



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche

**PREVALENZA DELLA CELIACHIA IN UNA
POPOLAZIONE DI DONATORI DI SANGUE
NON ANEMICI CON CARENZA DI FERRO**

**Relatore: Chiar.mo
Prof. Antonio Procopio**

**Tesi di Dottorato di:
Artan Çeka**

Ciclo XXXI A.A 2015/2018

Indice

Definizione della malattia celiaca	3
Epidemiologia ed importanza della celiachia nel mondo e in Italia	4
Storia della celiachia.	8
Fattori scatenanti la celiachia	10
Ruolo dei geni e dei fattori ambientali nella suscettibilità alla celiachia	12
Fisiopatologia della malattia celiaca	15
Aspetti clinici della celiachia	19
Presentazione	19
Comorbidità	20
Approcci diagnostici alla celiachia	22
Sintomi e segni suggestivi	23
Gruppi a rischio	24
Case finding	24
Istologia	25
Sierologia	27
Endoscopia	29
Tipizzazione HLA	30
Terapia della celiachia	31
Anemia da carenza di ferro e celiachia	34
Equilibrio del ferro nei donatori di sangue	36
Criteri di donazione	36
Deplezione di ferro e carenza di ferro subclinica in assenza di anemia	36
Valutazione della deplezione di ferro e carenza di ferro subclinica	37
Scopo dello studio	38
Metodi ed elaborazione statistica	39
Risultati	40
Prevalenza della carenza di ferro in assenza di anemia nella popolazione di donatori	40
Prevalenza della celiachia nella popolazione di donatori non anemici con carenza di ferro.	48
Discussione	51
Discussione	53
Bibliografia	

Definizione della malattia celiaca

La celiachia o malattia celiaca (CD) è un disordine infiammatorio cronico dell'intestino tenue scatenato dall'esposizione al glutine associato a cofattori ambientali in persone geneticamente predisposte. La presentazione clinica di questo disordine è molto variabile con forme asintomatiche o gravi quadri clinici chiaramente evidenti. La CD è un disordine multi sistemico che porta a differenti combinazioni nella presentazione clinica. Negli ultimi tempi sembra che ci sia un cambiamento nella presentazione clinica della CD virando dai quadri classici di malassorbimento ad una delle forme non classiche di presentazione con sintomi tenui, non specifici come stanchezza, alterazioni ematologiche, stipsi e/o distensione addominale. Oltre alla manifesta presentazione con malassorbimento è importante l'aumentata mortalità dovuta alla comparsa di proliferazioni clonali delle cellule T che predispongono al linfoma a cellule T associato a enteropatia. Ad oggi viene universalmente accettato che la CD è una condizione autoimmune in cui il fattore scatenante, il (glutine) e l'autoantigene, la transglutaminasi tissutale sono entrambi conosciuti rendendo tale condizione l'unica di questo tipo. La CD è la più frequente forma di intolleranza alimentare nel mondo occidentale di grande importanza clinica.

Epidemiologia ed importanza della celiachia nel mondo e in Italia

Fino a molto recentemente la malattia celiaca veniva considerata poco frequente negli Stati Uniti con una prevalenza stimata di 1 su 3000 abitanti¹. L'accuratezza delle stime sulla reale prevalenza della CD è migliorata sensibilmente con l'aumento dell'affidabilità dei test sierologici con l'introduzione in un primo momento di quelli per gli anticorpi IgA anti-gliadina e successivamente per gli anticorpi anti-endomisio e anticorpi IgA anti-transglutaminasi umana (hTTG). In campioni provenienti da grandi popolazioni questi test permettono lo screening per individuare le persone che necessitano una biopsia per confermare la CD. Attraverso questo approccio, la prevalenza della CD confermata da biopsia riportata in uno studio fatto sui bambini Finlandesi partendo da uno screening basato sui risultati degli anticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi è stata di 1:99², con risultati molto concordi per i due anticorpi. Questi dati sono stati confermati anche in una popolazione pediatrica Italiana in età scolare dove è stata riportata una prevalenza di 1:106^{2,3}. Tassi simili di sieroprevalenza sono stati riportati in grandi studi multicentrici condotti nelle popolazioni adulte in UK (1:87)⁴ e USA (1:105)⁵, portando l'attenzione sull'altissima frequenza della malattia nella popolazione caucasica. Questo disordine è meno comune negli Americani Ispanici⁶ e si pensa sia raro nell'Africa centrale e nell'est asiatico. La popolazione dove si presenta la maggior prevalenza di celiachia è quella dei Saharawi dove è stata riportata una prevalenza di anticorpi anti-endomisio di (5.6%)⁷. Questo valore molto più alto della media mondiale di prevalenza di malattia è il prodotto di un aumento drammatico di incidenza, dopo che questa popolazione che storicamente non consumava frumento per l'estrema povertà e stata assistita tramite programmi di aiuti umanitari introducendo nella dieta alimenti contenenti glutine.

Recentemente è stata condotta una revisione sistematica e meta-analisi per stimare l'esatta prevalenza a livello globale della CD.⁸ In questo studio dove venivano presi in considerazione le pubblicazioni dal 1991 al 2016 sono stati selezionati 96 articoli che rispettavano i criteri di inclusione da poter inserire nell'analisi statistica. Basandosi sui risultati dei test sierologici la prevalenza globale della CD era di 1,4% (intervallo di confidenza al 95%, 1,1%-1,7%) mentre considerando i risultati della biopsia la prevalenza era di 0,7%. Gli autori mettono in evidenza come sia necessario effettuare studi di prevalenza in molti paesi per avere una corretta stima della prevalenza a livello mondiale.

Generalmente la CD viene individuata più frequentemente nelle femmine rispetto ai maschi. Alcuni autori si sono posti però l'obiettivo di valutare il rischio di CD in base al sesso in popolazioni non diagnosticate prima, mediante l'uso di screening di massa. I risultati della revisione sistematica della letteratura e metanalisi condotta hanno messo in evidenza che le femmine hanno un rischio maggiore di diagnosi anche per quando riguarda i casi di celiachia prima non diagnosticata rispetto ai maschi riportando l'attenzione sulla necessità di programmi di screening e diagnosi mirati a loro.⁹

In Italia il Ministero della Salute con le sue attività istituzionali è fortemente impegnato in tema di celiachia attraverso un costante e laborioso lavoro di collaborazione con le Regioni e le Province Autonome. In particolare vengono realizzati diversi interventi mirati a garantire il celiaco durante il percorso diagnostico, condividendo con le Regioni i requisiti tecnici, professionali ed organizzativi minimi per l'individuazione dei presidi sanitari deputati sul territorio alla diagnosi di celiachia. Questa iniziativa è stata affiancata da un laborioso e articolato lavoro tecnico-legislativo di adeguamento normativo ai fini della tutela della vulnerabilità dei celiaci anche sul piano alimentare scrive la ministra della Salute nella prefazione della relazione annuale sulla celiachia del 2016¹⁰.

