highly prevalent with a questionable impact. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016; 20(1):97-100.
45. Sategna Guidetti C., et al., Autoimmune thyroid diseases and coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998; 10(11):927-931.
46. Van der Windt D.A., et al., Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *Jama.* 2010; 303:1738-46.
47. Conrad K., et al., A new dot immunoassay for simultaneous detection of celiac specific antibodies and IgA-deficiency. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50:337-43.
48. McGowan K.E., et al., Celiac disease and IgA deficiency: complications of serological testing approaches encountered in the clinic. *Clin Chem.* 2008; 54:1203-9.
49. Malamut G., et al., The enteropathy associated with common variable immunodeficiency: the delineated frontiers with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105:2262-75.
50. Lewis N.R., et al., Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010; 31:73-81.
51. Harewood G.C., et al., Diagnostic approach to a patient with suspected celiac disease: a cost analysis. *Dig Dis Sci.* 2001; 46:2510-4.
52. Jabri B., et al., Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006; 3:516-25.
53. Salmi T.T., et al., Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut.* 2006; 55:1746-53.

54. Rubio-Tapia A., et al., Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jun; 105(6):1412-20.
55. Iltanen S., et al., Increased density of jejunal gamma delta+ T cells in patients having normal mucosa-marker of operative autoimmune mechanisms? *Autoimmunity.* 1999; 29(3):179-87.
56. Rostom A., et al., American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 2006; 131:1981-2002.
57. Pais W.P., et al., How many duodenal biopsy specimens are required to make a diagnosis of celiac disease? *Gastrointest Endosc.* 2008; 67(7):1082-7.
58. Leffler D.A., et al., Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105:2520-4.
59. Nisticò L., et al., Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut.* 2006; 55(6):803-8.
60. Sollid L.M., Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:53-81.
61. Kaukinen K., et al., HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(3):695-9.
62. Sollid L.M., et al., Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med.* 1989; 169(1):345-50.
63. Kaukinen K., et al., HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(3):695-9.

64. Hill I.D., What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology* 2005; 128 (suppl):25-32.
65. Volta U., et al., Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci* 2008; 53:1582-8.
66. Walker-Smith J.A., et al., Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65:909-11.
67. Ciacci C., et al., The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *United European Gastroenterol J.* 2015; 3(2):121-135.
68. Oberhuber G., et al., The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:1185-94.
69. Doherty D.G., et al., HLA DQA, DQB e DRB genotyping by oligonucleotide analysis: distribution of alleles and haplotypes in British Caucasoids. *Hum Immunol.* 1992; 34:53-63.
70. Lango A., et al., HLA -DQA e -DQB haplotypes in a Swedish population. *Eur J Immunogenet.* 1993; 20:453-460.
71. Mazzilli M.C., et al., A study of Italian pediatric celiac disease patients confirms that the primary HLA association is to the DQ (alpha 1*0501, beta 1*0201) heterodimer. *Hum. Immunol.* 1992; 33:133-139.
72. Klein J., Sato A., The HLA System. First of two parts. *NEJM* 2000; 343:702-709.
73. Klein J., Sato A., The HLA System. Second of two parts. *NEJM* 2000; 343:782-786.
74. Alzali B., et al., Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* 2007; 69:545-556.

75. Dausset J., et al., The association of the HLA antigens with diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1974; 3(1):127-49.
76. McDevitt H.O., et al., HLA, immune response genes, and disease. *Lancet.* 1974 ; 1(7869) :1269-75.
77. Trowsdale J., HLA genomics in the third millennium. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17:498-504.
78. Shiina T., et al., An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004; 64:631-649.
79. Cardoso C.S., et al., HFE, the MHC and hemochromatosis: paradigm for an extended function for MHC class I. *Tissue Antigens* 2003; 61:263-275.
80. Valentonyte R., et al., Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 2005; 37:357-364.
81. Bonamico M., et al., Serologic and genetic markers of celiac disease: a sequential study in the screening of first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42:150-154.
82. Shenoy S., Genetic risks and familial associations of small bowel carcinoma. *World J Gastrointest Oncol.* 2016; 8(6):509-519.
83. Murray J.A., The widening spectrum of celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69:354-365.
84. Rashtak S., Murray J.A., Review Article: Celiac Disease, New Approaches to Therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Apr; 35(7):768-781.
85. Megiorni F., et al., A rapid and sensitive method to detect specific human lymphocyte antigen (HLA) class II alleles associated with celiac disease. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:193-6.

86. Hall R.P., et al., Alterations in HLA-DP and HLA-DQ antigen frequency in patients with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol.* 1989; 93:501-505.
87. Park M.S., et al., The 90% incidence of HLA antigen (Te24) in dermatitis herpetiformis. *Tissue Antigens.* 1983; 22:263-266.
88. Sachs J.A., et al., Different HLA associated gene combinations contribute to susceptibility for coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut.* 1986; 27:515-520.
89. Sollid L.M., et al., HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology.* 1993; 105:910-922.
90. Balas A., et al., Absolute linkage of celiac disease and dermatitis herpetiformis to HLADQ. *Tissue Antigens.* 1997; 50:52-56.
91. Bouguerra F., et al., Synergistic effect of two HLA heterodimers in the susceptibility to celiac disease in Tunisia. *Genet Epidemiol.* 1997; 14:413-422.
92. Polvi A., et al., HLA-DQ2 negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol.* 1998; 59:169-175.
93. Megiorni F., et al., A rapid and sensitive method to detect specific human lymphocyte antigen (HLA) class II alleles associated with celiac disease. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:193-6.
94. Liu E., et al., Risk of Pediatric Celiac Disease According to HLA Haplotype and Country. *N Engl J Med.* 2014; 371(1):42-49.
95. Vader W., et al., The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100:12390-5.
96. Catassi C., The world map of celiac disease. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2005; 35:37-55.

97. Lebwohl B., et al., Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*. 2015; 351:h4347.
98. Mustalahti K., et al., The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine* 2010; 42:587-95-721.
99. Hunt K.A., Van Heel D.A., Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut* 2009; 58(4):473-6.
100. Ventura A., et al., Gluten dependent diabets-related and thiroid-related autoantibodies in coeliac patients: a prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28:473.

