



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
TECNOLOGIE BIOMEDICHE IN MEDICINA CLINICA
XXIX CICLO

**Screening salivare della malattia celiaca in bambini e adolescenti
geneticamente predisposti**

Candidata

Dott.ssa Nicoletta Pietropaoli

Relatore

Prof. Fabio Midulla

Correlatori

Prof. Salvatore Oliva

Dott.ssa Chiara M. Trovato

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

A Roberto, pilastro della mia Casa

INDICE

Abbreviazioni

Abstract

1. La celiachia
2. Parte sperimentale
 - 2.1 Obiettivo dello studio
 - 2.2 Metodi
 - 2.2.1 Disegno dello studio
 - 2.2.2 Determinazione della suscettibilità genetica alla CD
mediante metodica su goccia di sangue
 - 2.2.3 Determinazione della suscettibilità genetica alla CD
mediante sistema Eu-Gen (Eurospital®)
 - 2.2.4 Raccolta dei campioni di saliva e determinazione degli
antitransglutaminasi IgA
 - 2.2.5 Raccolta dei campioni di siero e determinazione delle IgA
sieriche e degli antitransglutaminasi IgA
 - 2.2.6 Esame endoscopico e istologica
 - 2.2.7 Statistica
 - 2.3 Risultati
 - 2.3.1 Popolazione
 - 2.3.2 Analisi statistica
 - 2.4 Discussione
3. Bibliografia

ELENCO DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

Figura 1. Disegno dello studio

Tabella 1. Test di Mc Nemar

Abbreviazioni

Ab: anticorpi

TGA-IgA: anti-transglutaminasi tissutale tipo 2

CD: celiachia

CTLs: linfociti T citotossici

DGP: peptidi deamidati della gliadina

EGDS: esofagogastrodueodenoscopia

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EMA: anticorpi anti-endomisio

ESPGHAN: European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

GFD: Dieta senza glutine

HLA: Antigene leucocitario umano

IEL: linfociti intraepiteliali

IFI: immunofluorescenza indiretta

IFN: interferon

IgA: immunoglobuline A

IgG: immunoglobuline G

IL: interleuchina

MHC: complesso maggiore di istocompatibilità

PCD: celiachia potenziale

RIA: sistema radioimmunoassorbente

T1DM: diabete mellito di tipo 1

Treg: regulatory T cells

TG2: transglutaminasi di tipo 2

ULN: upper limit normal (sopra il limite di normalità)

Abstract

Introduzione: La celiachia (CD) è un disordine multifattoriale in cui il test genetico è di rilevanza clinica fondamentale. La malattia, infatti, solo raramente si sviluppa in assenza di aplotipi HLA-DQ2 e/o HLA-DQ8. Il quadro clinico della CD è estremamente variabile e, spesso, i pazienti sono asintomatici; pertanto, è di fondamentale importanza un intervento di prevenzione mirato alla diagnosi precoce di malattia nei soggetti a rischio.

Obiettivo: Screening salivare mediante determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA (TGA-IgA) con metodica radioimmunologica (RIA) per la diagnosi precoce di CD in una coorte di soggetti geneticamente predisposti.

Metodi: Sono stati arruolati 883 bambini frequentanti due scuole primarie del Comune di Roma e 91 familiari di I grado di pazienti celiaci seguiti presso l'ambulatorio di Gastroenterologia Pediatrica del Policlinico Umberto I. 289 scolari e 70 familiari sono risultati geneticamente predisposti. 359 campioni di saliva sono stati raccolti e analizzati per il dosaggio dei TGA IgA con metodo RIA; contestualmente sono stati raccolti 359 campioni di siero per la determinazione dei TGA-IgA con metodo RIA ed ELISA. I bambini con TGA-IgA positivi sono stati successivamente inseriti nell'iter diagnostico previsto dalle Linee Guida ESPGHAN 2020. La sensibilità e la specificità di entrambe le metodiche sono state calcolate confrontando i risultati con le diagnosi eseguite secondo i criteri EPSGHAN 2020. Il test salivare è stato confrontato con la metodica ELISA su siero mediante l'utilizzo del test di Mc Nemar.

Risultati: In una prima fase dello studio sono stati arruolati 359 soggetti geneticamente predisposti. Di questi, 19 bambini (5.3%) sono risultati positivi al test salivare: 16 bambini (84.2%) sono stati confermati alla determinazione sierologica con metodo RIA ed ELISA ed hanno ricevuto la diagnosi di CD; in particolare, 9 hanno mostrato valori di anticorpi TGA-IgA superiori di 10x il range di riferimento e anti-endomisio (EMA) positivi, mentre i restanti 7 bambini con valori inferiori a 10x sono stati sottoposti ad esofagogastroduodenoscopia (EGDS) che ha mostrato le tipiche lesioni istologiche. Un bambino (5.3%) con screening salivare positivo confermato con metodica RIA sul siero, ma con anticorpi negativi con ELISA è stato sottoposto ad EGDS che ha confermato la diagnosi. 2 bambini (10.5%) con valori salivari debolmente positivi non si sono confermati sul siero con entrambi i metodi e non hanno proseguito il follow-up.

Due dei 340 bambini (0.6%) con screening salivare negativo hanno mostrato valori sierici positivi con metodo RIA ed ELISA e hanno ricevuto la conferma istologica di CD. I restanti 338 bambini (99.4%) negativi al test salivare si sono confermati negativi alle determinazioni sierologiche con entrambi i metodi.

Il test salivare con metodo RIA ha mostrato una sensibilità pari a 94.4% (IC 95% 0.914-0.965) e una specificità pari a 99.4% (IC 95% 0.977-0.999); la sensibilità e specificità del metodo RIA su siero sono state del 100% (IC 95% 0.987-1); quelle del metodo ELISA sono state rispettivamente del 94.7% (IC 95% 0.918-0.967) e 100% (IC 95% 0.987-1). Il test di Mc Nemar ha mostrato la completa sovrapposibilità dei due test in esame ($p=1$).

Conclusioni: La metodica RIA su saliva ha mostrato risultati sovrapponibili a quelli ottenuti su siero con metodica ELISA; potrebbe rappresentare pertanto un valido test di screening affidabile, semplice, riproducibile, economico e non invasivo. Insieme al kit Gene Celiac Screen, anch'esso poco invasivo, di facile utilizzo ed economico, potrebbe essere inserita in una strategia di screening di massa per la celiachia.

1. La celiachia

La celiachia (CD) è una enteropatia su base autoimmune causata da una inappropriata risposta immunitaria all'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti.

Si tratta di una patologia ad eziologia multifattoriale su cui agiscono componenti ambientali, immunologiche e genetiche e che si manifesta come un'intolleranza permanente alla gliadina (una frazione proteica del glutine) e ad altre prolamine presenti nella segale (secalina) e nell'orzo (ordeina).

Tale condizione è caratterizzata dalla concomitante presenza di anticorpi circolanti (anti-transglutaminasi tissutale tipo 2, anti-endomisio, anti-gliadina deamidata), di lesioni istologiche a carico della mucosa del piccolo intestino e in particolar modo del duodeno, di aplotipo genetico predisponente (presenza di HLA DQ2 e/o DQ8) ed eventuale presenza di sintomatologia clinica [1].

La celiachia, infatti, storicamente definita come il “camaleonte clinico” [2], può presentarsi con una sintomatologia proteiforme, talvolta appannaggio del solo tratto gastrointestinale (diarrea, stipsi, dolore addominale ricorrente, meteorismo), talvolta con sintomi extra-intestinali (anemia, astenia, cefalea, aftosi ricorrente, osteoporosi, infertilità) o in assenza di sintomatologia specifica (celiachia silente). Quest'ultima condizione è presente soprattutto in coloro che appartengono a gruppi definiti “a rischio” (familiari di primo grado, pazienti affetti da altre patologie autoimmuni quali diabete di tipo 1, tiroidite di Hashimoto, artrite reumatoide, psoriasi, sindrome di Sjögren, paziente con deficit di IgA,

pazienti affetti da sindromi associate quali la sindrome di Down, la sindrome di Turner, la sindrome di William etc.) [1].

Dati di prevalenza dimostrano come l'incidenza della malattia sia in progressivo aumento non solo nelle regioni occidentali, ma anche nei paesi asiatici quali Cina e India [3]. Una recente metanalisi dimostra una prevalenza a livello mondiale pari a 1.4% [4]. Tali dati dimostrano come l'aumentata attenzione alla patologia stessa e i progressi diagnostici siano responsabili dell'incremento del numero delle diagnosi.

