



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Efficacia del Pentabiocel nel recupero clinico e laboratoristico
del bambino celiaco dopo l'avvio del trattamento con dieta
priva di glutine: studio prospettico, multicentrico,
randomizzato in doppio cieco controllato con placebo.**

Relatore: Chiar.mo
Prof. Carlo Catassi

Tesi di Laurea di
Elisa Cimadamore

Correlatore: Chiar.ma
Prof.ssa Maria Elena Lionetti

A.A. 2019/2020

Sommario

1. INTRODUZIONE	5
2. LA CELIACHIA	7
2.1 Epidemiologia.....	7
2.2 Eziopatogenesi.....	9
2.2.1 Predisposizione genetica	9
2.2.2 Ruolo dell'ambiente.....	10
2.2.3 Patogenesi	13
2.3 Clinica.....	16
2.4 Diagnosi.....	22
2.4.1 Test sierologici.....	22
2.4.2 Test genetico	24
2.4.3 Biopsia intestinale	25
2.4.4 Algoritmo diagnostico.....	27
2.5 Trattamento.....	30
2.6 Complicanze	33
2.7 Follow up della celiachia in età pediatrica	36
3. MICROBIOTA E MALATTIA CELIACA	40
3.1 Microbiota	40
3.2 Microbiota del paziente celiaco.....	42
3.3 Fattori che influenzano il microbiota intestinale del paziente celiaco	45
3.3.1 Disbiosi e suscettibilità genetica	45

3.3.2	Disbiosi e fattori ambientali.....	46
3.4	Ruolo del microbiota nella patogenesi della malattia celiaca	48
3.4.1	Effetti del microbiota sulla digestione del glutine	50
3.4.2	Effetti del microbiota sulla barriera intestinale.....	50
3.4.3	Effetti del microbiota sull'immunità.....	51
3.5	Disbiosi e manifestazioni cliniche della celiachia	57
3.6	Probiotici: un'opportunità di trattamento	59
3.6.1	Efficacia dei probiotici nella celiachia: studi clinici.....	62
4.	EFFICACIA DEL PENTABIOCEL NEL RECUPERO CLINICO E LABORATORISTICO DEL BAMBINO CELIACO DOPO L'AVVIO DEL TRATTAMENTO CON DIETA PRIVA DI GLUTINE	66
4.1	Obiettivi dello studio	66
4.2	Materiali e metodi.....	66
4.2.1	Disegno di studio e intervento	67
4.2.2	Metodi di valutazione.....	68
4.2.3	Misure di outcome	69
4.2.4	Analisi statistiche	70
4.3	Risultati.....	70
4.3.1	Effetti del trattamento: outcome primario.....	73
4.3.2	Effetti del trattamento: outcome secondari	78
4.4	Discussione.....	82
4.5	Conclusioni	87
	ALLEGATI	89

Allegato 1: Questionario di valutazione dell'aderenza alla dieta senza glutine	89
Allegato 2: Questionario di valutazione dei sintomi.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	95

1. INTRODUZIONE

La malattia celiaca è una patologia multisistemica autoimmune indotta dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti.

La predisposizione genetica e l'ingestione di glutine sono condizioni necessarie allo sviluppo della patologia. Altri fattori ambientali, ancora poco noti, sembrano giocare un ruolo nel modulare il rischio di sviluppare la celiachia, quali la nutrizione infantile, le infezioni, le modalità del parto e le caratteristiche del microbioma intestinale, specie nelle prime epoche della vita. Studi prospettici in lattanti sani a rischio di sviluppare celiachia hanno messo in evidenza che il genotipo HLA, assieme ad altri fattori ambientali, influenza la composizione del microbiota intestinale di questi bambini. Numerosi studi confermano la presenza di alterazioni qualitative e quantitative del microbiota intestinale dei pazienti celiaci che non si normalizzano del tutto dopo l'avvio del trattamento con dieta aglutinata. È stato pertanto suggerito che il microbiota intestinale possa avere un ruolo nella patogenesi, nella progressione e nella manifestazione clinica della patologia.

Queste ipotesi hanno indotto un crescente interesse nello studio dei possibili effetti benefici dei probiotici nella malattia celiaca. In particolare, è stato evidenziato che una miscela di ceppi probiotici, appartenenti alle specie *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium animalis* sottospecie *lactis*, è in grado di migliorare in maniera marcata la sintomatologia gastrointestinale tipo colon irritabile di pazienti celiaci in trattamento dietetico.¹ Pentabioceel è il nome commerciale del prodotto contenente la miscela di probiotici su menzionata: *Lactobacillus paracasei* LMG P-17504, *Lactobacillus plantarum* CECT 4528, *Bifidobacterium breve* Bbr8 LMG P-17501, *Bifidobacterium breve* BL10 LMG P-17500 e *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bi1 LMG P-17502.

Inserendosi in questo scenario, la tesi espone uno studio che ha come obiettivo primario quello di valutare se la somministrazione continuativa di Pentabioceel per 3 mesi, grazie ai suoi molteplici effetti favorevoli a livello della barriera intestinale, sia in grado di accelerare

i tempi di recupero clinico e laboratoristico del bambino affetto da celiachia dopo l'avvio della dieta senza glutine.

2. LA CELIACHIA

La malattia celiaca è una patologia sistemica di tipo autoimmunitario, primariamente localizzata nell'intestino tenue, scatenata dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti. È caratterizzata da un'ampia variabilità di presentazioni cliniche, da una specifica risposta anticorpale e dal danno alla mucosa del piccolo intestino.

2.1 Epidemiologia

La malattia celiaca è una delle più frequenti patologie umane permanenti. L'elevata diffusione della celiachia è in primo luogo da riferire alla diffusione ubiquitaria dei suoi fattori causali primari, cioè la predisposizione genetica (HLA-DQ2 e/o DQ8) e il consumo alimentare di prodotti a base di farina di frumento.

In passato la celiachia era considerata una malattia rara, tipica dell'età pediatrica e delle popolazioni occidentali, ma le diagnosi includevano solo i casi tipici di malattia ad esordio precoce. La reale frequenza di questa patologia si stima essere di gran lunga superiore rispetto ai casi clinicamente "visibili", cioè diagnosticati sulla base di sintomi clinici riferiti dal paziente. Per questo, nel descrivere l'epidemiologia della celiachia si fa spesso riferimento al concetto di iceberg, che ben raffigura un fenomeno le cui dimensioni sono molto maggiori di quelle apparenti (Figura 2.1). L'ampia disponibilità di test sierologici altamente affidabili, a partire dagli anni '80 del secolo scorso, ha consentito di effettuare indagini di screening sulla popolazione che hanno dimostrato come per ogni caso diagnosticato di celiachia ve ne siano almeno altri 3-5 che sfuggono alla diagnosi, generalmente per l'assenza di manifestazioni cliniche caratteristiche.²

Figura 2.1. Iceberg celiaco.

(Immagine da “L’iceberg celiachia: sintomi e patologie associate”, celiachiaitalia.com)



La malattia celiaca colpisce attualmente lo 0.6-1.0% della popolazione mondiale con ampie variazioni tra i paesi europei (dallo 0.3% in Germania al 2.4% in Finlandia) per ragioni non ancora chiarite.^{3,4} La celiachia è comune anche in altri continenti, in particolare, in Nord Africa⁵, in Medio Oriente⁶ e in India. In quest'ultimo paese, la patologia ha una distribuzione peculiare: risulta più comune nelle regioni nord-occidentali, dove il grano rappresenta un alimento base della dieta, mentre la frequenza è minore nelle aree dove si consuma prevalentemente riso.⁷ La più alta prevalenza della malattia (5,6%) è stata descritta nella popolazione Saharawi⁸, mentre è quasi assente in alcuni paesi dell'Est Asiatico, quali il Vietnam e il Giappone.

I dati epidemiologici più recenti dimostrano un aumento della frequenza di celiachia nel corso degli ultimi decenni, soprattutto nei Paesi occidentali. In Italia, la prevalenza della malattia in età pediatrica è pressoché raddoppiata nell'arco di meno di 30 anni. In parte, l'aumento dei casi osservati dipende dalla migliore performance dei test attualmente disponibili e dalla diffusa attenzione diagnostica verso la malattia, ma potrebbe essere

correlato anche a una serie di cambiamenti ambientali rilevanti, quali la varietà dei cereali utilizzati nell'alimentazione umana, la quantità di glutine assunto, la modalità di lievitazione dell'impasto panificatorio e altri fattori ancora sconosciuti.

Come altre patologie su base autoimmune, la celiachia presenta una maggiore prevalenza nel genere femminile rispetto a quello maschile (1.5-2:1). Questo dato epidemiologico suggerisce la necessità di una maggiore attenzione diagnostica nelle donne in considerazione delle potenziali ricadute sulla salute femminile di una malattia celiaca non diagnostica (es. infertilità, poliabortività, osteoporosi).

La prevalenza risulta aumentata anche nei parenti di primo grado di una persona celiaca (10-15%), nei soggetti affetti da diabete di tipo 1 (3-16%), sindrome di Down (5%), tiroidite di Hashimoto (5%) o colpiti da altre malattie autoimmuni (epatite autoimmune, sindrome di Sjogren), nei soggetti affetti da sindrome di Turner (3%) o con deficit di IgA (9%).⁹⁻¹⁴

2.2 Eziopatogenesi

La celiachia è una malattia complessa alla cui eziopatogenesi contribuiscono fattori genetici, immunologici e ambientali. Sono condizioni necessarie allo sviluppo della celiachia la presenza dei geni predisponenti e l'ingestione di glutine. Altri fattori ambientali sembrano giocare un ruolo nel modulare il rischio di sviluppare celiachia, quali il microbioma intestinale, specie nelle prime epoche della vita, la nutrizione infantile, le infezioni e la modalità del parto.

2.2.1 Predisposizione genetica

La malattia celiaca ha una forte componente ereditaria come testimoniato dall'alta ricorrenza familiare (10-15%) e dall'elevata concordanza della malattia tra gemelli omozigoti (75-80%).¹⁵ Numerosi geni sono coinvolti nella predisposizione genetica della

malattia celiaca, tuttavia il sistema HLA gioca un ruolo primario, in particolare i genotipi DQ2 e DQ8. Essi codificano per gli eterodimeri che compongono i recettori esposti dalle cellule presentanti l'antigene (APC) in grado di legare i peptidi del glutine e attivare una risposta immunitaria T cellulare alla base dello sviluppo delle lesioni mucosali tipiche della celiachia. Il genotipo DQ2, il più frequente, identifica il gene DQB1*02 generalmente associato, in posizione cis o trans, al gene DQA1*05, mentre il DQ8 è formato dai geni DQA1*0301 e DQB1*0302. I soggetti portatori del HLA-DQ2 in omozigosi presentano un alto rischio (25-30%) di sviluppare la malattia.

La presenza degli alleli DQ2 e/o DQ8 è una condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo della malattia celiaca dal momento che circa il 25-35% della popolazione generale è portatore dell'aplotipo DQ2, ma di questi solo il 3% sviluppa la malattia.¹⁶ Il *genome-wide association studies* (GWAS) ha identificato almeno altri 100 geni non-HLA associati al rischio di sviluppare la celiachia, che però giocano un ruolo minore nella predisposizione alla malattia.¹⁷

2.2.2 Ruolo dell'ambiente

Nella eziopatogenesi della malattia celiaca è fondamentale il contributo dei fattori esterni o ambientali, primo fra tutti l'ingestione di glutine.

Il glutine è un aggregato proteico eterogeneo contenuto in cereali ampiamente utilizzati nell'alimentazione umana, quali il frumento, l'orzo e la segale. Costituisce la frazione proteica principale del frumento (circa 80%) e la proteina maggiormente rappresentata nella dieta della popolazione europea (10-20 g/die). Il glutine è, di fatto, privo di potere nutritivo rilevante, ma conferisce particolare qualità alla farina di frumento, essendo dotato di un potere addensante o "collante" che facilita il processo di panificazione. Le caratteristiche viscoso-elastiche del glutine sono da attribuire al complesso network formato da due gruppi di proteine, le gliadine (α , γ e ω) e le glutenine, le cui caratteristiche sono il notevole contenuto di residui di prolina e glutamina e la scarsa digeribilità, a causa della ridotta

espressione di prolil-endopeptidasi nell'intestino umano. Tra i peptidi derivanti dalla digestione del glutine, alcuni contengono epitopi più immunogenici di altri. In particolare, il peptide immunodominante 33-mer, che consta di 33 aminoacidi della frazione α -gliadina, è il frammento più immunogenico, dotato di sei epitopi DQ2-ristretti, in grado di attivare la "cascata" fisiopatologica della celiachia poiché contenenti numerosi residui di prolina e glutammina. Infatti, la prolina conferisce sia la resistenza alla proteolisi sia la conformazione elicale in grado di rafforzare l'affinità di legame con le molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8 espresse dalle cellule presentanti l'antigene; d'altra parte, la glutammina fa da substrato per la deaminazione sostenuta dalla transglutaminasi tissutale aumentando così l'immunogenicità del glutine stesso.

Sebbene l'attività tossica del glutine sia stata inizialmente attribuita alla frazione α della gliadina, anche le γ , le ω gliadine e le glutenine sono in grado di indurre danno della mucosa intestinale, così come le prolamine di cereali affini, come le ordeine (nell'orzo) e le secaline (nella segale).

Nonostante il ruolo del glutine come trigger della malattia celiaca in soggetti geneticamente predisposti sia noto, sono in studio da tempo altri fattori ambientali che, in misura minore, potrebbero contribuire alla patogenesi della malattia celiaca, giustificando in tal modo il rapido aumento della sua prevalenza nei paesi occidentali negli ultimi decenni.¹⁸

E' stato ipotizzato che le infezioni intestinali, la quantità e qualità del glutine ingerito, la composizione del microbiota intestinale e le caratteristiche della nutrizione del primo anno di vita possano essere possibili fattori scatenanti la perdita di tolleranza immunologica nei confronti del glutine.³

I recenti studi clinici, epidemiologici e su modelli animali suggeriscono che l'esposizione a microrganismi commensali, non patogeni, nei primi mesi di vita siano associati a una protezione nei confronti della celiachia.¹⁹ In particolare, è stato osservato che topi germ-free sviluppano una patologia glutine-indotta più aggressiva rispetto a topi colonizzati da un microbiota benigno, privato di patogeni opportunisti (flora di Schaedler) e che in caso di

perturbazioni della flora microbica secondaria all'assunzione di antibiotici, gli stessi topi sviluppano una enteropatia glutine-indotta molto severa.²⁰ Numerosi studi hanno documentato la presenza di una disbiosi intestinale nei pazienti celiaci rispetto ai controlli sani, sebbene non sia stata identificata una univoca *signature*.¹⁹ Allo stato attuale, non è chiaro se la disbiosi sia implicata nella patogenesi o sia una conseguenza dell'inflammazione intestinale o della dieta priva di glutine, ma è noto che in alcuni casi questa alterazione qualitativa e quantitativa del microbiota intestinale persiste nonostante l'aderenza alla dieta priva di glutine.

L'epoca di introduzione del glutine e le modalità con le quali questa proteina alimentare viene introdotta rappresentano poi un ulteriore fattore ambientale rilevante. Le indagini sull'epidemia di malattia celiaca verificatasi in Svezia tra gli anni '80 e '90 del secolo scorso hanno riportato che l'introduzione di piccole quantità di glutine durante l'allattamento, in un'età compresa tra i 4 e i 6 mesi, è in grado di ridurre il rischio di malattia.^{21,22} Altri studi condotti su bambini a rischio genetico di diabete mellito di tipo 1 (DM1) suggeriscono che il rischio di sviluppare DM1 e/o malattia celiaca aumenta tra i soggetti che hanno introdotto il glutine prima dei 4 mesi o dopo i 7 mesi di età. Questi risultati supportano l'ipotesi secondo cui esista una finestra temporale, tra i 4 e i 7 mesi, durante la quale è più probabile lo sviluppo della tolleranza nei confronti del glutine.^{23,24} In un recente studio prospettico, multicentrico (CELIPREV) è stata chiarita la relazione tra l'età di introduzione del glutine nella dieta del lattante e il rischio di malattia celiaca. E' stato dimostrato che né la ritardata introduzione di glutine (a 12 mesi di età vs 6 mesi) né la durata dell'allattamento al seno modificano il rischio di sviluppare la celiachia nei bambini geneticamente predisposti, ma la ritardata introduzione di glutine può procrastinare l'esordio della malattia con il potenziale beneficio di mantenere un buono stato di salute durante il periodo cruciale dello sviluppo del bambino.²⁵

Un ulteriore studio ha confermato che, sebbene ci siano moltissime buone ragioni per raccomandare un prolungato allattamento al seno nei bambini, questa pratica non risulta protettiva nei confronti dello sviluppo della celiachia nei soggetti a rischio genetico.²⁶

In ultimo, il ruolo delle infezioni gastrointestinali nella patogenesi della celiachia è controverso. Il primo studio sull'associazione tra rotavirus e celiachia risale al 2006, in cui è stato descritto che in pazienti con malattia celiaca attiva ci sono dei sottogruppi di immunoglobuline IgA che riconoscono la proteina virale VP-7, suggerendo un possibile ruolo dell'infezione da Rotavirus nella patogenesi della malattia celiaca tramite un meccanismo di mimetismo molecolare.²⁷ E' stato riscontrato che gli anticorpi anti-rotavirus VP7 sono presenti prima dell'esordio della celiachia e precedono anche la rilevazione degli anticorpi anti-trasglutaminasi e anti-endomisio. Inoltre, è stato dimostrato che gli anticorpi anti-VP7 sono in grado di modulare l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi, nell'infiammazione e nell'alterazione dell'integrità della barriera epiteliale in colture di cellule epiteliali intestinali, tutte caratteristiche tipiche della malattia celiaca in vivo.²⁸ Nel complesso, questi risultati supportano il coinvolgimento dell'infezione da rotavirus nella patogenesi della celiachia ma sono in corso ulteriori studi riguardo questo aspetto.

2.2.3 Patogenesi

La patogenesi della malattia celiaca dipende da una complessa reazione immunitaria, che coinvolge meccanismi sia di tipo innato che adattativo, innescata dal glutine a livello della mucosa intestinale.

Dal punto di vista biochimico, le proteine del glutine sono ricche di prolina e glutammina e sono difficilmente digeribili dall'intestino umano, il quale risulta carente di prolina-endopeptidasi. Questo comporta la digestione del glutine in peptidi di dimensioni maggiori, che possono indurre una risposta dell'ospite in termini di permeabilità intestinale e di risposta immunitaria innata e adattativa. La gliadina, risultante dalla parziale digestione del glutine, può causare un immediato e transiente aumento della permeabilità intestinale. In particolare, sono stati identificati due motivi dell' α -gliadina che possono modulare la permeabilità della barriera intestinale tramite il legame con il recettore 3 delle chemochine (CXCR3) e il conseguente rilascio di zonulina, la quale stimola il disassemblamento dei

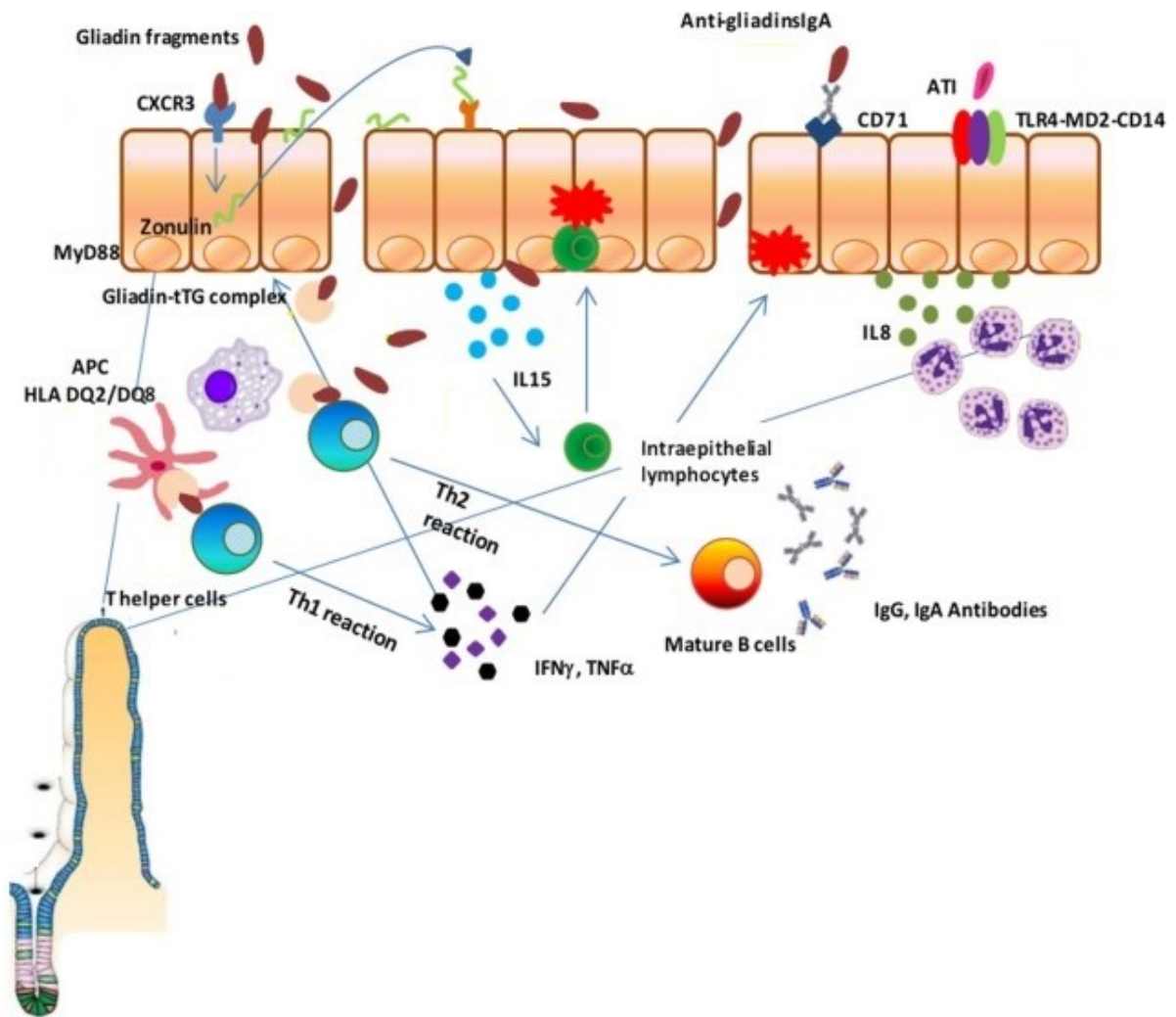
complessi proteici delle giunzioni serrate tra le cellule epiteliali intestinali.^{29,30} Si viene così a creare un passaggio paracellulare che permette ai peptidi del glutine di superare la barriera epiteliale e arrivare alla lamina propria. È stata anche descritta una migrazione per retrotranscitosi, ovvero per via transcellulare, una volta rotta la tolleranza al glutine. Questa via coinvolge il recettore della transferrina CD71, overespresso sul lato luminale della membrana plasmatica degli enterociti dei pazienti celiaci in fase attiva di malattia, il quale riconosce la gliadina complessata alle IgA secretorie e ne permette la transcitosi dal lume intestinale alla lamina propria.

Nella lamina propria, la gliadina stimola il rilascio di IL-15, del fattore di crescita cheratinocitario e di IL-8 con conseguente reclutamento di polimorfonucleati. Contemporaneamente, gli inibitori dell' α -amilasi/tripsina legano il complesso TLR4-MD2-CD14 stimolando la secrezione di citochine proinfiammatorie. A seguito dell'attivazione dell'immunità innata le cellule intestinali vanno incontro ad apoptosi con rilascio di antigeni intracellulari tra cui l'enzima transglutaminasi.

I peptidi del glutine che raggiungono la lamina propria vengono deamidati dalla transglutaminasi tissutale la quale, convertendo i residui di glutammina in acido glutammico, conferisce maggiore affinità ai peptidi del glutine per i recettori HLA esposti sulle cellule presentanti l'antigene (APC). Le cellule dendritiche, i macrofagi e gli enterociti presentano i peptidi del glutine caricati sulle molecole HLA di classe II ai linfociti T CD4+ nella lamina propria e questo contatto ne induce la loro attivazione e proliferazione. L'attivazione dei linfociti T helper CD4+ nella lamina propria e dei linfociti intraepiteliali (IEL) comporta la produzione di citochine pro-infiammatorie, quali l'interferone (IFN- γ), il TNF- α e l'IL-17, e stimola la maturazione dei linfociti B, i quali producono anticorpi IgM, IgG e IgA contro la transglutaminasi tissutale e altri auto-antigeni (Figura 2.2). L'IFN- γ stimola le cellule stromali a produrre le metalloproteasi e il fattore di crescita dei cheratinociti e incrementa la citotossicità dei linfociti intraepiteliali. Questi ultimi a loro volta inducono l'apoptosi degli enterociti, sostenuta dal sistema Fas/Fas-ligando, dalla perforina-granzima e dal pathway del recettore NKG2D esposto dai linfociti intraepiteliali.

Nel complesso, questi eventi portano alle modificazioni istologiche caratteristiche della mucosa intestinale del paziente celiaco, ovvero all'aumento dei linfociti intraepiteliali, all'atrofia dei villi dovuta all'apoptosi enterocitaria e all'iperplasia delle cripte.²

Figura 2.2. Patogenesi della malattia celiaca.
 (Immagine adattata da "Celiac disease: a comprehensive current review", BMC Med, 2019)

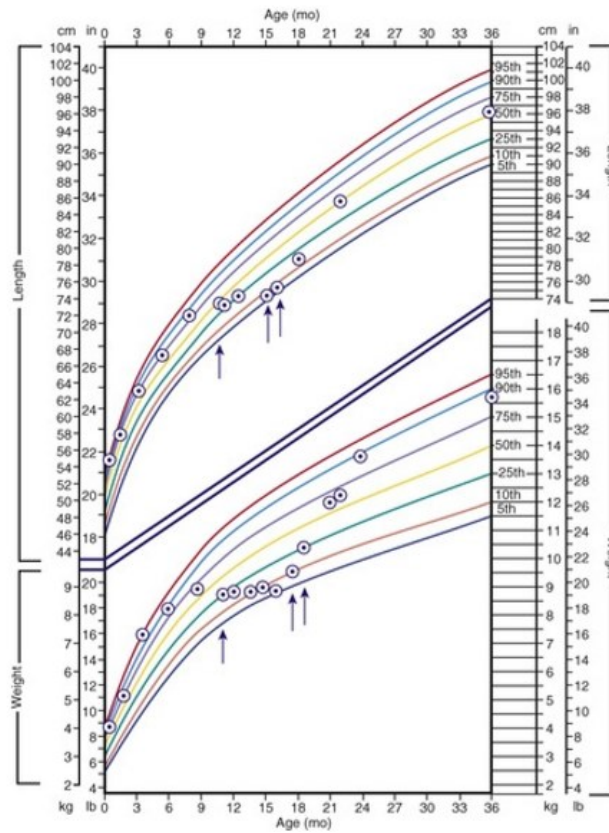


2.3 Clinica

La presentazione della celiachia è estremamente variabile. Si distinguono la forma classica (o tipica), la forma non classica (o atipica), la forma silente e la celiachia potenziale.

La celiachia tipica è il fenotipo più frequente nel bambino di età inferiore ai 3 anni. Esordisce dopo alcuni mesi dall'introduzione dei primi alimenti contenenti glutine. Le manifestazioni cliniche si caratterizzano per i segni tipici della sindrome da malassorbimento intestinale: compaiono gradualmente inappetenza, diarrea cronica, distensione addominale, ipotrofia della muscolatura, arresto della crescita e calo ponderale. La curva di crescita *a parabola* è un elemento suggestivo di celiachia ad esordio precoce.

