



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in:

DIETISTICA

Tesi di laurea:

**Determinazione delle tracce di glutine giornaliere nella dieta
senza glutine di pazienti affetti da malattia celiaca:
analisi quantitativa**

Relatore: Chiar.mo

Prof. Carlo Catassi

Candidato

Veronica Pace

Correlatore: Chiar.ma

Prof.ssa Maria Elena Lionetti

Anno Accademico 2018-2019

INDICE

I CAPITOLO	4
LA MALATTIA CELIACA	4
1.1 DEFINIZIONE	5
1.2 EPIDEMIOLOGIA	5
1.3 PATOGENESI.....	6
1.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE	8
1.4.1 <i>Forma tipica</i>	8
1.4.2 <i>Forma atipica</i>	8
1.4.3 <i>Celiachia silente</i>	10
1.4.4 <i>Celiachia potenziale</i>	10
1.5 DIAGNOSI	10
1.5.1 <i>Sierologia</i>	11
1.5.2 <i>Biopsia ed Istologia</i>	11
1.6 TRATTAMENTO	12
II CAPITOLO	14
LA DIETA SENZA GLUTINE	14
2.1 IL GLUTINE	15
2.2 IMMUNOGENICITÀ DELLA GLIADINA	15
2.3 LA DIETA SENZA GLUTINE (DSG) COME TERAPIA.....	17
2.4 ALIMENTI “VIETATI”, “A RISCHIO”, “PERMESSI”	17
2.4.1 <i>Alimenti vietati</i>	17
2.4.2 <i>Alimenti a rischio</i>	19
2.4.3 <i>Alimenti permessi</i>	19
III CAPITOLO	21
LE CONTAMINAZIONI DELLA DIETA SENZA GLUTINE	21
3.1 DEFINIZIONE	22
3.2 LE FONTI NORMATIVE	24
3.3 SOGLIA DI TOSSICITÀ	25

3.4 METODI DI STUDIO DELLA CONTAMINAZIONE.	26
3.5 REVISIONE DELLA LETTERATURA SULLA CONTAMINAZIONE	26
IV CAPITOLO	28
STUDIO SPERIMENTALE	28
4.1 SCOPO DELLA TESI	29
4.2 MATERIALI E METODI	29
4.2.1 <i>I pazienti</i>	29
4.2.2 <i>Diario Alimentare</i>	29
4.2.3 <i>Classificazione dei campioni sulla base del contenuto di glutine rilevato</i>	30
4.2.4 <i>Quantificazione giornaliera della contaminazione da glutine</i>	30
4.3 RISULTATI.....	31
4.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	33
4.4.1 <i>Il Counseling Dietetico</i>	35
V	38
ICONOGRAFIA	38
VI	50
BIBLIOGRAFIA	50

I CAPITOLO
LA MALATTIA CELIACA

1.1 DEFINIZIONE

La malattia celiaca (CD) è una patologia sistemica immuno-mediata scatenata dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti e localizzata primariamente nella mucosa del piccolo intestino¹. Il glutine è un complesso proteico contenuto nel frumento, nella segale, nell'orzo e in altri cereali minori. Tra le frazioni proteiche che lo compongono, sono le prolamine che scatenano in questi soggetti una risposta immunitaria T-linfocitaria inappropriata rappresentando quindi le maggiori responsabili dell'effetto tossico. Lo stato infiammatorio cronico della mucosa duodenale che ne consegue è però reversibile con l'eliminazione del glutine dalla dieta e può recidivare con la sua reintroduzione².

1.2 EPIDEMIOLOGIA

L'intolleranza al glutine è una delle patologie permanenti più frequenti in assoluto. Attualmente la prevalenza è dello 0.6-1% della popolazione sia in Europa (in Italia la prevalenza si attesta circa in un 1 caso ogni 100) che in altre aree del mondo (Nord e Sud America, Australia, Africa del Nord, Medio Oriente e parte del continente asiatico). La frequenza della malattia celiaca sta aumentando, anche, in molti paesi in via di sviluppo a causa dell'occidentalizzazione della dieta, cambiamenti nella produzione e lavorazione del frumento e grazie all'aumentata consapevolezza sulla malattia.³ In generale la malattia colpisce maggiormente la razza bianca e le donne con un rapporto femmine/maschi di 2:1. La frequenza di malattia è maggiore in alcuni gruppi di popolazione, definiti "a rischio", quali i familiari di primo grado del celiaco (10-15%), i pazienti affetti da altre patologie di tipo autoimmune come la tiroidite di Hashimoto (5%) o il diabete mellito di tipo I (3-16%), tipico dell'età pediatrica, ed i soggetti con patologie genetiche quali la sindrome di Down (5%), il deficit di IgA (9%) e la sindrome di Turner (3%).⁴

In realtà soltanto una frazione dei casi di celiachia sono riconosciuti e trattati, mentre la maggioranza sfuggono alla diagnosi a causa di sintomi non tipici o sfumati. Si calcola che per ogni paziente a cui è stata diagnosticata la celiachia ve ne sono da sette a dieci a cui la celiachia non è invece stata diagnosticata, per questo oggi si parla di "iceberg celiaco" (Figura 1)⁵.

1.3 PATOGENESI

La malattia celiaca (CD o MC) è una patologia multifattoriale derivata da una complessa interazione tra il patrimonio genetico dell'ospite, i fattori immunologici e i fattori ambientali.

I fattori genetici svolgono un ruolo fondamentale nella predisposizione alla malattia celiaca come dimostrato dall'elevato tasso di concordanza per la CD tra i gemelli monozigoti (85%).

I geni maggiormente implicati sono quelli del complesso maggiore di istocompatibilità, in particolare del sistema HLA di classe II DQ, situati sul braccio corto del cromosoma 6.

Circa il 90% dei celiaci risulta positivo per la variante HLA-DQ2 (DQA1*0501/DQB1*0201), mentre il 5% ha positiva la variante HLA-DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302). I restanti casi possiedono almeno una delle due componenti dell'eterodimero DQ2, più spesso il DQB1*0201.

La tipizzazione dell'HLA presenta un elevato valore predittivo negativo, quindi l'assenza di questi aplotipi esclude la possibilità di sviluppo della malattia. Tuttavia la presenza di questi alleli che codificano per tali molecole è una condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo della malattia.⁶

Altri fattori genetici potrebbero giocare un ruolo importante e sono stati individuati diversi geni non-HLA che conferiscono una predisposizione alla malattia, molti dei quali implicati nella risposta immunitaria e infiammatoria⁷. I fattori immunologici sono determinati sia da una risposta linfocitaria Th2 che stimola la formazione di autoanticorpi anti-gliadina (AGA), anti-endomisio (EMA) e anti-transglutaminasi (tTG); sia da una Th1 che è responsabile del rimodellamento tissutale.

La componente ambientale è in primo luogo rappresentata dalla quantità e qualità del glutine introdotto con gli alimenti, ma anche dalla durata dell'allattamento al seno, che sembrerebbe ritardare l'insorgenza della malattia, e dall'epoca dell'introduzione del glutine durante il divezzamento (l'introduzione prima dei 4 mesi e dopo i 7 mesi è associata ad un rischio aumentato).

Anche le infezioni intestinali, in particolare quelle da Rotavirus, potrebbero esercitare un ruolo nella patogenesi della CD⁸.

La reazione immunitaria responsabile della malattia avviene in seguito al superamento da parte della gliadina (prolammina del glutine), dell'epitelio intestinale fino al raggiungimento della lamina propria. In condizioni fisiologiche la presenza delle tight-junctions rende l'epitelio intestinale impermeabile al passaggio di macromolecole come il glutine, per cui solo minime quantità di frazioni antigeniche riescono a superare la barriera epiteliale.

Nei soggetti con malattia celiaca l'integrità delle tight-junctions risulta alterata determinando quindi un maggiore assorbimento di macromolecole e di glutine. Una volta giunta nella lamina propria la gliadina interagisce con la transglutaminasi tissutale che catalizza una reazione di deamidazione di uno specifico residuo glutammico convertendo la glutammina in acido glutammico carico negativamente.

La gliadina deamidata viene poi processata dalle cellule presentanti l'antigene (APC) e legata ai complessi HLA-DQ2/DQ8 per i quali, in seguito alla deamidazione, ha acquisito affinità. Successivamente viene presentata ai linfociti TCD4+.

Le cellule T così stimulate secernono una serie di citochine che orientano la risposta immunitaria verso la produzione di anticorpi (risposta Th2) o verso l'infiammazione e il rimodellamento tissutale (risposta Th1) (Figura 2). In particolare la risposta Th2, mediante la produzione di Interleuchina 4, induce l'espansione di cloni di cellule B autoreattivi e quindi la produzione di anticorpi diretti contro la gliadina, la tTG e i complessi tTG-gliadina.

La risposta Th1, attraverso il TNF α , stimola la secrezione da parte di fibroblasti intestinali di proteine che degradano alcune componenti di matrice con dissoluzione del tessuto connettivo e distruzione della mucosa. L'attivazione delle cellule dendritiche da parte dei peptidi del glutine determina l'up-regolazione di NKG2D e MICA sui linfociti intraepiteliali (IEL) e sugli enterociti, peggiorando 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.

Entrambi questi ultimi due eventi garantiscono una auto-alimentazione del processo⁹.

1.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE

Le manifestazioni cliniche dalla malattia sono tanto varie da poter distinguere quattro diverse forme cliniche di celiachia: forma tipica, atipica, silente e potenziale (Tabella 1). Sebbene la malattia celiaca possa presentarsi ad ogni età, i casi tipici si manifestano più spesso nella prima infanzia.

1.4.1 Forma tipica

La forma tipica è la più semplice da riconoscere e si manifesta tra i 6 e 24 mesi di vita, cioè dopo l'introduzione del glutine nella dieta. Il sintomo caratteristico di esordio è la diarrea con feci abbondanti e maleodoranti. A questo può associarsi anoressia con arresto della crescita o calo ponderale e addome globoso che contrasta con la perdita della massa magra evidenziabile soprattutto a livello degli arti inferiori e dei glutei (Figura 3). Inoltre ci può essere irritabilità⁵.

1.4.2 Forma atipica

La forma atipica si manifesta di solito nei bambini più grandi (5-7 anni) e negli adulti dove le manifestazioni di evidente malassorbimento sono assenti e i sintomi gastrointestinali, se presenti, comprendono manifestazioni insolite come dolore addominale ricorrente, gonfiore, nausea, vomito, costipazione, alterazione dello smalto dentario, stomatiti aftose ricorrenti⁵.