Tale incremento di prevalenza ha, inoltre, scatenato un acceso dibattito all'interno della comunità scientifica sul ruolo dello screening di popolazione. Secondo le attuali evidenze disponibili, lo screening deve essere riservato solamente ai soggetti appartenenti alle cosiddette popolazioni a rischio. Ad oggi, sono in corso sia in Italia sia in Europa progetti di screening su popolazione pediatrica di cui si attendono i risultati al fine di analizzare l'effettivo guadagno in termini di costi-benefici dello screening stesso [5].

A differenza di altre malattie autoimmuni, la celiachia è l'unico disordine di cui è noto il principale trigger ambientale, rappresentato dal glutine; ad ogni modo, altri cofattori ambientali, quali infezioni virali (Reovirus, Rotavirus, Norovirus, Adenovirus ed Astrovirus) [6-8], alterazioni della barriera intestinale [9-11], modifiche del microbiota intestinale [12], tipologia di parto [13-17], allattamento [18] e tempo di introduzione del glutine [19], sono stati spesso chiamati in causa. Al momento non è possibile, però, individuare il fattore scatenante che, insieme alla presenza del glutine nella dieta, determini la perdita di tolleranza e l'attivazione

dell'immunità innata e adattiva, responsabili della presenza di anticorpi in circolo e del danno mucosale patognomonico di malattia [20].

Per attivare tale reazione immune è necessaria la presenza dell'aplotipo predisponente: HLA di classe II DQ2 o DQ8. Per HLA (Human Leukocyte Antigen) si intende un super locus localizzato sul braccio corto del cromosoma 6, esteso per circa 4000 kb e caratterizzato da un'alta densità e variabilità genica per cui è soggetto ad eventi di crossing-over e ricombinazione ad ogni meiosi con una frequenza del 4%. Esistono cinque differenti classi di HLA e quella coinvolta nella patogenesi della celiachia è la classe II. I geni MHC di classe II sono chiamati HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, ciascuno contenente geni distinti A o B, codificanti rispettivamente per la catena alfa o beta. Le molecole di classe II sono principalmente espresse su cellule dendritiche, linfociti B, macrofagi e sono coinvolte nella presentazione degli antigeni esogeni e dei microrganismi ai linfociti CD4+, che innescano la risposta umorale.

L'eterodimero HLA DQ2 è formato da una catena alfa (α) codificata dall'allele HLA DQA1*05 e da una catena beta (β) codificata dall'allele HLA DQB1*02 (HLA DQB1*0201 o *0202). Negli individui con aplotipo DR3 i due alleli sono ereditati in cis (sullo stesso cromosoma) mentre negli individui con aplotipo DR5/DR7 si ereditano in trans (su due cromosomi) [21].

L'eterodimero HLA DQ8 è formato da una catena β ed una catena α codificate da HLA DQB1*0302 e HLA DQA1*03 rispettivamente.

Circa il 90-96% dei pazienti con CD esprime l'HLA-DQ2, la restante parte l'HLA-DQ8. La presenza di tali alleli è necessaria ma non sufficiente allo sviluppo della malattia: infatti, nonostante l'HLA-DQ2 sia comune nella

popolazione caucasica, con una prevalenza stimata intorno al 30-40% [5], solo il 3% di questa popolazione sviluppa la celiachia [22].

HLA-DQ2 e -DQ8 giocano un ruolo cruciale nella patogenesi della celiachia in quanto sono in grado di legare i peptidi del glutine deamidati dalla transglutaminasi tissutale di tipo 2 (tTG2). Il glutine possiede un alto contenuto di prolamine che, una volta ingerite, resistono alla degradazione da parte degli enzimi pancreatici e giungono intatte nel lume intestinale.

Questi frammenti sono un buon substrato per la tTG2 che è in grado di convertire alcuni residui di glutammina in glutammato; tale processo, che prende il nome di deamidazione, aumenta l'affinità del glutine per il legame con le molecole HLA-DQ2 e -DQ8 presenti sulle cellule presentanti l'antigene (APC)

Secondo il modello patogenetico maggiormente accreditato, i neoepitopi vengono captati, processati e presentati dai linfociti B della lamina propria, i quali si comportano da Antigen Presenting Cells (APC): da un lato attivano i linfociti T helper 2 con conseguente secrezione di citochine (soprattutto IL4) che a loro volta promuovono la proliferazione e la maturazione a plasmacellule dei linfociti B; dall'altro lato le APC attivano i linfociti T helper 1 che, tramite la secrezione di $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$, stimolano rispettivamente fibroblasti e macrofagi a secernere metalloproteasi (MMPs) che sono alla base della distruzione del connettivo tissutale [23] e dell'ispessimento della lamina propria.

I fibroblasti attivati producono il fattore di crescita cheratinocitario che porta all'ipertrofia delle cripte.

La citochina IL15 ha un ruolo fondamentale in questo processo. Importante è anche il ruolo degli autoanticorpi. Essi intervengono nelle interazioni reciproche (cross-talk) tra i fibroblasti e le cellule epiteliali che normalmente regolano lo stadio di equilibrio dinamico tra proliferazione, differenziazione e migrazione delle cellule della mucosa intestinale.

Dallo studio di Halttunen e Maki [24] si è visto che i fibroblasti producono una citochina, la TGF β , che induce le cellule dell'epitelio intestinale a crescere, formando strutture villo-like. Gli autoanticorpi bloccano l'attivazione del precursore del TGF β 1 tramite il loro legame con la tTG necessaria per questa reazione, portando così la mucosa all'atrofia.

Si è inoltre osservato che gli enterociti immaturi possiedono un'elevata affinità di legame per la gliadina. Questo potrebbe spiegare il motivo per cui lo sviluppo di CD è spesso preceduto da situazioni, come lo svezzamento precoce e le gastroenteriti, in cui si ha un'elevata presenza di cellule immature nella mucosa intestinale.

Dalla descrizione patogenetica possiamo dunque individuare i principali attori del danno intestinale, visualizzabile attraverso il prelievo di biopsie multiple (almeno due nel bulbo e quattro nel duodeno) durante l'esofagogastroduodenoscopia [25, 26].

Le lesioni istologiche tipiche della malattia celiaca sono:

- 1) l'incremento del numero dei linfociti intraepiteliali (IELs). Gli IELs rappresentano una sottopopolazione di linfociti T e il loro incremento è il primo e più sensibile indice dell'effetto del glutine sulla mucosa intestinale. Al momento della diagnosi di CD si effettua la conta delle

cellule epiteliali (EC) e gli IELs osservati tra le EC sono riportati secondo il rapporto IEL/100 EC.

Normalmente sono presenti solo pochi linfociti intraepiteliali; il numero di 40 IEL/100 EC viene considerato il valore limite. Infatti, la presenza di più di 40 IEL per 100 EC o, secondo alcuni autori, più di 25 IEL per 100 enterociti [27] è indicatore di un'attivazione immunologica. Purtroppo, l'incremento di IELs non è assolutamente specifico di CD e può verificarsi anche in altre patologie intestinali quali la giardiasi, l'allergia alle proteine del latte vaccino o altri allergeni alimentari, la sprue tropicale, l'enteropatia autoimmune e la graft versus host disease. In alcuni casi un aumentato numero di IELs può trovarsi anche in pazienti privi di qualunque patologia intestinale. Gli IELs sono più facilmente individuabili usando colorazioni specifiche per identificare i linfociti CD3⁺ (immunoistochimica).

2) l'iperplasia delle cripte: si può apprezzare soltanto in sezioni ben orientate, tagliate quindi perpendicolarmente all'asse della mucosa. Un aumentato tasso mitotico delle cellule situate al fondo delle cripte può precedere la loro iperplasia, ma ciò appare alquanto difficile da valutarsi. Nei soggetti normali il rapporto villo/cripta è di circa 4-5:1, mentre nei celiaci è inferiore a 3:1.

3) l'atrofia dei villi intestinali: espressa come diminuzione dell'altezza villare, alterazione del normale rapporto villo/cripta fino alla totale scomparsa dei villi (mucosa piatta).

Marsh [28] suggerì che queste lesioni seguono una precisa progressione nel tempo e classificò i reperti istologici secondo i seguenti stadi:

- ❑ Stadio 0 (pre-infiltrativo): assenza di alterazioni a carico della mucosa
- ❑ Stadio 1 (infiltrativo): infiltrazione dei linfociti a livello della lamina propria e aumento dei linfociti intraepiteliali
- ❑ Stadio 2 (iperplastico): iperplasia delle cripte
- ❑ Stadio 3 (pre-atrofico): atrofia dei villi intestinali
- ❑ Stadio 4 (atrofico): totale atrofia della mucosa intestinale.