Figura 2.3. Curva di crescita caratteristica di un bambino con malattia celiaca tipica. La crescita staturponderale è regolare da 0 ai 9 mesi di età, dove compaiono i primi sintomi quali inappetenza, vomito, diarrea dopo l'introduzione di glutine nella dieta (freccia singola). Dopo la diagnosi di celiachia e l'inizio del trattamento dietetico (doppia freccia), la crescita migliora. (Immagine riprodotta da "Nelson, Textbook of Pediatrics", 21 ed., cap. 364)



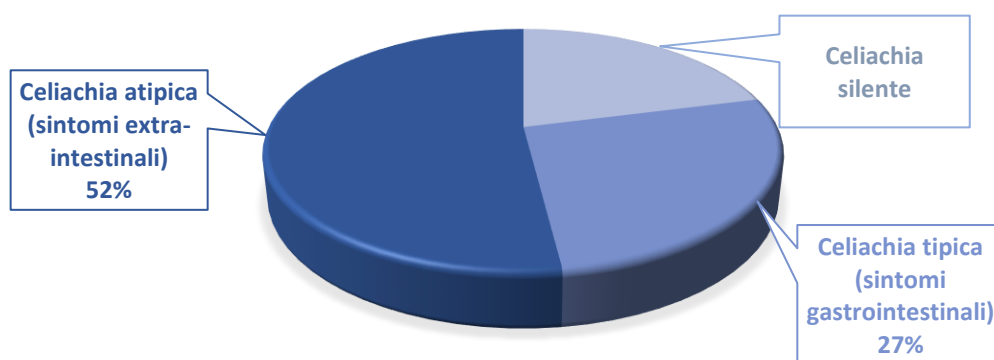
I bambini più grandi e gli adulti possono lamentare diarrea, gonfiore, costipazione, dolore addominale, astenia o perdita di peso. Nei casi più eclatanti si possono evidenziare anomalie elettrolitiche, ipocalcemia, ipoalbuminemia, edemi da ipoprotidemia, sarcopenia e riduzione dell'attività protrombinica da carenza di vit. K.^{31,32} Sono, invece, più frequenti sintomi simil colon irritabile quali dispepsia, alvo irregolare, stipsi, nausea e talvolta episodi di vomito.³³

Figura 2.4. Un bambino di 18 mesi con malattia celiaca tipica in fase attiva. Si nota la lassità delle pieghe cutanee, la distensione addominale, l'ipotrofia della muscolatura prossimale e lo scadimento delle condizioni generali. (Immagine da "Nelson Textbook of Pediatrics", 21 ed., cap. 364").



La celiachia ad esordio precoce riguarda solo il 27% dei casi (Grafico 2.1). C'è una quota sostanziale di casi atipici, in cui prevalgono le manifestazioni extra intestinali, e di forme silenti, in cui la diagnosi viene fatta sulla base degli esami sierologici in assenza di sintomatologia.

Grafico 2.1. Distribuzione dei fenotipi clinici dei pazienti celiaci.



La celiachia atipica o non classica, si caratterizza per una sintomatologia prevalentemente extra-intestinale mentre i sintomi gastrointestinali sono lievi o assenti (es. dolori addominali ricorrenti, stitichezza). Una caratteristica presentazione della celiachia atipica in età pediatrica è la bassa statura e/o il riscontro di un rallentamento patologico della velocità di crescita. Nel 40% dei pazienti con celiachia atipica è riscontrabile un'anemia, più spesso microcitica legata al ridotto assorbimento di ferro e/o alla flogosi cronica, oppure, meno frequentemente, un'anemia megaloblastica legata al deficit di acido folico e vitamina B12.³⁴ Il 70% dei pazienti alla diagnosi ha un'alterazione della densità minerale ossea, osteopenia o franca osteoporosi dovute al ridotto assorbimento di calcio e vitamina D3.³⁵ Altri segni includono la presenza di difetti dello smalto dentario, stomatite aftosa ricorrente (nel 20% dei pazienti con celiachia non diagnosticata), ipertransaminasemia isolata (40-50% dei pazienti non in trattamento) ascrivibile alla traslocazione di antigeni alimentari o batterici

che raggiungono il fegato a causa dell'aumentata permeabilità intestinale oppure allo sviluppo di un'epatite autoimmune, alterazioni della funzione riproduttiva che si possono manifestare con ritardo puberale, ritardo del menarca, amenorrea, modificazioni nel numero e mobilità degli spermatozoi. Inoltre, nel paziente celiaco possono manifestarsi segni e sintomi neurologici quali cefalea, parestesie, ansia, depressione, disturbi dell'apprendimento e disturbi dell'attenzione, in particolare in età pediatrica.³⁶ Infine, la dermatite erpetiforme è la più nota manifestazione extra-intestinale di celiachia, causata dalla deposizione di immunoglobuline di tipo A all'apice delle papille dermiche, indotta dall'ingestione del glutine. Tutte le manifestazioni descritte possono regredire dopo l'inizio della dieta priva di glutine anche se l'astenia, alcune manifestazioni neurologiche e alcuni sintomi gastrointestinali tendono a persistere per un lungo periodo in un sottogruppo di pazienti.

*Tabella 2.1. Manifestazioni extraintestinali di malattia celiaca.
Tabella tratta da "Nelson, Textbook of Pediatrics", 21 ed., cap. 364*

MANIFESTAZIONI		PROBABILI CAUSE
<i>Cutanee</i>	Ecchimosi, petecchie	Deficit vitamina K, raramente trombocitopenia
	Edema	Ipoproteinemia
	Dermatite erpetiforme	Autoimmunità contro transglutaminasi tipo 3 (epidermica)
	Dermatite e ipercheratosi follicolare	Malassorbimento vitamina A e vitamine complesso B
<i>Endocrinologiche</i>	Amenorrea, infertilità, impotenza, pubertà ritardata	Malnutrizione, disfunzione ipotalamo-ipofisaria, disfunzione immunologica
	Iperparatiroidismo secondario	Malassorbimento di calcio e/o vitamina D con ipocalcemia
<i>Ematologiche</i>	Anemia	Deficit di ferro, folati, vitamina B12 o piridossina
	Emorragie	Deficit vitamina K, rara trombocitopenia per deficit di folato
	Trombocitosi, corpi di Howell-Jolly	Iposplenismo

<i>Epatiche</i>	Elevati marker epatici Epatite autoimmune	Autoimmunità, epatite linfocitica
<i>Muscolari</i>	Atrofia	Malnutrizione a causa del malassorbimento
	Tetania	Malassorbimento di calcio, vitamina D e/o magnesio
	Ipostenia	Atrofia muscolare, ipokaliemia
<i>Neurologiche</i>	Neuropatia periferica	Deficit vitamine gruppo B, disfunzione neurologia su base immunologica
	Atassia	Danno cerebellare e delle colonna posteriori
	Lesioni demielinizzanti del sistema nervoso centrale	Disfunzione neurologica su base immunitaria
	Crisi convulsive	Non noto
<i>Scheletriche</i>	Osteopenia, osteoporosi, fratture patologiche	Malassorbimento di calcio e vitamina D, iperparatiroidismo secondario, infiammazione cronica
	Osteoartropatia	Non noto
<i>Altre</i>	Ipoplasia dello smalto dentario	Malassorbimento di calcio e vitamina D
	Ansia, schizofrenia	Non noto
	Emosiderosi polmonare	Non noto
	Stomatite aftosa	Non noto

La celiachia silente è una forma di malattia subclinica in cui i pazienti non lamentano sintomi ma spesso riconoscono comunque dei miglioramenti dopo l'avvio della dieta priva di glutine. Nella celiachia silente sono presenti le stesse alterazioni sierologiche ed istologiche dei casi tipici. In genere viene individuata incidentalmente a seguito di uno screening sierologico in soggetti a rischio (es. familiari di primo grado di celiaci o pazienti affetti da altre patologie autoimmuni).

La celiachia, infatti, può associarsi a differenti patologie autoimmuni o idiopatiche, come la dermatite erpetiforme (dermatite eritemato-pomfoide pruriginosa), diabete mellito di tipo 1, tiroidite di Hashimoto, deficit selettivo di IgA, alopecia areata, vitiligo, anemia emolitica autoimmune, gastrite autoimmune, malattia di Addison, connettiviti (es. sindrome di

Sjogren, Lupus eritematoso sistemico, sclerodermia), sindromi cromosomiche (es. Sindrome di Down, Turner e William), patologie neurologiche (es. atassia cerebellare, neuropatie periferiche, epilessia con/senza calcificazioni occipitali), epatite autoimmune, colangite biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva, cardiomiopatia dilatativa idiopatica.^{33,37,38} In soggetti affetti da queste patologie è indicato effettuare le indagini sierologiche di primo livello per eventualmente confermare o escludere la malattia celiaca.

L'ultima forma, la celiachia potenziale, è caratterizzata dal riscontro di anticorpi specifici per la malattia celiaca, in presenza di un genotipo HLA compatibile, in assenza di alterazioni architetturali della mucosa intestinale (Tipo 0 o 1 secondo Marsh). I pazienti con celiachia potenziale possono o meno presentare manifestazioni cliniche. Come nel caso della celiachia silente, anche la forma potenziale viene spesso riscontrata a seguito dello screening su popolazioni a rischio quali familiari di primo grado di celiaci, diabetici o pazienti con altre patologie autoimmunitarie.

La storia naturale della malattia nei pazienti con celiachia potenziale non è ancora del tutto chiarita. In alcuni casi è stata riportata una progressione verso una malattia celiaca conclamata con atrofia dei villi, in altri è stata dimostrata una spontanea negativizzazione degli anticorpi associati alla malattia celiaca in bambini con predisposizione genetica alla malattia. Ad oggi, non esistono chiare evidenze scientifiche che permettano di identificare un unico parametro in grado di predire al momento della diagnosi chi svilupperà nel tempo un franco danno della mucosa intestinale. Cercando di identificare fattori di rischio evidenziabili già al momento della diagnosi associati allo sviluppo del danno intestinale, è stato dimostrato che la classe di rischio genetico (in particolare la condizione di omozigosi per il DQ2) e il grado di infiammazione della mucosa duodenale (grado 1 di Marsh) sembrano correlare maggiormente con il possibile sviluppo del danno intestinale.³⁹

Per quanto riguarda le decisioni terapeutiche, il ruolo della dieta priva di glutine è ancora dibattuto, in particolar modo per i soggetti asintomatici. L'atteggiamento prevalente è quello di proporre la dieta priva di glutine ai pazienti sintomatici per verificare la glutine-

dipendenza dei sintomi; al contrario i pazienti asintomatici vengono lasciati a dieta libera, ma con uno stretto programma di follow-up per verificare l'andamento clinico-laboratoristico e la comparsa di eventuali segni e sintomi della malattia, come indicato dalle linee-guida ESPGHAN (*European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) 2012.⁴⁰

2.4 Diagnosi

La diagnosi di malattia celiaca si avvale della combinazione dei risultati degli esami sierologici (test anticorpali), della biopsia intestinale e del test genetico (tipizzazione HLA).

2.4.1 Test sierologici

La celiachia è caratterizzata dalla presenza di anticorpi specifici, quali gli anti-transglutaminasi di tipo 2 (anti-tTG), gli anti-gliadina deamidata (anti-DGP) e gli anti-endomisio (EMA). Esclusi gli anti-DGP, gli anticorpi utili per la diagnosi appartengono alla classe IgA. Gli anticorpi tipici della celiachia vanno testati quando il soggetto è a dieta libera, contenente glutine, e la prima volta vanno associati a una determinazione delle immunoglobuline totali, per escludere un deficit di IgA, condizione morbosa che può associarsi alla celiachia e può causare falsi negativi. Ad oggi, non esiste un test anticorpale con sensibilità e specificità del 100% (Tabella 2.2).

Tabella 2.2. Performance dei test sierologici per la diagnosi di malattia celiaca.³⁶

	Sensibilità (%)	Specificità (%)	VPP (%)	VPN (%)	Accuratezza (%)
Anti-tTG IgA	96.8	91.0	91.2	96.8	97.7
EmA IgA	93.7	99%	100	94.4	96.9
DGP IgG	84.4	98.5	98.2	86.8	91.6

Anti-tTG IgA: anticorpi anti-transglutaminasi, DGP: anticorpi anti-gliadina deamidata, EmA anticorpi anti-endomisio, VPP: valore predittivo positivo, VPN: valore predittivo negativo.

Gli anti-tTG possono essere individuati con metodiche ELISA o RIA.⁴⁰ La sensibilità di questo test è altissima (97%) se il soggetto è in dieta libera, mentre diventa molto più bassa se è in dieta priva di glutine, infatti, una volta avviata la terapia questo test non è in grado di evidenziare un'eventuale singola introduzione accidentale di glutine. I soggetti con alto titolo tTG-IgA hanno una probabilità vicina al 100% di avere una celiachia in fase florida. In particolare, vi è una forte associazione tra valori di anti-tTG superiori di 10 volte il cut-off dell'assay e la presenza di atrofia dei villi. Queste evidenze sono alla base della modifica dei criteri diagnostici della celiachia in età pediatrica proposti dalle linee guida ESPGHAN 2012, in cui si indica che la presenza di un valore di anti-tTG superiore di 10 volte il cut-off, associato alla positività degli EMA e alla compatibilità dell'HLA, in un soggetto con sintomi suggestivi di celiachia, permette di fare diagnosi di celiachia senza necessità di conferma bioptica⁴¹

La positività isolata degli anti-tTG, in particolare se caratterizzata da bassi valori, può essere associata anche ad altre condizioni, quali malattie autoimmuni, malattie epatiche, psoriasi e patologie neoplastiche. Questo fenomeno invece non è descritto per gli EMA, i quali presentano una specificità maggiore.

Il livello sierico degli autoanticorpi anti-endomisio si determina con metodica IFI (immunofluorescenza indiretta) su sezioni criostatiche di esofago di scimmia. I risultati sono soggetti a possibili errori interpretativi soprattutto in presenza di positività a basso titolo

anticorpale o di scarsa esperienza dell'operatore; inoltre, la scarsa disponibilità dei substrati antigenici innalza sensibilmente i costi del test. Per questi motivi, sebbene in laboratori esperti la specificità degli EMA sia vicina al 100%, il dosaggio di questi anticorpi non può essere considerato un test di primo livello ma è importantissimo come test di conferma.

Infine, gli anti-DGP hanno una performance inferiore rispetto agli anti-tTG e agli EMA, ma hanno un ruolo nella diagnostica della celiachia nei soggetti con deficit di IgA e nei bambini di età inferiore ai 2 anni con forte sospetto clinico, ma negatività degli anticorpi anti-transglutaminasi.⁴²

Una stretta aderenza alla dieta priva di glutine comporta la negativizzazione o un decremento significativo dei livelli anticorpali entro 12 mesi (18-24 mesi se il titolo alla diagnosi è molto alto) nella maggior parte dei pazienti, insieme al ripristino della normale architettura intestinale.⁴³

2.4.2 Test genetico

La quasi totalità dei soggetti celiaci (> 95%) è portatore dell'aplotipo HLA DQ2 o DQ8. Questi marcatori genetici sono peraltro presenti, nel loro complesso, in più del 30% della popolazione generale. Considerando i numerosi studi che valutano l'uso del HLA nella diagnostica della celiachia, emerge che la sensibilità del DQ2 è del 91%, ed aumenta al 96% quando associato al DQ8, mentre la specificità della combinazione dei due aplotipi è bassa, e varia nelle diverse popolazioni studiate dal 12 al 68%. Ne deriva che la loro positività in assenza dei marcatori sierologici della malattia celiaca (EMA, anti-tTG) non ha di fatto alcun significato diagnostico; piuttosto, l'importanza della tipizzazione HLA risiede nel suo valore predittivo negativo, dato che la negatività per entrambi gli aplotipi rende decisamente improbabile la diagnosi di malattia celiaca. Nella pratica clinica, il ruolo principale del test genetico nella celiachia è quello di escludere la malattia celiaca negli individui appartenenti a gruppi a rischio di sviluppare la malattia. L'assenza del DQ2/DQ8 in questi individui, rendendo improbabile lo sviluppo di malattia celiaca, rende inutile lo screening successivo

con metodiche sierologiche. Sempre sfruttando il suo elevato valore predittivo negativo, la tipizzazione HLA andrebbe poi offerta ai pazienti con diagnosi incerta di celiachia, come in caso di negatività per la sierologia e alterazioni mucosali lievi.⁴⁰

2.4.3 Biopsia intestinale

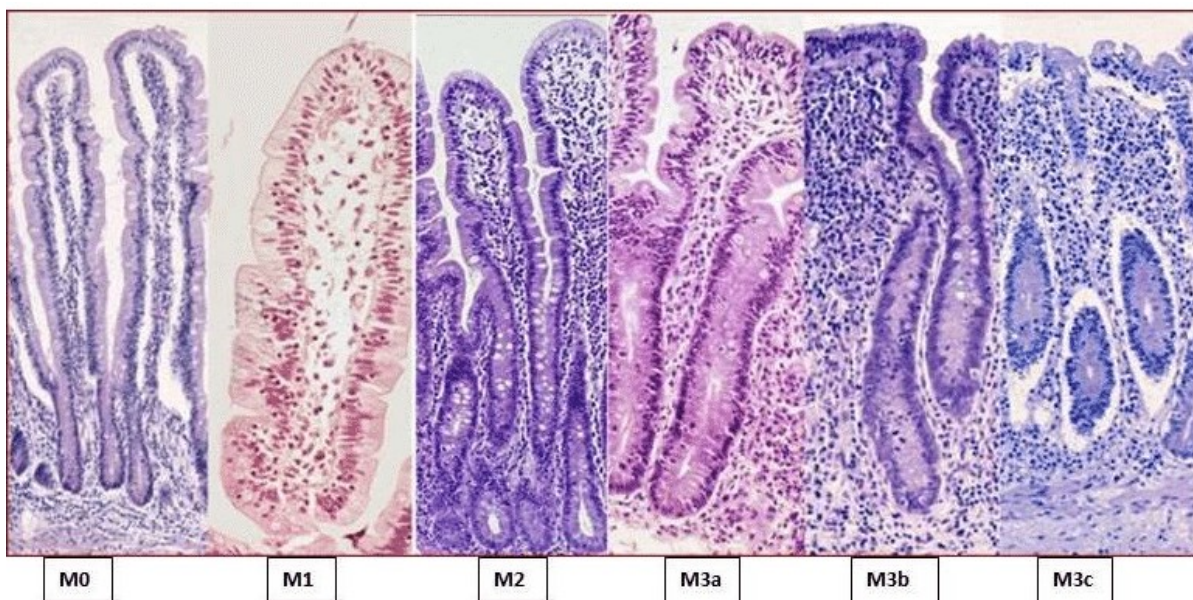
La valutazione morfologica della biopsia duodenale resta, ad oggi, il gold standard per la diagnosi di celiachia.⁴⁴ Il prelievo del campione istologico si esegue mediante esofagogastroduodenoscopia che offre la possibilità di effettuare campionamenti multipli e non prevede alcuna esposizione alle radiazioni ionizzanti. L'importanza del campionamento multiplo è dovuta a una possibile disomogeneità nella distribuzione delle lesioni mucosali (lesioni patchy), che potrebbero quindi non essere individuate in caso di campionamento singolo. È raccomandato il prelievo di almeno 4 frammenti bioptici dalla seconda/terza porzione del duodeno e almeno uno nel bulbo. È, inoltre, fondamentale mantenere il corretto orientamento dei campioni istologici.

L'aspetto istologico della mucosa intestinale del soggetto celiaco presenta diversi gradi di severità, andando dall'infiltrazione linfocitaria fino all'atrofia completa dei villi. I differenti tipi di lesioni sono categorizzate in cinque stadi secondo la classificazione di Marsh, modificata da Oberhuber, attualmente utilizzata nei centri di riferimento per la diagnosi di celiachia. Le lesioni di tipo 1 e di tipo 2, caratterizzate da un aumento dei linfociti intraepiteliali (con/senza iperplasia delle cripte) e villi normali, sono compatibili con la malattia celiaca ma non specifici. Queste alterazioni minime sono attribuibili anche ad allergie alimentari, malattia di Crohn, colite linfocitaria, infezioni batteriche o parassitarie, immunodeficienza comune variabile, SIBO (small intestinal bacterial overgrowth), assunzione di farmaci antinfiammatori non steroidei e infezione da *Helicobacter pylori*. In questi casi dubbi, è possibile applicare delle metodiche di secondo livello come lo studio all'immunofluorescenza dei depositi di anti-tTG IgA nella mucosa intestinale o la conta dei

linfociti intraepiteliali con recettore di tipo gamma/delta, il cui aumento risulta essere un parametro immunostochimico più specifico per la diagnosi di celiachia.⁴⁵

Le lesioni tipiche della celiachia corrispondono al tipo 3 secondo Marsh-Oberhuber e sono caratterizzate da un aumento dei linfociti intraepiteliali (> 25 linfociti ogni 100 cellule epiteliali), dall'atrofia dei villi, dall'iperplasia delle cripte e dall'alterazione del rapporto villo-cripta (da 3:1 a 1:1). Il tipo 3 è a sua volta suddiviso in tre sottostadi in base alla severità dell'atrofia villare (Figura 2.5).

*Figura 2.5. Classificazione istologica di Marsh-Oberhuber.
Immagine da "Celiac disease: An update", Bozzola et al., 2014*



M0: mucosa normale; M1: IELs aumentati; M2: IELs aumentati e iperplasia delle cripte; M3a atrofia villare parziale; M3b: atrofia villare subtotale; M3c: atrofia totale dei villi.

Non è necessario, almeno per quanto riguarda i pazienti in età pediatrica, ripetere l'esame istologico nei celiaci a dieta senza glutine che presentano risoluzione della sintomatologia e negativizzazione della sierologia, mentre andrebbe considerata una seconda biopsia nei pazienti che restano sintomatici nonostante il trattamento.

La biopsia intestinale è stato il primo esame ad essere introdotto per la diagnostica della celiachia, ma nel tempo ne sono stati evidenziati alcuni limiti. E' stato dimostrato che la sua specificità nel caso di lesioni minime è modesta, il danno mucosale può non essere distribuito uniformemente quindi l'istologico può non rispecchiare globalmente il danno intestinale, non è scevra da false positività perché talvolta un errato taglio del frammento biotico può far apparire atrofica una mucosa normale, l'esofagogastroduodenoscopia per ottenere il campione è un esame invasivo e costoso ed infine esistono casi di celiachia potenziale in cui la biopsia è per definizione normale. Tutte queste osservazioni, l'affinamento delle metodiche per la rilevazione dei titoli anticorpali e i test genetici hanno portato a un ridimensionamento del ruolo della biopsia. Secondo le ultime linee guida ESPGHAN la biopsia non è più necessaria a scopo diagnostico quando i livelli di tTG-IgA sono dieci volte superiori al cut-off con positività degli anti-endomisio. L'istologico resta, ad oggi, un esame importante e necessario nei bambini per i quali risulta un margine di incertezza sulla diagnosi finale.

2.4.4 Algoritmo diagnostico

Alla luce delle scoperte degli ultimi anni la Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica (ESPGHAN) ha generato, nel 2012, un algoritmo diagnostico "rivoluzionario" rispetto agli approcci passati, le cui novità sono state rivalutate e convalidate anche nell'ultimo aggiornamento delle linee guida per la diagnosi di malattia celiaca pubblicate nel gennaio 2020 (Figura 2.6).

Il primo esame da eseguire nel sospetto di celiachia o nei gruppi a rischio di malattia è il dosaggio degli anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA e le IgA totali (sezione A in Figura 2.6). In caso si riscontrassero ridotte concentrazioni di IgA totali (< 0.2 g/L sopra i 3 anni) andrebbero eseguiti i test per la valutazione degli anticorpi specifici di classe IgG

(IgG anti tTG, IgG EMA o IgG anti-DGP). Non sono raccomandati i test per la ricerca delle IgG o IgA contro la gliadina nativa né la valutazione anticorpale sui campioni di feci.

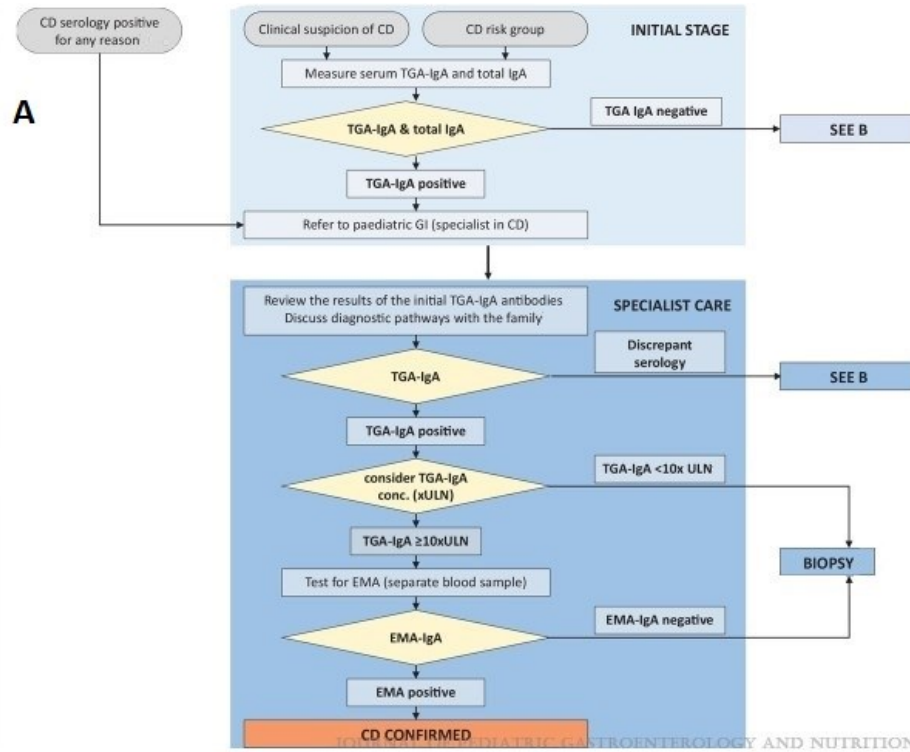
Le nuove linee guida confermano la validità del *no-biopsy approach* proposto nel 2012, ovvero della possibilità di evitare l'esame bioptico nei bambini con concentrazioni di IgA anti-transglutaminasi superiori a 10 volte il limite della norma (ULN) e positività per gli anticorpi IgA-EMA in un secondo campione ematico (sezione A in Figura 2.6). Nei bambini con positività degli IgA anti-transglutaminasi a basso titolo ($< 10x$ ULN) andrebbe eseguito l'esame bioptico per l'eventuale conferma della diagnosi. La tipizzazione HLA non è necessaria nei pazienti con positività per le IgA anti-transglutaminasi se la diagnosi di celiachia è posta con la biopsia intestinale o con i livelli di tTG-IgA $> 10 x$ ULN.⁴⁶ Questo approccio è ritenuto accurato sia per i soggetti sintomatici che asintomatici.

Dall'altro lato, la negatività per gli anticorpi specifici di classe IgA nei pazienti IgA-competenti deve far propendere verso diagnosi alternative alla celiachia senza necessità di ulteriori approfondimenti tranne in specifiche circostanze (es. soggetti di età inferiore a 2 anni, scarso consumo di glutine nella dieta, sintomi severi, predisposizione familiare, anamnesi positiva per altre patologie associate alla celiachia o assunzione di terapie immunosoppressive). In caso persista il sospetto diagnostico nonostante la negatività dei tTG-IgA, degli EMA e degli anti-DGP è raccomandato l'approfondimento bioptico e la tipizzazione HLA. In questo caso, se l'istologia mostra delle lesioni compatibili con la celiachia ma gli eterodimeri HLA DQ2/8 sono assenti, la malattia celiaca è improbabile e vanno considerate ulteriori possibili diagnosi differenziali di enteropatia (es. enteropatia autoimmune, allergia alimentare). Se, invece, sia le lesioni istologiche che il genotipo HLA sono compatibili con la malattia celiaca bisogna considerare la possibilità di una celiachia cosiddetta sieronegativa.