Nel bambino comunemente si può riscontrare un incremento delle aminotransferasi sieriche da correlare ad una blanda infiammazione epatica. Più spesso prevale la sintomatologia extra-intestinale secondaria al malassorbimento:

- l'*Anemia* è di frequente riscontro, anche come sola manifestazione. Si tratta solitamente di un'anemia siderocarenziale, da deficit di ferro, dovuta al danneggiamento della mucosa intestinale che ne altera l'assorbimento nella parte prossimale del piccolo intestino. Questi soggetti sono in genere refrattari alla terapia con ferro per os per cui esclusivamente la dieta senza glutine, eventualmente associata ad una integrazione con ferro fino a che non vengono ripristinate le riserve, è in grado di risolvere il problema. L'anemia, infine, può anche essere determinata da un possibile e concomitante malassorbimento di vitamina B12 e acido folico¹⁰;

- la *Dermatite Erpetiforme* di Dhuring è ad oggi considerata come una variante della malattia celiaca (celiachia cutanea) e si manifesta con vescicole/bolle cutanee presenti principalmente in modo simmetrico sulle superfici estensorie di gomiti, ginocchia, spalle etc. Anche questa risponde alla dieta aglutinata e a terapia immunosoppressiva¹¹;

- la *Bassa Statura*, può inoltre essere la manifestazione primaria;

- le *Malattie Osteo-articolari* (osteoporosi, osteopenia, artalgie) sono ritenute essere collegate al malassorbimento di calcio e vitamina D, ma anche ad un'interazione tra citochine infiammatorie e fattori locali di rimodellamento osseo.

Nei pazienti pediatrici una dieta senza glutine è l'unica terapia veramente efficace che può portare ad un recupero soddisfacente dell'integrità ossea. Mentre nell'adulto affetto da osteoporosi secondaria a MC non si verifica questo recupero spontaneo e non ci sono ancora dati conclusivi sull'efficacia della terapia standard dell'osteoporosi nel ridurre il rischio di frattura. Quindi la diagnosi tempestiva è fondamentale.

- l'*Astenia*;

- l'*Alopecia*;

- i *Disturbi Neurologici* come epilessia con calcificazioni endocraniche, cefalea, atassia, autismo, neuropatia, etc.¹²;

- nelle donne possono verificarsi *Disturbi della Fertilità* (aborti spontanei, menopausa precoce, amenorrea, infertilità)⁵.

1.4.3 *Celiachia silente*

La malattia celiaca silente è la forma che viene diagnosticata in seguito a programmi di screening sui familiari di primo grado asintomatici dei pazienti celiaci o in pazienti a rischio di celiachia (soggetti con diabete tipo 1, tiroidite di Hashimoto o sindrome di Down). Questa forma si caratterizza per la presenza di lesioni tipiche della mucosa intestinale nonostante l'assenza di sintomatologia sia tipica che atipica¹³.

1.4.4 *Celiachia potenziale*

Per malattia celiaca potenziale, invece, si intende una variante clinica in cui i soggetti presentano una mucosa intestinale normale in presenza di marcatori sierologici positivi a basso titolo. La forma potenziale non richiede l'inizio del regime dietetico privo di glutine, ma questi soggetti devono essere sottoposti a controlli periodici per identificare e trattare precocemente l'eventuale evoluzione in forma conclamata¹³.

1.5 DIAGNOSI

La corretta diagnosi della malattia celiaca è essenziale per iniziare precocemente il trattamento e prevenire le complicanze associate (aumentata incidenza di altre malattie autoimmuni, della mortalità, di osteoporosi e di tumori)^{14 15}.

Secondo le nuove linee guida della società europea di gastroenterologia, epatologia e nutrizione pediatrica (ESPGHAN) (22) la diagnosi si avvale della clinica, della sierologia specifica, della presenza di HLA-DQ2 e/o DQ8 e dei cambiamenti caratteristici nella biopsia duodenale.

Nei pazienti pediatrici con un alto titolo anticorpale anti-TG2 (>10 volte il limite superiore della norma), positività per gli EMA, positività per HLA-DQ2/8 e con remissione dei sintomi suggestivi di celiachia dopo l'inizio della dieta senza glutine, si può evitare di effettuare la biopsia duodenale per porre la diagnosi¹⁶. La positività degli anticorpi prima dell'inizio della dieta e la loro negativizzazione durante la DSG rappresenta un altro importante supporto alla diagnosi e al successivo follow-up¹⁷.

1.5.1 Sierologia

Gli autoanticorpi da andare a dosare nella malattia celiaca sono quelli contro la transglutaminasi di tipo 2 (anti-TG2), contro i peptidi della gliadina deamidata (DPG) e contro la transglutaminasi extracellulare (anti-endomisio, EMA).

Tranne che per gli anti-DPG, gli anticorpi utili per la diagnosi appartengono alla classe IgA; ma poiché alcuni individui possono essere affetti da deficit di IgA, è utile come primo approccio andare a ricercare le IgA totali sieriche e quindi, qualora risultassero basse, andare a dosare gli EMA IgG ed anti-tTG IgG¹⁸. La sierologia è utile anche come screening nei gruppi a rischio e per il follow-up della patologia, evitando di effettuare ulteriori biopsie durante la dieta priva di glutine, per valutare la restitutio ad integrum della mucosa.

Gli EMA e gli anti-tTG IgA presentano una specificità e sensibilità diagnostica molto elevata e praticamente sovrapponibile; tuttavia, a differenza degli EMA, i quali vengono rilevati con la tecnica di immunofluorescenza e come tali sono passibili di errori operatore-dipendenti, gli anti-tTG sono identificati con la tecnica ELISA automatizzata, la quale esclude gli errori sopra indicati¹⁹.

Al di sotto dei due anni di età gli anti-DPG hanno una sensibilità maggiore in quanto gli EMA e gli anti-tTG sono poco attendibili in questa fascia d'età²⁰.

1.5.2 Biopsia ed Istologia

La biopsia duodenale rappresenta il gold standard per la diagnosi nell'età adulta. Rimane un test fondamentale anche nei bambini con sospetto di malattia celiaca (in assenza di tutti i criteri che permettono di omettere questo esame diagnostico), poiché permette l'applicazione di tecniche istologiche avanzate, quali la ricerca mediante immunohistochimica dei depositi di IgA a livello sub-epiteliale, migliorando la resa diagnostica di questa procedura.

Si ottiene attraverso l'esecuzione di una esofagogastroduodenoscopia (EGDS) ed è in grado di dimostrare la presenza delle caratteristiche alterazioni della mucosa: iperplasia delle cripte, atrofia dei villi e infiltrato infiammatorio plasmacellulare a livello della lamina propria.

La sequenza delle lesioni che intervengono nella progressione del danno alla mucosa intestinale viene valutata attraverso la classificazione di Marsh modificata da Oberhuber. (Tabella 2) ²¹.

1.6 TRATTAMENTO

Ad oggi l'unico trattamento disponibile per la malattia celiaca è la dieta senza glutine (DSG), dove vengono esclusi tutti i cereali contenenti questo complesso proteico (frumento, segale, orzo, triticale, semolino o grano duro, spelta, kamut) ²². Al posto dei cereali proibiti possono essere introdotti prodotti dieto-terapeutici privi di glutine, riconoscibili dal marchio della "spiga barrata" sulla confezione. Non vi sono limitazioni all'uso di cereali naturalmente privi di glutine come il riso ed il mais o ad altri alimenti naturali, sia amidacei (patate, legumi, etc) che di altra natura (latte e derivati, frutta, verdura, carne, pesce, etc).

Il trattamento dietetico della celiachia determina la graduale scomparsa dei sintomi, delle alterazioni bio-umoral e la normalizzazione del quadro istologico della mucosa intestinale.

La dieta deve essere mantenuta per tutta la vita in quanto la sua sospensione comporta la rapida ricomparsa della sintomatologia e delle alterazioni della mucosa intestinale ².

La DSG rappresenta un trattamento risolutivo, ma presenta alcune importanti limitazioni che la rendono difficile da rispettare soprattutto a lungo termine.

La necessità di escludere tutti gli alimenti derivati dal frumento porta ad una notevole limitazione nelle scelte alimentari, evidente soprattutto nella prima colazione e nei pasti consumati fuori casa; infatti nel primo caso la quota di carboidrati complessi può essere soddisfatta solo dal consumo di prodotti alimentari pre-confezionati caratterizzati da una possibile composizione nutrizionale equilibrata.

Per quanto riguarda i pasti consumati fuori casa ancora pochi esercizi pubblici o privati sono in grado di soddisfare le esigenze nutrizionali del soggetto celiaco, con conseguenze importanti anche sul piano psicologico e delle relazioni sociali ²³.

Tutto questo sta spingendo la ricerca a trovare alternative terapeutiche alla dieta senza glutine anche grazie al miglioramento della conoscenza sulla patogenesi della malattia.

Diversi sono i possibili nuovi approcci terapeutici che si stanno studiando: eliminazione degli epitopi immunogenici del glutine dalle farine, degradazione dei peptidi della gliadina tramite l'utilizzo di un' endopeptidasi esogena, riduzione della permeabilità intestinale attraverso il blocco del recettore della zonulina, inibizione dell' attività della tTG2 intestinale attraverso antagonisti HLA, modulazione o inibizione delle citochine pro infiammatorie, induzione della tolleranza orale al glutine, etc ^{24 25 26}.

Ma questi ed altri approcci sono ancora in fase di studio e alcuni dei quali ancora in fase preclinica. Quindi ad oggi nessuna terapia alternativa alla DSG è disponibile, pertanto la dieta aglutinata rimane l'unica sicura ed efficace.

II CAPITOLO

LA DIETA SENZA GLUTINE

2.1 IL GLUTINE

Il termine glutine indica un complesso proteico contenuto nei cereali, come il frumento, la segale, l'orzo, il farro e il kamut. Non possiede valore nutrizionale, ma la sua importanza risiede esclusivamente nelle sue uniche proprietà chimico-fisiche, che conferiscono alla farina la capacità di assorbire acqua, ed all'impasto di assumere coesività, viscosità ed elasticità.

Tra le frazioni proteiche rappresenta la componente alcool-solubile, cioè formata dalle prolamine, quella di maggiore rilevanza nella malattia celiaca. Le prolamine, di cui fanno parte le gliadine per il frumento, le secaline per la segale, le ordeine per l'orzo, sono molto ricche degli amminoacidi prolina (P) e glutammina (Q). Questa composizione giustifica in parte la capacità immunogenica del glutine, poiché questi amminoacidi sono in grado di favorire il legame col complesso MHCII. Infatti la P garantisce la resistenza alla proteolisi gastrica e intestinale, mentre la Q convertita ad acido glutammico, carico negativamente, ad opera di una reazione di deamidazione catalizzata dalla transglutaminasi intestinale, aumenta ulteriormente l'affinità dei peptidi del glutine per i recettori HLA presenti sulle cellule dendritiche.