L'entità delle lesioni dipende dalla suscettibilità individuale e dalla quantità di glutine assunto. Successivamente la classificazione è stata modificata da Oberhuber et al. [29], che distinguono:

- ❑ Tipo 0: mucosa normale con presenza di meno di 40 linfociti intraepiteliali per 100 cellule epiteliali
- ❑ Tipo 1: tipo infiltrativo, caratterizzato da normale architettura dei villi, normale altezza delle cripte e numero di linfociti intraepiteliali $> 40/100$ EC
- ❑ Tipo 2: tipo iperplastico, caratterizzato da una normale architettura dei villi, aumento dei linfociti intraepiteliali $> 40/100$ EC ed iperplasia delle cripte;
- ❑ Tipo 3: tipo distruttivo, suddiviso in tre sottogruppi a seconda del grado di atrofia dei villi intestinali. Iperplasia delle cripte ed aumento dei linfociti intraepiteliali ($>40/100$ EC) sono sempre presenti. Il tipo 3 si divide in:
 - 3A: atrofia parziale dei villi;
 - 3B: atrofia subtotale;
 - 3C: atrofia totale dei villi intestinali;

- ❑ Tipo 4: caratterizzato da mucosa ipoplasica per atrofia totale dei villi, con normale lunghezza delle cripte e assenza di infiltrato flogistico. Si riscontra raramente.

Una versione semplificata della classificazione di Marsh-Oberhuber è stata successivamente proposta da Corazza e Villanacci [30], che distinguono:

- ❑ Grado A: architettura normale, non atrofica
- ❑ Grado B1: atrofia della mucosa, con rapporto villo: cripta < 3: 1
- ❑ Grado B2: atrofia totale della mucosa.

Questi tre gradi sono caratterizzati dalla presenza di > 25 IEL/100 EC.

È noto che il danno istologico è caratterizzato da una distribuzione definita “a macchia di leopardo” (patchiness) [31, 32] e che tali lesioni possano trovarsi non solo isolate a livello del bulbo [33, 34], ma anche a livello più caudale al di sotto del Treitz [35].

In ausilio alla diagnosi, a partire dagli anni 90', sono a disposizione del clinico differenti tipi di anticorpi di classe IgA ed IgG. Tra questi, senza dubbio, il principale ruolo è svolto dagli anticorpi anti-endomisio (EMA) e dagli anticorpi di classe IgA rivolti verso la transglutaminasi tissutale di tipo 2 (TGA-IgA).

Gli EMA sono autoanticorpi rivolti contro le proteine della matrice extracellulare e quindi, alterando l'interazione tra fibroblasti e cellule epiteliali, compromettono la struttura del villo. Per la loro produzione sono essenziali due brevi sequenze NH2 terminali della gliadina, i peptidi 31-43 e pertanto tali anticorpi sono in grado di riconoscere lesioni minime della mucosa, purché queste derivino dal contatto con la gliadina. Sono evidenziabili con la metodica di Immunofluorescenza Indiretta (IFI),

usando come substrato due particolari linee cellulari: l'endomizio del muscolo liscio del terzo distale dell'esofago di scimmia o il cordone ombelicale umano. Le fibrille reticoliniche che circondano le fibre muscolari lisce delle pareti delle arterie e della vena del cordone ombelicale umano sono infatti analoghe all'endomizio del terzo inferiore dell'esofago di scimmia. Il test è considerato positivo se una diluizione sierica uguale o superiore a 1:5 permette la visualizzazione dell'anticorpo. Questi marker si caratterizzano per la specificità particolarmente elevata, prossima al 100% (99,8%), affiancata all'ottima sensibilità (93-96%); sono tuttavia gravati dalla difficoltà di standardizzazione della metodica, con possibili errori interpretativi soprattutto in presenza di positività a basso titolo anticorpale o di scarsa esperienza diagnostica dell'operatore. Infine, la scarsa disponibilità dei substrati antigenici innalza sensibilmente i costi del test.

L'importanza diagnostica del dosaggio degli EMA di classe IgA è stata ridimensionata dalla scoperta di Dieterich e collaboratori [36], i quali hanno dimostrato che l'autoantigene riconosciuto dagli anticorpi anti-endomizio è la transglutaminasi tissutale (tTG). La differenza tra gli EMA e gli anticorpi TGA è data dal fatto che i primi sono un complesso in cui sono compresi anche gli anticorpi anti-muscolo liscio e gli anti ANA, mentre i secondi sono specifici per la transglutaminasi.

Il dosaggio sierico degli anticorpi TGA-IgA è tra le più recenti metodiche anticorpali in quanto fu introdotto nel 1997. Gli anticorpi TGA-IgA sono prodotti inizialmente a livello intestinale da linfociti B specifici, mediante un uso preferenziale dei geni della famiglia IGVH5-51; una volta prodotti, tali anticorpi possono depositarsi a livello della mucosa del piccolo intestino, prima di essere secreti in circolo [37].

L'esame sfrutta una tecnica immunoenzimatica, indipendente dall'operatore e poco costosa, con sensibilità e specificità pari rispettivamente al 94% e al 98% [38]. Il rischio di falsi positivi è superiore per pazienti affetti da altre patologie autoimmuni, da diatesi allergica ed epatopatie croniche.

I kit diagnostici per la determinazione dei TGA-IgA sono attualmente di seconda generazione: dapprima, infatti, sono stati utilizzati tessuti umani purificati (eritrociti), ma attualmente la coattazione della piastra viene praticata con tTG2 umana ricombinante e questo evita falsi positivi legati alla non completa purificazione dell'antigene. Un altro elemento che è stato particolarmente curato è quello del pretrattamento della piastra con Ca^{++} in modo da potenziare la reazione antigene-anticorpo.

Il confronto tra EMA e TGA-IgA mostra chiaramente come, sebbene il primo test sia più specifico, il secondo debba essere utilizzato come esame di prima scelta per lo screening della celiachia per la più elevata sensibilità, riproducibilità e disponibilità di substrato. Gli EMA vengono attualmente utilizzati come test di conferma in pazienti con TGA-IgA positivi. La letteratura riporta, inoltre, una superiore sensibilità degli anticorpi TGA-IgA nei confronti degli EMA anche nel follow-up della CD.

In caso di deficit di IgA possono essere dosati gli anticorpi (TGA e EMA) di classe IgG, con specificità e sensibilità minore.

Gli anticorpi anti-gliadina deamidata IgG (AGAD-IgG), molto sensibili e specifici in quanto si legano ai frammenti del glutine dopo che è avvenuta la deamidazione, vengono solitamente utilizzati nella diagnosi dei bambini di età inferiore ai 2 anni.

Secondo alcune evidenze, la comparsa degli anticorpi celiachia-specifici nel siero potrebbe precedere il danno strutturale intestinale [39]. Al contrario, esistono casi di pazienti celiaci sieronegativi [40]; in ogni caso, nella maggior parte di questi pazienti sono evidenziabili anticorpi TGA a livello intestinale o in altri tessuti [41].

Nel corso degli anni sono state pubblicate numerose linee-guida per la diagnosi di celiachia, con una progressiva semplificazione delle procedure diagnostiche.

Nel 1969 a Interlaken (Svizzera), durante l'incontro dell'ESPGAN, (European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition) vennero stabiliti per la prima volta i criteri per la diagnosi di malattia celiaca nel paziente pediatrico [42]. Erano richieste tre biopsie del piccolo intestino: la prima al momento del sospetto clinico, mentre il piccolo era a dieta libera; una seconda biopsia era necessaria durante il periodo di dieta aglutinata per identificare la scomparsa delle lesioni istologiche; l'ultima biopsia aveva lo scopo di visualizzare gli effetti sulla mucosa della riesposizione al glutine.

Venti anni dopo, nel 1990, l'ESPGHAN stabilì i nuovi criteri diagnostici [43]. La diagnosi di malattia celiaca veniva posta in bambini di età superiore ai 2 anni con lesioni istologiche caratteristiche del piccolo intestino e con miglioramento o scomparsa dei sintomi dopo l'introduzione di una dieta senza glutine. La presenza di marker sierologici di malattia celiaca e la loro negativizzazione in seguito all'introduzione della dieta senza glutine era considerata un ulteriore criterio a supporto della diagnosi.

Le linee-guida pubblicate nel 2012 [44] sono state riassunte in due algoritmi diagnostici. In bambini e adolescenti con sintomatologia compatibile, marker sierologici positivi con valori di TGA-IgA maggiori di dieci volte il valore di riferimento (ULN) e con genetica predisponente (HLA-DQ2 e/o HLA-DQ8) l'esecuzione dell'EGDS non era considerata più necessaria per la diagnosi. La biopsia conservava un ruolo diagnostico centrale per tutti coloro che non presentavano le caratteristiche sopra descritte: gli asintomatici e coloro che presentavano titoli anticorpali inferiori a dieci volte i valori di riferimento.