Figura 2.6. Algoritmo per la diagnosi di malattia celiaca.

(Immagine adattata da "European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020", Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, Gennaio 2020)

A) algoritmo diagnostico dei soggetti IgA-compenti, B) In caso di deficit di IgA.



2.5 Trattamento

La terapia della celiachia e dei disturbi glutine dipendenti consiste nell'eliminazione del glutine dalla dieta. Con il termine glutine non si intende solamente il complesso proteico alcol-solubile del grano (composto da gliadine e glutenine), ma anche le proteine dell'orzo (ordeine) e della segale (secaline), omologhe al glutine per struttura e tossicità per i soggetti celiaci. La dieta senza glutine (GFD, gluten-free diet) consiste nell'evitare cibi a base di grano (tutto il gruppo *Triticum*, compresi farro e spelta), segale ed orzo; inoltre è assolutamente necessario prestare attenzione a tutti quei prodotti alimentari trasformati e/o confezionati, nei quali il glutine viene aggiunto durante i processi industriali come additivo. Sono naturalmente privi di glutine, quindi permessi nella GFD, alcuni cereali quali mais, riso, sorgo, miglio, teff e gli pseudo-cereali, tra i più diffusi quinoa, grano saraceno e manioca. In passato l'avena veniva esclusa dalla dieta del celiaco. In realtà, la maggior parte dei celiaci tollera bene quantità medio-elevate di avena senza danni clinici, bioumoral o istologici. Molti studi hanno dimostrato che anche l'introduzione per periodi lunghi di prodotti a base di avena non comporta un rischio per il paziente celiaco, tranne gli eccezionali casi di intolleranza all'avena.⁴⁷ Verdure, ortaggi, frutta, tuberi, legumi, carne, pesce ed uova, sono naturalmente privi di glutine purché non presenti in prodotti lavorati e/o trasformati. Oltre agli alimenti naturalmente privi di glutine, il paziente può usufruire di prodotti alimentari appositamente formulati per celiaci. Questi sono sucedanei di alimenti di uso comune contenenti glutine che sono stati prodotti con materie prime prive o private del glutine. Per poter riportare l'indicazione "senza glutine" in etichetta, un prodotto alimentare deve avere un contenuto di glutine inferiore a 20 parti per milione, ovvero non deve contenere più di 20 mg/Kg di glutine, quantitativo misurabile tramite la metodica ELISA con anticorpo monoclonale r5, metodo Mendez (riconosciuta come metodo di tipo I dal Codex Alimentarius).⁴⁸ 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”. 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”.⁴⁸

Gli alimenti sicuri per il celiaco sono anche tutti quelli contrassegnati dal simbolo della “spiga barrata”, concesso dall’Associazione Italiana Celiachia (AIC), la quale fornisce ai pazienti celiaci anche un prontuario da poter consultare in caso di dubbio sulla sicurezza di uno specifico alimento.

La GFD è efficace nel determinare la remissione dei sintomi dipendenti dalla malattia celiaca, la normalizzazione dei livelli plasmatici degli auto-anticorpi specifici e delle lesioni della mucosa duodenale. La GFD, inoltre, è efficace nel prevenire le complicanze associate alla celiachia, alcune delle quali a prognosi estremamente sfavorevole. Per ottenere questi benefici, la compliance alla GFD deve essere rigorosa e il paziente deve prestare attenzione alle possibili contaminazioni, ovvero alla presenza non voluta di tracce di glutine in alimenti che ne sono naturalmente privi in seguito al passaggio accidentale durante processi di conservazione e preparazione domestica e/o nella ristorazione collettiva.⁴⁰

E’ stato dimostrato che il limite di tossicità giornaliero di glutine assunto è inferiore a 10 mg e l’assunzione anche minima, da 10 a 50 mg al giorno di glutine, può essere deleteria nel lungo termine per il celiaco.⁴⁹ L’utilizzo di prodotti a contenuto di glutine < 20 ppm garantisce di non superare la soglia dei 10 mg di glutine al giorno, anche per consumi giornalieri quantitativamente elevati di tali prodotti.⁵⁰ Alcuni alimenti hanno un maggior rischio di contaminazione, in particolare gli insaccati, le minestre pronte, alcuni salumi, maionese ed altri. Il rischio di contaminazione però oggi viene segnalato nell’etichettatura dei prodotti e il paziente celiaco può evitare un determinato prodotto e dare precedenza a un altro con su scritto “non contaminato da glutine”.

Nonostante le limitazioni della GFD, questo regime dietetico è equilibrato dal punto di vista nutrizionale, può fornire un apporto vario, bilanciato e completo di nutrienti, vitamine e minerali. La piramide alimentare per il celiaco è la stessa suggerita a tutta la popolazione. E' importante garantire un adeguato apporto di alimenti ricchi di fibra, legumi, vegetali, frutta e di latticini. Occorre suggerire al paziente di mantenere una certa varietà nell'uso dei cereali e non minimizzare la dieta ai soli riso e mais, ma integrare con grano saraceno, avena, miglio e altri cereali minori.

Gli individui celiaci in trattamento dietetico, nel lungo termine potrebbero andare incontro ad un ridotto intake di fibre, calcio, folati e vitamina B12. Non è comunque necessario assumere integratori, se si segue una GFD varia ed equilibrata. La dieta può comportare un consumo maggiore di lipidi e zuccheri semplici ma dagli studi non emergono alterazioni metaboliche e del profilo lipidico nei pazienti in GFD rispetto ai controlli,⁵¹ così come questo regime dietetico non è associato ad un maggior rischio di sovrappeso/obesità. Al contrario, lo studio di Brambilla et al. mostra come il body mass index dei pazienti in GFD sia mediamente inferiore rispetto al BMI di una popolazione sana non celiaca di pari età e genere.⁵² L'impatto della dieta sul versante psico-sociale è invece notevole. Il paziente si trova a vivere situazioni, a ristorante o in pasticceria in cui non trova una grande scelta di prodotti poiché la stragrande maggioranza di essi contiene glutine. Il problema che incide maggiormente sulla qualità di vita nel celiaco è quello di dover pensare sempre alle possibili fonti di contaminazione degli alimenti. È stato quindi preso in considerazione il problema di eventuali ricadute negative sul piano psico-affettivo della dieta senza glutine.

L'avvio del trattamento dietetico in genere migliora il benessere psicologico soprattutto nei soggetti sintomatici, ma nel lungo termine è stata messa in evidenza una leggera maggiore prevalenza di turbe ansioso-depressivo nei soggetti in GFD rispetto ai controlli anche se in età pediatrica questa problematica è generalmente molto contenuta. La maturazione di una progressiva maggiore consapevolezza nella popolazione generale e negli operatori del settore alimentare permetterà di eliminare le barriere della dieta senza glutine responsabili dell'impatto psico-emozionale sul paziente celiaco.⁵³

2.6 Complicanze

Le complicanze della celiachia sono situazioni rare che colpiscono circa l'1% dei pazienti celiaci e che peggiorano il decorso clinico della patologia.⁵⁴ E' stato ampiamente dimostrato che la diagnosi tardiva di malattia celiaca (dopo i 50 anni) e/o la mancata compliance alla dieta priva di glutine sono associate ad un'aumentata mortalità rispetto alla popolazione generale e sono i principali fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze.⁵⁵ Quest'ultime vanno sospettate in tutti i pazienti che, nonostante l'aderenza alla dieta, riferiscono una persistenza o una esacerbazione inspiegabile dei sintomi (es. diarrea, dolore addominale, perdita di peso, febbre, astenia severa, episodi subocclusivi). Le principali complicanze della malattia celiaca sono: la celiachia refrattaria, il linfoma T-cellulare intestinale e l'atrofia della milza/iposplenismo; meno frequenti sono l'adenocarcinoma del piccolo intestino e la digiuno-ileite ulcerativa.³⁶

L'ipostenismo anatomico e funzionale può essere riscontrato in circa il 30% dei pazienti celiaci adulti.⁵⁶ L'atrofia della milza deve essere sospettata in pazienti diagnosticati tardivamente, complicati, o con altre malattie autoimmuni. È confermata dal riscontro all'ecografia addominale di una milza di volume ridotto, spesso associata a cavitazione dei linfonodi mesenterici, quale espressione di un più generalizzato disordine linfo-reticolare.⁴⁰ L'atrofia è sempre accompagnata da una importante compromissione funzionale, confermata dall'aumento nel sangue periferico dei corpi di Howell-Jolly o delle "pitted red cells" (globuli rossi con caratteristiche escavazioni di membrana).

L'atrofia splenica della malattia celiaca si associa ad un aumentato rischio di infezioni da batteri capsulati (pneumococco, meningococco ed haemophilus) rispetto alla popolazione generale⁵⁷ e, di conseguenza, il riscontro nel paziente celiaco di una compromissione anatomico-funzionale della milza costituisce un'indicazione alla vaccinazione nei confronti di tali microrganismi.

La celiachia refrattaria si caratterizza per una mancata risposta clinica e istologica dopo 12 mesi di esclusione del glutine dalla dieta. Rappresenta circa l'1-1.5% dei casi di celiachia ed è associata a una maggiore incidenza di ulteriori complicanze come la digiunoileite ulcerativa, la sprue collagenosica e il linfoma intestinale.³⁶

Prima di far diagnosi di celiachia refrattaria occorre escludere altre condizioni, più frequenti, che possano giustificare la sintomatologia (es. deficit di lattasi, colite microscopica, insufficienza pancreatica, diabete) e/o la persistenza delle lesioni mucosali (es. scarsa compliance alla dieta aglutinata, possibilità di un miglioramento tardivo e pertanto non evidente dopo un anno di dieta, un possibile errore nell'interpretazione della prima biopsia legato ad artefatti tecnici o un'errata diagnosi differenziale con altre patologie non glutine-dipendenti che possono causare atrofia dei villi).

Una volta definita la diagnosi di celiachia refrattaria, è necessario distinguere tra i suoi possibili sottotipi sulla base del fenotipo immunoistochimico dei linfociti intraepiteliali (IELs), marcati da importanti differenze prognostiche. Si distinguono, infatti, due sottotipi di malattia refrattaria: il tipo 1, caratterizzato da una popolazione di IELs con un fenotipo immunoistochimico normale (CD3+CD8+), è frequentemente associato ad altre patologie autoimmuni ed ha un tasso di mortalità del 55% a 5 anni; il tipo 2, invece, si caratterizza per IELs con un fenotipo aberrante e riarrangiamento monoclonale della catena gamma del *T-cell receptor*, per la mancata espressione del CD4, del CD8 e della porzione di membrana del CD3, per la presenza di alterazioni cromosomiche, per il rischio elevato di evoluzione in linfoma T-cellulare e per una conseguente elevata mortalità (7% a 5 anni). Il tipo 2 è, a volte, associato alla presenza di digiuno-ileite ulcerativa, cioè di ulcerazioni intestinali multiple, che determinano stenosi plurime della parete e che si accompagnano a sintomi quali intenso dolore di tipo colico, distensione gassosa, febbre, peggioramento della diarrea e malnutrizione. Il tipo 1 generalmente risponde alla somministrazione di immunosoppressori (budesonide), mentre le principali opzioni terapeutiche nella malattia celiaca refrattaria di tipo 2 includono la cladribina, l'anticorpo anti-CD52 alemtuzumab o la chemioterapia ad alte dosi seguita da trapianto di cellule staminali autologhe. Ulteriori

bersagli molecolari potrebbero essere il TNF- α e l'IL-15. Infatti, l'IL-15, inibendo l'apoptosi dei linfociti intraepiteliali, favorisce l'emergenza di cloni proliferanti che danno origine alla popolazione linfomatoso.² Per questo, l'anticorpo monoclonale anti-IL-15 (AMG714) è stato ipotizzato come possibile nuova opzione terapeutica della malattia refrattaria di tipo 2.

Negli ultimi anni, alcuni studi hanno riportato un'incidenza del linfoma non-Hodgkin intestinale a cellule T da sei a nove volte maggiore nei pazienti celiaci rispetto alla popolazione generale. Il linfoma T si localizza più frequentemente nell'intestino tenue prossimale e si presenta macroscopicamente con nodularità multiple ed ulcerate, spesso complicate da stenosi e perforazioni. L'insorgenza inattesa di calo ponderale, dolore addominale, ripresa della diarrea, sangue nelle feci, febbre, sudorazione notturna, elevazione delle latticodeidrogenasi debbono sempre allertare nei confronti di questa complicanza. Il sesso maschile, l'età avanzata, la presenza del DQ2 in omozigosi e, soprattutto, il precedente rilievo di celiachia refrattaria rappresentano importanti fattori di rischio per questa complicanza. Il trattamento del linfoma intestinale associato alla celiachia prevede la chemioterapia con ifosfamide, epirubicina, etoposide (schema IVE) e metotrexate in differenti schemi terapeutici, seguiti dal trapianto autologo di cellule staminali. Se il linfoma mostra all'immunoistochimica un'elevata espressione del CD30 è possibile utilizzare il brentuximab vedotin, un anticorpo monoclonale anti-CD30 in associazione alla chemioterapia con ciclofosfamide-doxorubicina-prednisone (schema CHOP) seguiti dal trapianto di cellule staminali.⁵⁸

2.7 Follow up della celiachia in età pediatrica

Attualmente, non si hanno a disposizione raccomandazioni standardizzate per quanto riguarda il follow-up dei bambini con malattia celiaca. I pazienti celiaci dovrebbero essere seguiti con un controllo entro 6 mesi dalla diagnosi e, successivamente, ogni 1-2 anni con lo scopo di valutare il miglioramento della sintomatologia, verificare la compliance alla dieta senza glutine, monitorare la progressiva normalizzazione degli anticorpi, sorvegliare la possibile comparsa di malattie autoimmuni e/o di alterazioni metaboliche associate alla celiachia anche in trattamento, e diagnosticare precocemente l'eventuale comparsa di complicanze. Ad ogni controllo, il soggetto celiaco dovrebbe essere sottoposto a: visita medica, rilevamento dei parametri auxologici, valutazione dietetica, controllo dell'emocromo, dosaggio anticorpi serici anti-transglutaminasi di classe IgA (o IgG se vi è deficit delle IgA), accertamenti ematici per la valutazione del metabolismo del ferro, dei folati e della vitamina D dal primo controllo fino alla normalizzazione, dosaggio delle transaminasi, del colesterolo totale, del colesterolo HDL e dei trigliceridi.

La valutazione dell'autoimmunità per tireopatia, presente in circa il 5% dei celiaci, va effettuata tramite il dosaggio del TSH e degli anticorpi anti-TPO alla diagnosi e ogni 3 anni se risultano nella norma. Altri esami strumentali e specialistici vanno effettuati se la valutazione clinica lo suggerisce.⁴⁰

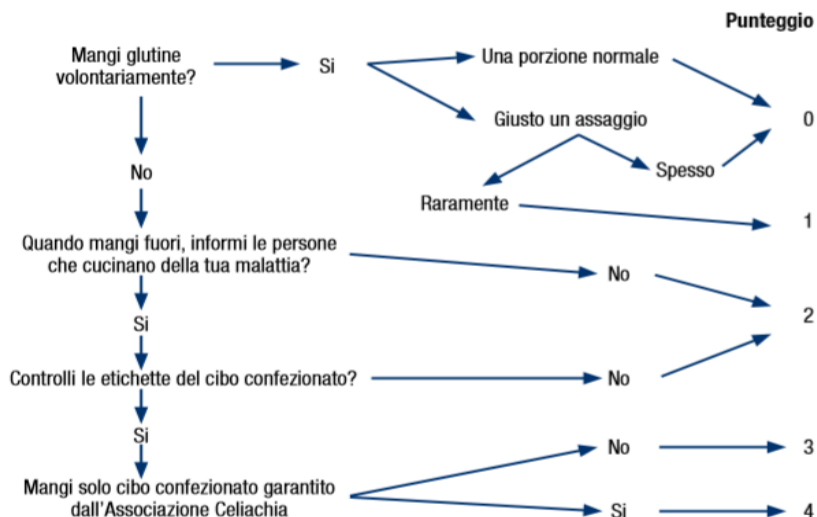
La densità ossea dovrebbe essere misurata in tutti i pazienti celiaci adulti di nuova diagnosi, mentre tale raccomandazione non è attualmente applicabile ai bambini e agli adolescenti, il cui metabolismo osseo è sicuramente più dinamico.⁵⁹ I bambini diagnosticati precocemente aumentano la loro densità ossea in modo più celere e raggiungono una normale densità della matrice minerale ossea semplicemente con l'adesione rigorosa alla dieta, perciò in assenza di elementi clinici che predicono una compromissione della salute dell'osso non è giustificata una valutazione DEXA di screening, né alla diagnosi né in seguito.^{60,61}

L'aderenza alla dieta priva di glutine è difficile da valutare oggettivamente e non esistono, ad oggi, indici non invasivi che permettano con certezza di valutare la compliance alla GFD di un soggetto celiaco. La soglia di ricomparsa dei sintomi legati alla malattia celiaca all'esposizione al glutine con la dieta è variabile da individuo a individuo. Il dosaggio degli anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA non correla strettamente con il consumo di glutine, soprattutto a lungo termine. La compilazione di questionari alimentari tramite cui il paziente possa auto-riportare le trasgressioni alla GFD non è uno strumento che ha dato risultati tali da poter sostituire la biopsia duodenale.

Per la valutazione della compliance al trattamento dietetico ci si avvale principalmente dell'intervista dietetica, della valutazione clinica e dell'andamento dei marcatori sierologici (in particolare i tTG-IgA). In alcuni casi si può far ricorso al dosaggio del glutine fecale e urinario (marcatore di ingestione recente di glutine) e, in situazioni eccezionali, alla biopsia intestinale.

L'intervista dietologica effettuata da personale esperto è di primaria importanza nel valutare se un paziente affetto da malattia celiaca segua una rigorosa dieta priva di glutine. Sono stati elaborati alcuni questionari che, seppure con un margine di incertezza notevole, aiutano il clinico a valutare in modo oggettivo l'aderenza alla GFD. Biagi et al. hanno proposto un questionario basato su quattro semplici domande con cui si ottiene un punteggio da 0 a 4. Questo breve e veloce algoritmo ha mostrato una buona correlazione con l'istologia ed è stato validato nell'ambito di uno studio multicentrico (Figura 2.7).⁶² Tuttavia, la sua applicabilità nei bambini e negli adolescenti non è stata provata.

Figura 2.7. Algoritmo anamnestico per la valutazione dell'aderenza alla dieta senza glutine. (Immagine tradotta da "A score that verifies adherence to a gluten-free diet: A cross-sectional, multicentre validation in real clinical life", Biagi et al, British Journal of Nutrition, 2012).



Wessels et al. hanno proposto un questionario più approfondito risultante dalla trascrizione di una più estensiva intervista dietetica sviluppata da un dietista professionista specializzato in GFD. Il *questionario dell'intervista dietetica* di Wessels si è dimostrato più accurato rispetto alla breve flowchart rappresentata in *Figura 2.7* nell'identificare eventuali errori nella GFD in bambini e giovani adulti.⁶³

La valutazione del clinico sulla base dell'intervista e dei questionari non è però un metodo standardizzato e il risultato è inevitabilmente deviato da una componente soggettiva.

Il margine di incertezza rimane anche prendendo in considerazione i titoli anticorpali. Il dosaggio degli anticorpi anti-tTG è spesso utilizzato nel follow up del paziente celiaco come indicatore della risposta clinica e della compliance alla dieta senza glutine,⁶⁴ ma trasgressioni volontarie minori o involontarie possono sfuggire a questa metodica. La cinetica di scomparsa di tTG-IgA è ampiamente variabile e dipende, oltre che dalla compliance al trattamento, dal livello anticorpale di partenza.⁶⁵ Inoltre, essi correlano solo parzialmente con la compliance alla dieta: il dosaggio degli anti-tTG sierici infatti può risultare costantemente negativo in pazienti in cui si ha certezza di trasgressioni più o meno

occasionali e viceversa rimanere positivo (in casi eccezionalmente rari) in pazienti in cui si ha evidenza dell'aderenza alla dieta e della remissione istologica. Ciò che conta maggiormente in corso di follow-up, tuttavia, è che il titolo diminuisca costantemente nel tempo e, in genere, nel bambino ci si aspetta la negativizzazione anticorpale più rapida rispetto all'adulto.⁶¹ Nella maggior parte dei casi con buona aderenza alla GFD, i tTG-IgA si normalizzano entro due anni di trattamento.⁶⁶

Un altro limite nell'utilizzo del titolo anticorpale nel follow up del celiaco è dato dal fatto che i livelli di tTG-IgA nel siero non correlano pienamente con il quadro istologico e la loro assenza non indica necessariamente l'avvenuta guarigione mucosale.⁴³ A differenza dell'esame istologico, gli anticorpi non permettono di cogliere con rapidità una modificazione del comportamento alimentare del paziente, ma dall'altra parte la biopsia è un esame non praticabile di routine.⁶⁷

Infine, alcuni recenti studi hanno dimostrato la validità dei test per la determinazione dei peptidi immunogenici del glutine (GIP) in campioni di feci e urine dei pazienti celiaci in GFD nell'evidenziare l'ingestione di tracce di glutine nelle precedenti 48-72 ore dall'esecuzione del test.⁶⁸ Questa determinazione può risultare utile per correlare la comparsa di sintomi nel soggetto celiaco all'ingestione volontaria o involontaria di glutine e per monitorare più attentamente l'aderenza al trattamento dietetico.⁶⁹

3. MICROBIOTA E MALATTIA CELIACA

3.1 Microbiota

Il tratto gastrointestinale ospita la più ampia e complessa flora batterica dell'organismo umano, il microbiota intestinale. Esso include oltre 1000 differenti specie batteriche e un numero di geni, il microbioma, 150 volte maggiore rispetto al genoma umano.⁷⁰ Tra il microbiota e l'intestino umano si sviluppa una relazione simbiotica mutualistica in cui entrambe le parti, in condizioni fisiologiche, traggono beneficio. Il microbiota, infatti, è essenziale per la maturazione dell'intestino, per l'omeostasi e la protezione contro microorganismi patogeni, è coinvolto in reazioni metaboliche con materiale non digerito dall'ospite, degrada polisaccaridi complessi aumentando l'efficacia digestiva dell'intestino umano, esercita un'azione trofica sull'epitelio intestinale, contribuisce alla produzione di vitamine e gioca un ruolo importante sullo sviluppo e sulla maturazione dell'immunità innata e acquisita.⁷¹ Di conseguenza, la composizione e la funzione del microbiota intestinale giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'equilibrio tra salute e malattia dell'ospite.

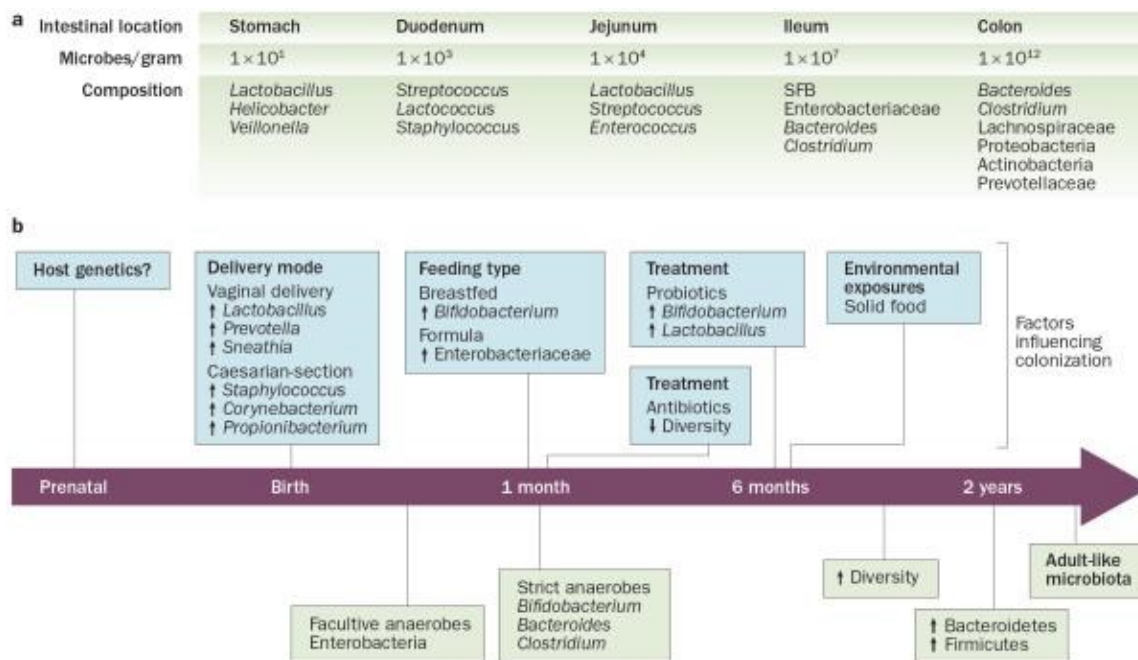
Alla composizione del microbiota intestinale partecipano circa 5-7 *phyla* batteriche delle 52 attualmente riconosciute sul pianeta. Nell'adulto, il 90% della popolazione batterica è rappresentato dalle *phyla* dei *Firmicutes* (a cui appartiene il genere *Clostridium*) e dei *Bacteroidetes* (a cui appartengono i generi *Bacteroides* e *Prevotella*), seguiti da membri dei *Proteobacteria* (che includono la famiglia delle *Enterobacteriaceae*) e degli *Actinobacteria* (che comprendono il genere *Bifidobacterium*).⁷²

La colonizzazione batterica dell'intestino umano da parte dei microbi ambientali inizia subito dopo la nascita e si modifica progressivamente nel corso degli anni. L'intestino del neonato si caratterizza per una dominanza di anaerobi facoltativi, in particolare di Proteobatteri, i quali, consumando ossigeno, alterando il pH e producendo anidride

carbonica, rendono l'habitat più favorevole alla colonizzazione da parte dei batteri anaerobi obbligati.⁷³ Entro le prime settimane dalla nascita gli Attinobatteri diventano dominanti poiché gli oligosaccardi contenuti nel latte materno stimolano la crescita di *Bifidobacterium* spp.⁷³ Con il svezzamento inizia la progressiva maturazione del microbiota verso una composizione più simile a quella dell'adulto, in cui dominano *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Figura 3.1).

Queste progressive modificazioni avvengono sotto la pressione di fattori genetici e fattori ambientali, come le caratteristiche del parto, l'assunzione di farmaci, la modalità di allattamento (al seno o con formula), la dieta, le infezioni ed altri (Figura 3.1b).

Figura 3.1. Caratteristiche del microbiota intestinale in base alla sede (a) e maturazione del microbiota intestinale nel tempo (b). (Immagine tratta da "Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota", Verdu et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015).



Il processo di colonizzazione dell'intestino del neonato rappresenta il momento di maggiore esposizione agli antigeni ambientali ed è una fase critica per l'ospite, il quale deve mettere in atto complessi meccanismi di controllo immunologico. Il sistema immunitario del neonato deve sviluppare una tolleranza (o iporesponsività) verso antigeni innocui della dieta e verso microrganismi simbiotici, permettendo così lo stabilirsi di un microbiota protettivo da una parte e l'eliminazione di antigeni dannosi e patogeni dall'altra.⁷⁴ È stato ipotizzato che la disbiosi, ovvero un'alterazione dell'equilibrio tra simbiotici e ceppi proinfiammatori, possa influenzare la risposta immunitaria dell'ospite favorendo la rottura dei meccanismi fisiologici di immunotolleranza verso antigeni self, creando in questo modo il substrato per reazioni di tipo autoimmunitario.