Le avenine, prolamine dell'avena, invece, hanno anch'esse un'elevata percentuale di Q (29.1%), ma in posizioni diverse da quelle di ancoraggio con i siti HLA-DQ2 e presentano pochi residui di P. Per questo motivo l'avena presenta una ridotta capacità di stimolare il sistema immunitario ²⁷.

2.2 IMMUNOGENICITÀ DELLA GLIADINA

Diversi studi relativi all'attivazione della risposta immunitaria contro il glutine hanno dimostrato che i responsabili sono i peptidi della gliadina, i quali a loro volta vengono distinti in:

1. *Tossici*, in grado di indurre danni tissutali attraverso l'attivazione della risposta immunitaria innata;
2. *Immunogenici*, in grado di stimolare la risposta immunitaria acquisita attivando i linfociti T HLA-DQ2/DQ8 e i linfociti B ^{28 29 30}.

Uno dei più noti tra i peptidi tossici è il frammento 31-43 dell' α -gliadina che viene trasportato attraverso la mucosa dei pazienti celiaci in quantità due volte superiori rispetto a quanto succede negli individui sani. Non ha attività immunogenica nei confronti dei linfociti T helper, ma scatena una risposta innata immediata attraverso una sovra-regolazione dell'espressione dell'interleuchina IL-15, della COX-2 e dei marker di attivazione cellulare CD25 e CD83 sui macrofagi, sui monociti e sulle cellule dendritiche. Recentemente è stato individuato anche il peptide 33-mer, un peptide altamente immunogeno contenente ben 6 epitopi tossici, il quale dopo la deamidazione gioca un ruolo centrale nell'attivazione della cascata patogenetica della CD attivando una forte risposta T linfocitaria^{31 32 33}.

Un effetto particolare della gliadina è di causare un incremento dell'espressione intracellulare di zonulina, molecola che regola la polimerizzazione dei microfilamenti di actina e l'apertura delle tight-junctions. La conseguenza è un aumento della permeabilità intestinale e quindi un ingresso facilitato ai peptidi immunogenici e tossici all'interno della lamina propria^{34 35 36}.

I peptidi immunologici hanno delle caratteristiche comuni:

1. sono localizzati in regioni ricche di proline (come precedentemente detto questo amminoacido aiuta la creazione del legame col complesso MCHII);
2. contengono glutamina che, deamidata ad acido glutammico negativo, potenzia l'affinità per i recettori HLA presenti sulle cellule dendritiche;
3. si trovano all'interno di peptidi più lunghi e multivalenti; a causa della diminuzione della degradazione del glutine che si osserva nei pazienti celiaci, da questi peptidi multivalenti vengono rilasciati frammenti oligopeptidici, tra cui quelli immunogenici e quelli tossici^{28 31 37}.

La presenza di potenziali peptidi immunogenici nelle ordeine (prolammine dell'orzo) e nelle secaline (prolammine della segale) potrebbe essere alla base della capacità di queste proteine di attivare la risposta immunitaria nei soggetti predisposti.

Contrariamente, nelle avenine ritroviamo un basso contenuto di prolina che spiega la ridotta tossicità dell'avena per i celiaci²⁷.

Questa differenza si rispecchia anche nella classificazione tassonomica dei cereali dove, sebbene tutti i cereali appartengano alla stessa sottofamiglia delle Poraceae, il frumento, l'orzo e la segale appartengono alla tribus delle Triticeae, mentre l'avena fa parte delle Aveneacee. Questa divisione si basa proprio sulla struttura delle frazioni proteiche dei cereali³⁸.

2.3 LA DIETA SENZA GLUTINE (DSG) COME TERAPIA

L'unico trattamento al momento possibile per la cura della MC consiste nell'esclusione del glutine dalla dieta. Questa esclusione deve essere continua, assidua e completa.

È, infatti, ormai ampiamente dimostrato che una stretta aderenza alla DSG si associa alla risoluzione della sintomatologia clinica, al miglioramento dei parametri laboratoristici, alla normalizzazione del quadro istologico e alla drastica riduzione del rischio di sviluppare complicanze, tra le quali, in particolare, infertilità, osteopenia/osteoporosi e neoplasie del tratto gastrointestinale. Al contrario, è altrettanto dimostrato come una non ottimale aderenza alla DSG si associ ad aumentata morbilità.

La DSG deve essere quindi “rigorosa”, ovvero bisogna allontanare completamente il glutine dalla propria alimentazione^{39, 40}.

2.4 ALIMENTI “VIETATI”, “A RISCHIO”, “PERMESSI”

Il paziente celiaco si deve orientare nelle sue scelte alimentari, partendo dalla suddivisione degli alimenti nelle tre categorie: “vietati”, “a rischio” e “permessi”, di seguito descritte.

2.4.1 Alimenti vietati

Sono gli alimenti che contengono glutine e pertanto non sono idonei ai celiaci.

Oltre a frumento (grano), segale, orzo, sono vietati al celiaco i seguenti alimenti e tutti i prodotti derivati da essi:

- **BULGUR (BOULGOUR O BURGHUL):** è un grano molto diffuso in Medio Oriente; viene cotto in acqua e frantumato dopo essere stato seccato al sole.
- **CRACKED GRANO:** è composto da chicchi di grano frantumati; a differenza del bulgur, che viene prima immerso in acqua, cotto, essiccato e poi frantumato; il cracked grano è frantumato crudo e richiede quindi la cottura.
- **COUSCOUS:** tradizionale piatto arabo, è una semola di grano duro mescolata ad acqua e lavorata a mano fino ad ottenere piccolissime sfere, essiccate poi al sole e cotte a vapore. Esistono oggi in commercio couscous senza glutine da cereali permessi.
- **FARRO:** è un tipo di grano molto popolare nell'antica Roma e attualmente molto diffuso, sia sotto forma di grani (nei minestrini surgelati, miscelato con legumi secchi per le preparazioni di minestrini, ecc.), oppure sotto forma di farina per la preparazione di paste, dolci, ecc. Esistono alcune varietà di Farro, una di queste è il Triticum Spelta.
- **FRIK:** è chiamato anche “grano verde Egiziano”.
- **GREUNKERN:** oggi viene tradotto come “grano verde Greco”, ma è il grano chiamato Spelta.
- **KAMUT®:** è un marchio registrato della società americana Kamut International, il cui nome designa una varietà di grano duro di origine egiziana.
- **MONOCOCCO:** il monococco (Triticum Monococco), detto anche ENKIR, è una varietà del farro.
- **SEITAN:** derivato dalla lavorazione del glutine del frumento; il glutine estratto viene trasformato in seitan; da secoli costituisce l'alimento base della cucina orientale.
- **SPELTA:** lo spelta (Triticum Spelta) è una varietà del farro.
- **TABULE':** il tabbouleh o tabulè è una pietanza araba e consiste in un'insalata a base di bulgur, con prezzemolo, cipollotti e menta tritati fini e con pomodoro e cetrioli a tocchetti, il tutto condito con succo di limone e olio d'oliva.
- **TRITICALE:** è un ibrido artificiale tra la segale e il grano tenero o altre varietà del genere Triticum. Creato alla fine del XIX secolo, solo ultimamente coltivato su larga

scala e la parola stessa è una fusione delle parole latine Triticum (triticum, frumento) e Secale (segale).

L'avena pura sembra essere tollerata dalla maggior parte delle persone con MC, ma deve essere introdotta nella dieta con cautela e i pazienti devono essere monitorati costantemente per valutare eventuali reazioni avverse (forte raccomandazione, moderato livello di prove). Questo perché i prodotti commerciali a base di avena sono spesso contaminati dal glutine proveniente da altri tipi di cereali. Ci sono dati in letteratura che indicano che un piccolo numero di persone con MC può essere intollerante anche all'avena pura, così che in questi soggetti si può sviluppare una risposta immunologica all'avena stessa⁴¹.

2.4.2 Alimenti a rischio

Sono gli alimenti che potrebbero contenere glutine in quantità superiore ai 20 ppm, o a rischio di contaminazione e per i quali è necessario conoscere e controllare gli ingredienti e i processi di lavorazione. Rientrano in questa categoria gli alimenti trasformati, come una farina di un cereale permesso, un salume, un gelato, ecc. Alla luce di queste ultime normative, l'AIC pertanto consiglia il consumo degli alimenti trasformati (rientranti nella categoria "a rischio") solo se riportanti la dicitura "senza glutine" o se presenti in Prontuario AIC degli alimenti o se con "Spiga Barrata" nell'etichetta.

2.4.3 Alimenti permessi

Sono gli alimenti che possono essere consumati liberamente, in quanto naturalmente privi di glutine o appartenenti a categorie alimentari non a rischio per i celiaci, poiché nel corso del loro processo produttivo non sussiste rischio di contaminazione.

Sono permessi alimenti naturalmente privi di glutine come il riso, il mais, le patate, il sorgo, la quinoa, il teff, il grano saraceno, l'amaranto, il miglio, la manioca, purché non subiscano la contaminazione da glutine nel corso della lavorazione.

Nessuna limitazione anche per verdure, frutta, legumi, carne, pesce, uova, latte e derivati, olio e burro (tutti alimenti senza glutine all'origine come materie prime, ma che potrebbero contenerne nel prodotto lavorato e trasformato presente in commercio).

Tra i prodotti trasformati presenti in commercio, sono poi permessi

1. gli alimenti dietoterapeutici senza glutine, regolamentati dal DL 111/92,
2. gli alimenti presenti nel Prontuario AIC degli alimenti - edizione corrente,
3. gli alimenti con il marchio registrato Spiga Barrata, di proprietà di AIC,
4. gli alimenti con il claim “senza glutine” in etichetta.

III CAPITOLO

**LE CONTAMINAZIONI DELLA DIETA SENZA
GLUTINE**

3.1 DEFINIZIONE

Per uniformare e chiarire definitivamente le informazioni sulla dieta senza glutine, nel 2011 l'Associazione Italiana Celiachia (AIC) ha diffuso il documento "Le contaminazioni" nella dieta senza glutine, frutto del lavoro di un gruppo misto laico-scientifico che si era avvalso della professionalità ed esperienza dei membri del Comitato Scientifico Nazionale, di alcuni professionisti dello staff e di alcuni rappresentanti del direttivo nazionale⁴².

Secondo la definizione di AIC, le contaminazioni "accidentali" consistono nell'aggiunta involontaria di glutine al prodotto alimentare che ne è privo, a causa di eventi non voluti, dunque non controllabili.