A settembre 2019 sono state pubblicate le nuove linee-guida pediatriche per la diagnosi [45], anch'esse composte da due algoritmi. Tali linee-guida confermano il valore predittivo degli anticorpi TGA-IgA ad alto titolo (maggiore di dieci volte il valore di riferimento) ed estendono la possibilità di omettere la biopsia intestinale anche ai soggetti asintomatici. La gastroscopia risulta pertanto necessaria solamente nei soggetti in cui gli anticorpi siano positivi al di sotto di dieci volte il valore di riferimento, indipendentemente dalla presenza o meno di sintomatologia. La tipizzazione genetica, inoltre, non è più richiesta ai fini diagnostici, ma acquista un ruolo selettivo nella determinazione dei soggetti a rischio all'interno di popolazioni specifiche.

Gli algoritmi diagnostici proposti dall'ESPGHAN nel 2012 e nel 2019 non sono però dirimenti riguardo al destino dei soggetti con anticorpi persistentemente inferiori a tre volte il valore di normalità e l'iter diagnostico di questi soggetti è attualmente rimandato al giudizio del clinico, anche se un recente studio del nostro gruppo ha dimostrato il ruolo delle TGA-IgA persistentemente non elevate nel predire il danno mucosale compatibile con la celiachia [46].

Alla luce di queste evidenze rimane centrale il ruolo degli anticorpi TGA-IgA, che rappresentano il test sierologico più appropriato per lo screening [47] e il follow-up della malattia celiaca.

Come mostrato in un recente studio internazionale, esiste una notevole variabilità tra un laboratorio e l'altro e una mancanza di standardizzazione dei vari test a disposizione per il dosaggio degli antitransglutaminasi [48].

Alcuni laboratori di ricerca, tra cui quello con cui collaboriamo presso il Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche del nostro Ateneo, utilizzano un metodo RIA in fase fluida che ne migliora notevolmente la sensibilità [49,50].

Nel 2004 Bonamico et al. hanno dimostrato di poter dosare tali anticorpi anche nella saliva ed hanno ottenuto risultati molto promettenti; la metodica è risultata molto sensibile (94,5%) e specifica (98,2%), con risultati simili a quelli determinabili in ELISA su siero e addirittura superiore agli EMA su siero [51].

I vantaggi dell'utilizzo della saliva sono molteplici: facilità di prelievo anche nei bambini; stress contenuto al momento del prelievo; agevole conservazione dei campioni; semplice preparazione preliminare del campione da analizzare.

Il test per la determinazione dei TGA-IgA con metodo RIA è sicuramente rapido, ripetibile, di semplice esecuzione e di costo contenuto. Nel 2009 il metodo è stato velocizzato, includendo dei passaggi su piastra al fine di permettere la determinazione di un numero di campioni più elevato nello stesso intervallo di tempo: a differenza del precedente metodo (Beta Counter) che consentiva l'analisi di 25 campioni in due ore, il nuovo metodo con il TopCount permette l'analisi di 50 campioni in 40 minuti.

2. Parte sperimentale

2.1 Obiettivo dello studio

In collaborazione con il laboratorio sperimentale del Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche dell'Università "La Sapienza" di Roma è stata messa a punto una metodica innovativa RIA per la determinazione degli anticorpi TGA-IgA. Tale metodica presenta numerosi vantaggi; è molto sensibile e specifica, riproducibile e di facile esecuzione e permette di dosare i TGA-IgA non solo su siero, ma anche su saliva, un fluido che può essere raccolto in maniera assolutamente non invasiva. L'applicazione del metodo radioimmunologico su saliva è particolarmente indicata nei bambini a partire dai 5 anni, che sono in grado di effettuare la raccolta di saliva, da loro vissuta come un gioco.

Nel tempo, il miglioramento dei metodi laboratoristici per la diagnosi di CD ha messo in evidenza l'alta prevalenza di forme paucisintomatiche o clinicamente silenti della patologia. Per questo motivo è sorta la necessità di confrontarsi sulla possibilità di realizzare programmi di screening di massa che consentissero di individuare i pazienti celiaci asintomatici.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità l'attuazione di un programma di screening per una determinata patologia richiede i seguenti requisiti [52], che risultano tutti applicabili alla celiachia [53]:

- a) alta prevalenza nella popolazione della patologia che si intende ricercare; questo è il caso della CD che mostra una prevalenza di circa l'1% nella popolazione generale;
- b) difficoltà ad effettuare una diagnosi tempestiva esclusivamente sulla base dei dati clinici; una diagnosi precoce basata solo su dati clinici è spesso impossibile proprio a causa dell'ampia diffusione di forme

atipiche o silenti [54];

c) incremento dei livelli di mortalità o morbidità a causa della diagnosi mancata o ritardata; tutti i pazienti non tempestivamente diagnosticati corrono il rischio di complicanze importanti che possono in rari casi anche ridurre l'aspettativa di vita del paziente;

d) facile esecuzione e accettabilità da parte di un grande numero di pazienti del test disponibile per lo screening della malattia in questione; le soluzioni proposte per realizzare un'ampia accettazione dei programmi di screening sono diverse;

e) costi contenuti del test e buon rapporto costo/beneficio; il costo della determinazione degli anticorpi eseguita con alcune metodiche può essere contenuto ed avere un'ottima ripercussione sul rapporto costi/benefici;

f) alta sensibilità e specificità della metodica prescelta; esistono test sierologici o salivari dedicati alla determinazione degli anticorpi antitransglutaminasi e degli EMA dotati di sensibilità e specificità molto elevate;

g) esistenza di una terapia che abbia effetti favorevoli sul decorso della patologia; la terapia per la CD è rappresentata dalla dieta priva di glutine, che è in grado di prevenire l'insorgenza delle complicanze legate alla patologia.

Dunque, la celiachia rispetta tutti i requisiti previsti dalla WHO per l'attivazione di un programma di screening di massa.

D'altra parte, è nota in letteratura l'importanza del valore predittivo negativo della tipizzazione genetica, che permette di selezionare una popolazione a più alto rischio di sviluppare la celiachia.

Pertanto, mediante tipizzazione genetica, si è effettuato uno shift da

screening di massa a screening di soggetti a rischio, per i quali è indicato un follow-up nel tempo con la ripetizione biennale del dosaggio anticorpale.

Date queste evidenze, l'obiettivo di questo studio è determinare, in una coorte di soggetti geneticamente predisposti, l'affidabilità espressa in termini di sensibilità e specificità del test salivare, confrontandolo con la metodica ELISA di riferimento.

2.2 Metodi

2.2.1. Disegno dello studio

Lo studio ha previsto l'arruolamento di una coorte di bambini e adolescenti geneticamente predisposti in due fasi successive:

1) sono stati arruolati bambini delle classi prima, seconda, terza e quarta (età compresa tra 5 e 10 anni) di due scuole primarie situate in due aree geografiche rappresentative della città di Roma, rispettivamente con sede nel VII e XIII Municipio. Tutti i bambini che hanno aderito allo studio sono stati sottoposti ad uno screening di primo livello mediante ricerca dei geni predisponenti HLA-DQ2 e HLA-QD8 su goccia di sangue intero prelevata dal dito. I bambini risultati negativi sono stati esclusi dallo studio; i bambini positivi hanno raccolto un campione di saliva ed hanno eseguito un prelievo venoso periferico per la determinazione delle IgA sieriche e degli anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA (TGA-IgA). I bambini con TGA-IgA positivi sono stati successivamente inseriti nell'iter diagnostico previsto dalle Linee Guida ESPGHAN 2012 presso il nostro Centro di Riferimento per la Celiachia della Regione Lazio, UOC di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica, Policlinico Umberto I;

2) sono stati arruolati soggetti pediatrici, familiari di primo grado (fratelli, sorelle o figli) di pazienti celiaci seguiti presso l'ambulatorio di gastroenterologia pediatrica del Policlinico Umberto I. Tutti i bambini hanno raccolto un campione di saliva e sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue periferico per la tipizzazione genomica HLA e per la determinazione degli anticorpi TGA-IgA e delle IgA sieriche. I bambini con tipizzazione genomica negativa sono stati secondariamente esclusi

dallo studio; tra i bambini geneticamente predisposti, quelli con TGA-IgA positivi hanno proseguito l'iter diagnostico previsto dalle Linee Guida ESPGHAN 2012.

Lo studio è stato condotto in accordo con i principi della dichiarazione di Helsinki. Tutti i bambini ed i loro genitori sono stati informati sugli obiettivi dello studio ed hanno firmato il consenso per la partecipazione alla ricerca.