3.2 Microbiota del paziente celiaco

Negli ultimi 10 anni sono stati pubblicati numerosi studi che hanno dimostrato un'alterata composizione del microbiota fecale e duodenale dei pazienti celiaci rispetto ai controlli sani (Tabella 3.1). Differenze in termini di metodi microbiologici, dimensioni dei campioni e caratteristiche dei pazienti non hanno consentito di definire una signature caratteristica del microbiota del paziente celiaco sebbene sia stato individuato un disequilibrio tra specie batteriche proinfiammatorie e antiinfiammatorie, con una prevalenza delle prime, suggerendo un possibile ruolo della disbiosi nell'aggravare e/o promuovere la malattia.¹⁸

Nello specifico, in bambini e adulti con celiachia attiva (non in trattamento) è stata riscontrata un'abbondanza di *Proteobacteria*^{75,76}, un aumento di batteri gram negativi come *Bacteroides* ed *Escherichia coli*⁷⁷⁻⁷⁹, di *Staphylococcus*^{77,79} e di *Clostridium*^{77,80} e una riduzione di *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.^{79,81,82} Sono state poi riportate anche diversità e alterazioni delle funzioni metaboliche del microbiota stesso (es. ridotta produzione di acidi grassi a catena corta o SCFA).^{79,83}

Tabella 3.1. Risultati degli studi sul microbiota fecale e duodenale dei bambini con malattia celiaca.

Autore	Popolazione	Campioni	Metodo	Risultati nei pazienti celiaci
Collado et al.⁸⁴	26 MC vs 23 CS	Feci	FISH	↑ Bacteroides- Prevotella, Clostridium hystoliticum, Eubacterium rectale, C. coccoides, Atopobium, Stapylococcus
Sanz et al.⁸¹	10 MC vs 10 CS	Feci	DGGE	Maggiore diversità in MC, L. curvatus, Leuconostoc mesenteroides solo in MC
Nadal et al.⁸²	20 MC vs 10 MC-GFD vs 8 CS	Biopsie duodenali	FISH	↓ Rapporto tra Lactobacillus-Bifidocaterium e Bacteroides-E.coli, ↑ rapporto Gram negativi / batteri totali
Collado et al.⁷⁷	8 MC vs 8 MC-GFD vs 8 CS	Feci e biopsie duodenali	q PCR	↑Bacteroides, Clostridium leptum, E.coli, Staphylococcus, ↓ Bifidobacterium
Di Cagno et al.⁸⁵	7 MC vs 7 MC-GFD vs 7 CS	Feci	Real time PCR, DGGE	↓ Bifidobacterium e Lactobacillum
Ou et al.⁸⁶	45 MC vs 18 CS	Biopsie duodenali	Sequenziamento 16S RNA	↑ Haemophilus, Streptococcus, Neisseria
Schippa et al.⁸³	20 MC prima e dopo GFD vs 10 CS	Biopsie duodenali	TGGE	↑ Bacteroides vulgatus, E.coli
De Palma et al.⁸⁰	24 MC vs 18 MC-GFD vs 20 CS	Feci	FISH	↓ rapporto gram positive sui gram negativi, ↓ Bifidobacterium, ↑ Bacteroides-Prevotella in MC
Sanchez et al.⁸⁷	20 MC vs 12 MC-GFD vs 8 CS	Biopsie duodenali	DGGE	↑ Bacteroides dorei, ↓ Bacteroides distasoni, fragilis, uniformis, ovatus; ↑ Bifidobacterium adolescentis e animalis sottospecie lactis.
Di Cagno et al.⁷⁹	19 MC vs 15 CS	Feci e Biopsie duodenali	DGGE	↓ Lactobaillus, Enterococcus, Bifidobacteria

Nistal et al. ⁸⁸	10 MC vs 11 MC-GFD vs 11 CS	Feci	DGGE	↑ <i>Bifidobacterium bifidum</i> e <i>catenulatum</i> in MC non trattati
Nistal et al. ⁸⁹	13 MC vs 5 MC-GFD vs 11 CS	Biopsie duodenali	Sequenziamento gene 16S rRNA	↓ <i>Streptococcus</i> e <i>Prevotella</i>
Sanchez et al. ⁹⁰	20 MC vs 20 MC-GFD vs 20 CS	Feci	PCR	↑ <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>haemolyticus</i> , ↓ <i>S. aureus</i> .
De Meij et al. ⁹¹	21 MC vs 21 CS	Biopsie duodenali	16S-23S IS-pro profiling method	Nessuna differenza significativa
Sanchez et al. ⁷⁶	32 MC vs 17 MC-GFD vs 8 CS	Biopsie duodenali	sequenziamento gene 16S rRNA	↓ Streptococcaceae, Firmicutes, ↑ Proteobacteria, Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae
Wacklin et al. ⁷⁵	33 MC (sintomatici e asintomatici) vs 18 CS	Biopsie duodenali	Sequenziamento gene 16S rRNA	↑ Proteobacteria come <i>Acinetobacter</i> e <i>Neisseria</i> , in pazienti con sintomi gastrointestinali. ↓ diversità in pazienti con sintomi gastrointestinali o anemia.
Cheng et al. ⁹²	10 MC vs 9 CS	Biopsie duodenali	qRT-PCR	<i>Haemophilus</i> spp. e <i>Serratia</i> relativamente più abbondanti
Wacklin et al. ⁹³	MC-GFD (18 sintomatici vs 18 asintomatici)	Biopsie duodenali	Sequenziamento gene 16S rRNA	↓ <i>Bacteroides</i> e Firmicutes ↑ Proteobacteria
Giron-Fernandez et al. ⁹⁴	11 A-MC vs 11 CS	Biopsie duodenali	DGGE	<i>Lactobacillus</i> genus
D'Argenio et al. ⁹⁵	20 MC vs 6 MC-GFD vs 15 CS	Biopsie duodenali	Sequenziamento gene 16S rRNA	↓ Firmicutes e Actinobacteria ↑ Proteobacteria e <i>Neisseria flavescens</i>
Quagliariello et al. ⁹⁶	40 MC vs 16 CS	Feci	qRT-PCR	↓ rapporto Firmicutes/ <i>Bacteroides</i> ↓ Actinobacteria e Euryarchaeota

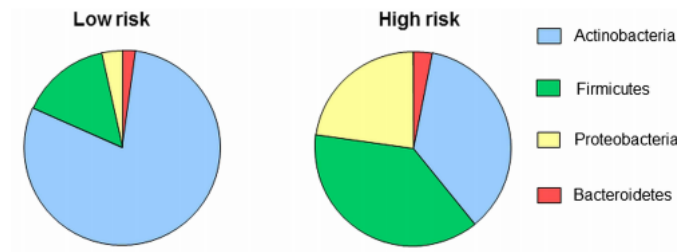
MC: malattia celiaca; A-MC: malattia attiva; CS: controlli sani; MC-GFD: celiaci in dieta senza glutine; FISH: ibridizzazione fluorescente in situ; qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction; TGGE: temperature gradient gel electrophoresis; DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis; ↑: aumento; ↓: riduzione

3.3 Fattori che influenzano il microbiota intestinale del paziente celiaco

3.3.1 Disbiosi e suscettibilità genetica

Alcuni recenti studi supportano il possibile ruolo della genetica nel modulare la composizione del microbiota intestinale nei primi anni di vita. In particolare, in un primo studio, De Palma et al. hanno rilevato una maggiore proporzione di *Bacteroides-Prevotella*, batteri gram negativi, *E. coli*, *Streptococcus*, *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides*, *C. histolyticum* e *C. lituseburensense* in bambini ad alto rischio genetico di celiachia rispetto a bambini con rischio basso o intermedio.⁹⁷ In questo stesso studio, però, non sono stati presi in considerazione importanti variabili ambientali quali la modalità del parto, l'allattamento e il tipo di nutrizione che pure influiscono notevolmente sulla composizione del microbiota. Infatti, stratificando i neonati in base al rischio genetico e al tipo di nutrizione, lo stesso gruppo ha rilevato che l'aumento di *Bacteroides fragilis* e *Staphylococcus* spp. e la riduzione del *Bifidobacterium* spp. associati alla predisposizione HLA, sono più attenuati nei neonati allattati al seno rispetto alla nutrizione con formula.⁹⁸ Infine, in 22 neonati, tutti esclusivamente allattati al seno e nati da parto vaginale, è stato dimostrato un significativo aumento di *Firmicutes* e *Proteobacteria* (*Corynebacterium*, *Gemella*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Raoultella*) e una riduzione di *Actinobacteria* (*Bifidobacterium* e *Bifidobacteriiaeae* non classificate) nel microbiota fecale del gruppo ad alto rischio genetico per la malattia (HLA-DQ2) rispetto a quelli a basso rischio (non-HLA-DQ2/8).⁹⁹ (Figura 3.2)

Figura 3.2. Distribuzione media di Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroides e Proteobacteria in neonati ad alto e a basso rischio genetico. (Grafico da “The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease”, Olivares et al., Gut, 2014).



Il ruolo del genotipo sul microbiota è supportato anche dal GWAS che ha identificato numerosi loci genici non-HLA associati al rischio di sviluppare malattia celiaca. Alcuni di questi loci codificano per proteine associate alla funzione immunitaria, altri modulano l’adesione e la colonizzazione batterica e potrebbero essere coinvolti nella regolazione della composizione del microbiota intestinale.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che uno specifico genotipo dell’ospite può essere una variabile indipendente in grado di influenzare la selezione dei primi colonizzatori intestinali e può potenzialmente contribuire ad aumentare il rischio di malattia. Tuttavia, il preciso ruolo del profilo microbico genotipo-associato nello sviluppo della celiachia non è ancora chiaro.¹⁰⁰

3.3.2 Disbiosi e fattori ambientali

Il microbioma intestinale dell’adulto si definisce tipicamente entro i primi due anni di vita (Figura 3.1) e i batteri acquisiti durante il parto e nei primi mesi hanno un’importanza fondamentale nello stabilire quella che sarà la flora batterica residente nell’intestino dell’individuo.

Studi osservazionali hanno mostrato un' aumentata prevalenza di celiachia in bambini nati da parto cesareo rispetto al parto vaginale ed è stato ipotizzato che la disbiosi che si accompagna alla prima condizione possa avere un ruolo nel giustificare questo aumentato rischio di malattia. Infatti, i bambini nati da parto vaginale acquisiscono prevalentemente i batteri appartenenti alla flora microbica materna vaginale e perianale. Di contro, nel microbiota intestinale dei bambini nati da parto cesareo prevalgono i batteri della flora microbica cutanea materna che risulta povera di *Bifidobacteria*.^{101,102}

Nei bambini geneticamente predisposti alla malattia celiaca e non, il microbiota intestinale è influenzato significativamente anche dal tipo di alimentazione nel primo anno di vita. In particolare, i bambini allattati al seno hanno una maggiore quota di *Clostridium leptum*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium breve* rispetto ai lattanti nutriti con formula, il cui intestino è invece abitato da una flora più ricca di *Bacteroides fragilis*, *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale* ed *E.coli*.²⁵ Queste differenze sono dovute alla presenza di oligosaccaridi nel latte materno che favoriscono la crescita di *Bifidobacteria* e prevengono l'espansione di potenziali patogeni come il *Clostridium difficile*.¹⁰³ Inoltre, essi rafforzano l'integrità della barriera intestinale rendendo gli enterociti meno vulnerabili agli insulti dell'immunità innata stimolata dai batteri. Per questi motivi, l'allattamento al seno è una pratica ottimale per favorire l'instaurarsi di una microflora intestinale benefica.¹⁰⁴

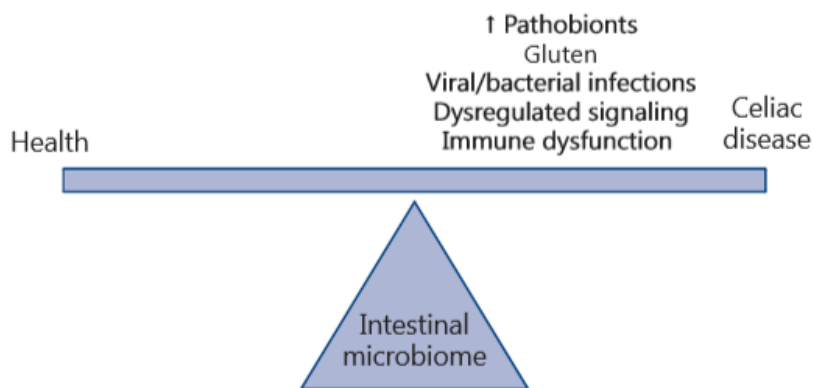
Infine, anche l'uso di antibiotici nel primo anno di vita è stato associato allo sviluppo di disbiosi intestinale (caratterizzata prevalentemente da una riduzione di *Bifidobacterium longum* e un aumento di *Bacteroides fragilis*¹⁰⁵), ridotta diversità microbica fecale e anticipato esordio di malattia celiaca, sebbene su questi aspetti la letteratura offra ancora risultati discordanti.¹⁰⁶

3.4 Ruolo del microbiota nella patogenesi della malattia celiaca

Per molti anni si è creduto che la predisposizione genetica e l'esposizione al glutine fossero necessarie e sufficienti allo sviluppo della malattia celiachia. Gli studi epidemiologici hanno dimostrato, però, che la predisposizione genetica è presente nel 20-30% della popolazione generale di cui solo l'1-2% sviluppa la malattia e che la perdita di tolleranza al glutine può apparire in qualsiasi momento della vita. Questi elementi fanno supporre che esistano anche altri fattori coinvolti nell'induzione del processo patologico alla base della malattia. Inoltre, diversi fattori ambientali conosciuti per il loro ruolo nell'influenzare la composizione della microflora intestinale sono stati associati anche al rischio di sviluppare la malattia celiaca nei soggetti predisposti. Tra queste variabili sono inclusi la modalità del parto e dell'allattamento, la dieta del lattante, l'epoca e la quantità di glutine assunto, le infezioni nel primo anno di vita e l'uso di antibiotici (vedi paragrafo 3.3.2).

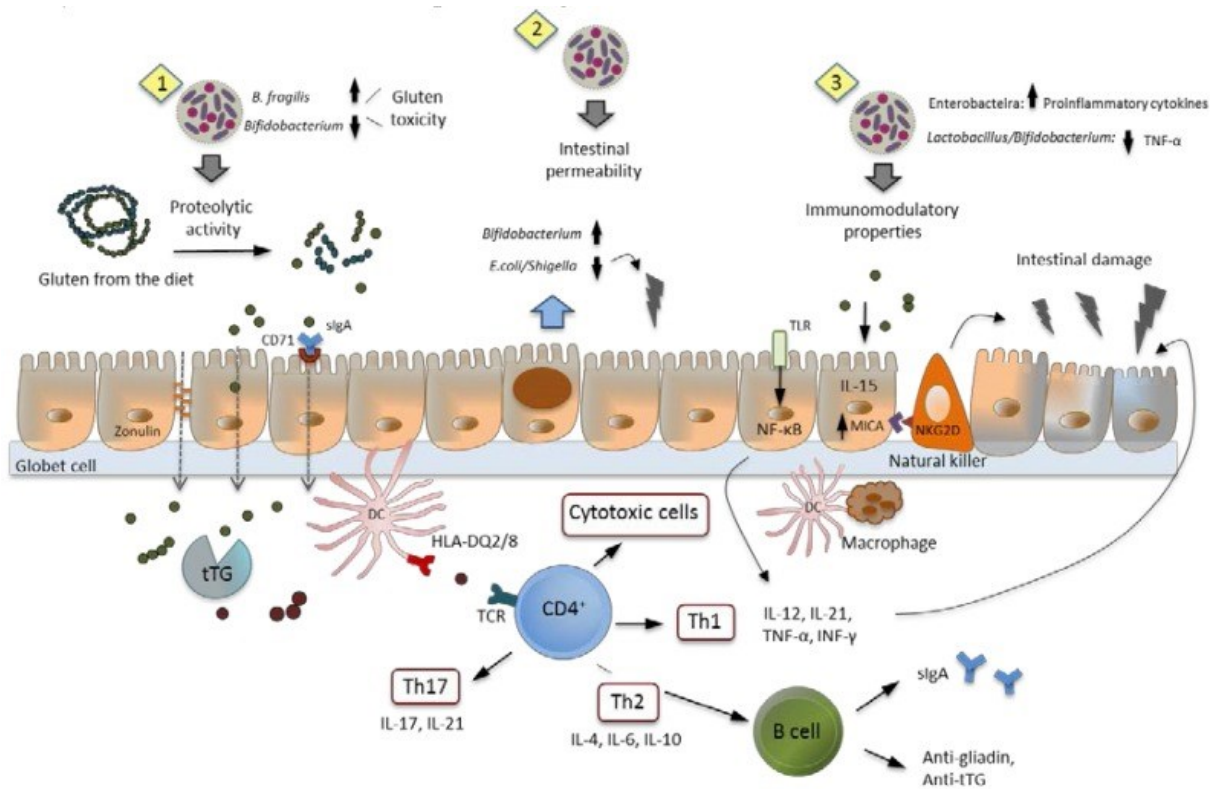
Le attuali evidenze suggeriscono che la disbiosi intestinale del celiaco possa avere un ruolo nella patogenesi, nell'evoluzione e nelle manifestazioni cliniche della malattia, ma finora nessuno studio longitudinale di ampia scala ha determinato se e come il microbiota e il suo profilo metabolomico possano influenzare la perdita di tolleranza al glutine e il successivo sviluppo della celiachia in soggetti geneticamente predisposti.

Figure 3.3. L'alterazione del microbiota intestinale può essere trigger della perdita di tolleranza al glutine e facilitare lo sviluppo di malattia celiaca. (da "Microbiome and Gluten", Y. Sanz, Ann Nutr Metab 2015).



Il microbiota intestinale può giocare un ruolo nella patogenesi della malattia celiaca mediante diversi meccanismi (Figura 3.4): (1) contribuisce alla degradazione del glutine in peptidi con attività immunogenica (tossica o tollerigena), (2) è implicato nella maturazione dell'epitelio intestinale e nella regolazione della permeabilità della barriera mucosale, (3) è in grado di modulare la risposta immunitaria innata ed adattativa.^{18,107}

Figura 3.4. Possibili meccanismi d'azione di componenti del microbiota intestinale nella malattia celiaca. Il microbiota intestinale può contribuire alla patogenesi della malattia celiaca favorendo la proteolisi di peptide del glutine producendo sia frammenti tossici che tollerigenici, influenzando il trofismo e la permeabilità della barriera intestinale e plasmando la risposta immunitaria attraverso la produzione di citochine e fattori proinfiammatori e/o antiinfiammatori. (Immagine tratta da "Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution?", Cenit et al., *Nutrients*, 2015).



3.4.1 Effetti del microbiota sulla digestione del glutine

Il glutine può essere metabolizzato da 144 ceppi di 35 specie batteriche. La maggior parte di essi fanno parte delle *phyla* dei *Firmicutes* e degli *Actinobacteria*.¹⁰⁸ In particolare, dei 31 ceppi in grado di degradare il glutine isolati nel piccolo intestino, 27 hanno dimostrato un'attività proteolitica nei confronti del 33-mero, il peptide più immunogenico del glutine, e tra questi i lattobacilli erano il genere più rappresentato. I lattobacilli e i bifidobatteri, infatti, hanno un complesso sistema proteolitico e necessitano di elevate quantità di aminoacidi per ottenere azoto ed energia sufficiente alla loro sopravvivenza.^{109,110} Tuttavia, come descritto nel paragrafo 3.2, questi *Actinobacteria* sono spesso carenti nel microbiota intestinale del paziente celiaco e sono attualmente presi in considerazione come supplemento probiotico nei pazienti celiaci in virtù dei loro molteplici effetti benefici (vedi paragrafo 3.6).

3.4.2 Effetti del microbiota sulla barriera intestinale

Il microbiota promuove modifiche sostanziali nella morfologia intestinale influenzando sul trofismo dei villi, sulla profondità delle cripte, sulla densità dei vasi, sulla proliferazione delle cellule staminali residenti, sulla produzione dello strato di muco, sull'espressione delle proteine costituenti le tight junctions e sulla maturazione del tessuto linfoide associato alla mucosa, tutti elementi fondamentali nel garantire un'adeguata protezione nei confronti di eventuali patogeni o sostanze tossiche/immunogeniche presenti nel lume intestinale.

Nel 2011, Sanz et al. hanno dimostrato che alcuni enterobatteri isolati dai pazienti celiaci aggravano i danni indotti dalla gliadina su colture cellulari in vitro e nelle anse intestinali di topi germ-free. Questi effetti avversi sono stati associati a vari meccanismi: (a) alla riduzione del numero di cellule mucinose e all'alterazione nell'espressione delle proteine delle tight junctions, perdendo così la funzione di barriera epiteliale e facilitando la traslocazione dei peptidi del glutine nella lamina propria; (b) all'aumentata secrezione di mediatori dell'infiammazione; (c) alla riduzione del rilascio dell'inibitore 1 delle metalloproteinasi

TIMP, con conseguente aumentata attività della metallopeptidasi di matrice coinvolta nella degradazione della matrice extracellulare e nel danno tissutale dell'ansa intestinale.¹¹¹

Nell'ambito delle proteine coinvolte nella struttura delle giunzioni serrate, la zonulina si è dimostrata fondamentale nella patogenesi della malattia celiaca^{29,112} e il suo rilascio è influenzato sia dai peptidi del glutine sia da alterazioni della composizione del microbiota intestinale.^{113,114} In particolare, il rilascio di zonulina conseguente all'attivazione del pathway del recettore CXCR3, espresso dalle cellule dell'epitelio intestinale e attivato sia da peptidi della gliadina sia da patogeni, comporta la distruzione delle tight junctions e il conseguente aumento della permeabilità epiteliale.¹¹⁵

Inoltre, recenti studi con topi germ-free incubati con fattori trigger come *E. coli* CBL2 o *Shigella* CBD8 hanno mostrato una significativa riduzione delle goblet cells nel piccolo intestino e alterata barriera epiteliale. Al contrario, quando incubati con gliadina, IFN γ e *Bifidobacterium bifidum* IATA-ES2 si verificava un aumento delle cellule mucinose, un'aumentata produzione di inibitore delle metalloproteasi e agenti chemiotattici con effetto protettivo sulla mucosa.¹¹⁶

Si ipotizza, quindi, che la disbiosi, attivando i meccanismi di immunità innata, possa danneggiare le giunzioni serrate e la barriera intestinale facilitando l'entrata di peptidi immunogenici nella lamina propria e stimolando la flogosi intestinale.¹⁰⁰

3.4.3 Effetti del microbiota sull'immunità

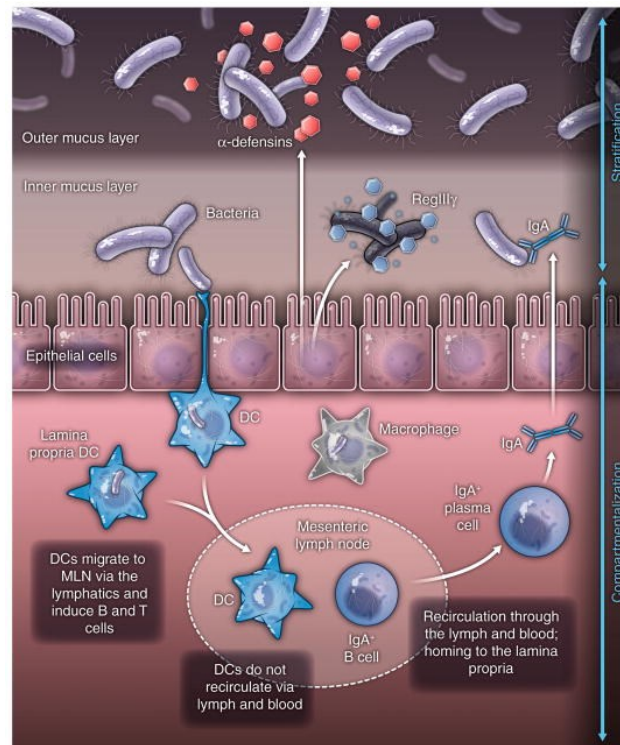
Le attuali conoscenze riguardo l'interazione tra il microbiota e il sistema immunitario derivano dagli studi su animali germ-free, allevati in ambiente a contaminazione controllata allo scopo di limitare l'esposizione a microrganismi, e su topi gnotobiotici, ovvero artificialmente esposti a specie microbiche qualitativamente e quantitativamente conosciute. Il contributo dei differenti attori del sistema immunitario sulla composizione del microbiota intestinale è stato valutato confrontando gli effetti della colonizzazione batterica su topi

wild-type rispetto a topi geneticamente modificati (es. topi knock out per geni che codificano per specifici Toll-like receptor).

Grazie ai modelli sperimentali sopra descritti, è stato possibile dimostrare come il sistema immunitario giochi un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi con le comunità batteriche residenti assicurando la relazione mutualistica ospite-microbiota, ma anche come gli stessi batteri residenti contribuiscano a plasmare l'immunità innata e adattativa dell'ospite.

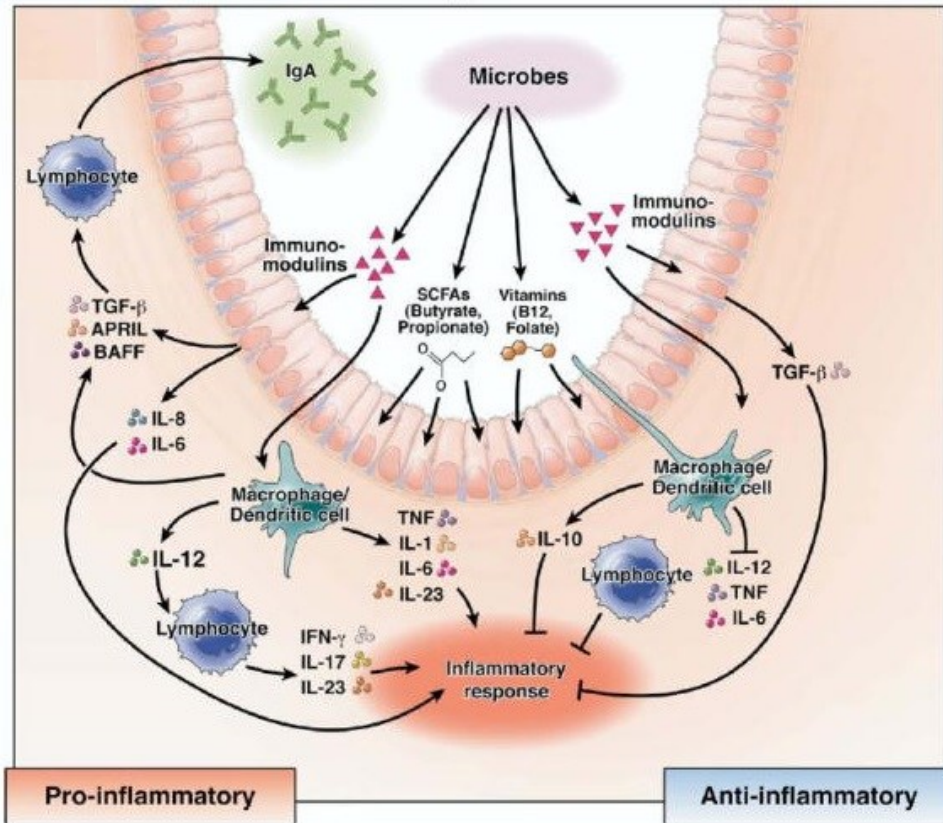
Numerosi fattori collaborano allo scopo di confinare la popolazione batterica all'interno del lume intestinale e minimizzare il contatto tra microbi ed epitelio intestinale. Tra di essi sono fondamentali: la produzione di muco da parte delle goblet cells, la secrezione di peptidi antibatterici come le α -defensine e RegIII γ da parte delle cellule epiteliali e la secrezione di immunoglobuline di classe A da parte delle plasmacellule della lamina propria. Alcuni microbi riescono comunque a superare la barriera intestinale e penetrare nella lamina propria dove vengono riconosciuti e fagocitati dalle cellule dendritiche (DC), le quali attivano i linfociti T e B a livello dei linfonodi mesenterici. A questo livello, i linfociti B maturano in plasmacellule e producono IgA che vengono secrete nel lume intestinale. In questo modo, l'immunità mucosale garantisce la compartimentalizzazione dei microbi e la protezione nei confronti di una potenziale invasività sistemica dei microrganismi stessi (Figura 3.5).¹¹⁷

Figura 3.5. Il sistema immunitario esercita un ruolo critico nel controllare la composizione, la diversità e la compartimentalizzazione del microbiota. (Immagine tratta da “Interactions between the microbiota and the immune system.”, Hooper et al., Science, 2012).