Dalla ultima mappatura epidemiologica (quella del 2016 menzionata sopra) risultano diagnosticati in Italia 198.427 celiaci di cui 2/3 di sesso femminile e 1/3 maschile. La malattia celiaca risulta quindi interessare in Italia più le donne (138.902) che gli uomini (59.525).

Mentre le recenti stime sulla prevalenza della celiachia riportano un valore intorno a 1%, la prevalenza media di celiachia in Italia, sulla base dei dati del 2016, risulta essere dello 0,33%. Nella Regione Marche è stata registrata la prevalenza più bassa con lo 0,22%. La prevalenza più bassa a livello nazionale si ha nelle Marche sia per i maschi (0,14%) che per le femmine (0,3%). La divergenza nei valori di prevalenza di celiachia nella Regione Marche rispetto alla popolazione nazionale e più in generale quella dei dati nazionali rispetto ai valori desiderabili spiegano il costante impegno nel mantenere alta l'attenzione della classe medica e la sensibilizzazione della popolazione su questa patologia.

Nel dicembre 2016 sono stati presentati i dati preliminari di una indagine di screening della celiachia in età evolutiva nelle scuole di Ancona e Verona negli anni 2015-2016 in una conferenza stampa indetta dall'Università Politecnica delle Marche. Il progetto ha visto l'arruolamento di 4647 bambini (82% dei soggetti invitati) di età compresa tra 5 e 10 anni mediante una campagna

informativa effettuata attraverso le scuole. La buona percentuale di adesione al protocollo proposto indica un alto interesse della popolazione alla problematica, merito anche delle campagne divulgative. In una prima fase è stata valutata la predisposizione genetica alla celiachia mediante la determinazione degli alleli per gli aplotipi HLA DQ2 e DQ8 individuando circa 1900 bambini positivi (circa 40% del campione). Nella seconda fase, nei campioni positivi allo screening genetico, sono stati ricercati gli anticorpi indicativi di CD riscontrando 54 casi di positività che poi hanno richiesto ulteriori esami e la valutazione clinica per la conferma della diagnosi di CD. Dai dati precedenti allo screening era nota la diagnosi di CD in 18 soggetti partecipanti (0,38% della popolazione) mentre i nuovi casi, se confermati dagli ulteriori accertamenti, sarebbero 40.¹¹ In questo modo la prevalenza globale di CD nel campione studiato dovrebbe essere 1,6%. Questo dato sarebbe molto vicino ai valori di prevalenza di celiachia a livello mondiale anche alla luce della recente metanalisi citata sopra⁸ e sicuramente molto migliori della prevalenza riportata nei ultimi dati presentati nella relazione al parlamento del 2016¹⁰. I dati sono nettamente migliori e più vicini ai valori desiderati di quelli prodotti dalle campagne di screening su bambini in età scolare degli anni '90 facendo ipotizzare un reale incremento della patologia o un aumento delle diagnosi dovuto all'affinamento delle tecniche e approcci diagnostici. L'importanza della valutazione di programmi di screening alternativi all'approccio classico di *case-finding* viene rafforzata dalla evidenza che maggior parte (circa 70%) dei casi di CD asintomatici o scarsamente sintomatici rimangono ancora non diagnosticati. L'approccio proposto nel progetto pilota apre la strada alla sperimentazione su larga scala di programmi di screening con modalità poco invasive, altamente sensibili e di efficacia garantita.

Ad un anno dall'entrata in vigore del nuovo protocollo diagnostico confrontando i dati nel triennio 2014-2016 emerge un incremento delle diagnosi più spinto, forse favorito dalla maggiore sensibilizzazione ma anche dai nuovi indirizzi scientifici. Nel 2016 il numero totale delle nuove diagnosi è stato di 15.569, oltre 5.000 diagnosi in più rispetto all'anno precedente.¹⁰

Il nuovo decreto sull'assistenza sanitaria integrativa anche per i prodotti alimentari destinati ai celiaci (DM del 17 maggio 2016) prevede che oggi l'unica tipologia di alimenti senza glutine erogabile gratuitamente dal Servizio Sanitario Nazionale ai celiaci sia quella identificabile in etichetta dalla dicitura "senza glutine" accompagnata dall'indicazione "specificamente formulato per persone intolleranti al glutine" oppure, in alternativa, "senza glutine" accompagnata

dall'indicazione "specificamente formulato per celiaci" e inserita nel Registro Nazionale dei prodotti senza glutine, consultabile sul sito del Ministero della Salute.

La revisione dei Livelli Essenziali di Assistenza (LEA), definita dal DM 12/01/2017, considerando che in base ai dati epidemiologici la CD presenta una prevalenza maggiore di 5/10.000 abitanti (così come vengono definite le malattie rare a livello europeo), prevede lo spostamento della CD e della sua variante clinica, la dermatite erpetiforme, nell'elenco delle malattie croniche invalidanti.

Storia della celiachia.