2.2.2 Determinazione della suscettibilità genetica alla CD mediante metodica su goccia di sangue

Durante le giornate di screening organizzate presso le sedi delle scuole, sono stati prelevati per ogni bambino 10 µl di sangue intero utilizzando lancette pungidito pediatriche, solitamente adoperate per il controllo della glicemia.

L'analisi è stata condotta in un secondo momento presso il laboratorio del nostro centro; è stato utilizzato un kit commerciale, Celiac Gene Screen, prodotto e commercializzato da Biodiagene S.r.l., in grado di determinare solo la presenza/assenza dei geni associati alla CD senza fornire ulteriori altre specifiche (DQ2 o DQ8, DQ2 in cis o trans, DQ2 in eterozigosi o omozigosi); tale kit, secondo quanto dichiarato dalla casa produttrice, ha una specificità diagnostica pari al 100% ed una sensibilità diagnostica pari al 100% [55].

Le fasi seguite per la determinazione della suscettibilità genetica sono state le seguenti:

- 1) lisi del campione ematico del paziente ottenuta introducendo il sangue intero del paziente (10 µl) in 200µl di Buffer di Estrazione;

2) amplificazione genica mediante metodica PCR (Polymerase Chain Reaction). La PCR è un metodo che consente di amplificare in vitro sequenze specifiche di DNA, sfruttando l'attività dell'enzima Taq Polimerasi che, utilizzando un primer come innesco, è in grado di generare un filamento complementare a quello del DNA di partenza. Il macchinario utilizzato si chiama Termociclatore. 35 Per la reazione occorrono: il DNA da amplificare, la coppia di primer (marcati con fluoroforo) che delimitano il segmento da amplificare, l'enzima Taq Polimerasi, un buffer contenente ioni che sono indispensabili per l'attività dell'enzima e i nucleotidi che vengono utilizzati dall'enzima per sintetizzare il nuovo filamento. Tutta la reazione si svolge attraverso quattro fasi che si susseguono ciclicamente (per un definito numero di cicli totali); ogni fase avviene ad una determinata temperatura di reazione e per un determinato intervallo di tempo:

- fase di denaturazione: durante la quale avviene la denaturazione delle molecole di DNA;
- fase di annealing: durante la quale avviene l'allineamento dei primer;
- fase di allungamento: durante la quale avviene la sintesi del filamento omologo ad opera della Taq Polimerasi;
- fase finale: in questa fase, la reazione di amplificazione è terminata ed il campione amplificato viene conservato ad una determinata temperatura per un tempo indefinito (in genere, fino a che l'operatore non decide di analizzare il campione).

3) rilevazione del prodotto amplificato al Biorun: si tratta di un lettore di fluorescenza che esegue automaticamente la rilevazione e l'interpretazione

dei risultati. Al termine della lettura, per ogni campione esaminato, fornisce risultato “+” se il campione è suscettibile alla CD, “-” se il campione non è suscettibile alla CD.

2.2.3 Determinazione della suscettibilità genetica alla CD mediante sistema Eu-Gen (Eurospital®)

Nella seconda fase del nostro studio, la tipizzazione dei geni HLA di classe II è stata condotta sui familiari di primo grado con la seguente metodica, eseguita in collaborazione con la Dott.ssa Barbara Mora e il Prof. Antonio Pizzuti dell'Unità di Genetica, del Policlinico Umberto I “Sapienza – Università di Roma”:

- estrazione del DNA con il metodo dei sali a partire da sangue fresco o congelato;
- lettura allo spettrofotometro a due diverse lunghezze d'onda, 260 e 280 nm, che corrispondono rispettivamente al picco di assorbimento del DNA e delle proteine;
- Polymerase Chain Reaction (PCR), un metodo che consente di amplificare in vitro sequenze specifiche di DNA. Questa tecnica sfrutta l'attività di un enzima, la Taq polimerasi che grazie a degli “inneschi appropriati” (primer) è in grado di ricostruire il filamento complementare a quello del DNA genomico di partenza. Questa sintesi viene ripetuta ad ogni ciclo per tutte le copie che man mano vengono sintetizzate. Durante ciascun ciclo si susseguono tre temperature diverse, nel corso delle quali rispettivamente si ha la denaturazione del DNA con l'apertura della doppia elica, l'allineamento dei primer e l'estensione, ad opera di una DNA-polimerasi, che aggiunge nucleotidi alle catene in crescita. La DNA-

polimerasi utilizzata è estratta dal batterio *Thermus Aquaticus*, che vive nelle sorgenti calde e per questo è stabile ed attiva alle elevate temperature cui si lavora.

Al termine del processo di polimerizzazione, i frammenti amplificati di DNA sono separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio e visualizzati, dopo colorazione con bromuro d'etidio, mediante esposizione del gel agli UV. L'interpretazione dei risultati è basata sulla presenza o assenza di frammenti di DNA di diverso ma specifico peso molecolare. Durante l'amplificazione, molti fattori possono alterare la riuscita della reazione (errori di pipettatura, scarsa qualità del DNA, presenza d'inibitori, etc.). Per verificare l'integrità della reazione viene aggiunto un controllo interno costituito da una coppia di primer che amplificano la regione conservata di un gene noto. In questo caso, una reazione positiva per un allele o un gruppo di alleli è visualizzata nel gel come un frammento di DNA (banda) localizzato fra la banda del controllo interno e quella dei primer;

- tipizzazione geni HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1: il materiale fornito dal kit utilizzato consiste in strip da 8 provette, ognuna contenente una differente mix di primer in forma liquida. Ogni provetta mix contiene due o tre coppie di primer di diversa specificità, consentendo la contemporanea amplificazione di sequenze diverse. I primer sono stati disegnati per essere fra di loro compatibili nella stessa reazione di PCR e per non formare dimeri o concatenameri che la inibirebbero. Oltre agli alleli HLA, in ogni provetta di reazione viene amplificata anche una sequenza genomica codificante per un gene "housekeeping" (β -globina umana). L'amplificazione di questa sequenza funge da controllo interno e garantisce l'affidabilità del risultato ottenuto.

2.2.4 Raccolta dei campioni di saliva e determinazione degli antitransglutaminasi IgA

a) TRATTAMENTO DEI CAMPIONI DI SALIVA

La raccolta della saliva e del siero (tra le 8 e le 11 del mattino) è stata effettuata su pazienti a digiuno. I campioni di saliva intera, non stimolata, dopo essere stati raccolti in tubi tipo Falcon da 50 ml e conservati in ghiaccio, sono stati centrifugati a 10.000 giri per 10 minuti in una centrifuga refrigerata (Eppendorf Centrifuge) a 4°C. Il sovranatante, suddiviso in aliquote, è stato conservato a -80°C fino al momento della determinazione anticorpale.

b) DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI SU SALIVA

Sono stati aggiunti 150 µl di saliva di ciascun campione da analizzare a 50 µl di soluzione costituita dalla 35S-tTG e Buffer Solution. Il tutto è stato incubato per una notte a 4°C su agitatore ruotante.

Il giorno successivo sono state aggiunti a ciascun campione analizzato 25 µl di una soluzione di anti-IgA umane coniugate con agarosio (IgA Agarose- Anti-Human IgA α -chain specific) (Sigma Aldrich). La soluzione è stata poi incubata per 180 minuti a 4°C su piastra rotante.

Ogni campione è stato poi trasferito in una "filter plate" da 96 pozzetti (Fisher) che permette ripetuti lavaggi volti ad eliminare l'antigene radiomarcato non legato. Il precipitato finale, dopo aggiunta di liquido scintillante (Microscint 20, Packard), è stato contato in un apposito Beta-counter (Top-Count) settato per l'utilizzo delle piastre da 96 pozzetti.

Sia nella metodica manuale sia in quella velocizzata, i risultati sono stati espressi mediante un indice autoanticorpale ottenuto calcolando, in ogni dosaggio, i dati relativi ad una saliva di controllo positiva e una negativa per gli anticorpi TGA-IgA.

La seguente formula è stata utilizzata per il calcolo finale dell'indice autoanticorpale:

$$\text{Indice Ab} = \frac{(\text{cpm campioni in esame} - \text{cpm controllo negativo})}{(\text{cpm controllo positivo} - \text{cpm controllo negativo})}$$

I limiti di positività per la presenza degli autoanticorpi anti-transglutaminasi su siero sono stati calcolati in accordo con il 99° percentile di 200 soggetti normali di controllo [56].