Tali contaminazioni sono quantitativamente presenti in tracce, al limite della rilevabilità strumentale. Parti per milione (ppm) e Parti per miliardo, dall'inglese parts per billion (ppb) sono unità di misura adimensionali che indicano un rapporto tra quantità misurate omogenee di un milione a uno. Ad esempio vengono usate per livelli estremamente bassi di concentrazione di un elemento chimico, ma anche per esprimere errori di misurazione, o tolleranze.

È utile distinguere due tipi di contaminazione:

- le *Contaminazioni Crociate* (cross-contamination), che possono avvenire lungo tutta la filiera di produzione, nel momento in cui il prodotto senza glutine viene a contatto con il glutine;
- le *Contaminazioni Ambientali*, possibili laddove si verificano comportamenti errati nella conservazione degli alimenti e nella preparazione dei pasti, sia nell'ambiente domestico che nella ristorazione collettiva.

Nel dare informazioni su questo argomento, AIC tiene conto:

1. delle fonti normative, nazionali ed internazionali;
2. delle conoscenze scientifiche in particolare sulle soglie di tossicità del glutine e sui consumi di alimenti senza glutine;
3. del principio di precauzione sancito dall'Unione Europea⁴³.

La completa eliminazione del glutine dalla dieta non è semplice da realizzare, in quanto i cereali non permessi ai celiaci si ritrovano in una moltitudine di prodotti alimentari ed il rischio di contaminazione accidentale da glutine è spesso possibile nei processi di lavorazione dell'industria alimentare.

Per questo AIC ha, da molti anni, messo in opera due progetti di controllo e promozione degli alimenti idonei alla dieta aglutinata: il marchio "Spiga Barrata" ed il "Prontuario AIC degli alimenti".

Il marchio "Spiga Barrata", di proprietà dell'AIC (registrato nel 1995), è costituito da un disegno di fantasia richiamante una spiga di grano tagliata da un segmento ed è per il consumatore celiaco simbolo di identificazione immediata di sicurezza ed idoneità alla propria dieta.

Il marchio "Spiga Barrata", viene concesso previa la sottoscrizione di un contratto tra AIC e l'Azienda interessata e la successiva verifica da parte di AIC dell'idoneità dei prodotti.

Il marchio "Spiga Barrata" è ad oggi riportato sull'etichetta di sempre più numerosi prodotti alimentari e rientra in un insieme più vasto di progetti che AIC ha attivato per favorire una sempre migliore qualità della vita dei soggetti celiaci e delle loro famiglie.

Il "Prontuario AIC degli alimenti" è una pubblicazione edita con frequenza annuale che raccoglie, a seguito di valutazione, anche quei prodotti che, seppur non pensati specificamente per una dieta particolare, risultano comunque idonei al consumo da parte del soggetto celiaco. L'edizione corrente vanta 600 aziende operanti in tutte le aree del mercato alimentare, presenti con più di 20.000 prodotti reperibili sul mercato.

Le aziende produttrici che aderiscono e concorrono con le loro risposte alla stesura dell'elenco, dichiarano l'idoneità dei loro prodotti ad essere consumati anche dai celiaci (in quanto il glutine eventualmente presente è sempre inferiore a 20 ppm), tenendo conto non solo degli ingredienti, ma anche delle possibili contaminazioni durante tutte le fasi di produzione (stoccaggio, lavorazione, confezionamento, ecc.).

AIC svolge, per ogni edizione, analisi a campione sui prodotti inseriti in Prontuario, previo prelievo a scaffale ed effettuazione del dosaggio di glutine presso laboratori riconosciuti da AIC.

La consapevolezza da parte delle aziende della possibilità che i propri prodotti vengano analizzati da AIC, e conseguente esclusione ufficiale dal Prontuario a causa di eventuali non conformità, costituisce un ulteriore sollecito al controllo ed alla gestione del rischio.

3.2 LE FONTI NORMATIVE

Attualmente, in Italia, in Europa e negli USA i prodotti che possono riportare in etichetta il claim “senza glutine” devono avere un contenuto di glutine < 20 ppm.

La normativa comunitaria conferma quanto sostenuto da AIC da sempre, anche quando in Italia il significato di “senza glutine” veniva abbinato ad “assenza”, cioè “zero” glutine, o meglio, lo zero analitico rilevabile dagli strumenti di misurazione disponibili. Solo nell’ottobre 2003, il Ministero della Salute, con la nota 600.12/AG32/2861, a firma del Direttore Generale dell’allora Ufficio Alimenti Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria del Ministero della Salute, indica in 20 ppm il valore massimo per i prodotti dietetici senza glutine.

Grazie anche alle evidenze scientifiche disponibili, dopo anni di discussioni nella comunità scientifica internazionale circa il limite massimo di glutine ammissibile in un alimento per poter essere considerato senza glutine, la Codex Alimentarius Commission, una Commissione istituita nel 1963 dalla FAO (l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura) e dall'OMS (l'Organizzazione delle Nazioni Unite per la Salute), ha redatto, nel 2008, la revisione dello Standard sui prodotti alimentari per persone celiache. Questo documento ha sancito definitivamente che un prodotto alimentare, per poter essere definito “senza glutine” non deve contenere più di 20 mg/Kg (o ppm = parti per milione) di glutine, quantitativo misurabile tramite la metodica ELISA con anticorpo monoclonale r5, metodo Mendez. Tale metodica analitica è stata riconosciuta come metodo di tipo I dal Codex Alimentarius.

La normativa europea ha ribadito questo limite, con il Regolamento CE 41/2009 prima e il Regolamento UE 828/2014 poi. Lo stesso Regolamento CE 41/2009 ha introdotto la categoria di prodotti specificamente formulati per celiaci con contenuto di glutine tra 21 e 100 ppm, che possono riportare in etichetta il claim “con contenuto di glutine molto basso”.

Un alimento può avere un contenuto di glutine molto basso se è basato o contiene uno o più ingredienti “deglutinati” ovvero che derivano da cereali contenenti glutine opportunamente trattati per renderli idonei ai celiaci. Non è possibile utilizzare tale indicazione per informare il consumatore circa la potenziale presenza accidentale di glutine, a causa del pericolo di contaminazione di alimenti non contenenti ingredienti con glutine specificamente deglutenizzati.

Gli alimenti con contenuto di glutine molto basso sono di difficile reperimento in Italia, non vi è indicazione a favorirne il consumo a scapito di quelli senza glutine, trattandosi di prodotti né inediti per tipologia, né più palatabili, né più economici. Non sono di per sé vietati al celiaco, che comunque dovrebbe consumarli in quantità inferiore rispetto ai prodotti equivalenti “senza glutine”.

3.3 SOGLIA DI TOSSICITÀ

La potenziale tossicità delle tracce di glutine non è ancora chiara. In precedenza si è dimostrato nei pazienti con celiachia in DSG che l'ingestione di 100–500 mg di gliadina/die (approssimativamente equivalente a 200–1000 mg di glutine) per 4 settimane è in grado di causare cambiamenti misurabili nell'architettura della mucosa dell'intestino tenue⁴⁴. Sono disponibili solo dati limitati sulla tossicità delle dosi più basse di glutine^{45, 46}. Questo è un problema importante perché l'ingestione giornaliera di glutine contaminante in pazienti con malattia celiaca, apparentemente ben trattati, varia da 5 a 50 mg.

Degno di citazione è lo studio "La tossicità delle tracce di glutine nei celiaci in trattamento: indagine prospettica in doppio cieco, controllata con placebo per stabilire un limite sicuro per il glutine". Lo studio multicentrico prendeva in esame un gruppo di quarantanove pazienti adulti con malattia celiaca in DSG da almeno due anni, sottoponendoli ad accertamenti clinici, sierologici e istologici al tempo zero e dopo il microchallenge con capsule contenenti 0 (gruppo placebo), 10 o 50mg di glutine. Dopo il microchallenge gli Anticorpi anti-transglutaminasi IgA rientravano nel range di normalità e non subivano variazioni rilevanti. Si evidenziava invece un aumento della mediana del rapporto villo/cripta nel gruppo placebo, probabilmente per un'osservazione più rigida della dieta senza glutine, mentre nel gruppo che assumeva una quantità

giornaliera di 50mg di glutine la mediana risultava inferiore al valore di partenza.⁴⁷ A causa della limitata numerosità dello studio non si era in grado di raggiungere conclusioni certe riguardo la potenziale tossicità di 10 mg/die di glutine, che restava quindi un'area "grigia". Tuttavia, il fatto che 10 mg di glutine/die fossero apparsi sicuri per la maggior parte dei soggetti studiati, mentre 50 mg/die inducevano cambiamenti istologici dopo 3 mesi di esposizione, permetteva di concludere che il limite di tossicità giornaliero di glutine assunto fosse compreso tra 10 mg (limite non tossico) e 50 mg.

3.4 METODI DI STUDIO DELLA CONTAMINAZIONE.

Per studiare la contaminazione da glutine si utilizzano principalmente metodiche ELISA (Enzyme-Linked-Immunoabsorbed-Sandwich Assay), basate sulla reazione antigene-anticorpo. Attualmente il gold standard per determinare la concentrazione del glutine all'interno degli alimenti è il saggio immunoenzimatico Ridascreen Gliadin sandwich R5 enzyme-linked immunosorbent assay R-7001 (R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

Questa metodica è certificata dall'Association of Official Analytic Chemists (AOAC) ed approvata dalla Commissione del Codex Alimentarius.⁴⁸ È un test immunologico basato sull'anticorpo monoclonale R5 (mAb) che riconosce potenziali epitopi tossici per il celiaco che si ritrovano nelle gliadine, ordeine e secaline. L'anticorpo riconosce e lega gli epitopi QQPFP (glutamine-glutamine-proline-phenylalanyne-proline) i quali si collocano nella regione N-terminale della molecola di glutine^{49, 50}.

3.5 REVISIONE DELLA LETTERATURA SULLA CONTAMINAZIONE

Ad oggi sono pochi gli studi che cercano di determinare analiticamente l'effettiva quantità di glutine che viene accidentalmente consumata dai pazienti con malattia celiaca in DSG giornaliera.

Due lavori svolti dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Pediatria dell'Università Politecnica delle Marche hanno dimostrato che la contaminazione da glutine nei prodotti senza glutine (naturalmente privi di glutine o etichettati come tali) commercializzati in Italia è oggi giorno rara e generalmente modesta su base quantitativa⁵¹, così come nei cosmetici e nei prodotti di igiene orale⁵². I prodotti contaminati appartengono più

comunemente ad articoli a base di avena, grano saraceno e lenticchie. Inoltre i prodotti senza glutine certificati e ad alto costo erano meno comunemente contaminati da glutine⁵¹.