Moltissimi anni fa, l'uomo era un semplice cacciatore/raccoglitore. La sua dieta era fatta di frutta, noci, tuberi e occasionalmente carne. Successivamente ha imparato a coltivare le piante e così ebbe inizio la rivoluzione agricola. Il modo di vivere del cacciatore/raccoglitore fu sostituito dalla domesticazione di colture e animali. Mentre le abitudini cambiavano sono sorti alcuni problemi inattesi. L'intestino umano si era sviluppato in un periodo di più di 2 milioni di anni, in un organo sofisticato che poteva tollerare antigeni alimentari presenti nei prodotti principali dell'alimentazione per centinaia di migliaia di anni. La rivoluzione agricola del periodo Neolitico ha generato una intera serie di antigeni alimentari precedentemente sconosciuti all'uomo. La maggior parte degli uomini si sono adattati e, tra quelli che non furono in grado di adattarsi, comparvero le intolleranze alimentari e nacque la malattia celiaca.¹²

Circa 8000 anni dalla sua comparsa ci fu per la prima volta l'identificazione della malattia celiaca da parte di un medico Greco chiamato Aretaeus di Cappodocia, vissuto nel primo secolo d.C. che scrisse riguardo "l'affezione Celiaca" chiamandola "koiliakos" dal termine Greco "koelia" che significa addome. Lui scriveva: "se lo stomaco non è ritentivo al cibo il quale vi passa non digerito e crudo, e niente arriva al copro, chiamiamo questa persona celiaca"¹³

Dopo altri 17 secoli, all'inizio del XIX secolo, Mathew Baillie, probabilmente all'oscuro delle segnalazioni di Aretaeus, descrisse un disordine diarroico cronico come causa di malnutrizione e caratterizzato da distensione addominale da gas, ed inoltre proponeva qualche forma di terapia dietetica riportando come alcuni pazienti trovavano giovamento dalla dieta basata interamente sul riso. Le osservazioni di Baillie comunque passarono praticamente inosservate e ci volle la descrizione del medico Inglese Samuel Gee, un'autorità di rilievo nelle malattie pediatriche, che circa 75 anni dopo definì la descrizione moderna della malattia celiaca mentre faceva lezione agli studenti di medicina. Nonostante le numerose autopsie eseguite a causa dell'alta mortalità e il passare del tempo, non si riusciva a capire quale era la causa della malattia celiaca. Haas notò che la dieta basata sulla banana era in grado di curare la malattia e Dicke notò che, durante i periodi di carestia di pane della seconda Guerra Mondiale, i bambini con malattia celiaca miglioravano, mentre peggioravano velocemente quando gli aerei alleati lanciavano pane sull'Inghilterra. Pochi anni dopo, insieme ad

altri, Dicke pubblicò i primi lavori preliminari dove documentava per la prima volta il ruolo del glutine nella malattia celiaca. Un ulteriore passo in avanti è stato la descrizione di un nuovo strumento in grado di raggiungere il duodeno distale per eseguire le biopsie da parte di Margo Shiner a metà degli anni cinquanta.¹²

La prima fotografia disponibile che rappresenta bambini affetti da celiachia è probabilmente quella scattata nel Ormod Street Hospital di Londra negli anni '30 in un'epoca in cui non era conosciuto il glutine come causa scatenante della malattia (**Fig. 1**). Allora il termine celiachia veniva utilizzato per descrivere una sindrome clinica caratterizzata da diarrea, gonfiore addominale, scarso accrescimento e ipotonia muscolare che colpiva in età pediatrica. A causa della mancanza della terapia, la mortalità di questi bambini era del 40%. Ad oggi la dieta priva di glutine è in grado di risolvere il quadro clinico in pochi mesi e non si arriva più a questi quadri di presentazione clinica.¹⁰



Figura 1. Fotografia raffigurante bambini celiaci.¹⁰

Fattori scatenanti la CD

La malattia celiaca si sviluppa dall'esposizione di un individuo geneticamente predisposto al glutine e altri cofattori ambientali. Il fattore scatenante della CD è il glutine il quale è una massa gommosa composta da proteine di deposito che rimangono dopo che l'amido è stato lavato dall'impasto di farina di grano. Si ottiene impastando la farina di frumento sotto un flusso di acqua corrente. Queste proteine possono essere separate approssimativamente in due frazioni, gliadine e glutenine in base alle caratteristiche di solubilità differenti in soluzioni alcoliche acquose. L'acqua è in grado di eliminare le componenti idrosolubili del frumento (amido, albumine e globuline) lasciando che le proteine idrosolubili (gliadine e glutenine) si uniscano tramite l'energia ceduta durante l'impasto per formare un reticolo visco-elastico in grado di trattenere l'anidride carbonica formata durante la lievitazione. Le proteine del glutine hanno una composizione chimica complessa e sono responsabili delle proprietà uniche di cottura del grano, capacità di assorbire l'acqua, coesività, viscosità ed elasticità dell'impasto. I legami non covalenti, come quelli ad idrogeno, legami ionici e legami idrofobici, sono importanti per l'aggregazione delle gliadine e gluteine determinando le proprietà strutturali e fisiche dell'impasto¹⁴.

Il glutine rappresenta la principale proteina di deposito del grano e cereali correlati e l'analisi dettagliata della gliadina ha permesso di identificare più di cento componenti che possono essere raggruppate in quattro tipologie principali (ω 5-, ω 1,2, α/β -, γ -gliadine). È stata documentata l'immunogenicità e la tossicità di molti epitopi della gliadina¹⁵. Esiste una distinzione tra l'immunogenicità e tossicità di un peptide. Per testare le proprietà immunostimolatorie vengono usati sistemi basati sui linfociti con saggi in vitro. Finora tutti i peptidi immunostimolatori in vitro sono tossici quando testati in vivo. Comunque sono necessarie sperimentazioni ex-vivo o in vivo per confermare la tossicità e un peptide, che non necessariamente presenti effetto stimolante in vitro, sarà privo di effetti tossici per i pazienti. Le glutenine possono essere divise in due gruppi, quelle ad alto peso molecolare e quelle a basso peso molecolare. L'immunogenicità¹⁶ e la tossicità¹⁷ del gruppo ad alto peso molecolare è stata dimostrata. L'immunogenicità è stata valutata facendo prima riconoscere le proteine ad un pannello di linee di linfociti T specifici per il glutine prelevati da lesioni di celiaci per poi cimentarle durante saggi ex vivo di riconoscimento da parte di linfociti T di biopsie di pazienti celiaci mentre per confermare la tossicità, è stata valutata somministrando in-

vivo a pazienti celiaci in dieta priva di glutine una miscela di gliadine ad alto peso molecolare per confrontare i cambiamenti morfologici delle biopsie prima e dopo sei ore dalla somministrazione. Le proteine di deposito (prolamine), con composizione simile di aminoacidi a quella delle frazioni gliadiniche del grano sono state identificate nell'orzo (ordeina) e segale (secalina) e presentano caratteristiche simili di tossicità a quelle dei cereali del grano nei confronti delle persone con malattia celiaca¹⁸. Nonostante diversi siano gli epitopi del glutine con attività immunostimolatoria, alcuni di questi sono più attivi di altri. Un peptide immunodominante di 33 aminoacidi (residui 57-89) identificato su una frazione dell' α -gliadina ha proprietà funzionali attribuibili a molti residui prolinici e glutaminici. Questo peptide è in grado di reagire con la transglutaminasi tissutale con maggiore selettività dei substrati naturali conosciuti dell'enzima. In tutti i cibi derivanti dal grano che sono tossici per i pazienti celiaci possiamo trovare peptidi omologhi a quello immunodominante mentre sono assenti nei cibi non tossici.¹⁹ La prolina conferisce ai peptidi l'aumentata resistenza proteolitica gastrointestinale e causa una conformazione di elica sinistrorsa che rafforza il legame con le molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8