2.2.5. Raccolta dei campioni di siero e determinazione delle IgA sieriche e degli antitransglutaminasi IgA

a) TRATTAMENTO DEI CAMPIONI DI SIERO

I campioni di sangue sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C e successivamente sierati, suddivisi in aliquote e conservati alla temperatura di -20°C fino al momento della determinazione.

b) DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI SU SIERO CON METODO RIA

La determinazione degli anticorpi TGA-IgA nel siero con il metodo RIA viene effettuata con una procedura simile a quella utilizzata per la saliva adoperando 2 µl di campione. Il limite di positività per la presenza degli anticorpi anti-transglutaminasi su siero con metodica RIA è stato calcolato al 99° percentile di 300 soggetti normali di controllo e il suo valore è 0,028.

c) DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI SU SIERO
CON METODO ELISA

Gli anticorpi anti-transglutaminasi IgA sono stati determinati mediante un test di immunoassorbenza enzimatica (ELISA) con l'uso di un kit commerciale (Eurospital ®). In tale metodica, l'enzima transglutaminasi tissutale ricombinante umano viene legato per microtitolazione ai pozzetti della piastra su cui si effettua l'analisi. Nei pozzetti viene aggiunto il siero in esame; se nel siero sono contenuti gli anticorpi specifici per tale antigene (anticorpi anti-transglutaminasi), questi si legano all'antigene adeso al fondo del pozzetto. Si aggiungono, infine, anticorpi anti-IgA umane marcati con perossidasi di rafano, che si legano agli anticorpi rimasti adesi al fondo del pozzetto.

Il coniugato in eccesso viene allontanato mediante nuovo lavaggio; si aggiunge quindi un substrato colorimetrico e si misura il valore di Densità Ottica (D.O.) con apposito lettore per micropiastre.

I valori di riferimento sono:

- Negativo: < 9.00 U/mL
- Dubbio: 9.00 – 16.00 U/mL
- Positivo: > 16.00 U/mL

d) DOSAGGIO DELLE IGA SIERICHE

Le IgA sieriche sono state determinate mediante Nefelometria: si tratta di un metodo di analisi chimico-fisica con il quale si determina la quantità di sostanza in sospensione in un liquido confrontando la luce diffusa da questa con la luce diffusa da una sospensione a titolo noto. La determinazione si esegue facendo attraversare la sospensione da un fascio luminoso di una data intensità e misurando, per mezzo di un'opportuna

cellula fotoelettrica, l'intensità del fascio luminoso diffuso in una direzione che è, in genere, perpendicolare al fascio incidente.

I valori di riferimento sono compresi tra 85e 450 mg/dl.

2.2.6 Esame endoscopico e istologia

I bambini che presentavano titoli anticorpali inferiori a dieci volte i valori di riferimento sono stati sottoposti ad esofagogastroduodenoscopia, in accordo con le linee-guida ESPGHAN 2012.

L'esofagogastroduodenoscopia è stata effettuata con endoscopio a fibre ottiche, OLIMPUS PQ20 o con apparecchio GIF-E. I pazienti, ricoverati in regime di Day Hospital e a digiuno, sono stati addormentati mediante inalazione di soluzione di alogenati e successivamente Propofol per via endovenosa. Nel corso dell'esame sono state effettuate biopsie multiple: due frammenti a livello del bulbo duodenale e quattro frammenti al livello della seconda e terza parte del duodeno distale con pinze FB-19K e FB-24Q. Ogni biopsia è stata orientata su carta millipore, fissata in formalina al 10% ed inclusa in paraffina. Le sezioni, colorate con ematossilina-eosina e, sono state esaminate al microscopio ottico. Le lesioni istologiche della mucosa intestinale sono state definite secondo la classificazione Marsh, modificata da Oberhuber et al. [29].

2.2.7. Statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software statistico R (R Core Team 2019, versione 3.6.1), utilizzando Tidyverse, una collezione di programmi disponibili in open source, utilizzati per la raccolta, la pulizia, la progettazione e la visualizzazione dei dati.

Il Test di McNemar è un test non parametrico che si applica a tabelle di frequenza 2×2 . Viene generalmente impiegato per verificare l'esistenza di differenze in dati dicotomici prima e dopo un certo cambio o evento o trattamento; nel nostro studio è stato impiegato per confrontare due metodi qualitativi.

Il livello di significatività statistica per tutti i test utilizzati è indicato dal p value $<0,05$. In statistica, tale parametro indica la probabilità di ottenere risultati uguali o meno probabili rispetto a quelli osservati nel test, considerando vera l'ipotesi nulla: il p value aiuta quindi a capire se la differenza tra il risultato osservato e quello atteso è significativa in termini statistici, ovvero se questa differenza non è spiegabile o è difficilmente spiegabile mediante la casualità introdotta dal campionamento della popolazione in esame.

2.3 Risultati

2.3.1 Popolazione

- All'interno del progetto di screening nelle scuole sono stati arruolati 883 bambini (400 maschi), dei quali 310 (35.1%) geneticamente predisposti (140 maschi e 170 femmine); di questi soggetti, 289 hanno effettuato raccolta salivare e prelievo ematico.

- All'interno della coorte dei familiari di primo grado sono stati arruolati 91 bambini (34 maschi), dei quali 70 (76.9%) geneticamente predisposti hanno effettuato raccolta salivare e prelievo ematico.

Pertanto, sono stati arruolati 359 soggetti geneticamente predisposti (162 maschi, età media 8.25), di cui 19 (5.3%) sono risultati positivi al test salivare, come mostrato in Figura 1. Di questi, 16 bambini (84.2%) sono stati confermati alla determinazione sierologica con metodo RIA ed ELISA ed hanno ricevuto la diagnosi di CD; in particolare, 9 hanno mostrato valori anticorpali di anti-transglutaminasi superiori a 10x il range di riferimento e anti-endomisio (EMA) positivi, mentre i restanti 7 bambini con valori inferiori a 10x il range di riferimento sono stati sottoposti ad esofagogastroduodenoscopia (EGDS) che ha mostrato le tipiche lesioni istologiche. Un bambino (5.3%) con screening salivare positivo confermato con metodica RIA sul siero, ma con anticorpi negativi con ELISA è stato sottoposto ad EGDS che ha confermato la diagnosi. 2 bambini (10.5%) con valori salivari debolmente positivi non si sono confermati sul siero con entrambi i metodi e non hanno proseguito il follow-up.

Tra i 340 bambini con screening salivare negativo, due (0.6%) hanno mostrato valori sierici positivi con metodo RIA ed ELISA, hanno effettuato

l'EGDS e hanno ricevuto la conferma istologica di CD. I restanti 338 bambini (99.4%) negativi al test salivare si sono confermati negativi alle determinazioni sierologiche con entrambi i metodi.

Nel gruppo di bambini in studio, nessuno aveva precedentemente ricevuto la diagnosi di celiachia.

Tutti i bambini positivi presentavano normali valori di IgA sieriche, ad eccezione di una bambina con deficit parziale di IgA che è risultata negativa al test salivare ma positiva alle determinazioni sieriche, con successiva conferma istologica di CD.

In conclusione, nei soggetti geneticamente predisposti, la prevalenza di malattia è risultata pari a 1.9% (19/359); in dettaglio, nella popolazione proveniente dallo screening nelle scuole risulta essere del 3.8% (11/289), mentre nel gruppo dei familiari di primo grado la prevalenza ha raggiunto l'11.4% (8/70).