J. Syage et al. hanno pubblicato una meta-analisi basata sui risultati di studi clinici che misurano la quantità di glutine nelle feci^{53, 54} e nelle urine⁵⁵, sia in popolazioni con CD che in popolazioni controllo sane^{56.57}. Applicando un fattore di conversione hanno calcolato l'ingestione di glutine a partire dalla misurazione dei peptidi immunogenici del glutine (GIPs) nelle feci e nelle urine. Secondo quanto elaborato, l'esposizione media al glutine da parte di individui con malattia celiaca in DSG supera la soglia di tossicità giornaliera⁵⁸.

Essendo i dati della letteratura discordanti tra loro, abbiamo cercato di apportare nuovi contenuti con il nostro studio sulla contaminazione nella DSG giornaliera dei bambini con celiachia.

IV CAPITOLO

STUDIO SPERIMENTALE

4.1 SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del nostro studio è quello di determinare analiticamente la quantità di glutine consumata accidentalmente dai pazienti celiaci pediatrici a DSG attraverso la quantificazione delle micro contaminazioni nei campioni alimentari dei pasti consumati nell'arco di 24 h, comprendendo sia le preparazioni casalinghe che quelle somministrate in ambiente diverso da quello domestico (scuola, ristorante, etc).

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 I pazienti

Lo studio è stato proposto a tutti i pazienti a cui era stata posta diagnosi di malattia celiaca secondo i criteri ESPGHAN raccomandati presso il Centro di Celiachia della Clinica Pediatrica dell'Università Politecnica delle Marche nel periodo compreso tra Ottobre 2018 e Agosto 2019. Sono stati inclusi solo i pazienti a DSG da almeno 5 mesi. Costituivano criteri di esclusione dallo studio: l'età inferiore a dodici mesi e superiore a sedici anni e la presenza di altre patologie concomitanti.

4.2.2 Diario Alimentare

I partecipanti allo studio sono stati invitati a fornire i campioni dei pasti consumati durante un periodo di 24 ore e a compilare il relativo diario alimentare delle 24 ore (Figura 4). A tutti i pazienti veniva raccomandata la raccolta di campioni alimentari provenienti da tutti i pasti principali (colazione, pranzo, spuntini e cena). Venivano esclusi dalla raccolta: acqua, latte, frutta e verdura cruda non condita, che non sarebbero potuti essere stati contaminati dal glutine in alcun modo.

Piccole porzioni di ogni pasto, prelevato dopo la sua preparazione domestica o presso altra ristorazione, venivano raccolte a domicilio e poste in contenitori puliti (contenitore delle urine in caso di alimenti liquidi e sacchettino in plastica a chiusura a pressione in caso di cibi solidi) e venivano conservati alla temperatura di -5°C se consegnati entro le successive 24 ore o a -20°C se consegnati successivamente. I campioni venivano consegnati dalle famiglie al personale del Laboratorio di Malattie Metaboliche della

Clinica Pediatrica dell'Università Politecnica delle Marche e conservati a -80°C fino al momento delle analisi.

Il diario alimentare delle 24 ore comprendeva le seguenti informazioni:

- a) Descrizione dell'alimento, specificando gli eventuali condimenti utilizzati (es. pennette di farina di mais + olio extravergine di oliva + parmigiano);
- b) Quantità precisa dell'alimento (in grammi o millilitri);
- c) Luogo dove viene consumato il pasto (casa, mensa della scuola, a casa dei nonni, ristorante ecc.).

La grammatura aveva lo scopo di valutare quantitativamente l'eventuale assunzione di glutine con il pasto e calcolare se la concentrazione assunta giornalmente superasse la soglia di tossicità, mentre il luogo di preparazione/consumo aiutava a capire se vi fossero ambienti in cui la probabilità di avere una micro-contaminazione da glutine fosse maggiore rispetto ad altri.

4.2.3 Classificazione dei campioni sulla base del contenuto di glutine rilevato

Sono stati considerati "gluten-free" quei prodotti la cui concentrazione di glutine risultava essere inferiore ai 20 ppm (equivalente a 10 mg/Kg di Gliadina), mentre sono stati classificati come "a bassa contaminazione da glutine" quei campioni aventi valori compresi tra 20 e 100 ppm. Se si superavano i 100 ppm, i campioni relativi venivano classificati come "significativamente contaminati".

4.2.4 Quantificazione giornaliera della contaminazione da glutine

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

4.3 RISULTATI

Lo studio è stato proposto a 60 pazienti celiaci. Quattro pazienti sono stati esclusi per la presenza di altre patologie concomitanti. Quattordici hanno rifiutato di partecipare o non hanno riconsegnato gli alimenti dopo aver dato l'adesione al progetto. Sono stati inclusi nello studio 42 bambini celiaci, 24 femmine (57%) e 18 maschi (43%), con età mediana 9 anni (range: 1 – 16 anni), in DSG in mediana da 13 mesi (range: 5 mesi – 9 anni), (Tabella 3).

In base alla durata della DSG, sono stati individuati 3 sottogruppi di partecipanti allo studio:

- 1- in DSG da 5 mesi, 2 pazienti (5%)
- 2- in DSG per un periodo > 5 mesi e ≤ 12 mesi, 18 pazienti (43%)
- 3- in DSG da più di 12 mesi, 22 pazienti (52%)

Per quanto riguarda i marcatori sierologici della celiachia, 16 bambini (38%) avevano anticorpi anti-transglutaminasi IgA positivi: di questi, 2 pazienti facevano terapia con dieta senza glutine da 5 mesi, 12 appartenevano al secondo sottogruppo e 2 al terzo (Tabella 5). I rimanenti 26 bambini (62%) avevano i marcatori sierologici negativi.

Complessivamente sono stati analizzati 285 campioni provenienti dai 42 pazienti arruolati.

Sei pazienti avevano effettuato la raccolta dei campioni di Lunedì, 4 di Martedì, 15 di Mercoledì, 2 di Venerdì, 5 di Sabato e 4 di Domenica. Sei partecipanti allo studio non hanno specificato la data in cui avevano effettuato il campionamento.

Dei campioni analizzati, 60 (21%) erano prodotti animali, 70 (25%) prodotti dolciari, 135 (47%) prodotti farinacei, 20 (7%) prodotti vegetali/legumi (Figura 5).

193 erano stati consumati a casa, 29 a scuola, 6 al ristorante, 44 dai nonni, 9 in comunità. Quattro campioni non riportavano il luogo in cui erano stati consumati.

Nessuno dei campioni analizzati presentava contaminazione. Un solo campione su 285 (0,4%) aveva un contenuto di glutine superiore a 20 ppm con entrambe le metodiche

ELISA, R5 e G12. Pertanto, dei 42 pazienti arruolati, solo un paziente presentava un alimento contaminato (2.4%).

Il livello di glutine nell'alimento contaminato era pari a 74.2 ppm (metodica R5). Il consumo di glutine giornaliero del paziente a cui apparteneva il campione contaminato ammontava a 1,6 mg/die, inferiore alla soglia di tossicità di 10 mg/die.

Il campione risultato positivo alla contaminazione di glutine era un prodotto farinaceo, trattandosi nello specifico di un prodotto confezionato (cracker salati, di cui la marca non veniva specificata nel diario), era stato consumato a casa dei nonni e campionato di Mercoledì. La paziente, a cui apparteneva il campione in questione, al momento della visita di controllo aveva 1 anno e 4 mesi e risultava avere anticorpi anti-transglutaminasi IgA pari a 19 U/ml (con valore normale di riferimento 19 U/ml) ed aveva avviato da 6 mesi la dieta senza glutine ed era clinicamente asintomatica, (Tabella 4).

Cinque campioni presentavano un livello di glutine compreso tra 10 e 20 ppm. Di questi, 4 erano stati consumati a casa e uno dai nonni. Uno di questi campioni era un prodotto di origine animale (polpette di macinato di carne, uova, parmigiano e pan grattato preparate in casa e campionate di Lunedì), uno dolciario (biscotti fatti in casa campionati di Domenica) e tre farinacei (1-pan grattato, 2-pane e prosciutto, 3-pasta di mais con salsa al pomodoro, olio e parmigiano; rispettivamente campionati Sabato, Martedì e Mercoledì). I pazienti a cui appartenevano questi prodotti erano 3 femmine e 2 maschi, di età compresa tra 3 e 12 anni (mediana 6 anni); e avevano ricevuto diagnosi di celiachia in mediana da 13 mesi (range 8-30 mesi). Al controllo due di questi, una femmina e un maschio, avevano sierologia positiva con anticorpi anti-transglutaminasi IgA pari a 25,6 U/ml (6 volte il valore normale) e 9 U/ml (1,28 volte il valore normale), ed erano rispettivamente in DSG da 12 mesi e 8 mesi. I pazienti di questo gruppo erano tutti asintomatici, tranne una paziente che riferiva stipsi al momento dell'arruolamento, comunque migliorata dall' avvio della DSG.

Complessivamente, la dose di glutine assunta giornalmente in tutti i 42 pazienti arruolati era significativamente inferiore alla soglia di tossicità di 10 mg/die (Figura 6).

4.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'unica terapia al momento disponibile per il trattamento della malattia celiaca è rappresentata dalla dieta senza glutine, da effettuare in maniera rigorosa per tutta la vita.

I celiaci devono eliminare dalla loro alimentazione quotidiana cibi contenenti glutine, come pane, cereali, farine e pasta. Gli alimenti privi di glutine possono essere distinti in: a) alimenti naturalmente privi di glutine e b) alimenti dieto-terapeutici, sostitutivi degli analoghi contenenti glutine, ma prodotti con cereali privi di glutine (ad esempio, pasta di riso).

Tra gli alimenti naturalmente privi di glutine troviamo tutti i cibi di origine animale, la frutta, la verdura, i legumi, i semi, i tuberi, alcuni cereali (riso, mais, sorgo) e gli pseudocereali (amaranto, quinoa). Storicamente nella dieta senza glutine i principali cereali sostituti del grano erano il riso e il mais⁶⁰.

In letteratura si trovano dati ancora poco chiari sull'entità del problema della contaminazione da glutine nella dieta senza glutine dei pazienti con malattia celiaca.

Da un lato alcuni studi dimostrano che i livelli di contaminazione da glutine nei prodotti che si trovano nel mercato Italiano, sia naturalmente privi di glutine che sostitutivi, sono molto bassi^{51, 52}.

D'altro canto, ci sono anche studi che suggeriscono che la contaminazione da glutine sia un rischio frequente⁵⁸ e potenzialmente dannoso per il celiaco, andando di fatto a riattivare lo stato infiammatorio a livello dell'intestino tenue, così come dimostrato dallo studio di Catassi et al⁴⁷.