Ruolo dei geni e dei fattori ambientali nella suscettibilità alla CD

Nonostante lo schema di ereditarietà sia sconosciuto, è chiaro che la CD tende a clusterizzare in alcune famiglie. Basandosi sulla chiara evidenza di aggregazione familiare dimostrata in studi dove la ricerca di anticorpi anti-gliadina si è mostrata molto utile per evidenziare la celiachia latente nei familiari di pazienti celiaci²⁰ e il tasso di concordanza di circa 85% dei gemelli monozigotici, indipendentemente dal sesso e il genotipo HLA²¹, risulta molto verosimile che i fattori genetici siano alla base della CD. C'è una probabilità aumentata rispetto alla popolazione generale di sviluppare CD nei genitori, fratelli o figli dei celiaci. I risultati di studi sul *linkage* genetico mostrano che la malattia è fortemente associata con i geni HLA-DQ. La maggior parte dei pazienti sono portatori della variante DQ2 e altri portano la variante di DQ8²². L'associazione tra i geni HLA (locus COELIAC1 sul cromosoma 6p21) e la CD è molto forte se confrontata con altre malattie correlate a HLA. Comunque i ricercatori stimano che l'effetto genetico attribuibile ad HLA è di 53%. Questo effetto non spiega completamente la componente genetica di questa malattia ma alla luce delle molteplici evidenze pubblicate risulta utile nell'esclusione della diagnosi di CD e nel ridimensionamento dell'influenza dei fattori genetici non HLA²³. Circa un terzo della popolazione generale è portatrice di DQ2 suggerendo che l'HLA è solo in parte causa della malattia. La concordanza di malattia nei fratelli identici per HLA è molto minore rispetto a quella dei gemelli monozigotici. Quindi, altre regioni non HLA devono essere coinvolte rendendo la CD un disordine genetico complesso dovuto al contributo di molti geni²⁴. Inoltre i ricercatori riportano che elementi aggiuntivi di suscettibilità potrebbero essere conferiti da: COELIAC2 (5q31–33),²⁵ che contiene cluster genetici per le citochine; COELIAC3 (2q33)²⁶ che codifica per la molecola costimolatoria negativa CTLA4; and COELIAC4 (19p13.1),²⁷ che contiene la variante del gene per la miosina IXB codificante una miosina non convenzionale che altera il rimodellamento dell'actina epiteliale. I risultati di due studi di associazione sull'intero genoma hanno mostrato varianti di rischio nella regione che codifica per l'interleuchina-2 e interleuchina-21 (4q27),²⁸ che sono entrambe implicate nell'infiammazione intestinale, e altre sei varianti genetiche di rischio che controllano la risposta immunitaria.²⁹ La mappatura fine ed il sequenziamento dettagliato di queste regioni è necessario per stabilire la loro relazione causale con la malattia celiaca.³⁰

Il locus HLA e le altre varianti di sequenza del DNA identificate nei studi di associazione su larga scala (GWA) spiegano circa il 50% dell'ereditarietà della CD. La patogenesi della CD potrebbe quindi essere spiegata da altri livelli di informazione genetica indipendenti dalla variazione di sequenza, come possono essere la metilazione del DNA ed è possibile che si possa spiegare parte delle associazioni di SNP attraverso la metilazione di specifici alleli. Considerando che la mappatura della metilazione del DNA può essere diversa nelle diverse popolazioni cellulari uno studio ha preso per la prima volta in considerazione il metiloma delle cellule epiteliali e di quelle immuni delle biopsie duodenali di pazienti con CD e di soggetti di controllo. È stata individuata in questo modo una diversa metilazione dei geni della regione HLA. Attraverso la genotipizzazione dei SNP dei stessi campioni è stata messa in evidenza che il metiloma epiteliale è caratterizzato dalla perdita dei confini delle isole CpG. Questa alterazione si associa spesso ad espressione genetica alterata e ad aumento della variabilità di metilazione nei campioni. Queste evidenze indicano che la metilazione del DNA costituisce un fenomeno indipendente dal genotipo che modifica la regione HLA associandosi con la patologia in modo specifico per alcune popolazioni cellulari.³¹

La suscettibilità di un individuo al glutine potrebbe essere aumentata dall'utilizzo di alcuni farmaci. Cammarota et al.³² hanno concluso che l'utilizzo dell'interferon- α , con proprietà immunomodulatorie nella terapia dei pazienti con epatite C può attivare o peggiorare disordini autoimmuni sottostanti tra cui la CD in individui predisposti. È comunque importante riconoscere che ci sono evidenze per cui alcuni farmaci, come ACE inibitori³³ e sartani^{34,35}, inducono una sindrome malassorbitiva simil-celiaca la quale non ha però come substrato un meccanismo autoimmune ed è reversibile con la sospensione del farmaco. Le infezioni intestinali potrebbero causare un aumento transitorio della permeabilità dell'intestino tenue e potrebbero portare ad un sovra espressione e rilascio della transglutaminasi tissutale che aumenta la immunogenicità del glutine. Batteri a bastoncello sono stati identificati nell'epitelio intestinale di bambini con malattia celiaca nonostante questa colonizzazione possa essere casuale.³⁶ I risultati di studi longitudinali mostrano che un'alta frequenza di infezioni da rotavirus può aumentare il rischio di malattia celiaca in bambini geneticamente predisposti. In questi studi è stato dimostrato che le infezioni frequenti da rotavirus erano predittive di rischio aumentato di CD se confrontati con l'assenza di infezione. È stato inoltre dimostrato che il rischio aumenta con l'aumentare delle infezioni.³⁷ L'omologia fra la proteina neutralizzante rotavirus VP-7 e la transglutaminasi tissutale potrebbe spiegare tramite meccanismi di mimetismo molecolare come l'infezione da rotavirus possa essere implicata nello sviluppo della malattia celiaca. Un sottogruppo di IgA anti-transglutaminasi è in grado di riconoscere