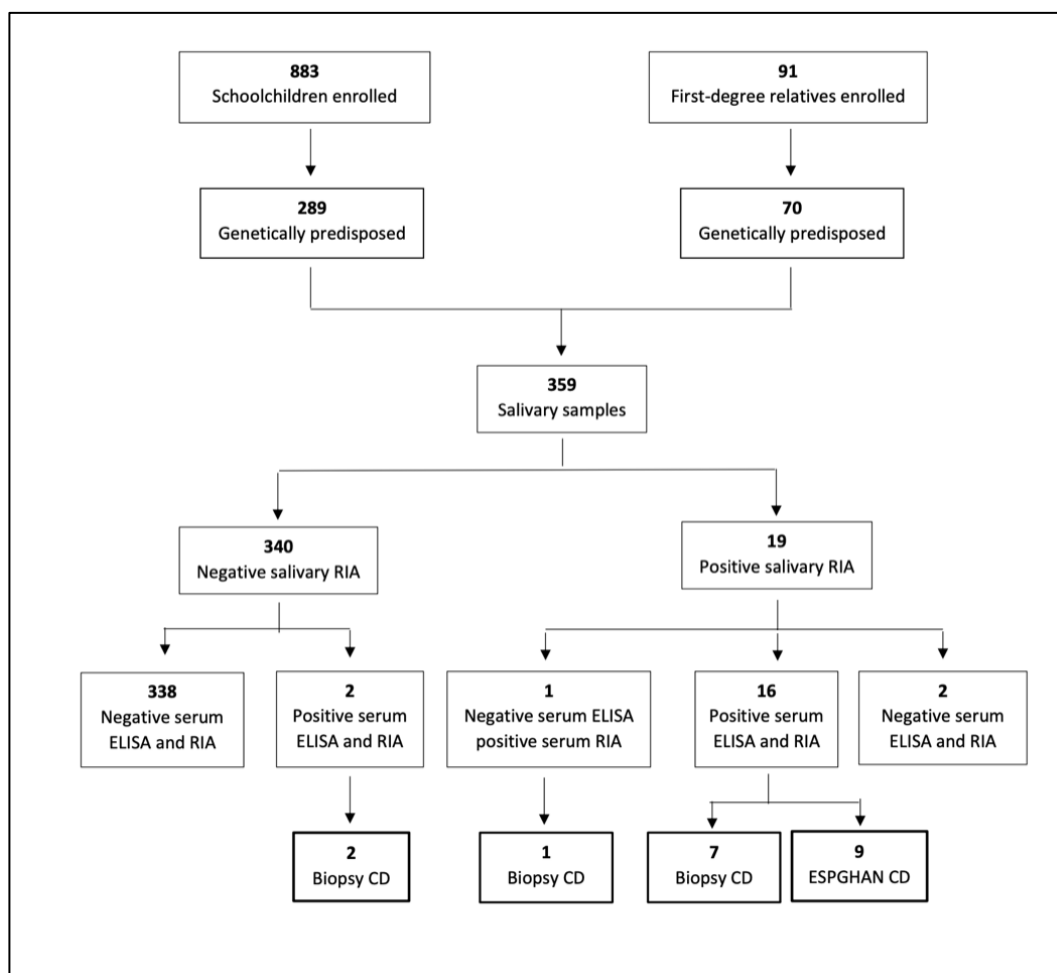


Figura 1. Disegno dello studio

2.3.2 Analisi statistica

Il test salivare con metodica RIA ha mostrato una sensibilità pari a 94.4% (IC 95% 0.914-0.965) e una specificità pari a 99.4% (IC 95% 0.977-0.999); la sensibilità e specificità del metodo RIA su siero sono state del 100% (IC 95% 0.987-1); quelle del metodo ELISA sono state rispettivamente del 94.7% (IC 95% 0.918-0.967) e 100% (IC 95% 0.987-1).

Il test di McNemar Chi squared, utilizzato per confrontare sensibilità e specificità della metodica salivare RIA con il metodo sierologico ELISA che è attualmente considerato il test di screening di riferimento, ha mostrato la completa sovrapponibilità dei due test in esame ($p=1$) (Tabella 1).

	RIA salivare +	RIA salivare -
ELISA sierologico +	16	2
ELISA sierologico -	3	338
Totale	19	340

Tabella 1. Test d Mc Nemar

2.4 Discussione

Riguardo la diagnosi della celiachia, è attualmente acceso in letteratura il dibattito sull'efficacia degli screening nella popolazione generale. Di contro, secondo la strategia del case finding, sarebbe considerato appropriato il ricorso agli accertamenti diagnostici solo nei casi sintomatici [57]. È ormai noto che, a causa della variabilità del quadro clinico, molti casi paucisintomatici o asintomatici di CD sfuggono alla diagnosi; nel cosiddetto "iceberg celiaco", infatti, solo una percentuale ridotta di casi viene adeguatamente riconosciuta e trattata. Pertanto, sarebbe fondamentale un intervento di prevenzione secondaria mirato alla diagnosi tempestiva dei casi sommersi.

In questo studio è stata in primo luogo identificata una coorte di soggetti geneticamente predisposti, effettuando uno shift da screening di massa a screening di soggetti a rischio che, come noto dalla letteratura, necessitano di follow-up anticorpale periodico [44].

La celiachia soddisfa tutti i criteri stabiliti dall'OMS per l'attuazione di un programma di screening. In merito al primo requisito, la CD è stata riconosciuta come malattia sociale con la legge n° 123 del 4 luglio 2005. In particolare, nel campione studiato la prevalenza è risultata pari a 3.8% (11/289) nella popolazione scolastica geneticamente predisposta; l'unico dato di paragone presente in letteratura è quanto riscontrato da Gatti et al. in uno screening condotto nelle aree metropolitane di Ancona e Verona, da cui si evince una prevalenza del 5.62% [5]. Nel gruppo dei familiari di primo grado la celiachia è stata riscontrata in 8 soggetti su 70 (11.4%), risultato inferiore rispetto alla prevalenza descritta in un recente studio retrospettivo (44.4%) [58]. Il dato relativo ai familiari può essere spiegato

dal fatto che nella coorte analizzata sono stati presi in esame solamente fratelli e figli dei soggetti celiaci nel momento puntuale della raccolta, tralasciando pertanto gli altri familiari (madre, padre, fratelli maggiorenni) che, pur essendo a rischio, hanno superato la maggiore età.

Alla luce di queste considerazioni, la coorte studiata non è una rappresentazione fedele dei familiari di primo grado, bensì una fotografia della sola età pediatrica.

In riferimento al secondo punto dell'OMS relativo allo screening, la celiachia rappresenta l'unico esempio di patologia autoimmune in cui esiste una terapia eziologica: la dieta senza glutine. Se la diagnosi viene posta nella prima decade di vita è possibile, infatti, garantire un accrescimento soddisfacente e ridurre in maniera significativa il rischio di patologie associate.

Nella prima fase dello studio si è deciso di arruolare una popolazione pediatrica in età scolare (5-10 anni), periodo in cui il bambino segue le indicazioni dei genitori e consuma i pasti principali in un ambiente protetto (casa o scuola) [59,60]. Numerosi studi dimostrano, infatti, che se la diagnosi viene posta in età adolescenziale, specie se in soggetti in completo benessere, la compliance al regime dietetico aglutinato è scarsa [61,62]. D'altro canto, però, essendo noto dalla letteratura un secondo picco di incidenza in età puberale, si è pensato di estendere lo studio arruolando anche familiari fino ai 18 anni di età.

In relazione ai test sierologici utilizzati per la diagnosi della CD, il metodo RIA per la determinazione degli anticorpi TGA-IgA in fase fluida su campioni di siero appare attualmente il test più sensibile [49]. Il gruppo afferente al Dipartimento di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile (U.O.D. Celiachia Patologie da Malassorbimento) e al Laboratorio Sperimentale del

Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche ha messo a punto un test per la determinazione dei TGA-IgA con la metodica RIA con antigene umano ricombinante nella saliva, un fluido che può essere raccolto facilmente, in modo non invasivo e soprattutto ben accettato dai bambini in età scolare. Questa metodica è risultata molto sensibile (94.4%) e specifica (99.4%); in particolare, i nostri risultati hanno mostrato una completa sovrapposibilità del test salivare RIA e della metodica sierologica ELISA ($p=1$), sottolineando il notevole vantaggio di avere a disposizione un test rapido, non invasivo, ripetibile, di semplice esecuzione e di costo contenuto.

La maggior parte dei bambini risultati positivi al test salivare ha seguito il protocollo diagnostico completo; solo due bambini (0.55%) con valori salivari debolmente positivi non si sono confermati sul siero con entrambi i metodi e non hanno proseguito il follow-up.

Com'è noto, questo studio prevede in prima battuta la determinazione dei TGA di classe IgA. Considerando che nella popolazione generale esistono soggetti con deficit selettivo di IgA (in Italia 0,14%) e che nei celiaci la prevalenza del deficit di IgA è più elevata rispetto alla popolazione generale (1,7%) [63], un limite di questo studio può essere rappresentato dal rischio di non individuare questi pazienti. Bisogna tener presente però che, seppure la concentrazione degli Ab nella saliva sia inferiore rispetto al siero, le IgA costituiscono la classe anticorpale maggiormente rappresentata all'interno di questo fluido e vengono attivamente secrete dalle plasmacellule presenti nelle ghiandole salivari minori. Non sempre, dunque, i pazienti celiaci con deficit sierologico di IgA presentano TGA-IgA salivari indosabili.

In conclusione, la metodica RIA su saliva ha mostrato risultati sovrapponibili a quelli ottenuti su siero con la metodica ELISA di riferimento; potrebbe rappresentare pertanto un valido test di screening affidabile, semplice, riproducibile, economico e non invasivo. Insieme al kit Gene Celiac Screen, anch'esso poco invasivo, di facile utilizzo ed economico, potrebbe essere inserita in una strategia di screening di massa per la celiachia.