Dagli studi più recenti, però, è emerso che anche il microbiota è in grado di modulare il sistema immunitario dell'ospite. Una microflora intestinale ottimale, infatti, rafforza l'immunità innata regolando la proliferazione delle cellule epiteliali, l'espressione delle proteine delle tight junctions, la permeabilità paracellulare e la funzione di barriera epiteliale (come descritto nel paragrafo 3.4.2). Inoltre, specifici componenti del microbiota hanno un ruolo nell'espressione e attivazione dei Toll-like receptors (TLRs) che vengono esposti dalle cellule epiteliali e dalle cellule dell'immunità innata e che hanno un'importanza fondamentale nel mantenimento del cross-talk tra ospite e microbiota. L'attivazione dei TLRs porta alla sintesi di varie citochine e chemochine che costituiscono uno dei principali meccanismi attraverso il quale l'ospite sviluppa tolleranza verso microbi innocui e contemporaneamente ne previene la disseminazione nell'organismo. (Figura 3.6)

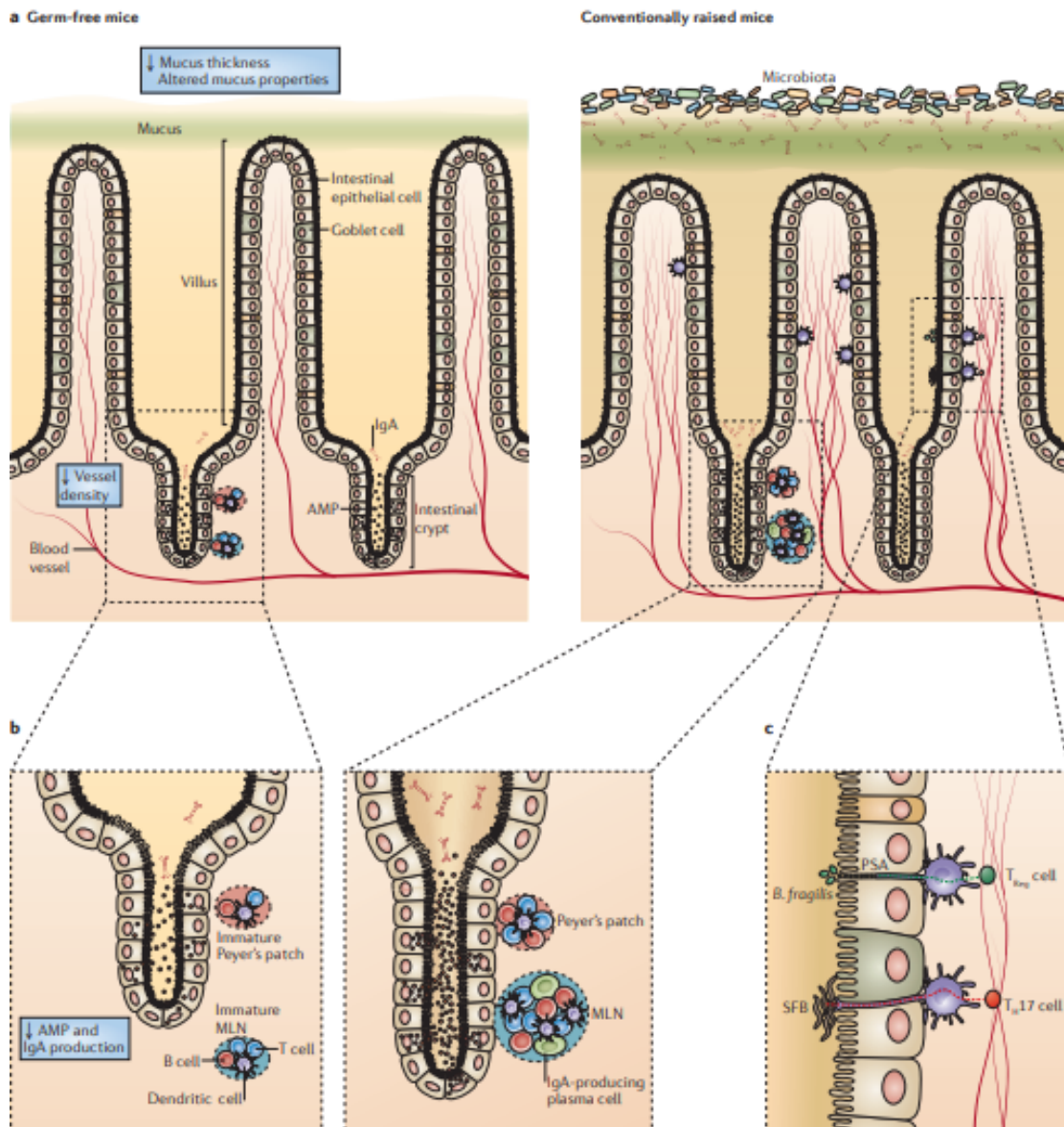
Figura 3.6. Specifici ceppi batterici modulano l'immunità mucosale attraverso la secrezione di molecole o tramite la diretta interazione con cellule immunitarie e con l'epitelio intestinale. Le risposte antinfiammatorie sono mediate dalla produzione di TGF- β da parte delle cellule epiteliali intestinali e di IL-10 dai macrofagi e cellule dendritiche. Le reazioni proinfiammatorie sono il risultato della produzione di citochine da parte dell'epitelio, dei monociti e dei linfociti.¹¹⁸ (Immagine tratta da "Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era.", Preidis-Versalovic, Gastroenterology, 2009).



Il microbiota ha anche un notevole impatto sullo sviluppo dell'immunità adattativa (Figura 3.7). In particolare, è stato dimostrato che l'assenza del microbiota nei topi germ-free si associa ad un'ipotrofia del tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale (MALT), una ridotta secrezione di IgA da parte dei linfociti B, un ridotto numero di linfociti T CD8 intraepiteliali e una riduzione dei livelli di immunoglobuline sieriche rispetto ai topi colonizzati da una flora batterica adeguata.^{117,119} Inoltre, è stato documentato come specifici ceppi di batteri commensali siano in grado di influenzare la differenziazione dei linfociti T della lamina propria verso differenti funzioni effettrici, proinfiammatorie (Th1, Th17) o

antiinfiammatorie (T regolatori), stimolando la produzione di specifiche citochine da parte delle cellule epiteliali e delle cellule dell'immunità innata.¹²⁰ Ad esempio, il *Bacteroides fragilis*, attraverso la produzione del polisaccaride A (PSA), è in grado di indurre la secrezione di IL-10 da parte dei linfociti T intraepiteliali che a sua volta stimola la maturazione di linfociti T regolatori e inibisce l'espansione dei Th17 con effetto finale di tipo antinfiammatorio.¹²¹ Al contrario, i batteri filamentosi segmentati (SFB) inducono l'aumento dei linfociti T helper 17 con attività pro-infiammatoria.¹²²

Figura 3.7. Il microbiota intestinale collabora alla maturazione della barriera intestinale, dell'immunità e adattativa. In topi germ-free (a), i villi del tratto distale del piccolo intestino sono più alti e sottili e hanno una minor complessità vascolare rispetto ai villi degli animali allevati convenzionalmente. In assenza di batteri, le cripte intestinali sono meno profonde, contengono meno cellule staminali proliferanti e lo strato di muco ha uno spessore ridotto. (b) In assenza di colonizzazione batterica si riscontrano, inoltre, pochi follicoli linfatici, placche del Peyer immature e linfonodi mesenteriali (MLN) scarsamente sviluppati. I livelli di IgA e di peptidi antimicrobici (AMPs) sono ridotti rispetto agli animali allevati tradizionalmente. (c) Negli animali allevati convenzionalmente, il polisaccaride A (PSA) prodotto dal *Bacteroides fragilis* induce l'espansione dei linfociti T CD4+, CD25+ e FOXP3+ ovvero dei linfociti T regolatori (Treg) che contribuiscono alla risposta immunitaria di tipo anti-infiammatorio. Al contrario, i batteri filamentosi segmentati (SFB) inducono l'aumento dei linfociti T helper 17 con attività pro-infiammatoria.¹²² (Immagine tratta da "The gut microbiota-masters of host development and physiology.", Sommer-Bäckhed, Nat Rev Microbiol. 2013).



Dalla letteratura scientifica finora pubblicata si evince che il contributo del microbiota sulla patogenesi della malattia celiaca è ancora incerto. È attualmente in corso uno studio genomico, ambientale, microbiomico e metabolomico sulla celiachia (CDGEMM) che ha l'obiettivo di capire il ruolo che il microbioma intestinale gioca nei primi passaggi dello sviluppo della malattia autoimmune. Questo studio internazionale prospettico, longitudinale e osservazionale permetterà di approfondire la storia naturale della malattia celiaca e di altre malattie autoimmuni. L'ipotesi di questo studio è che l'introduzione del glutine nella dieta, insieme alla particolare composizione del microbioma intestinale degli infanti geneticamente predisposti alla celiachia, sia in grado di attivare pathway metabolici specifici che contribuiscono alla perdita di tolleranza al glutine e allo sviluppo dell'autoimmunità. L'identificazione e la validazione di specifici profili microbiomici e metabolomici che possano predire la perdita di tolleranza in bambini geneticamente a rischio di autoimmunità fornirà le informazioni necessarie per l'implementazione di interventi di prevenzione precoce per ristabilire la tolleranza e prevenire la malattia celiaca.¹²³

3.5 Disbiosi e manifestazioni cliniche della celiachia

Recenti studi suggeriscono che il microbiota possa avere un ruolo anche nelle manifestazioni cliniche della malattia celiaca. È stato dimostrato che pazienti celiaci con sintomi gastrointestinali hanno un microbiota differente rispetto ai pazienti asintomatici e ai controlli.⁷⁵ In particolare, Wacklin et al. hanno riportato che la flora batterica dei pazienti affetti da una sintomatologia prevalentemente gastrointestinale è dominata da *Proteobacteria* mentre i *Firmicutes* prevalgono nel microbiota dei pazienti con dermatite erpetiforme e dei controlli sani.⁷⁵

Sono stati eseguiti studi microbiologici anche nei pazienti celiaci in cui persistono i sintomi nonostante l'aderenza alla GFD. In questo sottogruppo di pazienti sono state rilevate alterazioni qualitative e quantitative del microbiota duodenale rispetto agli asintomatici, in

termini di riduzione della *microbial richness* e di abbondanza di *Proteobacteria*, suggerendo che la disbiosi intestinale possa avere un ruolo nella persistenza dei sintomi nonostante l'aderenza alla GFD.⁹³

Da un altro punto di vista, la GFD rappresenta un importante *bias* nella valutazione della relazione tra microbiota e persistenza dei sintomi perché si tratta di un intervento in grado di influenzare la composizione della flora intestinale. De Palma et al. hanno studiato gli effetti di un mese di dieta senza glutine sul microbiota intestinale in 10 soggetti sani e hanno trovato una significativa riduzione di *Bifidobacterium*, *Clostridium lituseburense* e *Faecalibacterium prausnitzii*, e un aumento di *Enterobacteriaceae* e di *Escherichia coli*,¹²⁴ ipotizzando che questa modificazione possa essere legata a una ridotta introduzione di polisaccaridi, soprattutto fruttani, con l'inizio della GFD documentata dal diario nutrizionale giornaliero redatto dai partecipanti allo studio. I fruttani, infatti, hanno un effetto prebiotico e costituiscono una delle principali fonti di energia per i batteri commensali e un ridotto intake di questi polisaccaridi può spiegare la riduzione di particolari ceppi batterici simbiotici. Molti studi, inoltre, riconoscono che l'avvio della GFD comporta un recupero solo parziale della disbiosi del paziente celiaco, in particolare, tendono a persistere la riduzione di *Bifidobacteria* e *Lactobacilli* e l'aumento di *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* e di ceppi virulenti di *E.coli*.¹²⁴

3.6 Probiotici: un'opportunità di trattamento

Sebbene la dieta priva di glutine sia l'unico trattamento attualmente disponibile per la malattia celiaca, mantenere una stretta aderenza ad essa per tutta la vita è molto difficile.⁶¹ Inoltre, la determinazione dei peptidi immunogenici del glutine nei campioni di feci ha permesso di verificare che, anche in pazienti considerati strettamente aderenti alla dieta sulla base dei questionari e degli test sierologici, si verificano trasgressioni e ingestioni accidentali di glutine non trascurabili.⁶⁹ Non per ultimo, l'1-1,5% dei pazienti celiaci è affetto da celiachia refrattaria in cui la GFD non si dimostra sufficiente ad ottenere la remissione clinica e la guarigione istologica. Per questi motivi i ricercatori e i pazienti celiaci stessi nutrono grandi aspettative nei confronti di possibili nuove terapie farmacologiche.¹²⁵ Le strategie terapeutiche attualmente in studio vanno ad agire separatamente su tre principali meccanismi: (a) sul processamento del glutine a livello del lume intestinale per ridurre la tossicità o inibirne il contatto con l'epitelio intestinale (es. grani ingegnerizzati, polimeri leganti, lievito madre arricchito); (b) sulla permeabilità intestinale interferendo con i meccanismi di trasporto paracellulare (es. lazarotide) e transcellulare (es. anticorpi monoclonali anti-IL15); (c) sul blocco della risposta immune nella lamina propria.¹²⁶ Come approfondito nel paragrafo 3.4, il microbiota intestinale collabora allo svolgimento di tutte queste attività e le nuove conoscenze sulla flora microbica del paziente celiaco hanno aperto la strada alla ricerca di terapie complementari basate sull'uso dei probiotici.¹²⁷

I probiotici sono microrganismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite. Essi producono sostanze inibitorie nei confronti di patogeni, bloccano i loro siti di adesione, competono per i nutrienti e degradano recettori per le tossine.¹²⁸ Specifici ceppi batterici hanno anche un'importante attività digestiva verso il glutine.

E' stato dimostrato che alcuni ceppi di lattobacilli, quando aggiunti alla preparazione di prodotti a base di frumento, sono in grado di lisare peptidi del glutine ricchi in prolina e glutammina e ridurre la concentrazione di glutine a livelli inferiori a 10 ppm (*gluten-free*).¹²⁹

Nell'intestino di maiale sono stati identificati quattro ceppi di *Lactobacilli* (*L. ruminis*, *L. Johndoni*, *L. amyloyorus*, *L. salivaris*) con alta attività di degradazione dei peptidi del glutine in grado di ridurre l'immunotossicità.¹³⁰ Sono stati ottenuti risultati incoraggianti anche dallo studio di Francavilla et al. in cui una selezionata miscela di ceppi di *Lactobacilli* si è dimostrata in grado di idrolizzare completamente epitopi immunogenici del glutine, compresi il peptide della gliadina 33-mer, il peptide dell' α 9-gliadina 57-68, il peptide A-gliadina 62-75 e peptide 62-75 della γ -gliadina. Il pool dei 10 *Lactobacilli* selezionati ha idrolizzato il glutine da circa 18000 ppm a meno di 10 ppm dopo 360 minuti di trattamento in condizioni sperimentali che simulavano l'ambiente gastrointestinale.¹³¹

Un ulteriore dato a supporto dell'utilizzo di probiotici nella celiachia viene fornito da un recente studio in cui a 20 pazienti celiaci è stato somministrato per tre giorni pane pretrattato con lattobacilli e proteasi fungine in grado di idrolizzare il glutine (*Lactobacillus alimentaris*, *L.brevis*, *L.sanfranciscensis*, *L.Hilgardi*). Nella mucosa intestinale di questi pazienti, a differenza dei celiaci che hanno assunto farina di frumento naturale, non è stata riscontrata un'attivazione dei linfociti T né un aumento dei livelli di IFN γ . Questi risultati confermano che la fermentazione della farina di frumento con lattobacilli e proteasi fungine è in grado di abolire l'immunogenicità del glutine nei soggetti celiaci¹³² e può essere suggerita come strategia terapeutica complementare per migliorare l'efficacia della GFD, alleviare i problemi delle restrizioni della dieta senza glutine e mitigare gli effetti di un'esposizione accidentale di glutine in pazienti celiaci in trattamento.

Oltre alla loro azione sulla degradazione del glutine, alcuni microrganismi hanno importanti effetti sulla permeabilità intestinale dei pazienti celiaci e sono in grado di modularne la risposta immunitaria.¹²⁸ Anche per questi motivi, la somministrazione di probiotici che aiutino a ripristinare l'equilibrio del microbiota intestinale del paziente celiaco rappresenta una ragionevole opzione terapeutica.¹³³

Sono stati condotti numerosi studi in vitro e su animali con lo scopo di valutare i potenziali effetti dei probiotici nella malattia celiaca.

Partendo dagli studi in vitro, Lindfors et al. hanno dimostrato che il *Bifidobacterium lactis* è in grado di ridurre gli effetti tossici dei peptidi derivati del glutine su colture di cellule intestinali (Caco-2) in termini di riduzione della permeabilità della barriera epiteliale.¹³⁴

Papista et al. hanno dimostrato che anche il *Saccaromyces boulardi* KK1, in modelli murini di sensibilità al glutine, è in grado di idrolizzare peptidi tossici del glutine e controbilanciare la flogosi portando ad una ridotta espressione di CD71, di citochine proinfiammatorie e ad un miglioramento del danno istologico intestinale.¹³⁵

Inoltre, in un recente studio, alcuni lattobacilli si sono dimostrati in grado di digerire in vitro gli inibitori dell'amilasi-tripsina (ATIs), proteine del frumento che inducono l'attivazione della risposta immunitaria innata tramite il pathway del TRL-4. Alcune specie di lattobacilli (*Lactobacillus salivarius* H32.1, *Lactobacillus mucosae* D5a1 e *Lactobacillus rhamnosus* LE3) riducono sia l'infiammazione che la permeabilità intestinale stimolata dagli ATIs.¹³⁶

Laparra et al. hanno testato gli effetti del *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in modelli animali di enteropatia glutine-indotta dimostrando come la somministrazione di questo particolare ceppo riduca la produzione di citochine infiammatorie (come il TNF α) e il danno istologico intestinale.¹³⁷ Il ceppo *Bifidobacterium longum* NCC2705, invece, produce la serpina, un inibitore della serin-proteasi, con proprietà immuno-modulanti e preventive sulla flogosi gliadina-indotta in modelli di topi geneticamente suscettibili di malattia celiaca (NOD/DQ8).¹³⁸ Gli effetti benefici di questi microrganismi sono strettamente ceppo-specifici. Infatti, la somministrazione di alcuni ceppi di *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus* in topi transgenici esprimenti il gene DQ8 producono un aumento della secrezione di TNF con effetto pro-infiammatorio anziché benefico.¹³⁹

Tutti gli studi in vitro e su modelli animali sopra riportati testimoniano gli effetti benefici dei probiotici sulla digestione dei peptidi del glutine, sulla barriera intestinale e sul sistema immunitario, ma ci sono ancora pochi dati disponibili riguardo l'efficacia dei probiotici sulla malattia celiaca in vivo.

3.6.1 Efficacia dei probiotici nella celiachia: studi clinici

In virtù dei risultati ottenuti dagli studi in vitro e delle evidenze acquisite sulla capacità di specifici ceppi microbici di digerire peptidi del glutine (vedi paragrafo 3.4.1), gli studi clinici riguardanti i possibili effetti dei probiotici sui pazienti pediatrici celiaci finora condotti sono concentrati soprattutto sull'utilizzo di ceppi di bifidobatteri e lattobacilli.

La somministrazione di *Bifidobacterium infantis* NLS-SS (*Natren Life Start super strain*) per tre settimane ha comportato un miglioramento della sintomatologia gastrointestinale in 22 pazienti con malattia celiaca attiva (non in trattamento).¹⁴⁰ Questo effetto benefico è stato associato all'influenza del probiotico sull'immunità innata. E' stata infatti documentata una riduzione dell'espressione del peptide antimicrobico HD5 (human α -defensina 5) e una riduzione della conta delle cellule di Paneth nelle biopsie duodenali dei pazienti affetti da celiachia attiva dopo trattamento con probiotico.¹⁴¹

Olivares et al., in un recente trial randomizzato controllato, hanno dimostrato un aumento del percentile di crescita, una ridotta conta di linfociti T CD3+ periferici e ridotti livelli di TNF in 18 pazienti celiaci di nuova diagnosi in trattamento con dieta senza glutine e *Bifidobacterium longum* CECT 7347 rispetto al gruppo placebo. Hanno anche riportato un migliore rapporto tra batteri innocui e patobionti, sebbene non sia stato riscontrato un miglioramento della sintomatologia.¹⁴²

Sono stati eseguiti tre studi controllati randomizzati con lo scopo di valutare gli effetti della somministrazione di due particolari ceppi di *Bifidobacterium breve* (B632 e BR03) per tre mesi sui bambini celiaci in dieta senza glutine. Nell'insieme, i risultati degli studi hanno riportato un aumento di *Actinobacteria* e un ripristino del rapporto *Firmicutes/Bacteroides*⁹⁶, una riduzione dei livelli di TNF α ¹⁴³ e una modulazione nella produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) nel gruppo trattato con probiotico rispetto al gruppo placebo. Tuttavia queste modificazioni non si sono rivelate stabili nel tempo e la composizione del microbiota è tornata circa al basale dopo tre mesi di follow-up.¹⁴⁴

Per studiare eventuali effetti dei probiotici sui pazienti celiaci con sintomatologia gastrointestinale persistente nonostante il trattamento dietetico, Harnett et al. hanno testato una miscela probiotica (VSL#3) su 23 pazienti celiaci sintomatici in dieta senza glutine, ma non hanno riscontrato significative differenze nella composizione del microbiota fecale né sulla sintomatologia. Al contrario, Francavilla et al. hanno recentemente valutato l'efficacia di una nuova miscela probiotica somministrata per tre settimane a pazienti adulti celiaci con sintomi gastrointestinali persistenti nonostante la stretta aderenza alla GFD con risultati promettenti. Si tratta del primo trial randomizzato controllato condotto in un'ampia popolazione di pazienti che valuta sia dal punto di vista clinico che microbiologico l'effetto di una miscela probiotica. La miscela di probiotici è stata disegnata sulla base delle carenze dimostrate e comprende 5 ceppi: 2 ceppi di batteri lattici (*Lactobacillus casei* LMG 101/37 P-17504, *Lactobacillus plantarum* CECT 4528) e 3 bifidobatteri (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi1 LMG P17502, *Bifidobacterium breve* Bbr8 LMG P-17501, *B. breve* B110 LMG P-17500). I risultati hanno mostrato che la miscela probiotica oggetto di studio è risultata efficace nel migliorare la severità dei sintomi misurati tramite IBS-Severity Score (IBS-SS) e Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS); inoltre, essa ha indotto una modifica del microbiota intestinale, caratterizzata da un aumento dei bifidobatteri, ancora rilevabile 6 settimane dopo la sospensione dei probiotici. Questi dati rafforzano l'ipotesi secondo cui uno stato di disbiosi possa essere alla base della persistenza dei sintomi nonostante l'aderenza al trattamento con dieta priva di glutine.¹

Tabella 3.2. Principali evidenze in letteratura sull'uso dei probiotici in pazienti celiaci
(modificata da "Probiotics in celiac disease", Francavilla et al, Nutrients, 2018).

Autori	RCT	Popolazione	Ceppi batterici e tempo di somministrazione	Risultati nel gruppo con probiotico
Smecuol et al. ¹⁴⁰	Si	22 MC (12 probiotico vs 10 placebo)	<i>Bifidobacterium infantis</i> (<i>Natren life start</i>) 3 settimane	Miglioramento sintomi GI (stipsi, RGE, indigestione) misurati con GSRS; ↓ rapporto livelli di TTG-IgA e DGP-IgA post/pre trattamento; ↑ serum macrophage inflammatory protein-1beta. Nessuna differenza nella permeabilità intestinale. Nessuna differenza nella produzione di citochine e chemochine.
Olivares et al. ¹⁴²	Si	18 MC-GFD e probiotico vs 18 MC-GFD e placebo	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>CECT 7347</i> 3 mesi	↑ percentile altezza ↓ linfociti T CD3+ periferici ↓ livelli TNF α ↓ <i>Bacteroides fragilis</i> e <i>Enterobacteriaceae</i> ↑ rapporto tra batteri innocui e potenzialmente patogeni Nessuna differenza sui sintomi GI
Quagliariello et al. ⁹⁶	Si	20 MC-GFD e probiotico vs 20 MC-GFD e placebo vs 16 CS	<i>Bifidobacterium breve</i> (<i>ceppi B632 e BR03</i>) 3 mesi	↑ Actinobacteria Ripristino rapporto Firmicutes/ <i>Bacteroides</i>
Klemenak et al. ¹⁴³	Si	24 MC-GFD e probiotico vs 25 MC-GFD e placebo vs 18 CS	<i>Bifidobacterium breve</i> (<i>ceppi B632 e BR03</i>) 3 mesi	↓ TNF α (non persistenti)
Primec et al. ¹⁴⁴	Si	20 MC-GFD e probiotico vs 20 MC-GFD e placebo vs 16 CS	<i>Bifidobacterium breve</i> (<i>ceppi B632 e BR03</i>) 3 mesi	↓ Firmicutes e TNF α

Harnett et al. ¹⁴⁵	Si	45 MC-GFD sintomatici (23 probiotico vs 22 placebo)	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> BB02, <i>B. longum</i> BL03, <i>B. infantis</i> BI04, <i>Lactobacillus acidophilus</i> BA05, <i>L. plantarum</i> BP06, <i>L. paracasei</i> BP07, <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> BD08 (VSL#3) 12 settimane	Nessuna differenza nel microbiota fecale. Nessuna differenza nella severità dei sintomi.
FrancaVilla et al. ¹	Si	109 MC-GFD con sintomi IBS (54 probiotico vs 55 placebo)	Miscela di: <i>Lactobacillus casei</i> LMG 101/37 P-17504, <i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 4528, <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> Bi1 LMG P-17502, <i>Bifidobacterium breve</i> Bbr8 LMG P-17501, <i>B. breve</i> BI10 LMG P-17500 6 settimane	Miglioramento dei sintomi GI misurati con IBS-SS e GSRS ↑ Bifidobacteria (persistente anche a sei settimane di follow up)

RCT: Randomised Placebo-Controlled Trial, MC: malattia celiaca attiva (in dieta con glutine), MC-GFD: malattia celiaca in dieta priva di glutine IBS: Irritable bowel syndrome (sindrome dell'intestino irritabile); GSRS: Gastrointestinal Symptoms Rating Scale; TNF: Tumor necrosis factor; IBS-SS: IBS-Severity Score; GI: gastrointestinali; TTG IgA: anti-transglutaminasi IgA; DPG IgA: IgA anti-gliadina deaminata.

Nel complesso, i risultati di questi studi in vivo suggeriscono i potenziali effetti benefici dell'uso dei probiotici contenenti lattobacilli e bifidobatteri nel ripristinare una flora microbica adeguata, ridurre la flogosi intestinale e migliorare la sintomatologia in pazienti celiaci in dieta priva di glutine.

4. EFFICACIA DEL PENTABIOCEL NEL RECUPERO CLINICO E LABORATORISTICO DEL BAMBINO CELIACO DOPO L'AVVIO DEL TRATTAMENTO CON DIETA PRIVA DI GLUTINE

4.1 Obiettivi dello studio

L'obiettivo primario di questo studio è quello di valutare se la somministrazione continuativa di Pentabioceel per 3 mesi, grazie ai suoi molteplici effetti favorevoli a livello della barriera intestinale, sia in grado di accelerare i tempi di recupero clinico e laboratoristico del bambino affetto da celiachia dopo l'avvio della dieta senza glutine. Per la valutazione del miglioramento clinico sono stati considerati i parametri auxologici, i sintomi riferiti dal paziente standardizzati secondo lo score *Validated Disease-Specific Symptom Index for Celiac Disease* (VDSS) e le modificazioni delle caratteristiche delle feci secondo *Bristol Stool Chart*. I parametri laboratoristici monitorati comprendono l'emoglobina, la ferritina, l'albumina, la vitamina D, gli anticorpi anti tTG-IgA, gli anti gliadina deamidata IgG e la calprotectina fecale.