la proteina virale VP-7 nella CD attiva. Questi anticorpi riconoscono gli autoantigeni ed essendo funzionalmente attivi sono in grado di aumentare la permeabilità intestinale e indurre l'attivazione dei monociti.³⁸ I cambiamenti nell'alimentazione infantile possono influenzare l'incremento e la riduzione della malattia, come riportano i risultati di uno studio svolto in Svezia. I risultati di questo studio caso controllo³⁹, che prevedeva la costruzione di modelli statistici basati sui questionari che valutavano le modalità di svezzamento dei bambini, mostrano che l'introduzione del glutine nella dieta mentre i bambini venivano ancora allattati al seno, e la introduzione di piccole o medie quantità anziché grandi quantità, sono fattori indipendenti protettivi nei confronti della malattia nella infanzia precoce e probabilmente tardiva, mentre la tempistica dell'introduzione del glutine da solo era irrilevante. Comunque questi studi non sono stati confermati da uno studio prospettico osservazionale successivo che ha valutato l'associazione della tempistica dell'esposizione al glutine con la comparsa di CD in bambini ad alto rischio in quanto portatori di HLA definiti a rischio.⁴⁰ Alcune evidenze più robuste sono state apportate da uno studio multicentrico a doppio cieco di follow-up nel quale sono stati seguiti dalla nascita per dieci anni 225 bambini spagnoli a rischio di sviluppare CD in base al genotipo HLA (HLA-DQ2/HLA-DQ8). In questo studio viene riportato che la quantità di glutine assunta nel periodo tra 11 e 36 mesi e la durata dell'alimentazione al seno non sono fattori di rischio per lo sviluppo di CD. I più rilevanti fattori di rischio ritrovati sono stati il sottogruppo genotipico (HLA-DQ2.5/DQ2.5 e DQ2.5/DQ2.2) con rischio relativo di 4,7 e il sesso femminile che comportava un rischio di cinque volte maggiore a quello maschile. In questi gruppi a rischio la malattia si presentava nella maggior parte dei casi prima dei due anni di età e con una lieve espressione clinica⁴¹. Sono comunque necessari ulteriori grandi studi di follow-up per chiarire come cofattori dietetici incidono sulla comparsa di questa condizione prima che l'immunità di un bambino sia sviluppata per identificare strategie di prevenzione primaria.³⁰

Fisiopatologia della malattia celiaca

La malattia celiaca è la più frequente enteropatia autoimmune a livello mondiale. Nella CD viene attivato in un sottogruppo di soggetti geneticamente predisposti l'infiammazione dell'intestino tenue scatenata dall'esposizione al glutine e guidata dai linfociti T. l'espressione di HLA DQ2 e/o DQ8 nelle cellule presentanti l'antigene dell'intestino di questi soggetti fa sì che questi leghino il glutine preventivamente modificato ad opera della transglutaminasi tissutale (TG2).⁴²

Lo studio della fisiopatologia della CD si è focalizzato sui meccanismi attraverso i quali i peptidi del glutine, una volta attraversato l'epitelio nella lamina propria, vengono deamidati dalla transglutaminasi tissutale per essere poi presentati dalle cellule presentanti l'antigene DQ2+ o DQ8+ alle cellule T CD4+ patogenetiche. Una volta attivate, le cellule T CD4+ guidano la risposta delle cellule T-helper di tipo 1 che porta allo sviluppo delle lesioni celiache ossia l'infiltrazione intraepiteliale e della lamina propria delle cellule infiammatorie, iperplasia delle cripte ed atrofia dei villi.³⁰

Le proteasi gastrointestinali nel lume intestinale rappresentano la prima difesa contro le proteine nella dieta che sono potenzialmente tossiche, incluse le proteine del glutine non completamente digerite.¹⁹ Alcuni autori hanno potuto quantificare e dimostrare un aumento delle plasmacellule e dei loro precursori nella lamina propria della mucosa dei pazienti celiaci rispetto ai non celiaci. Le plasmacellule sono state messe in evidenza con l'utilizzo di anticorpi contro antigeni plasmacellulari e l'aumento sarebbe per gli autori potenzialmente un meccanismo di difesa contro il microbiota anormale proliferante nel duodeno del paziente celiaco.⁴³

La permeabilità intestinale è aumentata nella malattia celiaca e il glutine può raggiungere la lamina propria attraverso vie differenti. I ricercatori hanno postulato che esiste una via paracellulare sulla base dell'aumento di espressione della zonulina, una proteina implicata nell'apertura delle giunzioni serrate,⁴⁴ e i cambiamenti indotti dai T-helper di tipo 1 sull'espressione, localizzazione, o fosforilazione delle proteine epiteliali giunzionali nella malattia attiva.⁴⁵ Inoltre Wapenaar et al.⁴⁶ hanno identificato varianti nei geni che codificano per le proteine delle giunzioni serrate in un modello basato sullo studio della CD e colite ulcerosa, suggerendo che fattori ereditari potrebbero contribuire a questo effetto che se replicato da ulteriori evidenze confermerebbero un substrato eziologico comune nelle due malattie. Comunque, il passaggio paracellulare del glutine non è

provato, mentre risultati di studi hanno mostrato che il peptide α 2-gliadin-33mer immunodominante viene traslocato nella lamina propria dopo una parziale degradazione attraverso una via di transitosi dipendente dall'interferon- γ .⁴⁷ Inoltre, la via di trasporto protetto dei peptidi gliadinici, mediata dalla retrotransitosi delle IgA secretorie dal compartimento apicale a quello basale mediante il recettore della transferrina CD71,⁴⁸ promuove l'influsso delle proteine del glutine intatte e quindi dannose. La transglutaminasi tissutale, un enzima ubiquitario calcio dipendente che catalizza modificazioni post translazionali delle proteine e viene rilasciata durante l'infiammazione, potrebbe avere almeno due ruoli importanti nella malattia celiaca. Essa è il principale bersaglio antigenico per gli anticorpi anti-endomisio e anticorpi anti-HTTG⁴⁹ oltre ad essere l'enzima che mediante modifiche enzimatiche delle proteine alimentari è responsabile della deamidazione che aumenta l'effetto immunostimolatorio del glutine.⁵⁰ L'espressione e l'attività della transglutaminasi tissutale sono aumentati nella mucosa dei pazienti con malattia celiaca, dove, deamidando la glutamina in acido glutamico, rendendo i peptidi gliadinici carichi negativamente e quindi più propensi a calzare bene nelle tasche delle regioni leganti l'antigene di DQ2/DQ8 mediante generazione di peptidici attraverso un meccanismo di modificazione enzimatica.⁵¹ Ulteriori funzioni dell'enzima nella malattia celiaca sono quella del *cross-linking* dei peptidi gluteinici, formando complessi sovramolecolari e catalizzando sia il legame dei peptidi gluteinici al collagene intestinale o l'incorporazione dell'istamina nelle proteine gluteiniche (transamidazione). Tutte queste azioni contribuiscono alla formazione di un vasto numero di epitopi stimolanti le cellule T che potrebbero essere implicati in stadi differenti della malattia.³⁰