Pertanto, un importante argomento di dibattito è rappresentato dalla contaminazione da glutine nella dieta senza glutine dei pazienti con malattia celiaca.

Per tale motivo, abbiamo disegnato uno studio volto a verificare quantitativamente l'introito giornaliero di glutine nei bambini in DSG tramite l'analisi dei pasti consumati in una giornata.

I risultati iniziali di questo studio mostrano che: a) una bassa percentuale di pazienti pediatrici presenta una contaminazione in corso di DSG; b) la quantità di glutine alla quale i bambini in DSG sono accidentalmente esposti è molto bassa; c) la presenza di

tracce di glutine non arriva comunque a superare la soglia di tollerabilità di 10mg/die di glutine, a dispetto di quanto emerso dalla meta analisi di Syage et al.

Dai risultati preliminari di questo studio è possibile osservare che sono più a rischio di contaminazione i pazienti che sono a DSG da breve tempo, probabilmente perché non hanno ancora messo in atto in maniera accurata tutte le strategie necessarie per evitare la contaminazione; mentre i pazienti a DSG da più tempo sono più esperti nel riconoscere eventuali fonti di contaminazione e nell'evitare errori nella quotidianità.

Inoltre, la gran parte dei pazienti che presentavano contaminazione risultavano ancora essere positivi ai marcatori sierologici della celiachia. Dato che potrebbe essere la conseguenza della stessa contaminazione quotidiana, oppure potrebbe essere legato alla breve durata della DSG di questi pazienti, per cui fisiologicamente non si è ancora raggiunta la negativizzazione sierologica.

Inoltre, alcuni dei bambini che presentavano contaminazione avevano consumato il pasto a casa dei nonni. Questo dato può rappresentare la spia di una maggiore disattenzione da parte di nonni ed è pertanto importante da considerare, in occasione del counseling familiare, per fornire le opportune informazioni sui cosiddetti "errori" da evitare al fine di non incorrere nella contaminazione.

Il nostro studio presenta dei limiti rappresentati dalla numerosità dei partecipanti, dalla raccolta di campioni relativa ad un periodo di sole 24 ore che non è chiaramente rappresentativo della vita di tutti i giorni ed il possibile "effetto Hawthorne", secondo cui il semplice fatto di essere sotto osservazione comporta una modificazione del comportamento di chi è osservato.

In conclusione, il nostro studio dimostra che il rischio di contaminazione giornaliera con tracce di glutine nei pazienti celiaci a DSG in età pediatrica è molto basso. I risultati finora ottenuti costituiscono un segnale positivo di ottima aderenza alla dieta senza glutine e dimostrano che è sufficiente aderire a semplici regole che permettono di prevenire il rischio di contaminazione.

4.4.1 *Il Counseling Dietetico*

Il team multidisciplinare che prende in carico il paziente, è composto anche dalla figura del Dietista, un professionista esperto in malattia celiaca, che ha il compito di valutare: lo stato nutrizionale del bambino; le abitudini alimentari; la preferenza tra i cibi naturalmente privi di glutine e gli alimenti industriali gluten free; lo svolgimento di attività fisica e l'inserimento del soggetto celiaco in ambito familiare, scolastico e sociale con l'obiettivo di garantire la migliore compliance alla dieta, con lo scopo di far acquisire tutte le competenze necessarie per gestire in maniera autonoma le diverse situazioni (pasti nei servizi di ristorazione, alla mensa scolastica, ai compleanni) e riconoscere i potenziali momenti a rischio di contaminazione.

Gli strumenti utilizzati dal dietista sono il confronto delle etichette nutrizionali dei vari prodotti dell'industria, la formazione sulla gestione e conservazione degli alimenti negli spazi domestici, la presentazione dell'Associazione Italiana Celiachia (AIC), ed infine la verifica dell'acquisizione pratica delle competenze.

Facendo riferimento alla definizione di AIC di "Contaminazioni Ambientali", cioè possibili laddove si verificano comportamenti errati nella conservazione degli alimenti e nella preparazione dei pasti, risulta essere fondamentale riorganizzare la propria quotidianità a partire dalla cucina e dalla tavola stessa, specialmente se si condividono gli ambienti con persone che non sono intolleranti al glutine.

Le strategie d'intervento si basano su consigli pratici che devono essere rispettati da tutti i componenti della famiglia e che devono sempre essere osservati, per garantire una rigorosa aderenza alla dieta senza glutine.

Ad esempio:

- 1) Riporre le confezioni aperte in modo che non si possano contaminare con prodotti contenenti glutine. Si consiglia infatti di riporre gli alimenti senza glutine in contenitori ermetici, nei ripiani più alti della dispensa, lontano da quelli contenenti glutine, oppure dedicare uno singolo scaffale alla sola conservazione degli alimenti senza glutine;
- 2) Lavarsi sempre le mani con sapone prima di cucinare e comunque ogni volta che si siano sporcate con alimenti con glutine;
- 3) Preparare le pietanze su superfici pulite;

- 4) Utilizzare per ogni preparazione pentole, stoviglie e posate pulite. Sia il lavaggio in lavastoviglie che a mano consentono l'eliminazione dei residui di glutine. Tutte le stoviglie, le posate e gli utensili che vengono a contatto con gli alimenti, di qualsiasi materiale siano costituiti, compreso il legno, sono idonei, purché lavati con cura con acqua e detersivo. Per gli utensili forati (es. schiumarola, colapasta) è consigliabile una maggiore attenzione, ma anche in questo caso un accurato e attento lavaggio, a mano o in lavastoviglie, permette una buona pulizia;
- 5) Non utilizzare per la cottura di pietanze senza glutine acqua che sia stata precedentemente utilizzata per cuocere alimenti con glutine;
- 6) Non friggere in olio precedentemente utilizzato per la frittura di alimenti con glutine;
- 7) Utilizzare carta da forno o fogli di alluminio su superfici (ad esempio la piastra o la griglia del forno) che potrebbero essere contaminate;
- 8) Non occorre avere spugne dedicate in quanto è sufficiente il loro risciacquo in acqua corrente e detersivo per allontanare eventuali residui alimentari;
- 9) È possibile utilizzare lo stesso forno per la cottura contemporanea di alimenti con e senza glutine, prestando attenzione nel maneggiare le teglie, per evitare di far ricadere residui con glutine negli alimenti senza glutine. Un accorgimento utile e molto semplice può essere quello di far cuocere gli alimenti senza glutine nei ripiani più alti del forno, ricoprendoli con un foglio di alluminio, e quelli con glutine su quelli più bassi;
- 10) È possibile scegliere di preparare i pasti con tempistiche diverse, utilizzare le superficie, le pentole e le stoviglie pulite per preparare i pasti senza glutine e solo successivamente procedere con la preparazione degli altri pasti.

L'importanza del counseling familiare, si evidenzia anche per quanto riguarda il consumo di pasti fuori casa. Nonostante sia importante promuovere la convivialità, è necessario adottare delle strategie anche in questo caso. Ad esempio contattare il servizio di ristorazione con anticipo, informando il personale della propria esigenza di mangiare senza glutine; farsi sempre riconoscere dal cameriere prima di ordinare in modo da evitare possibili scambi di piatti ed eventuali contaminazioni; chiedere sempre gli ingredienti delle pietanze che si intendono consumare e in caso di dubbio, evitare di consumare il piatto stesso.

Sempre a sostegno del soggetto celiaco, l'Associazione Italiana celiachia, ha dato vita al progetto Alimentazione Fuori casa (AFC): si tratta di un network comprendente più di 4000 locali di ristorazione informati sulla celiachia e in grado di offrire un servizio idoneo alle esigenze alimentari dei celiaci, in seguito al completamento di un percorso formativo specifico.

Presso il nostro Centro di riferimento per la diagnosi e il follow-up della malattia celiaca è attualmente disponibile un esperto dietista che mette in atto tutte le strategie mirate alla prevenzione della contaminazione.

I risultati ottenuti nel nostro studio confermano l'importanza e l'utilità delle strategie messe in atto dal nostro team ai fini di una corretta aderenza alla dieta senza glutine.

V

ICONOGRAFIA

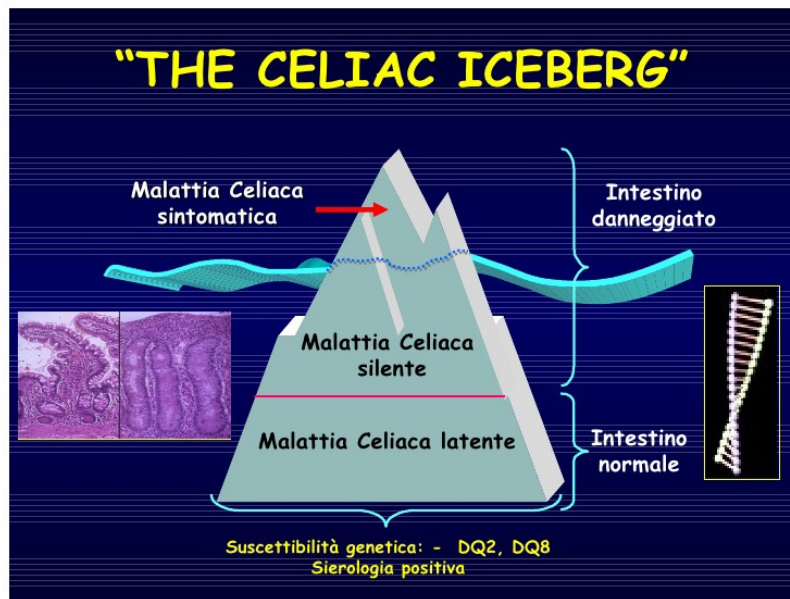


Figura 1: Modello dell'iceberg celiaco: la punta è formata da pazienti con sintomi (classici o non) e danno intestinale, subito sotto la superficie ci sono i soggetti senza sintomi o con sintomi lievi e danno intestinale (celiachia silente) e alla base ci sono i soggetti senza sintomi, senza danno intestinale, senza sierologia tipica ma geneticamente predisposti (celiachia latente).