4.2 Materiali e metodi

Lo studio è di tipo multicentrico, prospettico, controllato con placebo, con assegnazione randomizzata all'intervento (probiotico o placebo).

Sono stati arruolati pazienti afferenti presso la Clinica Pediatrica dell'Università Politecnica delle Marche – Ospedali Riuniti di Ancona e presso l'U.O. di Pediatria dell'Ospedale di Cava de' Tirreni tra Maggio 2018 e Maggio 2020.

Sono stati inclusi bambini/adolescenti di età compresa tra i 2 ed i 16 anni reclutati al momento della diagnosi di celiachia effettuata secondo le Linee-Guida ESPGHAN 2012.

Sono stati stabiliti i seguenti criteri di esclusione: (a) comorbidità autoimmune o altre malattie croniche associate; (b) associato deficit selettivo di IgA sieriche; (c) scarsa aderenza alla dieta priva di glutine al controllo dei 6 mesi, rilevata mediante punteggio > 10 al questionario di *Wessels*; (d) aderenza al protocollo di intervento < 85%; (e) terapia antibiotica praticata durante i 7 giorni precedenti il T0 e/o il T6; (f) terapia antibiotica durante i 3 mesi di trattamento con probiotico/placebo.

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Politecnica delle Marche.

Per ogni paziente è stato raccolto il consenso informato scritto per la partecipazione allo studio.

4.2.1 Disegno di studio e intervento

Per ogni paziente, al momento dell'arruolamento nello studio, è stata compilata una Clinical Reporting Form (CRF) comprendente i dati anagrafici, familiari e relativi alla diagnosi di celiachia. Al momento stesso della diagnosi, le famiglie sono state adeguatamente istruite, da una dietista esperta, sulle modalità da attuare per seguire una dieta rigorosamente priva di glutine.

Sulla base della sintomatologia di presentazione i pazienti sono stati stratificati in due gruppi: sintomatici e asintomatici.

All'interno di ogni gruppo di stratificazione ogni paziente è stato randomizzato, tramite l'utilizzo di un software, a ricevere il probiotico o il placebo, rispettivamente.

Il prodotto somministrato al gruppo di trattamento è il PENTABIOCEL che consiste in una miscela di ceppi probiotici contenente: *Lactobacillus paracasei* 101/37 (LMG P-17504),

Lactobacillus plantarum 14D (CECT 4528), Bifidobacterium breve Bbr8 (LMG P-17501), Bifidobacterium breve BL10 (LMG P-17500) e Bifidobacterium animalis subsp lactis Bi1 (LMG P-17502).

Ad ogni bambino è stata somministrata una bustina al giorno di Pentabiocel o del placebo (in base alla randomizzazione) per 12 settimane consecutive. I due prodotti erano indistinguibili per quanto riguarda il sapore e l'aspetto.

La lista di randomizzazione che definisce quale prodotto sia stato somministrato ad ogni gruppo è contenuta in una busta chiusa e non verrà aperta fino a che tutti i dati dello studio non verranno raccolti e digitalizzati, a meno che non si verificano seri eventi avversi ritenuti direttamente attribuibili al prodotto dello studio.

4.2.2 Metodi di valutazione

Per ogni paziente sono stati registrati parametri clinici e bioumorali all'arruolamento e avvio della GFD (tempo 0), dopo 3 mesi di trattamento dietetico con il probiotico o con placebo (tempo T3) e all'uscita dallo studio, dopo 6 mesi (tempo T6). Addizionalmente sono stati somministrati due questionari per via telefonica ai pazienti e/o ai loro familiari dopo 1 mese dalla sospensione del trattamento con probiotico/placebo (tempo T4).

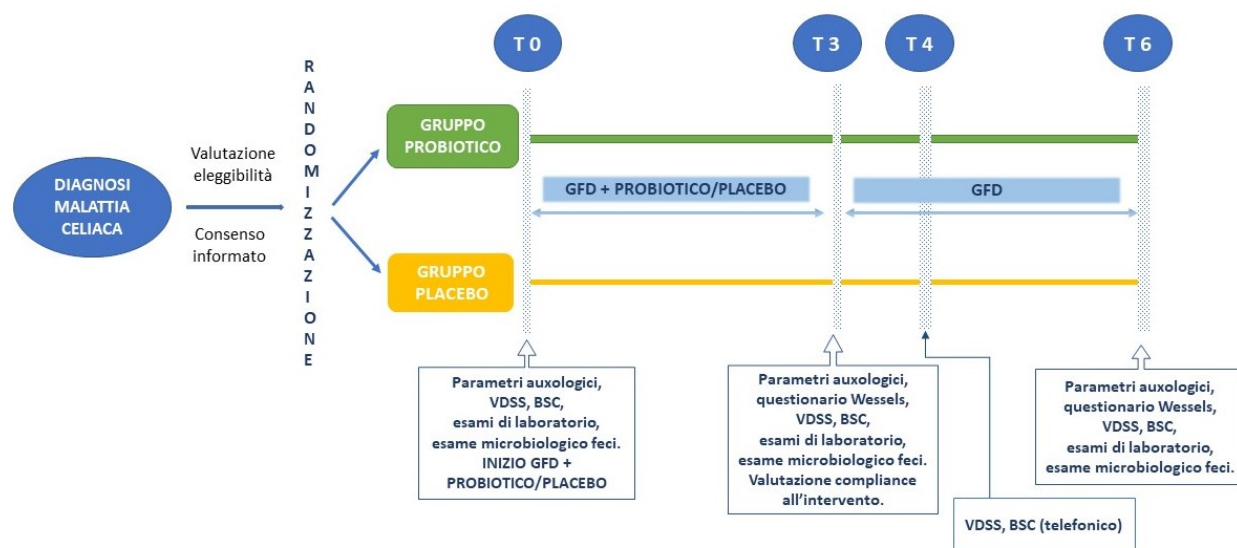
Sono stati valutati i seguenti parametri clinici: (1) parametri auxologici (peso, altezza e BMI) ai tempi T0, T3 e T6; (2) questionario di Wessels per la valutazione della aderenza alla dieta priva di glutine ai tempi T3 e T6; (3) score dei sintomi basato sul *Validated Disease-Specific Symptom Index for Celiac Disease* (Leffler et al, CGH 2009, modificato) ai tempi T0, T3, T4 e T6; (4) *Bristol Stool Chart* per le caratteristiche delle feci a T0, T3, T4 e T6.

Ad ogni visita (T0, T3 e T6) sono stati visionati i seguenti parametri laboratoristici: emoglobina, ferritina, transaminasi, albumina, vitamina D, anticorpi anti tTG-IgA, anti gliadina deamidata IgG e calprotectina fecale.

In occasione di ogni controllo ambulatoriale (T0, T3 e T6) i pazienti hanno fornito un campione di feci su cui effettuare le analisi del microbiota intestinale.

A tre mesi dall'inizio del trattamento con probiotico o placebo (T3) è stata valutata la compliance all'intervento mediante revisione del diario giornaliero relativo alla assunzione del prodotto.

Figura 4.1. Disegno di studio, metodi di valutazione e tempistiche.



GFD: dieta senza glutine; VDSS: Validated Disease-Specific Symptom Index for Celiac Disease (Leffler et al, CGH 2009, modificato); BSC: Bristol Stool Chart; esami di laboratorio: emoglobina, ferritina, transaminasi, albumina, vitamina D, anticorpi anti TTG IgA e anti gliadina deamidata IgG e calprotectina fecale.

4.2.3 Misure di outcome

L'outcome primario viene valutato in base all'esito del *Validated Disease Specific Index Symptom for Celiac Disease* (VDSS) al tempo T3 rispetto al basale. È considerata significativa una riduzione dell'index superiore di almeno il 20% nel gruppo dei trattati con Pentabiocel rispetto ai trattati con placebo.

Nell'ambito degli outcome secondari vengono valutate le differenze tra i due gruppi di trattamento relative a tutti i parametri considerati ed in particolare: (a) delta BMI T0-T3 e T0-T6; (b) delta TTG IgA T0-T3 e T0-T6; (c) delta ferritina T0-T3 e T0-T6; (d) delta calprotectina fecale T0-T3 e T0-T6; (e) variazioni qualitative e quantitative del microbiota intestinale.

4.2.4 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte tramite il software R. Tutti i valori sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) tranne dove diversamente specificato. Per comparare percentuali e variabili nominali è stato usato il Test Esatto di Fisher. Per identificare eventuali differenze tra i due gruppi di intervento riguardo variabili continue indipendenti è stato applicato il test di Mann-Whitney a due code, mentre per comparare le osservazioni all'interno dello stesso gruppo in momenti diversi del follow up è stato usato il test di Wilcoxon per campioni appaiati. Tutti i test statistici sono stati condotti ponendo il livello di significatività al 5%.

4.3 Risultati

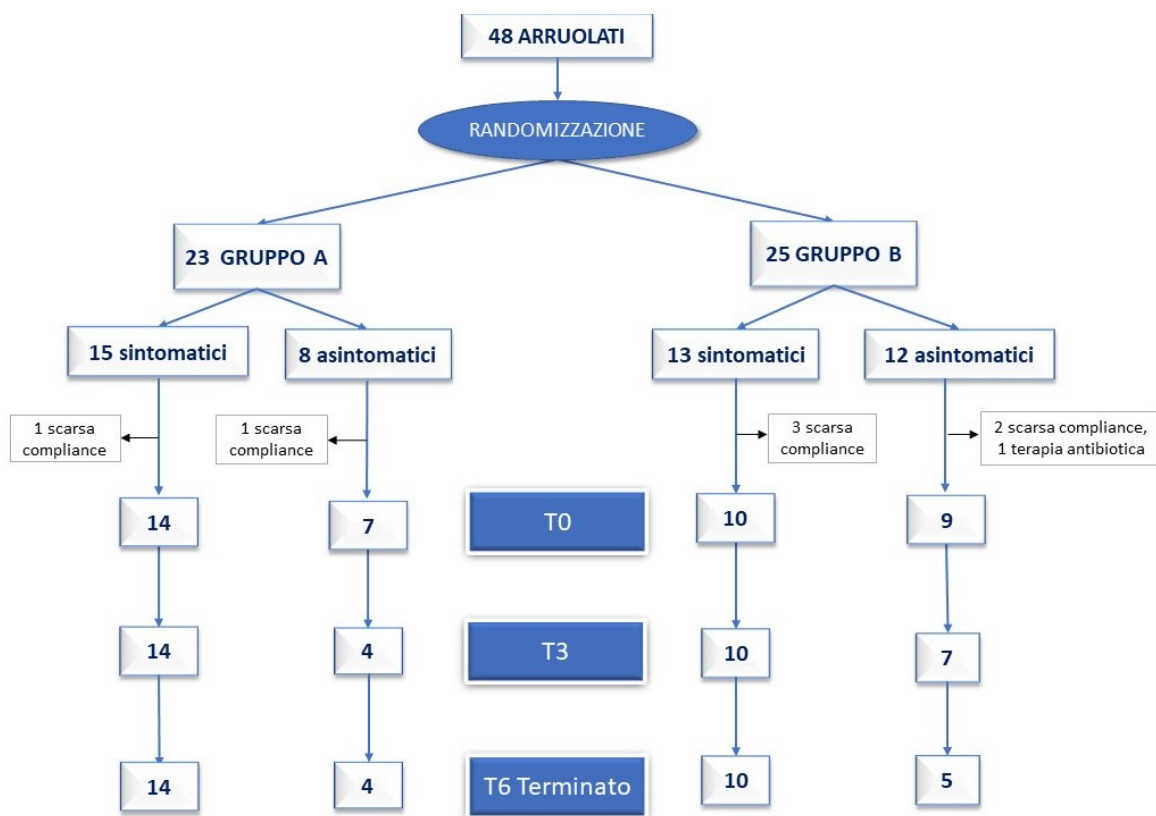
Da Maggio 2018 a Maggio 2020 sono stati arruolati in totale 48 pazienti di cui 8 sono stati esclusi dallo studio in corso di follow-up. Le principali motivazioni del drop-out sono state l'assunzione di terapia antibiotica durante i primi tre mesi dall'arruolamento, la scarsa compliance all'intervento e l'impossibilità ad effettuare il follow up nel mese di Marzo 2020 a causa dell'emergenza COVID-19. I 40 pazienti rispondenti ai criteri di inclusione sono stati assegnati, tramite il sistema di randomizzazione, 21 al gruppo A e 19 al gruppo B. All'interno dei singoli gruppi i pazienti sono stati stratificati in base alla sintomatologia di

presentazione risultando rispettivamente 14 asintomatici e 7 asintomatici all'interno del gruppo A e 10 sintomatici e 9 asintomatici nel gruppo B.

Quale dei due gruppi abbia ricevuto il probiotico o il placebo non sarà noto fino al termine della raccolta dei dati e delle analisi statistiche.

Come mostrato in Figura 4.2, alla data 11 Maggio 2020, tutti i pazienti partecipanti allo studio hanno effettuato la valutazione al momento dell'arruolamento (T0) e 33 hanno completato il follow-up a 6 mesi (T6).

Figura 4.2. Flow diagram dei pazienti all'interno dello studio dall'arruolamento al termine del follow-up, fino a data 11/05/2020.



Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti al momento dell'arruolamento (T0) sono riportate in Tabella 4.1. Ad eccezione dei livelli di vitamina D, non sono state osservate altre differenze statisticamente significative tra i due gruppi di intervento per ciascuno dei parametri osservati ($p > 0,05$).

Tabella 4.1. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti al tempo T0.

	Gruppo A	Gruppo B	<i>p</i>
Età media alla diagnosi (anni)	9,13 ± 4,30	9,60 ± 3,01	NS
Maschi	50%	41%	NS
Sintomatici	77,78%	58,82%	NS
BMI (kg/m²)	18,15 ± 3,34	16,88 ± 2,67	NS
TTG-IgA (U/ml)	179,53 ± 187,13	256,65 ± 180,46	NS
Ferritina (ng/ml)	24,39 ± 14,19	25,45 ± 18,53	NS
Vitamina D (ng/ml)	18,21 ± 4,69	23,54 ± 5,48	0,01
Calprotectina fecale (mg/kg)	54,24 ± 30,81	93,21 ± 144,99	NS
Calprotectina < 50 mg/kg (%)	38,89	58,82	NS
Bristol Stool Chart	3,33 ± 1,29	2,33 ± 1,15	NS
VDSS	33,28 ± 7,77	31,56 ± 10,79	NS

VDSS: *Validated Disease Specific Index Symptom for Celiac Disease*; BMI: *Body Mass Index*; TTG-IgA: *tissue transglutaminase immunoglobulin-A* (valori normali < 7 U/ml); NS: *statisticamente non significativo*.

4.3.1 Effetti del trattamento: outcome primario

Il *Validated Disease Specific Symptom Index for Celiac Disease* (VDSS) al T0 è risultato $33,27 \pm 7,76$ nel gruppo A e $31,56 \pm 10,79$ nel gruppo B ($p > 0,05$); al tempo T3 si è ridotto a $26,25 \pm 5,74$ nel gruppo A e a $26,80 \pm 6,85$ nel gruppo B ($p > 0,05$).

Considerando la variazione percentuale T3-T0 del punteggio VDSS, i due gruppi sono risultati comparabili (delta VDSS T3-T0: $-13,94\% \pm 31,04\%$ per il gruppo A, $-7,30\% \pm 22,39\%$ per il gruppo B; $p > 0,05$) (Tabella 4.2). Allo stesso modo, anche al termine del follow-up la differenza di variazione del VDSS tra i due gruppi, seppure più ampia, non è risultata statisticamente significativa (delta % VDSS T6-T0: $-23,67\% \pm 27,20\%$ gruppo A, $-13,70\% \pm 17,51\%$ gruppo B, $p > 0,05$).

L'elaborazione dei dati a seguito della stratificazione dei pazienti in sintomatici e asintomatici ha evidenziato una riduzione dell'indice VDSS maggiore nei pazienti sintomatici del gruppo A rispetto al gruppo B dopo sei mesi di follow-up (Grafico 4.1, Tabella 4.3), ma questa differenza non è risultata significativa ($p = 0,07$).

Grafico 4.1. Andamento dei valori medi del VDSS nei pazienti sintomatici dei due gruppi nel corso del follow-up.

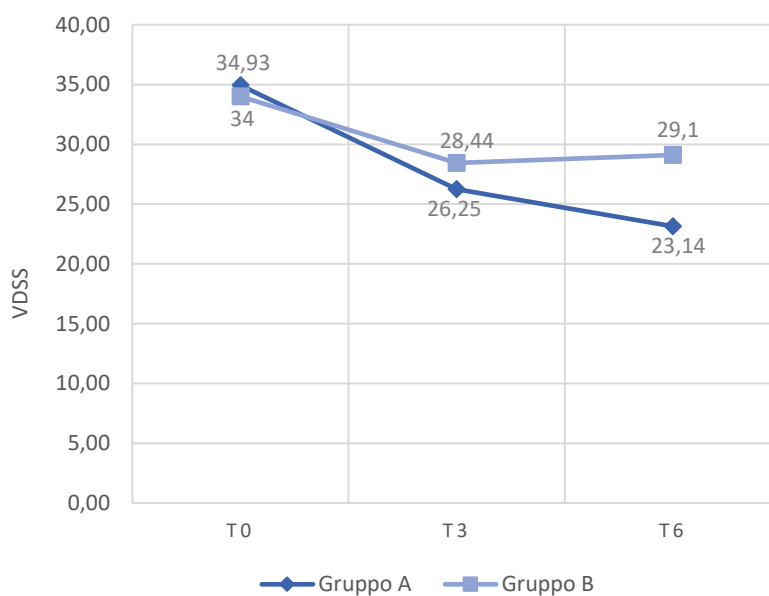


Tabella 4.2. Punteggio VDSS al T3 e variazione rispetto al T0.

	Gruppo A (n = 18)	Gruppo B (n = 17)	p
VDSS T3	26,25 ± 5,74	26,80 ± 6,85	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-13,94 ± 31,04	-7,30 ± 22,39	NS
	Gruppo A sintomatici (n =14)	Gruppo B sintomatici (n =10)	p
VDSS T3	26,25 ± 6,17	28,44 ± 6,56	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-17,72 ± 32,53	-5,95 ± 25,01	NS
	Gruppo A asintomatici (n=4)	Gruppo B asintomatici (n=7)	p
VDSS T3	26,25 ± 5,06	24,33 ± 7,09	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-2,60 ± 26,65	-9,33 ± 19,86	NS

VDSS: Validated Disease Specific Index Symptom for Celiac Disease

Tabella 4.3 Punteggio VDSS al T6 e variazione rispetto al T0.

	Gruppo A (n =18)	Gruppo B (n =15)	p
VDSS T6	23,89 ± 4,82	26,38 ± 8,32	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-23,67 ± 27,20	-13,70 ± 17,51	NS
	Gruppo A sintomatici (n=14)	Gruppo B sintomatici (n=10)	p
VDSS T6	23,14 ± 4,69	29,10 ± 8,82	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-30,03 ± 24,30	-11,85 ± 16,90	NS
	Gruppo A asintomatici (n=4)	Gruppo B asintomatici (n=5)	p
VDSS T6	26,50 ± 5,00	21,83 ± 5,27	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-1,42 ± 28,01	-16,80 ± 19,67	NS

Analizzando le singole manifestazioni cliniche riferite dai pazienti, in entrambi i gruppi è stata registrata una riduzione della frequenza e dell'intensità di tutti i sintomi valutati tramite il VDSS durante le visite di follow-up rispetto all'intervista al tempo 0. Tuttavia, solamente nel Gruppo A, è stata riscontrata una riduzione significativa della frequenza degli episodi di dolore addominale e di epigastralgia già dopo i primi tre mesi dalla diagnosi (Tabella 4.4a). Nello stesso gruppo, al termine del follow-up è stato osservato un miglioramento significativo anche del meteorismo e dell'alvo.

I pazienti del gruppo A hanno manifestato anche un miglioramento progressivo nella percezione del proprio stato di salute, cosa che non si è verificata nel secondo gruppo.

Tabella 4.4a. Valori medi dell'entità dei sintomi estratti dal VDSS dei pazienti sintomatici del Gruppo A.

<i>SINTOMI</i>	<i>T0</i>	<i>T3</i>	<i>p (T0-T3)</i>	<i>T6</i>	<i>p (T0-T6)</i>
Dolore addominale	2,64	1,5	p < 0,05	1,58	p < 0,05
Nausea	1,64	1,33	NS	1,44	NS
Epigastralgia	2,14	1,25	p < 0,05	1,5	NS
Meteorismo	2,36	1,58	NS	1,5	p < 0,05
Diarrea	2,21	1,5	NS	1,17	p < 0,05
Stipsi	1,71	1,58	NS	1,25	NS
Astenia	2,57	1,92	NS	1,42	NS
Cefalea	2	1,42	NS	1,33	NS
Fame improvvisa	2,21	1,83	NS	2,08	NS
Inappetenza	2,07	1,67	NS	1,5	NS
Percezione stato di salute	2,07	2	NS	1,42	p < 0,05

Tabella 4.4b. Valori medi dell'entità dei sintomi estratti dal VDSS dei pazienti sintomatici del Gruppo B.

<i>SINTOMI</i>	<i>T0</i>	<i>T3</i>	<i>p (T0-T3)</i>	<i>T6</i>	<i>p (T0-T6)</i>
Dolore addominale	2,3	1,57	NS	1,9	NS
Nausea	1,9	1,29	NS	1,6	NS
Epigastralgia	2,1	1,43	NS	1,8	NS
Meteorismo	1,8	1,71	NS	1,8	NS
Diarrea	2	1,57	NS	1,6	NS
Stipsi	2,4	2	NS	1,4	NS
Astenia	2,7	1,86	NS	1,9	NS
Cefalea	2,4	1,86	NS	2,1	NS
Fame improvvisa	2,6	2,43	NS	2,4	NS
Inappetenza	2,1	1,71	NS	2	NS
Percezione stato di salute	1,9	1,71	NS	1,8	NS

Grafico 4.2a. Andamento del dolore addominale, dell'epigastralgia, del meteorismo, della diarrea e della percezione dello stato di salute nei pazienti sintomatici del Gruppo A.

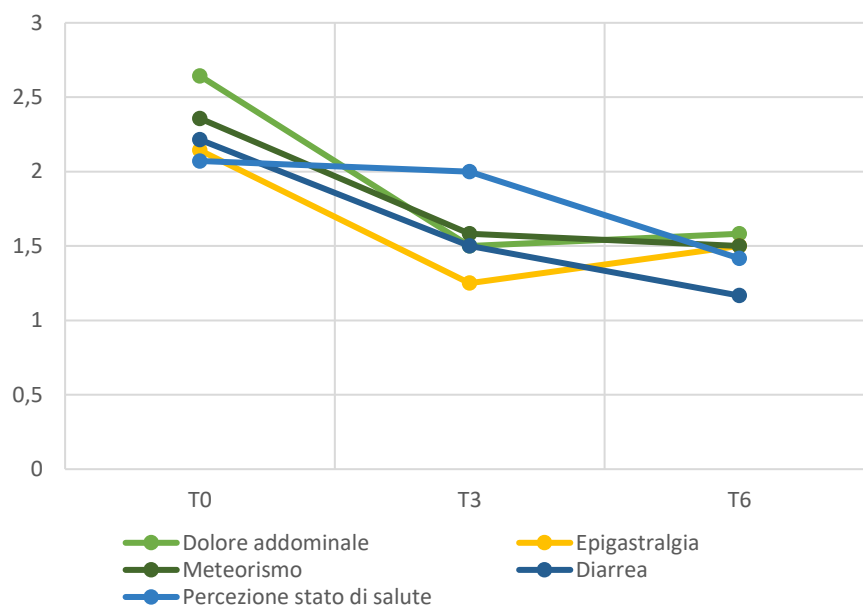
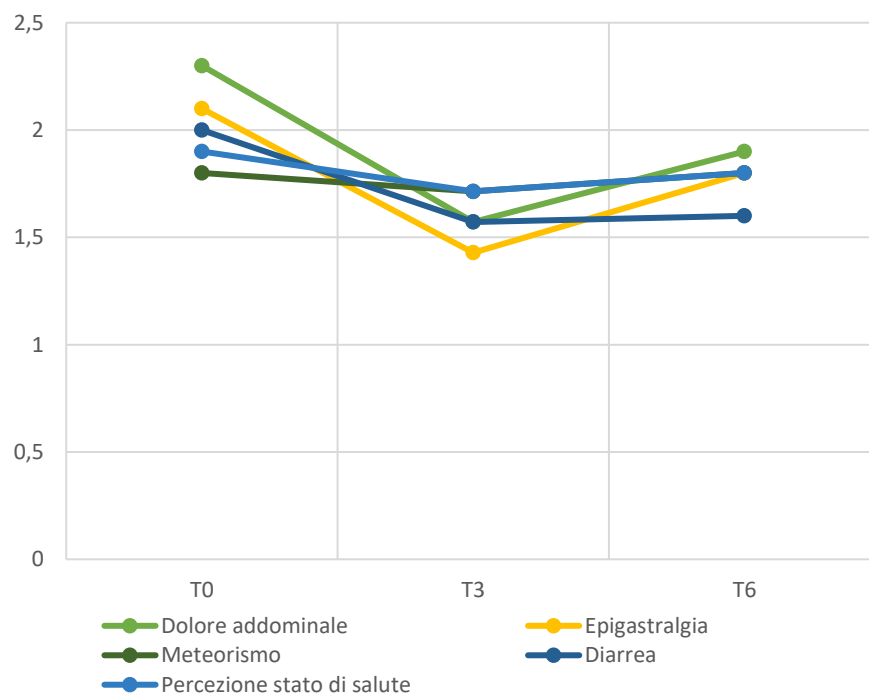


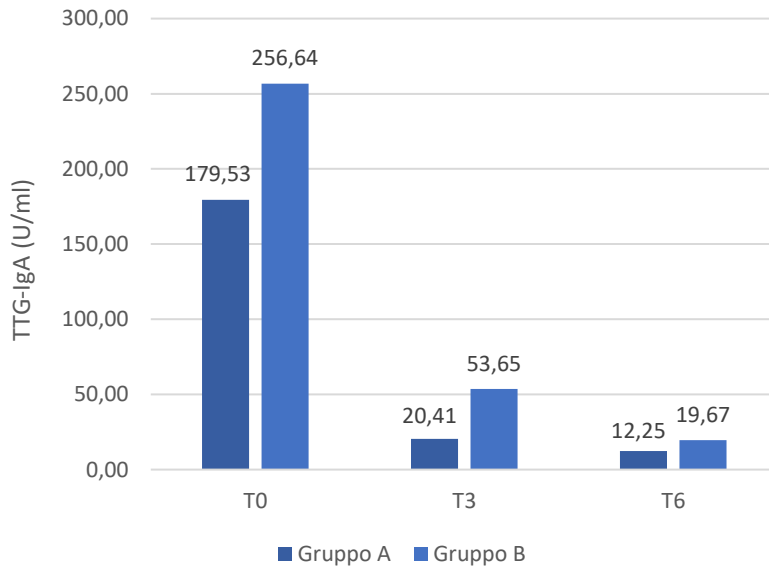
Grafico 4.2b. Andamento del dolore addominale, dell'epigastralgia, del meteorismo, della diarrea e della percezione dello stato di salute nei pazienti sintomatici del Gruppo B.