Nella mucosa dei pazienti con malattia celiaca attiva, le cellule T CD4+ reattive al glutine producono varie citochine infiammatorie tra cui quelle più importante è l'interferon- γ . Queste citochine innescano vari meccanismi effettori inclusa la secrezione aumentata di metalloproteasi danneggianti la matrice tissutale e aumento della citotossicità dei linfociti intraepiteliali contro gli enterociti con aumento dell'apoptosi degli enterociti e appiattimento dei villi.⁵² Molti aspetti dei meccanismi molecolari che guidano la risposta immune nella malattia celiaca sono sconosciuti. Alcune citochine proinfiammatorie sono sovraesprese nella mucosa celiaca attivata, come l'interferon- γ , interferon- α , interleuchina-6, interleuchina-18 e interleuchina-21. Comunque paradossalmente, il TNF α , che è il più potente promotore dell'infiammazione, e l'interleuchina-12 che è la citochina principale che stimola le cellule T alla produzione di interferon- γ , non sono aumentate. Di Sabatino et al. hanno dimostrato il ruolo patogenetico della produzione dalle cellule dendritiche plasmocitoidi di interferon- α , cosa che pone l'attenzione sul ruolo centrale

dell'interferon- α nel promuovere la differenziazione delle cellule T di tipo 1 e la produzione di interferon- γ .^{30,53}

L'immunità mediata dalle cellule T da sola non basta per spiegare l'espansione de linfociti CD8+ citotossici intraepiteliali. L'interleuchina-15 è implicata nell'attivazione della citotossicità dipendente dalle perforine e granzima dei linfociti intraepiteliali nei celiaci, e nel promuovere la loro espressione dei recettori delle cellule *Natural Killer* che riconoscono molecole MHC di classe I non classiche, contribuendo così all'aumento dell'apoptosi degli enterociti. Inoltre l'interleuchina-15 potrebbe avere un ruolo cruciale nella comparsa delle proliferazioni clonali delle cellule T a causa della sua azione antiapoptotica sui linfociti intraepiteliali, predisponendo così i pazienti alle complicazioni neoplastiche della malattia celiaca. L'incontrollata sovraespressione di IL-15 nella CD refrattaria perpetua il danno epiteliale e promuove la comparsa di proliferazioni cellulari T di tipo clonale.⁵⁴ Alcuni peptidi gluteinici possono indurre direttamente danno della mucosa attraverso una via non dipendente dalle cellule T (risposta innata). Il peptide meglio caratterizzato è il frammento non immunodominante p31-43/49 dell' α -gliadina che si pensa sia incapace di stimolare le cellule T CD4+ reattive al glutine. Nella mucosa celiaca, p31-43/49 induce la produzione dell'interleuchina-15 la quale a sua volta inibisce il *signalling* immunoregolatorio del TGF β , promuove la maturazione delle cellule dendritiche e causa stress epiteliale. Alcuni aspetti della patogenesi della malattia celiaca rimangono comunque sconosciuti, compresa la relazione tra gli eventi nell'epitelio, il contributo dell'immunità innata o adattativa e il ruolo delle cellule T regolatorie.³⁰

In uno studio recente viene descritto come un peptide di derivazione gluteinica/gliadinica (P31-43) è in grado di inibire il canale del cloro (CFTR) che normalmente è mutato nei pazienti con fibrosi cistica (CF) portando ad uno stato acquisito di inibizione di CFTR nell'intestino e contribuendo alla patogenesi della CD. I bambini con CF hanno un rischio tre volte maggiore di sviluppare CD e l'inibizione di CFTR non porta soltanto a squilibri intra ed extracellulari ma attiva la transglutaminasi-2 e disabilita l'autofagia. La combinazione di questi fenomeni altera l'omeostasi degli enterociti bloccandoli in uno stato pro-infiammatorio irreversibile che facilita la risposta immune mediata dai linfociti T contro un altro peptide di derivazione gluteinica/gliadinica (P57-68). Nel modello proposto la patogenicità della gliadina si esprime attraverso l'effetto antigenico della proteina deamidata P57-67 coadiuvata dalla proteina P31-43. Gli autori propongono i meccanismi descritti, come possibili target terapeutici nella cura della CD mediante l'utilizzo di potenziatori di CFTR, inibitori di

TGM2 e stimolatori dell'autofagia nella stessa maniera in cui vengono applicati con successo nella terapia della CF.⁵⁵

Tramite uno studio in vitro, ex vivo è stato possibile valutare l'effetto dell'esposizione a dosi crescenti di gliadina digerita (250 µg/mL - 1000 µg/mL) sulle colture cellulari. In un recente studio è stato documentato un aumento de +50% di specie reattive dell'ossigeno ROS dopo 12 ore di esposizione a partire da una dose di 500 µg/mL di gliadina. Inoltre è stato possibile dimostrare danno al DNA dopo 24 ore di esposizione a concentrazioni di 250 µg/mL gliadina. L'attività della transglutaminasi tissutale (TG2) aumentava con l'aumentare delle dosi di gliadina (250/500/1000 µg/mL). Effetti dannosi sono stati messi in evidenza anche con immunistoichimica su campioni bioptici di pazienti celiaci confermando l'induzione di stress ossidativo, danno al DNA e stimolazione pro-apoptotica della gliadina sia nelle colture cellulari che nella mucosa dei pazienti celiaci.⁵⁶