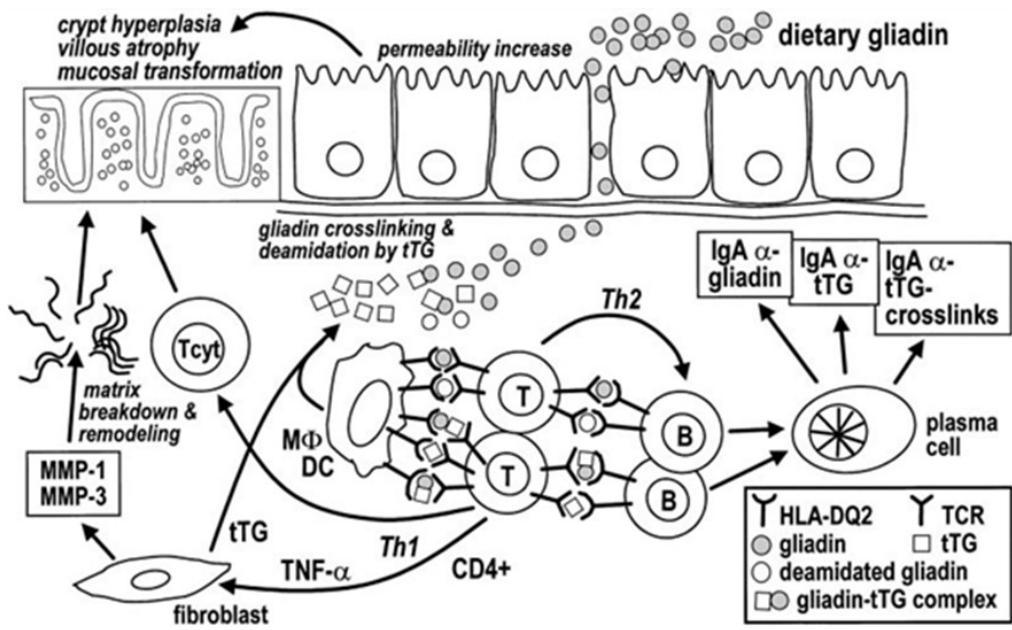


Figura 2: Schema semplificato della risposta immunitaria al glutine nella malattia celiaca.

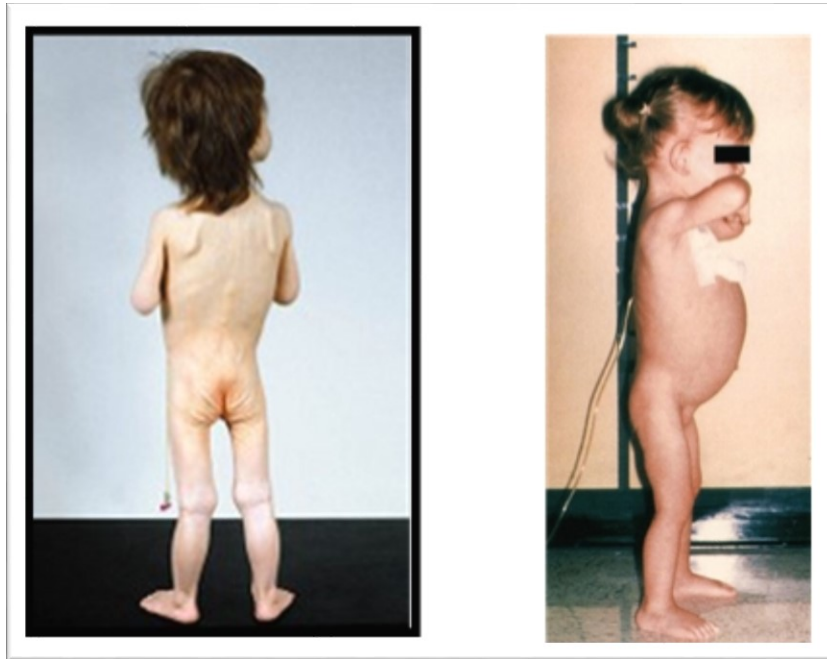


Figura 3: Quadri caratteristici di malattia celiaca maggiore con ipotrofia della radice degli arti (a) ed addome globoso (b).

Esempio compilazione diario alimentare

<i>Codice</i>	<i>Alimento</i>	<i>Quantità (g o ml)</i>	<i>Dove ha mangiato</i>
COLAZIONE			
01	Biscotti	40	casa
SPUNTINO			
02	Pane e prosciutto cotto	120	scuola
PRANZO			
03	Pasta + salsa al pomodoro + olio extravergine di oliva + parmigiano	90	casa della nonna
MERENDA			
04	Yogurt	125	casa
CENA			
05	Fettina di vitello + olio extravergine di oliva	80	casa
06	Patate + olio extravergine di oliva	100 g 5 mL	casa

Figura 4: *Diario alimentare delle 24 ore.*

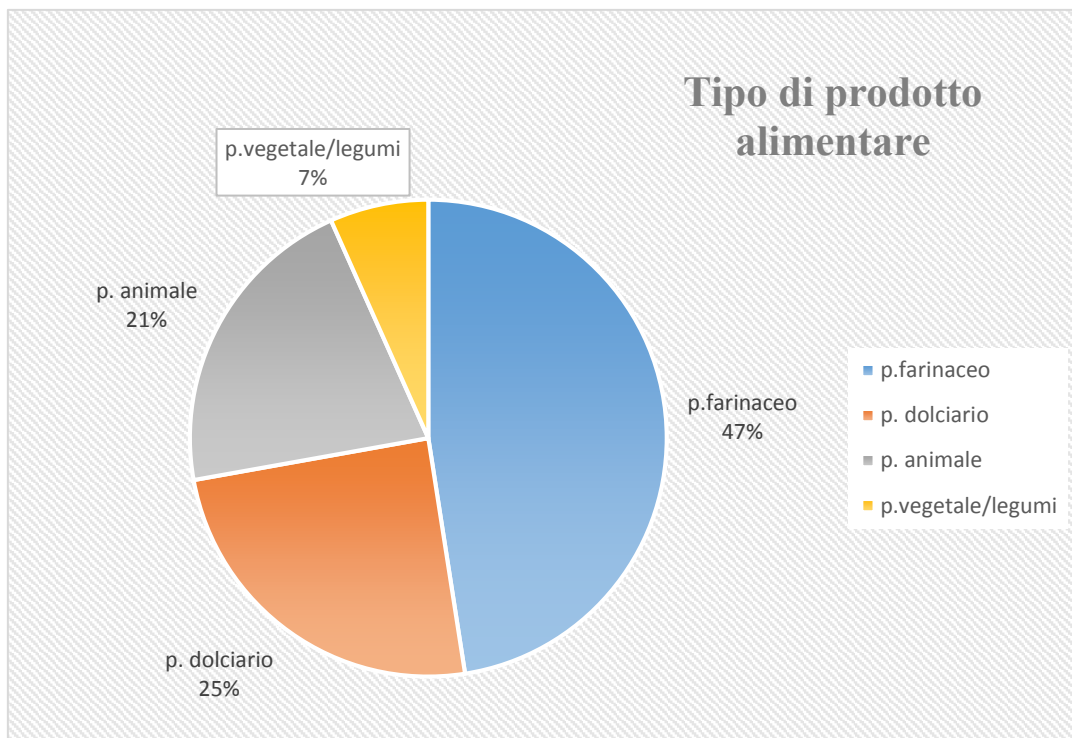


Figura 5: *Tipologie dei 285 prodotti alimentari raccolti.*

<i>Celiachia Tipica</i>	<i>Celiachia Atipica</i>	<i>Celiachia Silente</i>	<i>Celiachia Potenziale</i>
Diarrea cronica	Anemia (da perdita ferro, vit. B12, ac. Folico)	No sintomi	No sintomi
Distensione addominale	Bassa statura	Presenza di danni tipici alla mucosa intestinale	No danni mucosa
Arresto di crescita o perdita di peso	Ritardo puberale	Sierologia presente	Sierologia presente
Anoressia	Osteopenia/osteoporosi	Genetica compatibile	Genetica compatibile
Perdita massa muscolare	Dermatite erpetiforme		
Irritabilità	Ipoplasia smalto dentario		
	Stomatiti aftose ricorrenti		<i>Celiachia Latente</i>
	Dolore addominale ricorrente		No sintomi
	Gonfiore		No danni mucosa
	Vomito		No sierologia
	Costipazione		Genetica compatibile
	Epatite		
	Sintomi neurologici (irritabilità, depressione, autismo, mal di testa, polineuropatia, atassia cerebellare, epilessia)		
	Artriti		

Tabella 1: Manifestazioni cliniche della celiachia.

Tipo 1	Aumento dei linfociti intraepiteliali (<25/100 cellule epiteliali)
Tipo 2	Iperplasia delle cripte
Tipo 3a	Atrofia lieve dei villi
Tipo 3b	Atrofia parziale dei villi
Tipo 3c	Atrofia subtotale dei villi

Tabella 2: *Classificazione istologica delle lesioni intestinali nella celiachia secondo Marsh modificata da Oberhuber.*

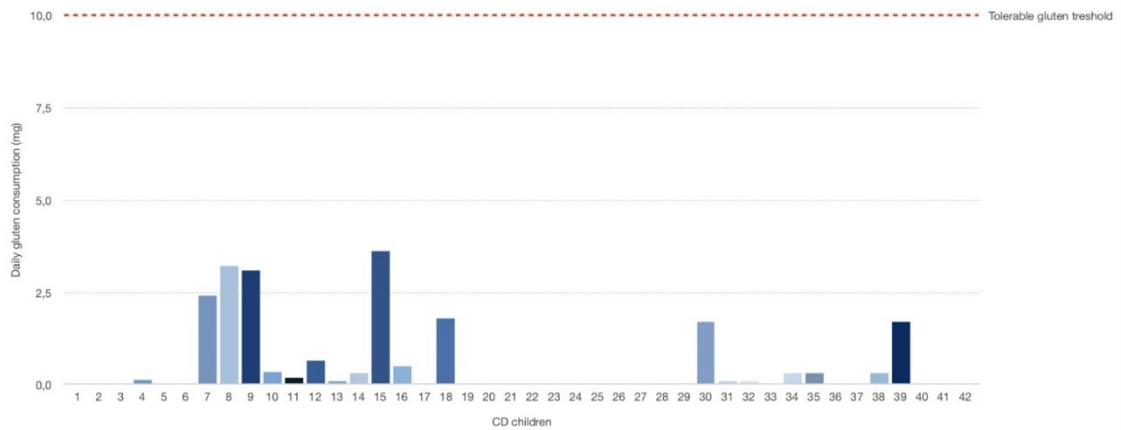


Figura 6: Consumo di glutine giornaliero nei 42 bambini in dieta senza glutine.

VARIABILE	PAZIENTI CELIACI <i>n.=42</i>
Età Mediana (range)	9 anni (1-16)
Sesso F (%)	24 (57 %)
Durata DSG Mediana (range)	13 mesi (5 mesi - 9 anni)
Sintomi alla diagnosi	
<i>Tipici</i> n. (%)	19 (45 %)
<i>Atipici</i> n. (%)	16 (38 %)
<i>Silenti</i> n. (%)	7 (17 %)
Sintomi all' arruolamento	
Si n. (%)	3 (7 %)
No n. (%)	39 (93 %)
tTG IgA all' arruolamento	
<i>Positivi</i> n. (%)	16 (38 %)
<i>Negativi</i> n. (%)	26 (62%)

Tabella 3: Caratteristiche basali dei pazienti arruolati.