4.3.2 Effetti del trattamento: outcome secondari

Rispetto ai valori anticorpali riscontrati al T0, i livelli di TTG-IgA non hanno mostrato una significativa differenza di variazione percentuale T3-T0 nei due gruppi (-83,08%±12,86% vs -77,00%±20,37%; $p > 0,05$). Allo stesso modo, al termine del follow-up, non sono state osservate differenze significative né per quanto riguarda i livelli anticorpali in termini assoluti (12,25±12,00 U/ml vs 19,67±22,96 U/ml; $p > 0,05$) né comparando la variazione percentuale T6-T0 (-88,16%±11,22% vs -90,92%±7,22%; $p > 0,05$).

Grafico 4.3. Valori anticorpali medi dei due gruppi nel corso del follow-up.



Tuttavia, i due gruppi differiscono sia al T3 che al T6 per la percentuale di pazienti con valori anticorpali negativi (TTG-IgA < 7 U/ml). In particolare, dopo i primi tre mesi di trattamento il 46,67% dei pazienti del gruppo A ha ottenuto una negativizzazione dei valori anticorpali contro l'11,76% del gruppo B ($p = 0,049$) e al termine del follow up questa differenza diventa ulteriormente più evidente (55,56% gruppo A vs 13,33% gruppo B; $p=0,027$).

Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi di intervento dopo i primi tre mesi e al termine del follow-up per quanto riguarda il BMI, il delta % BMI, la ferritina, il delta % ferritina, la *Bristol Stool Chart* e la calprotectina fecale (Tabelle 4.5 e 4.6).

In aggiunta ai parametri delineati come outcome secondari dello studio, è stata monitorata anche la vitamina D. I livelli di quest'ultima risultavano significativamente maggiori nel gruppo B al basale; dopo i primi tre mesi dall'inclusione nello studio i valori di vitamina D sono risultati comparabili tra i due gruppi, grazie ad un aumento significativo del 40,61%±48,33% nel gruppo A rispetto a 1,69%±47,25% nel gruppo B ($p = 0,037$).

Grafico 4.4. Livelli medi di vitamina D nei due gruppi nel corso del follow-up.

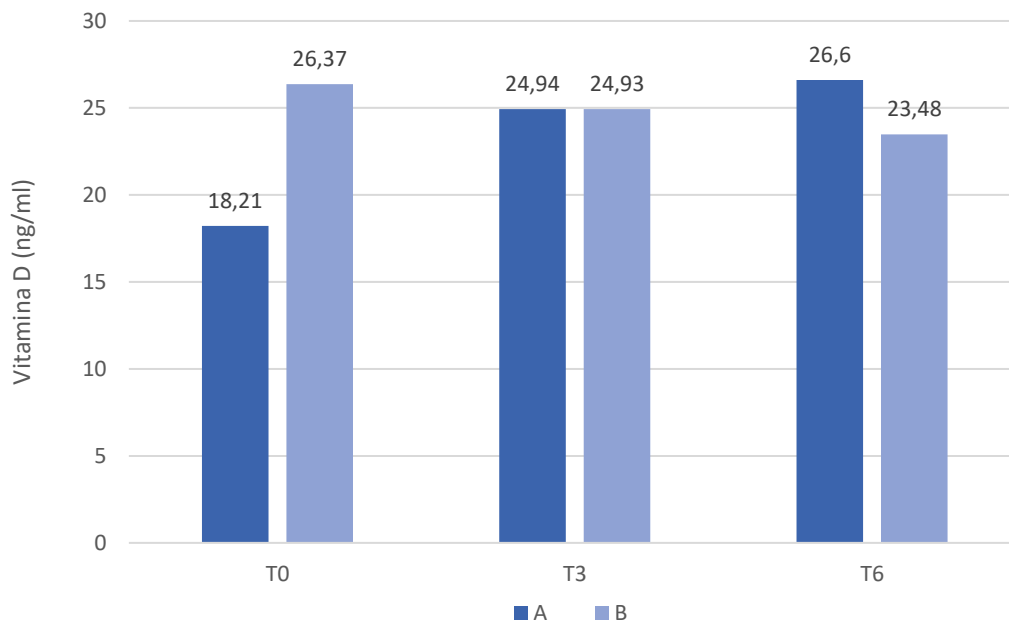


Tabella 4.5. Parametri al T3 e variazione rispetto al T0.

	Gruppo A (n = 18)	Gruppo B (n = 17)	p
TTG-IgA (U/ml)	20,41 ± 21,19	53,65 ± 69,23	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-83,08 ± 12,86	-77,00 ± 20,37	NS
TTG IgA < 7 U/ml (%)	46,67	11,76	0,049
Ferritina (ng/ml)	19,82 ± 12,81	24,44 ± 18,03	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-6,52 ± 41,86	10,63 ± 52,20	NS
Vitamina D (ng/ml)	24,94 ± 11,64	24,93 ± 9,03	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	40,61 ± 48,33	1,69 ± 47,26	0,037
BMI (kg/m²)	18,76 ± 3,01	17,57 ± 2,30	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	1,70 ± 4,41	4,63 ± 6,44	NS
Calprotectina < 50 mg/kg (%)	72,22	70,59	NS
Bristol Stool Chart	3,00 ± 0,89	3,00 ± 0,97	NS
Compliance all'intervento (%)	89,80 ± 15,81	90,04 ± 11,79	NS

BMI: Body Mass Index; TTG-IgA: tissue transglutaminase immunoglobulin-A (valori normali < 7 U/ml); compliance all'intervento espressa come percentuale di bustine assunte.

Tabella 4.6. Parametri al T6 e variazione rispetto al T0.

	Gruppo A (n =18)	Gruppo B (n =15)	p
TTG-IgA (U/ml)	12,25 ± 12,00	219,67 ± 22,96	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	-88,16 ± 11,22	-90,92 ± 7,22	NS
TTG IgA < 7 U/ml (%)	55,56	13,33	0,027
Ferritina (ng/ml)	19,40 ± 6,58	26,68 ± 13,84	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	6,79 ± 68,91	19,01 ± 60,88	NS
Vitamina D (ng/ml)	26,6 ± 9,95	23,49 ± 9,01	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	56,80 ± 75,69	14,77 ± 52,73	NS
BMI (kg/m²)	18,69 ± 3,47	18,13 ± 2,50	NS
Variazione rispetto al T0 (%)	3,14 ± 5,92	7,50 ± 8,61	NS
Bristol	3,08 ± 0,77	2,63 ± 0,89	NS
Calprotectina < 50 mg/kg (%)	93,75	90,00	NS

BMI: Body Mass Index; TTG-IgA: tissue transglutaminase immunoglobulin-A (valori normali < 7 U/ml)

4.4 Discussione

La dieta priva di glutine è l'unico trattamento attualmente disponibile per la malattia celiaca ed è in grado di determinare la normalizzazione delle lesioni intestinali, la negativizzazione degli autoanticorpi e la scomparsa dei sintomi presenti all'esordio. Questo miglioramento clinico, laboratoristico e istologico è graduale e avviene generalmente entro 12-24 mesi. Le tempistiche del recupero indotto dalla dieta senza glutine sono variabili da paziente a paziente e dipendono da numerosi fattori quali la modalità di presentazione (tipica, atipica, silente), l'età di esordio, l'aderenza al trattamento e, secondo dati recenti, anche dalla tipologia quantitativa e qualitativa del microbiota intestinale.⁶⁶

La persistenza di una lesione intestinale minima e di una sintomatologia sfumata soprattutto gastroenterica non è rara, soprattutto per la difficoltà di mantenere nel tempo una dieta “a zero contenuto di glutine”.⁶¹ Non ci sono ancora metodi abbastanza efficaci e *cost-effective* per verificare “in tempo reale” eventuali trasgressioni e ingestioni accidentali di glutine che comunque possono inficiare il recupero istologico della mucosa intestinale del celiaco^{67,69}; inoltre, necessitando di una stretta aderenza per tutta la vita, la GFD può dar luogo a problematiche di tipo psico-sociale non trascurabili.⁵³

Non per ultimo, l'1-1,5% dei pazienti celiaci è affetto da celiachia refrattaria in cui la GFD non si dimostra sufficiente ad ottenere la remissione clinica e la guarigione istologica.³⁶

Per questi motivi negli ultimi anni si è diffuso molto interesse verso la ricerca di terapie alternative e/o complementari alla GFD.

Le nuove scoperte riguardanti il contributo del microbiota intestinale al mantenimento della barriera intestinale, alla regolazione del sistema immunitario e alla digestione dei peptidi del glutine (paragrafo 3.4) insieme alla sempre maggiore consapevolezza dello squilibrio microbiologico che caratterizza l'intestino del paziente celiaco (paragrafo 3.2) hanno aperto la strada alla ricerca di terapie complementari basate sull'uso dei probiotici.

Sono stati condotti numerosi studi in vitro e su modelli animali che hanno dimostrato come alcuni ceppi batterici siano in grado di digerire il glutine riducendone l'immunogenicità.¹³² Di Cagno et al. hanno dimostrato che i prodotti da forno realizzati utilizzando un lievito naturale con farina di frumento fermentata da proteasi di lattobacilli e funghi, possono essere assunti con sicurezza da pazienti celiaci, suggerendo una possibile strategia terapeutica complementare per migliorare l'efficacia della GFD, alleviare i problemi delle restrizioni della dieta aglutinata e mitigare gli effetti di un'esposizione accidentale di glutine in pazienti celiaci in trattamento.

Oltre alla loro azione sulla degradazione del glutine, alcuni microrganismi hanno importanti effetti sulla permeabilità intestinale dei pazienti celiaci e sono in grado di modularne la risposta immunitaria.¹²⁸ Anche per questi motivi, la somministrazione di probiotici che aiutino a ripristinare l'equilibrio del microbiota intestinale del paziente celiaco potrebbe rappresentare una ragionevole opzione terapeutica.¹³³

In virtù dei risultati di studi recenti che suggeriscono che il microbiota possa avere un ruolo anche nelle manifestazioni cliniche della malattia celiaca⁷⁵, alcuni gruppi di ricerca hanno concentrato la loro attenzione sul valutare se, ristabilendo un'adeguata flora microbica tramite l'uso di probiotici, si riscontrino benefici dal punto di vista del recupero clinico del bambino celiaco. Tuttavia, i trials clinici finora pubblicati con l'obiettivo di studiare gli effetti della supplementazione di probiotici sulla sintomatologia e sui parametri laboratoristici del paziente celiaco sono ancora pochi e riportano risultati discordanti.

Smecuol et al. hanno condotto uno studio con 22 pazienti a cui è stato somministrato *Bifidobacterium infantis* o placebo prima dell'inizio della dieta priva di glutine con lo scopo di valutare eventuali effetti del probiotico indipendenti dalla dieta. Hanno riscontrato un significativo miglioramento di specifici sintomi gastrointestinali, suggerendo un ruolo dei probiotici nell'alleviare i sintomi anche nei pazienti non in trattamento.¹⁴⁰

La somministrazione di *Bifidobacterium longum* CECT 7347 è stata associata a un aumento del percentile di crescita, una ridotta conta di linfociti T CD3+ periferici e ridotti livelli di TNF- α in 18 pazienti celiaci di nuova diagnosi in trattamento con dieta senza glutine.¹³⁷

Tre trials controllati randomizzati hanno riportato che una supplementazione di *Bifidobacterium breve* (B632 e BR03) per tre mesi sui bambini celiaci in dieta senza glutine può portare ad un aumento di *Actinobacteria* e un ripristino del rapporto *Firmicutes/Bacteroides*⁹⁶, una riduzione dei livelli di TNF α ¹⁴³ e una modulazione nella produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) nel gruppo trattato con probiotico rispetto al gruppo placebo seppure queste modificazioni non si siano rivelate costanti nel tempo. Harnett et al. hanno randomizzato 45 pazienti celiaci con sintomi gastrointestinali persistenti a ricevere *VSL#3* o placebo per 3 mesi e non hanno riscontrato modificazioni del microbiota fecale, dei parametri sierologici né miglioramento dei sintomi nel corso dello studio. Al contrario, Francavilla et al. hanno recentemente evidenziato che una miscela di ceppi probiotici, in particolare appartenenti alle specie *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, somministrata per tre settimane, è in grado di migliorare in maniera marcata la sintomatologia gastrointestinale tipo colon irritabile di pazienti celiaci in trattamento dietetico. Inoltre, l'intervento ha indotto una modificazione del microbiota intestinale, caratterizzata da un aumento dei bifidobatteri, ancora rilevabile 6 settimane dopo la sospensione dei probiotici.¹

Inserendosi in questo scenario, lo studio presentato in questa tesi è un trial clinico randomizzato in doppio cieco controllato con placebo che si pone l'obiettivo di valutare l'efficacia di una miscela di specifici ceppi di bifidobatteri e lattobacilli somministrata per 3 mesi nell'accelerare il miglioramento clinico e laboratoristico del bambino celiaco che inizia la dieta priva di glutine. In particolare, è stato posto come *endpoint primario* la determinazione del miglioramento sintomatologico riportato dai pazienti, standardizzata tramite l'indice VDSS.

I risultati preliminari dello studio (paragrafo 4.3) mostrano che le variazioni della sintomatologia dopo tre mesi di trattamento e dopo tre mesi dal termine dello stesso, seppure presenti, non possono essere attribuite alla somministrazione del probiotico, in quanto la differenza tra il gruppo che assumeva probiotico e il gruppo che assumeva placebo non era significativa. Tuttavia, dall'analisi dei sottogruppi effettuata per verificare la variazione dei sintomi nei pazienti sintomatici distinti dai pazienti asintomatici, è emersa una riduzione dei sintomi maggiore nel gruppo A rispetto al gruppo B a 3 e 6 mesi dall'avvio del trattamento; tale differenza, seppur evidente, non raggiunge il livello di significatività, probabilmente a causa della ridotta dimensione campionaria. I risultati definitivi del progetto su un più ampio numero di pazienti potranno fornire maggiori indicazioni al riguardo. Inoltre, l'analisi dei singoli sintomi compresi nel questionario VDSS utilizzato nello studio, in particolare dei sintomi tipici gastrointestinali (es. diarrea, stipsi, dolore addominale, meteorismo, inappetenza) ha mostrato dei risultati interessanti. Da questa analisi, infatti, è emerso un miglioramento significativo rispetto al basale nel gruppo A sia dopo 3 mesi di trattamento che dopo 6 mesi per quanto riguarda specifici sintomi gastrointestinali quali il dolore addominale, il meteorismo, la diarrea e l'epigastralgia, mentre nel gruppo B non si è osservata una differenza significativa né dopo 3 mesi né dopo 6 mesi di trattamento per gli stessi sintomi. Inoltre, la percezione dello stato di salute da parte dei bambini appartenenti al gruppo A ha mostrato un significativo miglioramento nel corso del follow-up. È stata riscontrata, infatti, una continua riduzione del punteggio riguardante domande del questionario volte a valutare la qualità della vita del bambino celiaco in termini di percezione del proprio stato di salute in generale e in relazione alla malattia. Tale miglioramento non è invece risultato significativo nel gruppo B. Pertanto, dall'analisi dei sintomi è possibile ipotizzare che il gruppo A abbia tratto beneficio dal trattamento probiotico, anche se solo l'apertura del cieco potrà confermare questa ipotesi.

Anche dall'analisi degli outcome secondari, sono state evidenziate differenze tra i due gruppi di intervento in termini di tempistiche di negativizzazione dei livelli di TTG-IgA e aumento dei valori di vitamina D, che potrebbero essere risultato del trattamento. In

particolare, nell'ambito del gruppo A si è osservata una percentuale di pazienti che ha raggiunto la negativizzazione anticorpale dopo i primi tre mesi di trattamento e dopo tre mesi dal termine del trattamento significativamente più alta rispetto al gruppo B. La negativizzazione anticorpale è un affidabile marcatore della guarigione mucosale; pertanto, è possibile ipotizzare che i bambini del gruppo A abbiano raggiunto più velocemente la *restitutio ad integrum mucosale* rispetto al gruppo B e che verosimilmente tale effetto sia legato alla somministrazione del probiotico. Inoltre, sempre nel gruppo A abbiamo osservato un aumento significativo dei livelli di vitamina D dopo i primi tre mesi di trattamento. L'effetto del microbiota intestinale sulla produzione di vitamina D è stato recentemente dimostrato da numerosi studi, che evidenziano come la composizione del microbiota intestinale può influenzare l'espressione del recettore della vitamina D, della proteina legante la vitamina D e degli enzimi attivatori.¹⁴⁶ Il ripristino di una eubiosi grazie al trattamento probiotico può aver ristabilito l'equilibrio e consentito un miglioramento nella produzione di vitamina D. Questo risultato è estremamente interessante, alla luce delle attuali linee guida europee che raccomandano di mantenere livelli adeguati di vitamina D nell'età pediatrica, in quanto la carenza di vitamina D è considerata una delle principali cause di bassa densità minerale ossea e conseguente rischio di fratture, ma anche e soprattutto per i suoi numerosi effetti extra-scheletrici, con un possibile ruolo preventivo in diverse condizioni, tra cui malattie infettive, asma, malattie autoimmuni e rischio cardiovascolare.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

In conclusione, l'insieme dei nostri risultati consente di ipotizzare che il gruppo A abbia assunto il Pentabiocel e il gruppo B il placebo. Se questa ipotesi venisse confermata dall'apertura del cieco, che avverrà dopo aver completato la valutazione degli ultimi pazienti in follow-up, i risultati dello studio potrebbero avvalorare l'ipotesi secondo cui una miscela di ceppi probiotici selezionati, possa favorire un più rapido recupero clinico e laboratoristico del bambino celiaco in dieta senza glutine.

Non sono state eseguite biopsie intestinali nel corso del follow-up, di conseguenza non è noto se il più rapido miglioramento di alcuni sintomi gastrointestinali e dei parametri bioumorali del gruppo A corrisponda ad un migliore e più veloce recupero istologico.

I risultati preliminari esposti in questa tesi non includono le analisi del microbiota fecale raccolto in corso del follow-up dei pazienti che verrà analizzato solo al termine della raccolta dei dati e delle analisi statistiche complete, in modo tale da non inficiare la validità del cieco e i risultati definitivi dello studio. La valutazione del microbiota intestinale sarà fondamentale per capire se il tipo di probiotico, il dosaggio e le tempistiche di somministrazione siano adeguate ad indurre una modificazione della flora intestinale del paziente celiaco temporanea o duratura.

4.5 Conclusioni

Dai risultati preliminari dello studio risulta che un gruppo di intervento ha ottenuto un più rapido miglioramento delle principali manifestazioni gastrointestinali attribuibili alla malattia celiaca rispetto al gruppo di controllo, in particolare riguardo specifici sintomi quali il dolore addominale, l'epigastralgia, il meteorismo e la diarrea. È stato osservato anche una più celere ottimizzazione della percezione dello stato di salute da parte del bambino stesso. In aggiunta, lo stesso gruppo ha ottenuto una più rapida negativizzazione dei livelli anticorpali e un maggiore incremento dei valori della vitamina D. Queste differenze potrebbero indicare, se confermate dai risultati definitivi dello studio in seguito all'apertura del cieco, che la supplementazione con Pentabiocel nel paziente celiaco associato alla dieta priva di glutine potrebbe avere un ruolo nel determinare un miglioramento più rapido del quadro bioumorale, della sintomatologia e della qualità della vita del bambino celiaco.

Visto l'interesse crescente riguardo l'integrazione con probiotici nel trattamento della malattia celiaca, ulteriori futuri studi potranno avvalorare o confutare il razionale dell'utilizzo degli stessi nella pratica clinica.

ALLEGATI

Allegato 1 : Questionario di valutazione dell'aderenza alla dieta priva di glutine

(versione modificata del questionario allegato al manoscritto "Assessment of dietary compliance in celiac children using a standardized dietary interview" Wessels et al. - DOI:

10.1016/j.clnu.2017.04.010)

Tra parentesi i punti assegnati ad ogni risposta che determineranno i seguenti punteggi: 0-2 dieta senza glutine rigorosa; 3-20 dieta senza glutine con errori significativi; 21-84 dieta senza glutine non seguita

1. Segui una dieta senza glutine? Sì(0)/No(84)

Se no, perché? (seleziona le risposte più appropriate)

- Perché non ho disturbi legati all'assunzione di glutine
- Perché è troppo complicato
- Perché è troppo costoso
- Altro:.....

Il questionario termina qui se la tua risposta è stata "No".

2. Assumi glutine accidentalmente? Sì/No.

Se sì: (seleziona la risposta più appropriata)

- Tutti i giorni (2)
- Una volta a settimana (1)
- Una volta al mese (0)
- Una volta all'anno (0)

3. Assumi glutine volontariamente? Sì/No

Se sì, si tratta di: (seleziona la risposta più appropriata)

- Pane/cereali: ogni giorno (5), una volta a settimana (4), una volta al mese (2), una volta all'anno (0)
- Pasta: ogni giorno (5), una volta a settimana (4), una volta al mese (2), una volta all'anno (0)
- Pizza: ogni giorno (5), una volta a settimana (4), una volta al mese (2), una volta all'anno (0)

- Pasticceria: ogni giorno (5), una volta a settimana (4), una volta al mese (2), una volta all'anno (0)
- Frittura: ogni giorno (3), una volta a settimana (2), una volta al mese (1), una volta all'anno (0)
- Barrette dolci, caramelle, patatine, noci: ogni giorno (2), una volta a settimana (1), una volta al mese (0), una volta all'anno (0)
- Altro:.....: ogni giorno (3), una volta a settimana (2), una volta al mese (1), una volta all'anno (0)

Se sì, assumo volontariamente glutine: (seleziona le risposte più appropriate)

- A casa
- A casa di altri familiari
- Durante le serate con gli amici
- In occasioni speciali (compleanno, feste...)
- Quando mangio fuori
- A lavoro
- Quando faccio sport
- Quando sono in vacanza

4. Se c'è una piatto speciale la mangio anche se potrebbe contenere glutine. Sì(2)/No(0).

5. Quando mangio fuori casa mi accerto di informare accuratamente chi si occuperà del cibo. Sì/No.

Se no, non lo faccio: (seleziona le risposte più appropriate)

- Quando sono in vacanza (3)
- Quando sono in viaggio per lavoro (3)
- Quando trascorro la notte fuori (2)
- Quando sono ad una festa (1)

6. A casa sono l'unico a seguire una dieta priva di glutine. Sì/No.

Se no, chi altro?

- Moglie/marito
- Fratello/sorella
- Padre
- Madre

7. A casa, oltre ai prodotti privi di glutine, sono presenti anche alimenti contenenti glutine. Sì/No.

Se sì:

- I prodotti contenenti glutine sono conservati separatamente dai prodotti senza glutine. Sì(0)/No(2).

- Altre persone, che non seguono una dieta senza glutine, usano burro e altri condimenti spalmabili non contenenti glutine. Sì/No.
 - o Se sì, vengono usate posate pulite? Sì(0)/No(2).
- Se vengono usate farine contenenti glutine e non, quella priva di glutine viene usata per prima. Sì(0)/No(2).

8. Il cibo senza glutine viene sempre preparato usando mani, piano di lavoro e strumenti puliti. Sì(0)/No(2).

9. Se necessario, il cibo senza glutine viene preparato usando tostapane, friggitrice e teglie personali. Sì(0)/No(2).

10. Consumo pane senza glutine. Sì/No.

Se sì, si tratta di pane:

- Cotto in casa, usando farina con marchio “gluten free”. Sì/No.
- Preconfezionato. Sì(0)/No(5).
- Comprato in un forno locale che produce pane artigianale. Sì(2)/No(0).

Se no, perché:

- Non mangio pane. Sì/No.
- Mangio pane contenente glutine. Sì(5)/No(0).

11. Consumo soltanto pasta con il marchio “gluten free”. Sì(0)/No(3).

12. Consumo prodotti di pasticceria e cereali esclusivamente con il marchio “gluten free”. Sì(0)/No(3).

13. Consumo farine naturalmente prive di glutine (come mais, riso, grano saraceno, avena, quinoa, teff). Sì/No.

Se sì, soltanto con il marchio “gluten free”. Sì(0)/No(3).

14. Consumo alimenti contenenti amido di grano. Sì/No.

Se sì: (selezionare la risposta più appropriata)

- Ogni giorno (2)
- Una volta a settimana (1)
- Una volta al mese (0)
- Una volta all'anno (0)

15. Consumo alimenti contenenti amido di grano senza glutine. Sì/No.

16. Consumo alimenti che presentano la dicitura “può contenere tracce di glutine”. Sì/No.

Se sì: (selezionare la risposta più appropriata)

- Ogni giorno (2)
- Una volta a settimana (1)
- Una volta al mese (0)
- Una volta all'anno (0)

17. Consumo cibi che presentano la dicitura “prodotto in uno stabilimento in cui vengono lavorati anche glutine e grano”. Sì/No.

Se sì: (selezionare la risposta più appropriata)

- Ogni giorno (2)
- Una volta a settimana (1)
- Una volta al mese (0)
- Una volta all'anno (0)

18. Bevo birra contenente glutine. Sì/No.

Se sì: (selezionare la risposta più appropriata)

- Ogni giorno (2)
- Una volta a settimana (1)
- Una volta al mese (0)
- Una volta all'anno (0)

19. Quando ho bisogno di assumere un farmaco mi assicuro che non contenga glutine. Sì(0)/No(1).

20. Se non ho la certezza che un certo alimento sia privo di glutine:

- Controllo l'eventuale presenza del marchio “gluten free”. Sì/No.
- Leggo l'elenco degli ingredienti. Sì/No.
- Faccio un controllo incrociato con la lista dei prodotti senza glutine presenti nel Prontuario AIC. Sì/No.
- Chiedo al produttore. Sì/No.
- Lo mangio e osservo la comparsa di eventuali malesseri. Sì/No.

21. Quando assumo alimenti contenenti glutine avverto dei malesseri. Sì/No.

Se sì: (selezionare le risposte più appropriate)

- Dolore addominale. Sì/No.
- Diarrea. Sì/No.
- Vomito. Sì/No.
- Spossatezza. Sì/No.
- Perdita di appetito. Sì/No.
- Altro:.....

22. Credo di avere una conoscenza adeguata della dieta senza glutine. Sì/No.

23. Mi preoccupo che la mia dieta sia sufficientemente ricca di nutrienti (come proteine, grassi e vitamine). Sì/No.

24. Ritengo importante confrontarmi con un dietista con cadenza regolare. Sì/No.

Se sì: (selezionare la risposta più appropriata)

- Una volta all'anno
- Una volta ogni 2 anni
- Una volta ogni 5 anni
- Altro:.....
- Mi piacerebbe discutere di:.....

25. Ritengo importante confrontarmi con un medico con cadenza regolare. Sì/No.

Se sì, quando: (selezionare la risposta più appropriata)

- Una volta all'anno
- Una volta ogni 2 anni
- Una volta ogni 5 anni
- Altro:.....
- Mi piacerebbe discutere di:.....

26. Seguo anche un altro tipo di dieta oltre a quella priva di glutine. Sì/No.

Se sì, quale: (selezionare la risposta più appropriata)

- Priva di lattosio
- Priva di latte di mucca
- Altro:.....

Allegato 2 : Questionario di valutazione dei sintomi

Validated Disease-Specific Symptom Index for Celiac Disease (VDSS) modificato.

Leffler DA, Dennis M, Edwards George J, Jamma S, Cook F, Schuppan D, and Kelly CP. The Celiac Center, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts.