Lo stress ossidativo è stato studiato anche come possibile biomarcatore per il monitoraggio dei pazienti con CD trattata. Gli autori di uno studio hanno valutato campioni bioptici di duodeno e sangue di pazienti celiaci non trattati e pazienti in terapia con dieta priva di glutine suddividendoli in responsivi e non responsivi alla terapia. Sono stati misurati i livelli plasmatici di ROS, la perossidazione lipidica, ossidazione proteica, capacità totale antiossidante (TAC), ossido nitrico e glutatione negli eritrociti. Attraverso questo studio è stato messo in evidenza un aumento significativo dei marcatori plasmatici di stress ossidativo e una riduzione degli antiossidanti nei pazienti celiaci non trattati e quelli trattati ma non responsivi se confrontati con il sottogruppo di pazienti non responsivi alla dieta priva di glutine. È stata osservata una correlazione diretta fra il grado di atrofia duodenale, la produzione di ROS e perossidazione lipidica mentre la capacità antiossidante totale e i livelli di glutatione negli eritrociti erano inversamente correlati confermando il coinvolgimento dello stress ossidativo nel danno tissutale dei pazienti con CD e l'atrofia duodenale.

57

Aspetti clinici della CD

PRESENTAZIONE

Fino a 30 anni fa, l'uso della biopsia intestinale era riservata ai pazienti con sintomi di evidente malassorbimento e conseguentemente la prevalenza di malassorbimento tra i pazienti con malattia celiaca era molto alta. All'inizio degli anni 80, la consapevolezza della malattia è migliorata e una riduzione della soglia per approfondimenti diagnostici ci ha permesso di riconoscere l'espressione più subdola e clinicamente variabile della condizione. Alla fine degli anni 80, dopo la comparsa della sierologia, il numero dei pazienti con sintomi minori era il doppio di quello delle persone con malassorbimento evidente. Questa osservazione venne accompagnata da un significativo aumento delle diagnosi, progressiva riduzione dell'età dei pazienti alla diagnosi e la riduzione del rapporto fra femmine e maschi.⁵⁸ Il trend venne inizialmente osservato in Italia e successivamente confermato anche negli USA.⁵⁹ Nonostante i chiari avanzamenti nella diagnosi il numero di casi non diagnosticati rimane ancora alto. Un recente studio svolto negli Stati Uniti si è proposto l'obiettivo di studiare in modo sistematico, mediante l'utilizzo di questionari sottoposti a specialisti di diverse branche di un centro universitario, il grado di consapevolezza nei riguardi della malattia nei pazienti adulti. L'elaborazione dei dati ottenuti dal questionario a 18 sezioni dove venivano esplorate le caratteristiche cliniche, problematiche diagnostiche e gestionali della CD ha messo in evidenza che circa 70% dei medici ritenevano la CD una malattia rara. I gastroenterologi avevano una percezione migliore del rischio aumentato di linfoma rispetto agli altri specialisti. Solo un terzo dei partecipanti valutava l'eventuale deficit di IgA contestualmente agli anticorpi per la CD.⁶⁰ La malattia è da due a tre volte più frequente nelle femmine rispetto ai maschi, ma questo predominio si riduce dopo i 65 anni. Lo spettro di presentazioni cliniche della malattia celiaca è molto vasto. I pazienti possono essere da asintomatici a gravemente sintomatici. Per catalogare le possibili forme di presentazione clinica dovrebbero essere evitati termini come atipico, tipico e classico mentre termini come silente, minore e maggiore possono caratterizzare la presentazione clinica in modo semplice e chiaro. L'uso del termine silente è stato comunque criticato perché considerando che molti casi di celiachia diagnosticati tramite programmi di screening non sono

silenti ma semplicemente non riconosciuti. Alcuni autori, in uno studio ormai datato, hanno preso in considerazione la loro esperienza di circa 15 anni ed hanno osservato che, suddividendo il periodo in tre sottogruppi minori, la frequenza di nuove diagnosi di CD poste sulla base di sintomi minori aumentava con il passare degli anni e l'aumento della loro esperienza e consapevolezza. L'anamnesi, esame obiettivo o di laboratorio eseguita in modo approfondito possono evidenziare alterazioni subdole⁶¹ anche se molti pazienti con malattia silente sono completamente asintomatici. Alcune malattie autoimmuni o immunomediate si associano frequentemente alla malattia celiaca. Queste comprendono il diabete di tipo 1, la tiroidite autoimmune, miocardite autoimmune, cardiopatia dilatativa idiopatica, sindrome di Sjögren, lupus eritematoso sistemico, epatite autoimmune, colangite autoimmune, cirrosi biliare primitiva, deficit di IgA, malattia di Addison, nefropatia mesangiale da IgA, alopecia areata, disordini neurologici, atopia, malattia infiammatoria intestinale, vasculite sistemica e intestinale, psoriasi, artrite idiopatica giovanile, e polimiosite.³⁰

La CD si può presentare con uno spettro molto ampio di sintomi variando dai problemi addominali in senso lato, alla carenza di ferro o stanchezza cronica. In una revisione sistematica della letteratura alcuni autori hanno preso in considerazione la valutazione dell'affaticamento come sintomo della CD. Da questa analisi sono stati evidenziati 298 articoli dei quali 11 articoli hanno studiato l'affaticamento nella CD e soltanto cinque rispondevano ai criteri per la valutazione finale. In questi ultimi l'affaticamento veniva descritto metodologicamente. Nessuno dei lavori considerati era di alta qualità e presentavano vari difetti metodologici. Nonostante l'affaticamento viene spesso riportato dai pazienti ed osservato alla valutazione clinica da parte del medico nella CD la mancanza di una chiara definizione della stessa rende difficile la valutazione metodologicamente rigorosa di questo sintomo basandosi sulle pubblicazioni disponibili.⁶²

COMORBIDITA

Più di 50% dei pazienti celiaci non trattati presentano perdita di massa ossea rilevata con la densitometria ossea (dual-energy X-ray absorptiometry:DXA).⁶³ La perdita di massa ossea in alcuni pazienti con malattia celiaca è in grandi linee proporzionale all'entità di malassorbimento.⁶⁴ Studiando i parametri di contenuto minerario osseo, area ossea e densità mineraria ossea è stato

possibile documentare che nei bambini, l'osteoporosi può essere reversibile seguendo una dieta priva di glutine con ripristino dei normali valori densitometrici. I tre parametri presi in considerazione si normalizzavano a quattro anni dalla diagnosi e l'inizio della dieta priva di glutine.⁶⁵ Negli adulti la densitometria minerale ossea migliora ma raramente si normalizza ponendo questi ultimi a maggior rischio di fratture.⁶⁶ Gran parte del miglioramento della densità minerale ossea avviene dopo uno o due anni di eliminazione del glutine. Perciò il momento migliore di misurazione potrebbe essere in questo momento quando la densitometria è indicata per valutare la necessità di supplementare la dieta priva di glutine con farmaci attivi sulla mineralizzazione.³⁰