È importante sottolineare che la tipizzazione genetica su goccia di sangue e, a seguire, la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi sul campione di saliva potrebbero essere proposte e facilmente impiegate anche in un setting ambulatoriale, consentendo un'ampia diffusione sul territorio di questa metodica di screening.

3. Bibliografia

1. Ludvigsson, J.F., et al., *The Oslo definitions for coeliac disease and related terms*. Gut, 2013. 62(1): p. 43-52.
2. Fasano, A., *Celiac disease--how to handle a clinical chameleon*. N Engl J Med, 2003. 348(25): p. 2568-70.
3. Catassi, C., S. Gatti, and A. Fasano, *The new epidemiology of celiac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2014. 59 Suppl 1: p. S7-9.
4. Singh, P., et al., *Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2018. 16(6): p. 823-836 e2.
5. Gatti, S., et al., *Increased Prevalence of Celiac Disease in School-age Children in Italy*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020.
6. Kagnoff, M.F., et al., *Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease*. J Exp Med, 1984. 160(5): p. 1544-57.
7. Stene, L.C., et al., *Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study*. Am J Gastroenterol, 2006. 101(10): p. 2333-40.
8. Zanoni, G., et al., *In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes*. PLoS Med, 2006. 3(9): p. e358.

9. Fasano, A., et al., *Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(12): p. 5242-6.
10. Paterson, B.M., et al., *The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. 26(5): p. 757-66.
11. Tripathi, A., et al., *Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(39): p. 16799-804.
12. Valitutti, F., S. Cucchiara, and A. Fasano, *Celiac Disease and the Microbiome*. Nutrients, 2019. 11(10).
13. Roberts, S.E., et al., *Perinatal risk factors and coeliac disease in children and young adults: a record linkage study*. Aliment Pharmacol Ther, 2009. 29(2): p. 222-31.
14. Decker, E., et al., *Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children*. Pediatrics, 2010. 125(6): p. e1433-40.
15. Marild, K., et al., *Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: a nationwide case-control study*. Gastroenterology, 2012. 142(1): p. 39-45 e3.
16. Lionetti, E., et al., *Mode of Delivery and Risk of Celiac Disease: Risk of Celiac Disease and Age at Gluten Introduction Cohort Study*. J Pediatr, 2017. 184: p. 81-86 e2.

17. Koletzko, S., et al., *Cesarean Section on the Risk of Celiac Disease in the Offspring: The Teddy Study*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2018. 66(3): p. 417-424.
18. Girbovan, A., et al., *Is the evidence of breastfeeding protection against coeliac disease real?* Allergol Immunopathol (Madr), 2017. 45(6): p. 616-618.
19. Lionetti, E., et al., *Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children*. N Engl J Med, 2014. 371(14): p. 1295-303.
20. Jabri, B. and L.M. Sollid, *Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(12): p. 858-70.
21. Sollid L, Markussen G, Ek J, et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ- α/β heterodimer. J Exp Med 1989.
22. Liu, E., M. Rewers, and G.S. Eisenbarth, *Genetic testing: who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease?* Gastroenterology, 2005. 128(4 Suppl 1): p. S33-7.
23. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin K, et al. *Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease*. Gastroenterology 1999

24. Halttunen T, Maki M. *Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation.* Gastroenterology 1999
25. Green, P.H., *Celiac disease: how many biopsies for diagnosis?* Gastrointest Endosc, 2008. 67(7): p. 1088-90.
26. Dai, Y., et al., *Celiac Disease: Updates on Pathology and Differential Diagnosis.* Adv Anat Pathol, 2019. 26(5): p. 292-312.
27. Veress B, Franzen L, Bodin L, et al. *Duodenal intraepithelial lymphocyte-count revisited.* Scand J Gastroenterol 2004
28. Marsh, M.N., *Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue').* Gastroenterology, 1992. 102(1): p. 330-54.
29. Oberhuber, G., G. Granditsch, and H. Vogelsang, *The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. 11(10): p. 1185-94.
30. Corazza, G.R. and V. Villanacci, *Coeliac disease.* J Clin Pathol, 2005. 58(6): p. 573-4.
31. Scott, B.B. and M.S. Losowsky, *Patchiness and duodenal-jejunal variation of the mucosal abnormality in coeliac disease and dermatitis herpetiformis.* Gut, 1976. 17(12): p. 984-92.

32. Ravelli, A., et al., *How patchy is patchy villous atrophy?: distribution pattern of histological lesions in the duodenum of children with celiac disease*. Am J Gastroenterol, 2010. 105(9): p. 2103-10.
33. Bonamico, M., et al., *Patchy villous atrophy of the duodenum in childhood celiac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004. 38(2): p. 204-7.
34. McCarty, T.R., et al., *Efficacy of duodenal bulb biopsy for diagnosis of celiac disease: a systematic review and meta-analysis*. Endosc Int Open, 2018. 6(11): p. E1369-E1378.
35. Valitutti, F., et al., *Mapping histologic patchiness of celiac disease by push enteroscopy*. Gastrointest Endosc, 2014. 79(1): p. 95-100.
36. Dieterich, W., et al., *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease*. Nat Med, 1997. 3(7): p. 797-801.
37. Maglio, M., et al., *Intestinal Production of Anti-Tissue Transglutaminase 2 Antibodies in Patients with Diagnosis Other Than Celiac Disease*. Nutrients, 2017. 9(10).
38. Collin, P., et al., *Antiendomysial and anti-human recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. 17(1): p. 85-91.

39. Kurppa, K., et al., *Celiac disease without villous atrophy in children: a prospective study*. J Pediatr, 2010. 157(3): p. 373-80, 380 e1.
40. Lewis, N.R. and B.B. Scott, *Systematic review: the use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests)*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. 24(1): p. 47-54.
41. Salmi, T.T., et al., *Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits*. Gut, 2006. 55(12): p. 1746-53.
42. McNeish, A.S., et al., *The diagnosis of coeliac disease. A commentary on the current practices of members of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN)*. Arch Dis Child, 1979. 54(10): p. 783-6.
43. *Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*. Arch Dis Child, 1990. 65(8): p. 909-11.
44. Husby, S., et al., *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. 54(1): p. 136-60.
45. Husby, S., et al., *European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2019.

46. Trovato CM, et al., *Diagnostic value of persistently low positive TGA-IgA titers in symptomatic children with suspected children disease.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2021.
47. Lewis, Scott. *Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease.* Aliment Pharmacol Ther, 2010.
48. Werkstetter KJ, et al., *Accuracy in Diagnosis of Celiac Disease Without Biopsies in Clinical Practice.* Gastroenterol, 2017.
49. Bonamico M, et al., *Radioimmunoassay to detect anti-transglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease.* Am J Gastroenterol, 2001.
50. Bao F, et al., *Development of human transglutaminase IgA and IgG autoantibody radioimmunoassay: evaluation of patients with type 1 diabetes mellitus.* Immunology, 1998.
51. Bonamico M, et al., *Tissue transglutaminase autoantibody detection in human saliva: a powerful method for celiac disease screening.* J Pediatr, 2004.
52. Ludvigsson, et al., *Screening for Celiac Disease in the General Population and in High-Risk Groups.* United European Gastroenterology Journal, 2015.
53. Cataldo F, et al., *Celiac disease: to screen or not to screen the general population?* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005.

54. Jansen, et al., *The Identification of Celiac Disease in Asymptomatic Children: The Generation R Study*. Journal of Gastroenterology, 2018.
55. Verma AK, et al., *Validation of a novel single-drop rapid human leukocyte antigen -DQ2/-DQ8 typing method to identify subjects susceptible to celiac disease*. JCG Open, 2018.
56. Kim SY, et al., *Transglutaminase in disease*. Neurochemistry, 2002.
57. Catassi C et Fasano A, *Coeliac disease. The debate on coeliac disease screening--are we there yet?* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014.
58. Nellikkal SS, et al., *High prevalence of celiac disease among screened first-degree relatives*, Mayo Clin Proc, 2019.
59. Fabiani E, et al., *Dietary compliance in screening-detected coeliac disease adolescents*. Acta Paediatr Suppl, 1996.
60. Högberg L, et al., *Better dietary compliance in patients with coeliac disease diagnosed in early childhood*. Scand J Gastroenterol, 2003.
61. Toscano V, et al., *Importance of gluten in the induction of endocrine autoantibodies and organ dysfunction in adolescent celiac patients*. Am J Gastroenterol, 2000.
62. Greco L, et al., *Compliance to a gluten-free diet in adolescents, or "what do 300 coeliac adolescents eat every day?"*. Ital J Gastroenterol Hepatol, 1997.

63. Cataldo F, et al., *Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency*. J Pediatr, 1997.