Domanda	1	2	3	4	5
1. Ha mai avvertito dolore o fastidio all'addome superiore o epigastria nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
2. Ha avuto nausea nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
3. Ha avvertito crampi allo stomaco nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
4. Ha avuto gonfiore durante le ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
5. Ha avuto diarrea nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
6. Ha avuto la sensazione di incompleto svuotamento intestinale nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
7. Ha avuto "crampi da fame" nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
8. Si è sentito stanco nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
9. Ha avuto cefalea nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
10. Ha avvertito impulsi improvvisi ad assumere cibo nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
11. Ha avuto inappetenza nelle ultime 4 settimane?	Mai	Raramente	Qualche volta	Spesso	Sempre
12. Come avverte la sua salute in relazione alla malattia celiaca?	Eccellente	Buona	Indifferente	Scarsa	Orribile
13. Nel complesso, come avverte il suo stato di salute?	Eccellente	Buona	Indifferente	Scarsa	Orribile
14. Quanto dolore ha avuto nelle ultime 4 settimane?	Nessuno	Sopportabile	Un po'	Abbastanza	Molto
15. Sto bene	Fortemente d'accordo	Piuttosto d'accordo	Né d'accordo né in disaccordo	Piuttosto in disaccordo	Fortemente in disaccordo
16. Il mio stato di salute è come quello delle persone che conosco	Fortemente d'accordo	Piuttosto d'accordo	Né d'accordo né in disaccordo	Piuttosto in disaccordo	Fortemente in disaccordo

BIBLIOGRAFIA

1. Francavilla R, Piccolo M, Francavilla A, et al. Clinical and Microbiological Effect of a Multispecies Probiotic Supplementation in Celiac Patients With Persistent IBS-type Symptoms: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled, Multicenter Trial. *J Clin Gastroenterology*. 2019;53(3):117-125. doi:10.1097/MCG.0000000000001023
2. Di Fabio G, Lovello O, Catassi C, et al. LA CELIACHIA NELL'ETA' PEDIATRICA E NELL'ADULTO. *Assoc Ital Celiachia Onlus*. Published online 2018.
3. Fasano A, Catassi C. Celiac disease. *N Engl J Med*. Published online 2012. doi:10.1056/NEJMcp1113994
4. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*. Published online 2010. doi:10.3109/07853890.2010.505931
5. Alarida K, Harown J, Ahmaida A, et al. Coeliac disease in Libyan children: A screening study based on the rapid determination of anti-transglutaminase antibodies. *Dig Liver Dis*. Published online 2011. doi:10.1016/j.dld.2011.01.002
6. Dalgic B, Sari S, Basturk B, et al. Prevalence of celiac disease in healthy Turkish school children. *Am J Gastroenterol*. Published online 2011. doi:10.1038/ajg.2011.183
7. Gupta R, Reddy DN, Makharia GK, et al. Indian task force for celiac disease: Current status. *World J Gastroenterol*. Published online 2009. doi:10.3748/wjg.15.6028
8. Catassi C, Räscht IM, Gandolfi L, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*. Published online 1999. doi:10.1016/S0140-6736(99)02609-4
9. Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Lahr BD, et al. Predictors of Family Risk for Celiac Disease: A Population-Based Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. Published online 2008. doi:10.1016/j.cgh.2008.04.008
10. Volta U, Tovoli F, Caio G. Clinical and immunological features of celiac disease in

patients with Type 1 diabetes mellitus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. Published online 2011. doi:10.1586/egh.11.38

11. Sattar N, Lazare F, Kacer M, et al. Celiac disease in children, adolescents, and young adults with autoimmune thyroid disease. *J Pediatr*. Published online 2011. doi:10.1016/j.jpeds.2010.08.050
12. Wouters J, Weijerman ME, van Furth AM, et al. Prospective Human Leukocyte Antigen, Endomysium Immunoglobulin A Antibodies, and Transglutaminase Antibodies Testing for Celiac Disease in Children with Down Syndrome. *J Pediatr*. Published online 2009. doi:10.1016/j.jpeds.2008.08.007
13. Frost AR, Band MM, Conway GS. Serological screening for coeliac disease in adults with Turner's syndrome: Prevalence and clinical significance of endomysium antibody positivity. *Eur J Endocrinol*. Published online 2009. doi:10.1530/EJE-08-0846
14. Lenhardt A, Plebani A, Marchetti F, et al. Role of human-tissue transglutaminase IgG and anti-gliadin IgG antibodies in the diagnosis of coeliac disease in patients with selective immunoglobulin A deficiency. *Dig Liver Dis*. Published online 2004. doi:10.1016/j.dld.2004.06.017
15. Lundin KEA, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease - Genetic overlap and screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Published online 2015. doi:10.1038/nrgastro.2015.136
16. Mazzilli MC, Ferrante P, Mariani P, et al. A study of Italian pediatric celiac disease patients confirms that the primary HLA association is to the DQ(α 1*0501, β 1*0201) heterodimer. *Hum Immunol*. Published online 1992. doi:10.1016/0198-8859(92)90064-T
17. Dieli-Crimi R, Cénit MC, Núñez C. The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *J Autoimmun*. Published online 2015. doi:10.1016/j.jaut.2015.07.003

18. Cristofori F, Indrio F, Miniello VL, De Angelis M, Francavilla R. Probiotics in celiac disease. *Nutrients*. 2018;10(12):1-13. doi:10.3390/nu10121824
19. Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: Role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Published online 2015. doi:10.1038/nrgastro.2015.90
20. Galipeau H, McCarville JL, Moeller S, et al. Gluten-Induced Responses in NOD/DQ8 Mice Are Influenced by Bacterial Colonization. *Gastroenterology*. 2014;146(5):S-833. doi:10.1016/s0016-5085(14)63025-0
21. Ivarsson A, Persson L, Nyström L, et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. Published online 2000. doi:10.1111/j.1651-2227.2000.tb01210.x
22. Ivarsson A, Myléus A, Norström F, et al. Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. *Pediatrics*. Published online 2013. doi:10.1542/peds.2012-1015
23. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, et al. Timing of Initial Cereal Exposure in Infancy and Risk of Islet Autoimmunity. *J Am Med Assoc*. Published online 2003. doi:10.1001/jama.290.13.1713
24. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *J Am Med Assoc*. Published online 2005. doi:10.1001/jama.293.19.2343
25. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, et al. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med*. 2014;371(14):1295-1303. doi:10.1056/NEJMoa1400697
26. Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, et al. Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med*. Published online 2014. doi:10.1056/NEJMoa1404172

27. Zanoni G, Navone R, Lunardi C, et al. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med*. Published online 2006. doi:10.1371/journal.pmed.0030358
28. Dolcino M, Zanoni G, Bason C, et al. A subset of anti-rotavirus antibodies directed against the viral protein VP7 predicts the onset of celiac disease and induces typical features of the disease in the intestinal epithelial cell line T84. *Immunol Res*. Published online 2013. doi:10.1007/s12026-013-8420-0
29. Lammers KM, Lu R, Brownley J, et al. Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. *Gastroenterology*. Published online 2008. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.023
30. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. Published online 2006. doi:10.1080/00365520500235334
31. Vivas S, Ruiz De Morales JM, Fernandez M, et al. Age-related clinical, serological, and histopathological features of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. Published online 2008. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.01977.x
32. Reilly NR, Aguilar K, Hassid BG, et al. Celiac disease in normal-weight and overweight children: Clinical features and growth outcomes following a gluten-free diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Published online 2011. doi:10.1097/MPG.0b013e3182276d5e
33. Volta U, Caio G, Stanghellini V, De Giorgio R. The changing clinical profile of celiac disease: A 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center. *BMC Gastroenterol*. Published online 2014. doi:10.1186/s12876-014-0194-x
34. Baydoun A, Maakaron JE, Halawi H, Abou Rahal J, Taher AT. Hematological manifestations of celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. Published online 2012. doi:10.3109/00365521.2012.706828

35. Kamycheva E, Goto T, Camargo CA. Celiac disease is associated with reduced bone mineral density and increased FRAX scores in the US National Health and Nutrition Examination Survey. *Osteoporos Int*. Published online 2017. doi:10.1007/s00198-016-3791-4
36. Caio G, Volta U, Sapone A, et al. Celiac disease: A comprehensive current review. *BMC Med*. Published online 2019. doi:10.1186/s12916-019-1380-z
37. Leffler DA, Green PHR, Fasano A. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Published online 2015. doi:10.1038/nrgastro.2015.131
38. Caio G, De Giorgio R, Volta U. Coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Lancet*. Published online 2018. doi:10.1016/S0140-6736(18)31486-7
39. Auricchio R, Mandile R, Del Vecchio MR, et al. Progression of Celiac Disease in Children With Antibodies Against Tissue Transglutaminase and Normal Duodenal Architecture. *Gastroenterology*. Published online 2019. doi:10.1053/j.gastro.2019.04.004
40. Protocollo per la diagnosi ed il follow-up della malattia celiaca. *Gazz Uff della Repubb Ital*. Published online 2015:148-158. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
41. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, et al. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Published online 2012. doi:10.1097/MPG.0b013e31821a23d0
42. Amari S, Alvisi P, De Giorgio R, et al. Antibodies to deamidated gliadin peptides: An accurate predictor of coeliac disease in infancy. *J Clin Immunol*. Published online 2013. doi:10.1007/s10875-013-9888-z
43. Dipper CR, Maitra S, Thomas R, et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies in the follow-up of adult coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Published online 2009. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04039.x

44. Volta U, Caio G, Boschetti E, et al. Seronegative celiac disease: Shedding light on an obscure clinical entity. *Dig Liver Dis*. Published online 2016. doi:10.1016/j.dld.2016.05.024
45. Fernández-Bañares F, Carrasco A, García-Puig R, et al. Intestinal intraepithelial lymphocyte cytometric pattern is more accurate than subepithelial deposits of anti-tissue transglutaminase IgA for the diagnosis of celiac disease in lymphocytic enteritis. *PLoS One*. Published online 2014. doi:10.1371/journal.pone.0101249
46. Kurppa K, Mearin L, Husby S, et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020;70(1):141-157. doi:10.1097/MPG.0000000000002497
47. Lionetti E, Gatti S, Galeazzi T, et al. Safety of Oats in Children with Celiac Disease: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Pediatr*. Published online 2018. doi:10.1016/j.jpeds.2017.10.062
48. Cardi E, Corazza GR, Fabio G Di, et al. LE CONTAMINAZIONI NELLA DIETA SENZA GLUTINE.
49. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. Published online 2007. doi:10.1093/ajcn/85.1.160
50. Gibert A, Espadaler M, Angel Canela M, Sánchez A, Vaqué C, Rafecas M. Consumption of gluten-free products: Should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Published online 2006. doi:10.1097/01.meg.0000236884.21343.e4
51. Brar P, Kwon GY, Holleran S, et al. Change in Lipid Profile in Celiac Disease: Beneficial Effect of Gluten-Free Diet. *Am J Med*. Published online 2006. doi:10.1016/j.amjmed.2005.12.025

52. Brambilla P, Picca M, Dilillo D, et al. Changes of body mass index in celiac children on a gluten-free diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Published online 2013. doi:10.1016/j.numecd.2011.10.002
53. Simsek S, Baysoy G, Gencoglan S, Uluca U. Effects of gluten-free diet on quality of life and depression in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Published online 2015. doi:10.1097/MPG.0000000000000799
54. Biagi F, Gobbi P, Marchese A, et al. Low incidence but poor prognosis of complicated coeliac disease: A retrospective multicentre study. *Dig Liver Dis*. Published online 2014. doi:10.1016/j.dld.2013.10.010
55. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Choung RS, et al. Increased mortality among men aged 50years old or above with elevated IgA anti-transglutaminase antibodies: NHANES III. *BMC Gastroenterol*. Published online 2016. doi:10.1186/s12876-016-0547-8
56. Di Sabatino A, Brunetti L, Maffè GC, Giuffrida P, Corazza GR. Is it worth investigating splenic function in patients with celiac disease? *World J Gastroenterol*. Published online 2013. doi:10.3748/wjg.v19.i15.2313
57. Caraceni P, Benazzi B, Caio G, Zaccherini G, Domenicali M, Volta U. Hyposplenism as a cause of pneumococcal meningoencephalitis in an adult patient with coeliac disease. *Ital J Med*. Published online 2011. doi:10.1016/j.itjm.2011.02.005
58. Malamut G, Cellier C. Complications of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Published online 2015. doi:10.1016/j.bpg.2015.05.005
59. Rantalainen T, Weeks BK, Nogueira RC, Beck BR. Effects of bone-specific physical activity, gender and maturity on tibial cross-sectional bone material distribution: A cross-sectional pQCT comparison of children and young adults aged 5-29years. *Bone*. Published online 2015. doi:10.1016/j.bone.2014.11.015

60. Trovato CM, Albanese C V., Leoni S, et al. Lack of clinical predictors for low mineral density in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Published online 2014. doi:10.1097/MPG.0000000000000541
61. Valitutti F, Trovato CM, Montuori M, Cucchiara S. Pediatric Celiac Disease: Follow-Up in the Spotlight. *Adv Nutr An Int Rev J*. Published online 2017. doi:10.3945/an.116.013292
62. Biagi F, Bianchi PI, Marchese A, et al. A score that verifies adherence to a gluten-free diet: A cross-sectional, multicentre validation in real clinical life. *Br J Nutr*. Published online 2012. doi:10.1017/S0007114511007367
63. Wessels MMS, te Lintelo M, Vriezinga SL, Putter H, Hopman EG, Mearin ML. Assessment of dietary compliance in celiac children using a standardized dietary interview. *Clin Nutr*. Published online 2018. doi:10.1016/j.clnu.2017.04.010
64. Kaukinen K, Sulkanen S, Mäki M, Collin P. IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Published online 2002. doi:10.1097/00042737-200203000-00017
65. Hogen Esch CE, Wolters VM, Gerritsen SAM, et al. Specific celiac disease antibodies in children on a gluten-free diet. *Pediatrics*. Published online 2011. doi:10.1542/peds.2010-3762
66. Gidrewicz D, Trevenen CL, Lyon M, Decker Butzner J. Normalization time of celiac serology in children on a gluten-free diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Published online 2017. doi:10.1097/MPG.0000000000001270
67. Leffler D, Schuppan D, Pallav K, et al. Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut*. Published online 2013. doi:10.1136/gutjnl-2012-302196

68. Sugai E, Costa A, de la Paz Temprano M, et al. Detection of Gluten Immunogenic Peptides in Feces and Urine in Patients with Celiac Disease on a Gluten-Free Diet. *Gastroenterology*. Published online 2017. doi:10.1016/s0016-5085(17)30866-1
69. Comino I, Fernández-Bañares F, Esteve M, 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*. Published online 2016. doi:10.1038/ajg.2016.439
70. Sanz Y. Microbiome and Gluten. *Ann Nutr Metab*. Published online 2015. doi:10.1159/000440991
71. Montalto M, D'Onofrio F, Gallo A, Cazzato A, Gasbarrini G. Intestinal microbiota and its functions. *Dig Liver Dis Suppl*. Published online 2009. doi:10.1016/S1594-5804(09)60016-4
72. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, De Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes Nutr*. Published online 2011. doi:10.1007/s12263-011-0229-7
73. Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. Published online 2006. doi:10.1542/peds.2005-2824
74. Pozo-Rubio T, Olivares M, Nova E, et al. Immune development and intestinal microbiota in celiac disease. *Clin Dev Immunol*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/654143
75. Wacklin P, Kaukinen K, Tuovinen E, et al. The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease. *Inflamm Bowel Dis*. Published online 2013. doi:10.1097/MIB.0b013e31828029a9

76. Sánchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Fernández-Murga ML, Sanz Y. Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Appl Environ Microbiol*. Published online 2013. doi:10.1128/AEM.00869-13
77. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol*. Published online 2009. doi:10.1136/jcp.2008.061366
78. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol*. Published online 2008. doi:10.1186/1471-2180-8-232
79. Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: Molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol*. Published online 2011. doi:10.1186/1471-2180-11-219
80. De Palma G, Nadal I, Medina M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol*. Published online 2010. doi:10.1186/1471-2180-10-63
81. Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Published online 2007. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00337.x
82. Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol*. Published online 2007. doi:10.1099/jmm.0.47410-0
83. Schippa S, Iebba V, Barbato M, et al. A distinctive “microbial signature” in celiac pediatric patients. *BMC Microbiol*. Published online 2010. doi:10.1186/1471-2180-10-175

84. Collado MC, Calabuig M, Sanz Y. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol*. Published online 2007.
85. Di Cagno R, Rizzello CG, Gagliardi F, et al. Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. *Appl Environ Microbiol*. Published online 2009. doi:10.1128/AEM.02793-08
86. Ou G, Hedberg M, Hörstedt P, et al. Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*. Published online 2009. doi:10.1038/ajg.2009.524
87. Sánchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal Bacteroides species associated with coeliac disease. *J Clin Pathol*. Published online 2010. doi:10.1136/jcp.2010.076950
88. Nistal E, Caminero A, Vivas S, et al. Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. *Biochimie*. Published online 2012. doi:10.1016/j.biochi.2012.03.025
89. Nistal E, Caminero A, Herrán AR, et al. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: Effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis*. Published online 2012. doi:10.1002/ibd.21830
90. Sánchez E, Ribes-Koninck C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal Staphylococcus spp. and virulent features associated with coeliac disease. *J Clin Pathol*. Published online 2012. doi:10.1136/jclinpath-2012-200759
91. De Meij TGJ, Budding AE, Grasman ME, Kneepkens CMF, Savelkoul PHM, Mearin ML. Composition and diversity of the duodenal mucosa-associated microbiome in children with untreated coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. Published online 2013. doi:10.3109/00365521.2013.775666

92. Cheng J, Kalliomäki M, Heilig HG, et al. Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. *BMC Gastroenterol*. Published online 2013. doi:10.1186/1471-230X-13-113
93. Wacklin P, Laurikka P, Lindfors K, et al. Altered Duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet. *Am J Gastroenterol*. Published online 2014. doi:10.1038/ajg.2014.355
94. Girón Fernández-Crehuet F, Tapia-Paniagua S, Morinigo-Gutiérrez MA, et al. The duodenal microbiota composition in children with active coeliac disease is influenced by the degree of enteropathy. *An Pediatría (English Ed)*. Published online 2016. doi:10.1016/j.anpede.2015.07.018
95. D'Argenio V, Casaburi G, Precone V, et al. Metagenomics reveals dysbiosis and a potentially pathogenic *N. flavescens* strain in duodenum of adult celiac patients. *Am J Gastroenterol*. Published online 2016. doi:10.1038/ajg.2016.95
96. A. Q, I. A, N. B, et al. Effect of bifidobacterium breve on the intestinal microbiota of coeliac children on a gluten free diet: A pilot study. *Nutrients*. Published online 2016.
97. De Palma G, Capilla A, Nadal I, et al. Interplay between human leukocyte antigen genes and the microbial colonization process of the newborn intestine. *Curr Issues Mol Biol*. Published online 2010. doi:10.21775/cimb.012.001
98. de Palma G, Capilla A, Nova E, et al. Influence of milk-feeding type and genetic risk of developing coeliac disease on intestinal microbiota of infants: The PROFICEL study. *PLoS One*. Published online 2012. doi:10.1371/journal.pone.0030791
99. Olivares M, Neef A, Castillejo G, et al. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*. Published online 2015. doi:10.1136/gutjnl-2014-306931

100. Chibbar R, Dieleman LA. The gut microbiota in celiac disease and probiotics. *Nutrients*. 2019;11(10). doi:10.3390/nu11102375
101. Kristensen K, Henriksen L. Cesarean section and disease associated with immune function. *J Allergy Clin Immunol*. Published online 2016. doi:10.1016/j.jaci.2015.07.040
102. Namatovu F, Olsson C, Lindkvist M, et al. Maternal and perinatal conditions and the risk of developing celiac disease during childhood. *BMC Pediatr*. Published online 2016. doi:10.1186/s12887-016-0613-y
103. Nguyen TTH, Kim JW, Park JS, et al. Identification of oligosaccharides in human milk bound onto the toxin a carbohydrate binding site of clostridium difficile. *J Microbiol Biotechnol*. Published online 2016. doi:10.4014/jmb.1509.09034
104. Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem*. Published online 2011. doi:10.1074/jbc.M111.248138
105. Pozo-Rubio T, de Palma G, Mujico JR, et al. Influence of early environmental factors on lymphocyte subsets and gut microbiota in infants at risk of celiac disease; the PROFICEL study. *Nutr Hosp*. Published online 2013. doi:10.3305/nh.2013.28.2.6310
106. Mårild K, Ye W, Lebwohl B, et al. Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: A nationwide case-control study. *BMC Gastroenterol*. Published online 2013. doi:10.1186/1471-230X-13-109
107. Cenit MC, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Intestinal microbiota and celiac disease: Cause, consequence or co-evolution? *Nutrients*. 2015;7(8):6900-6923. doi:10.3390/nu7085314

108. Caminero A, Herrán AR, Nistal E, et al. Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: Isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiol Ecol*. Published online 2014. doi:10.1111/1574-6941.12295
109. Herrán AR, Pérez-Andrés J, Caminero A, et al. Gluten-degrading bacteria are present in the human small intestine of healthy volunteers and celiac patients. *Res Microbiol*. Published online 2017. doi:10.1016/j.resmic.2017.04.008
110. Olivares M, Laparra M, Sanz Y. Influence of bifidobacterium longum CECT 7347 and gliadin peptides on intestinal epithelial cell proteome. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ; 2011. doi:10.1021/jf201212m
111. Sanz Y, Pama G De, Laparra M. Unraveling the ties between celiac disease and intestinal microbiota. *Int Rev Immunol*. Published online 2011. doi:10.3109/08830185.2011.599084
112. Mnard S, Lebreton C, Schumann M, et al. Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *Am J Pathol*. Published online 2012. doi:10.1016/j.ajpath.2011.10.019
113. Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrerio A, Fasano A. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with Non-Celiac gluten sensitivity. *Nutrients*. Published online 2015. doi:10.3390/nu7031565
114. Vorobjova T, Raikkerus H, Kadaja L, et al. Circulating Zonulin Correlates with Density of Enteroviruses and Tolerogenic Dendritic Cells in the Small Bowel Mucosa of Celiac Disease Patients. *Dig Dis Sci*. Published online 2017. doi:10.1007/s10620-016-4403-z
115. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. Intestinal permeability in coeliac disease: Insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut*. Published online 2012. doi:10.1136/gutjnl-2011-300327

116. Cinova J, de Palma G, Stepankova R, et al. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: Study in germ-free rats. *PLoS One*. Published online 2011. doi:10.1371/journal.pone.0016169
117. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science (80-)*. Published online 2012. doi:10.1126/science.1223490
118. Preidis GA, Versalovic J. Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. *Gastroenterology*. 2009;136(6):2015-2031.
119. Tlaskalová-Hogenová H, Tránková R, Kozáková H, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol*. Published online 2011. doi:10.1038/cmi.2010.67
120. Alexander KL, Targan SR, Elson CO. Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. Published online 2014. doi:10.1111/imr.12180
121. Round JL, Lee SM, Li J, et al. The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science (80-)*. Published online 2011. doi:10.1126/science.1206095
122. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. Published online 2013. doi:10.1038/nrmicro2974
123. Leonard MM, Camhi S, Huedo-Medina TB, Fasano A. Celiac disease genomic, environmental, microbiome, and metabolomic (CDGEMM) study design: Approach to the future of personalized prevention of celiac disease. *Nutrients*. Published online 2015. doi:10.3390/nu7115470

124. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr.* 2009;102:1154-1160. doi:10.1017/S0007114509371767
125. Norsa L, Tomba C, Agostoni C, et al. Gluten-free diet or alternative therapy: A survey on what parents of celiac children want. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66:590-594. doi:10.3109/09637486.2015.1064872
126. Auricchio R. Il bambino con malattia celiaca potrà un giorno assumere il glutine ?
Terapie alternative alla dieta : stato dell ' arte. *Giorn Gastr Epatol Nutr Ped* 2016. 2016;VIII:58-64. doi:10.19208/2282-2453-113
127. Valitutti F, Cucchiara S, Fasano A. Celiac disease and the microbiome. *Nutrients.* Published online 2019. doi:10.3390/nu11102403
128. de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, do Carmo Gouveia Peluzio M. Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):482-489. doi:10.1128/CMR.00106-13
129. Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, et al. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: New perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol.* Published online 2007. doi:10.1128/AEM.00260-07
130. Duar RM, Clark KJ, Patil PB, et al. Identification and characterization of intestinal lactobacilli strains capable of degrading immunotoxic peptides present in gluten. *J Appl Microbiol.* Published online 2015. doi:10.1111/jam.12687
131. Francavilla R, De Angelis M, Rizzello CG, Cavallo N, Dal Bello F, Gobbetti M. Selected probiotic lactobacilli have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. *Appl Environ Microbiol.* Published online 2017. doi:10.1128/AEM.00376-17

132. Mandile R, Picascia S, Parrella C, et al. Lack of immunogenicity of hydrolysed wheat flour in patients with coeliac disease after a short-term oral challenge. *Aliment Pharmacol Ther.* Published online 2017. doi:10.1111/apt.14175
133. Francavilla R, Cristofori F, Angelis M De, Aldo B, Italia B. Probiotici e celiachia ... quanto i sintomi resistono alla dieta. *G DI Gastroenterol Epatol E Nutr Pediatr.* Published online 2019:19-21.
134. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, et al. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin Exp Immunol.* Published online 2008. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03635.x
135. Papista C, Gerakopoulos V, Kourelis A, et al. Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics. *Lab Investig.* 2012;92:625-635. doi:10.1038/labinvest.2012.13
136. Caminero A, McCarville JL, Zevallos VF, et al. Lactobacilli Degrade Wheat Amylase Trypsin Inhibitors to Reduce Intestinal Dysfunction Induced by Immunogenic Wheat Proteins. *Gastroenterology.* Published online 2019. doi:10.1053/j.gastro.2019.02.028
137. Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PLoS One.* Published online 2012. doi:10.1371/journal.pone.0030744
138. McCarville JL, Dong J, Caminero A, et al. A commensal *Bifidobacterium longum* strain prevents gluten-related immunopathology in mice through expression of a serine protease inhibitor. *Appl Environ Microbiol.* Published online 2017. doi:10.1128/AEM.01323-17
139. D'Arienzo R, Maurano F, Lavermicocca P, Ricca E, Rossi M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine.* Published online 2009. doi:10.1016/j.cyto.2009.08.003

140. Smecuol E, Hwang HJ, Sugai E, et al. Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of bifidobacterium infantis natrene life start strain super strain in active celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. Published online 2013. doi:10.1097/MCG.0b013e31827759ac
141. Pinto-Sánchez MI, Smecuol EC, Temprano MP, et al. Bifidobacterium infantis NLS Super Strain Reduces the Expression of α -Defensin-5, a Marker of Innate Immunity, in the Mucosa of Active Celiac Disease Patients. *J Clin Gastroenterol*. Published online 2017. doi:10.1097/MCG.0000000000000687
142. M. O, G. C, V. V, Y. S. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of Bifidobacterium longum CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *Br J Nutr*. Published online 2014.
143. Klemenak M, Dolinšek J, Langerholc T, Di Gioia D, Mičetić-Turk D. Administration of Bifidobacterium breve Decreases the Production of TNF- α in Children with Celiac Disease. *Dig Dis Sci*. Published online 2015. doi:10.1007/s10620-015-3769-7
144. Primec M, Klemenak M, Di Gioia D, et al. Clinical intervention using Bifidobacterium strains in celiac disease children reveals novel microbial modulators of TNF- α and short-chain fatty acids. *Clin Nutr*. Published online 2019. doi:10.1016/j.clnu.2018.06.931
145. Harnett J, Myers SP, Rolfe M. Probiotics and the Microbiome in Celiac Disease: A Randomised Controlled Trial. *Evidence-based Complement Altern Med*. Published online 2016. doi:10.1155/2016/9048574
146. Singh P, Kumar M, Al Khodor S. Vitamin D deficiency in the Gulf Cooperation Council: Exploring the triad of genetic predisposition, the gut microbiome and the immune system. *Front Immunol*. Published online 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.01042

147. Saggese G, Peroni D, Vierucci F, et al. Vitamin D in pediatric age: Consensus of the Italian Pediatric Society and the Italian Society of Preventive and Social Pediatrics, jointly with the Italian Federation of Pediatricians. *Ital J Pediatr*. Published online 2018.
148. Aranow C. Vitamin D and the immune system. In: *Journal of Investigative Medicine*. ; 2011. doi:10.2310/JIM.0b013e31821b8755
149. Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, Lubberts E. Vitamin D in autoimmunity: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Immunol*. Published online 2017. doi:10.3389/fimmu.2016.00697