VARIABILE	GLUTINE <10 ppm n. pazienti=36	GLUTINE 10-20 ppm n. pazienti=5	GLUTINE >20 ppm n. pazienti=1
Età Mediana (range)	9 anni (2-16)	6 anni (3-12)	1 anno
Sesso F (%)	20 (56 %)	3 (60 %)	1 (100 %)
Durata DSG Mediana (range)	15,5 mesi (5-111)	13 mesi (8-30)	6 mesi
Sintomi alla diagnosi			
<i>Tipici</i> n. (%)	15 (42 %)	3 (60 %)	1 (100 %)
<i>Atipici</i> n. (%)	14 (39 %)	2 (40 %)	0
<i>Silenti</i> n. (%)	7 (19 %)	0	0
Sintomi all'arruolamento			
<i>Sì</i> n. (%)	2 (6 %)	1 (20 %)	0
<i>No</i> n. (%)	34 (94 %)	4 (80 %)	1 (100 %)
tTG IgA all'arruolamento			
<i>Positivi</i> n. (%)	14 (39 %)	2 (40 %)	0
<i>Negativi</i> n. (%)	22 (61 %)	3 (60 %)	1 (100 %)

Tabella 4: Confronto delle caratteristiche demografiche, cliniche e sierologiche dei pazienti che presentavano contaminazione a quelli che non la presentavano.

	Pz in DSG da 5mesi	Pz in DSG tra 5 - 12 mesi	Pz in DSG > 12 mesi	Tot.
Pz con tTG IgA Negative	-	6	20	26 (62%)
Pz con tTG IgA Positive	2	12	2	16 (38%)
Tot.	2 (5%)	18 (43%)	22 (52%)	42

Tabella 1: Dati clinici.

VI

BIBLIOGRAFIA

1. Fasano, A. & Catassi, C. Celiac Disease. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2419–2426 (2012).
2. Fasano, A. & Catassi, C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* **120**, 636–651 (2001).
3. Mustalahti, K. *et al.* The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Ann. Med.* **42**, 587–595 (2010).
4. Catassi, C. The world map of celiac disease. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* **35**, 37–55 (2005).
5. Fasano, A. & Catassi, C. Coeliac disease in children. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **19**, 467–478 (2005).
6. Sollid, L. M. & Lie, B. A. Celiac disease genetics: Current concepts and practical applications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 843–851 (2005).
7. Trynka, G. *et al.* Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat. Genet.* **43**, 1193–1201 (2011).
8. Zanoni, G. *et al.* In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med.* **3**, 1637–1653 (2006).
9. Schuppan, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* **119**, 234–242 (2000).
10. Halfdanarson, T. R., Litzow, M. R. & Murray, J. A. Hematologic manifestations of celiac disease Review article Hematologic manifestations of celiac disease. *Russell J. Bertrand Russell Arch.* 412–421 (2008). doi:10.1182/blood-2006-07-031104
11. Nicolas, M. E. O., Krause, P. K., Gibson, L. E. & Murray, J. A. Dermatitis herpetiformis. *Int. J. Dermatol.* **42**, 588–600 (2003).
12. Lionetti, E. *et al.* The neurology of coeliac disease in childhood: What is the evidence? A systematic review and meta-analysis. *Developmental Medicine and Child Neurology* **52**, 700–707 (2010).

13. Sabatino, A. Di & Corazza, G. R. Coeliac disease. TL - 373. *Lancet* **373** VN-, 1480–1493 (2009).
14. Ventura, A., Magazzu, G. & Greco, L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* **117**, 297–303 (1999).
15. Holmes, G. K. T., Prior, P., Lane, M. R., Pope, D. & Allan, R. N. Malignancy in coeliac disease - Effect of a gluten free diet. *Gut* **30**, 333–338 (1989).
16. Husby, S. *et al.* European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **54**, 136–160 (2012).
17. Pietzak, M. M. Follow-up of patients with celiac disease: Achieving compliance with treatment. *Gastroenterology* **128**, (2005).
18. Cataldo, F. *et al.* IgG1 antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. *Gut* **47**, 366–369 (2000).
19. Carroccio, A. *et al.* Comparison of Anti-Transglutaminase ELISAs and an Anti-Endomysial Antibody Assay in the Diagnosis of Celiac Disease: A Prospective Study. *Clin. Chem.* **48**, (2002).
20. Burgin-Wolff, A. *et al.* Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch. Dis. Child.* **66**, 941–947 (1991).
21. Oberhuber, G., Granditsch, G. & Vogelsang, H. The histopathology of coeliac disease: Time for a standardized report scheme for pathologists. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **11**, 1185–1194 (1999).
22. Lionetti, E. & Catassi, C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 219–231 (2011).
23. Lee, A. & Newman, J. M. Celiac diet: Its impact on quality of life. *J. Am. Diet. Assoc.* **103**, 1533–1535 (2003).
24. García-Manzanares, Á. & Lucendo, A. J. Nutritional and dietary aspects of celiac

- disease. *Nutrition in Clinical Practice* **26**, 163–173 (2011).
25. Veeraraghavan, G., Leffler, D. A., Kaswala, D. H. & Mukherjee, R. Celiac disease 2015 update: New therapies. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* **9**, 913–927 (2015).
 26. Schuppan, D., Junker, Y. & Barisani, D. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology* **137**, 1912–1933 (2009).
 27. Stepniak, D. & Koning, F. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum. Immunol.* **67**, 460–8 (2006).
 28. Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A. & Corazza, G. R. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* **140**, 408–16 (2005).
 29. Wieser, H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr. Suppl.* **412**, 3–9 (1996).
 30. Mowat, A. M. Coeliac disease--a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet (London, England)* **361**, 1290–2 (2003).
 31. Matysiak-Budnik, T. *et al.* Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* **125**, 696–707 (2003).
 32. Maiuri, L. *et al.* Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* **362**, 30–37 (2003).
 33. Mamone, G. *et al.* Identification of a peptide from α -gliadin resistant to digestive enzymes: Implications for celiac disease. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **855**, 236–241 (2007).
 34. Clemente, M. G. *et al.* Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* **52**, 218–223 (2003).
 35. Elli, L., Dolfini, E. & Bardella, M. T. Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. *Toxicology Letters* **146**, 1–8 (2003).
 36. Fasano, A. Intestinal zonulin: Open sesame! *Gut* **49**, 159–162 (2001).
 37. Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M. & Khosla, C. Intestinal digestive

- resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **283**, G996–G1003 (2002).
38. Garsed, K. & Scott, B. B. Can oats be taken in a gluten-free diet? A systematic review. *Scand. J. Gastroenterol.* **42**, 171–178 (2007).
 39. Fuchs, V. *et al.* Factors associated with long diagnostic delay in celiac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **49**, 1304–1310 (2014).
 40. Ukkola, A. *et al.* Patients' experiences and perceptions of living with coeliac disease - implications for optimizing care. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **21**, 17–22 (2012).
 41. Rubio-Tapia, A., Hill, I. D., Kelly, C. P., Calderwood, A. H. & Murray, J. A. ACG clinical guidelines: Diagnosis and management of celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* **108**, 656–676 (2013).
 42. Lionetti, E. Le contaminazioni nella dieta senza glutine. 72–75 (2017).
 43. Reg. CE 178/2002 Parlam. e Cons. 28.1.02. Available at: http://www.celiachia.it/public/bo/upload/dieta/immagini/documenti/Regolamento_CE_178-2002.pdf. (Accessed: 8th October 2019)
 44. Catassi, C. *et al.* Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: A clinical and jejunal morphometric study. *Gut* **34**, 1515–1519 (1993).
 45. Ciclitira, P. J., Ellis, H. J. & Fagg, N. L. Evaluation of a gluten free product containing wheat gliadin in patients with coeliac disease. *BMJ* **289**, 83–83 (1984).
 46. K. Kaukinen, P. Collin, K. Holm, I. Wheat Starch-Containing Gluten-Free Flour Products in the Treatment of Coeliac Disease and Dermatitis Herpetiformis: A Long-Term Follow-up Study. *Scand. J. Gastroenterol.* **34**, 163–169 (1999).
 47. Catassi, C. *et al.* A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 160–166 (2007).
 48. Codex Stan, A. Codex standard for foods for special dietary use for persons

- intolerant to gluten. *Codex Aliment. Codex Stan 118-1979*. Amendment: 1983 and 2015. Rev (2015). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
49. Valdés, I., García, E., Llorente, M. & Méndez, E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 465–747 (2003).
 50. Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, et al. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-to... : *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. Available at: https://journals.lww.com/eurojgh/Abstract/2001/10000/A_monoclonal_antibody_that_recognizes_a_potential.11.aspx. (Accessed: 25th September 2019)
 51. Verma, A. K. *et al.* Gluten contamination in naturally or labeled gluten-free products marketed in Italy. *Nutrients* **9**, (2017).
 52. Verma, A. K. *et al.* Contribution of Oral Hygiene and Cosmetics on Contamination of Gluten-free Diet: Do Celiac Customers Need to Worry About? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **68**, 26–29 (2019).
 53. Comino, I. *et al.* Fecal Gluten Peptides Reveal Limitations of Serological Tests and Food Questionnaires for Monitoring Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *Am. J. Gastroenterol.* **111**, 1456–1465 (2016).
 54. Comino, I. *et al.* Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 670–677 (2012).
 55. Moreno, M. D. L. *et al.* Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut* **66**, 250–257 (2017).
 56. Lähdeaho, M. L. *et al.* Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology* **146**, 1649–1658 (2014).
 57. Murray, J. A. *et al.* No Difference Between Latiglutenase and Placebo in Reducing Villous Atrophy or Improving Symptoms in Patients With Symptomatic

- Celiac Disease. *Gastroenterology* **152**, 787-798.e2 (2017).
58. Syage, J. A. *et al.* Determination of gluten consumption in celiac disease patients on a gluten-free diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **107**, 201–207 (2018).
 59. Morón, B. *et al.* Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: Characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One* **3**, (2008).
 60. Barera, G. *et al.* Body composition in children with celiac disease and the effects of a gluten-free diet: a prospective case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 71–75 (2000).
 61. Celiac disease. Available at <https://www.slideshare.net/gastrocure/celiac-disease-17653941>.
 62. Associazione Italiana Celiachia. Available at: www.celiachia.it