Nella CD i problemi autoimmuni sono molto più frequenti rispetto alla popolazione generale. Questo potrebbe essere dovuto alla condivisione di substrati genetici comuni nelle patologie diverse. Prendendo in considerazione la popolazione pediatrica la prevalenza di condizioni autoimmuni associate aumenta quando l'età alla diagnosi è maggiore in quanto si ritiene che la durata dell'esposizione al glutine sia stata maggiore.⁶⁷ Nei pazienti adulti nonostante l'età alla diagnosi correla con la prevalenza di altre malattie autoimmuni si è ritenuto più importante considerare la durata media dell'effettiva esposizione al glutine invece che l'età alla diagnosi. In questo caso si sono ottenuti dati contrastanti dimostrando che l'effettiva durata di esposizione al glutine non correla con la prevalenza di malattie autoimmuni.⁶⁸ Considerando quindi che facendo una diagnosi e terapia precoce potrebbe essere possibile evitare le patologie autoimmuni associate almeno nei bambini, si conferma la necessità di mantenere alta l'attenzione nel rilevare ogni segno e sintomo indicativo di CD nell'intento di intercettare il prima possibile le forme atipiche di presentazione o silenti che ormai sono la maggioranza. L'importanza dell'autoimmunità nella malattia celiaca è triplice: in primo luogo, essa aggrava ulteriormente il decorso clinico della malattia celiaca; secondo, i pazienti potrebbero presentare soltanto i sintomi secondari alla autoimmunità e questo potrebbe favorire la diagnosi della malattia celiaca minore; e terzo, la privazione del glutine potrebbe migliorare il controllo di alcuni disordini autoimmuni associati. Lievi alterazioni epatiche sono comuni nella malattia celiaca. Ipertransaminasemia isolata, senza cambiamenti specifici istologici e prontamente reversibile con dieta priva di glutine, è la più frequente forma di coinvolgimento epatico. Altre possibili forme includono l'epatite autoimmune, cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva e steatosi epatica non alcolica.⁶⁹ Viene raccomandata la ricerca di CD nei pazienti che presentano epatite autoimmune.^{70 30}

Approcci diagnostici alla celiachia

Alcune importanti novità sono state introdotte in tema di celiachia con il nuovo protocollo di diagnosi e follow-up (G. U. n. 191 del 19 agosto 2015) alla luce delle nuove evidenze scientifiche, in particolare le Linee Guida sulla diagnosi di celiachia della Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica (ESPGHAN) che hanno introdotto la possibilità di porre diagnosi di celiachia senza ricorrere alla biopsia duodenale in casi selezionati in età pediatrica. Vengono proposte in questo protocollo due algoritmi diagnostici per l'età pediatrica (**Fig. 2**) e per l'età adulta (**Fig. 3**).

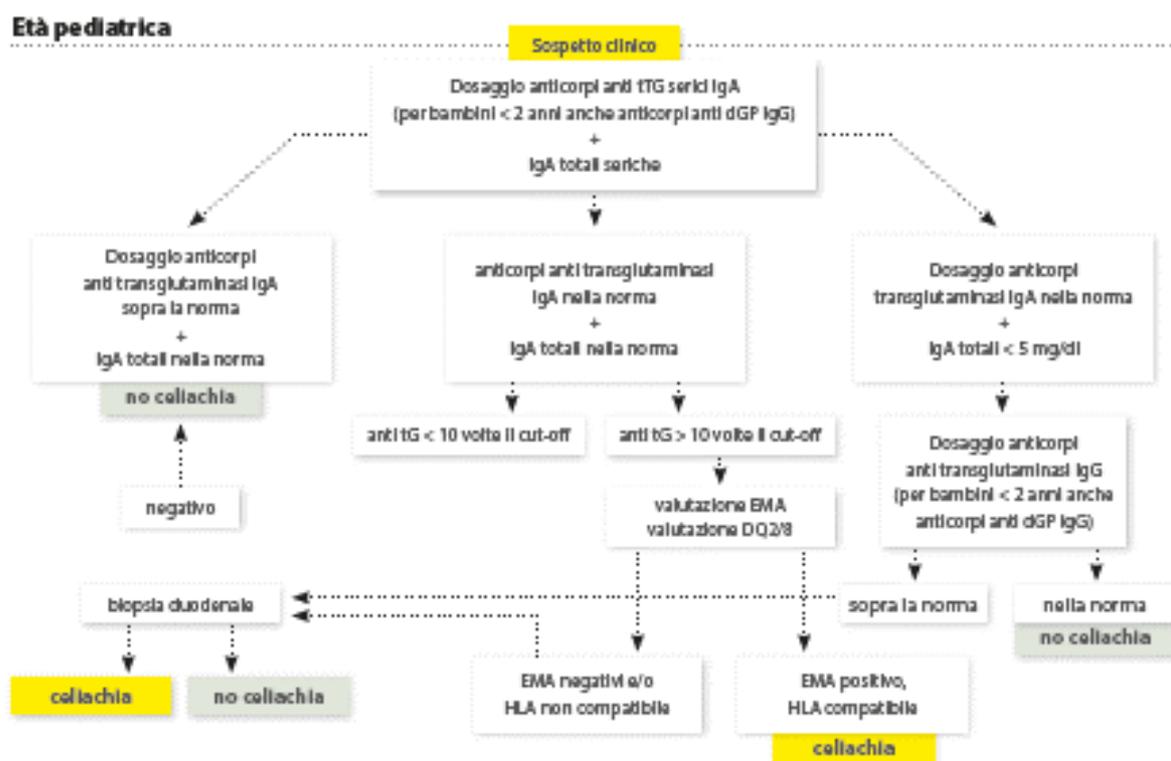


Figura 2. Algoritmo diagnostico per la CD in età pediatrica.¹⁰

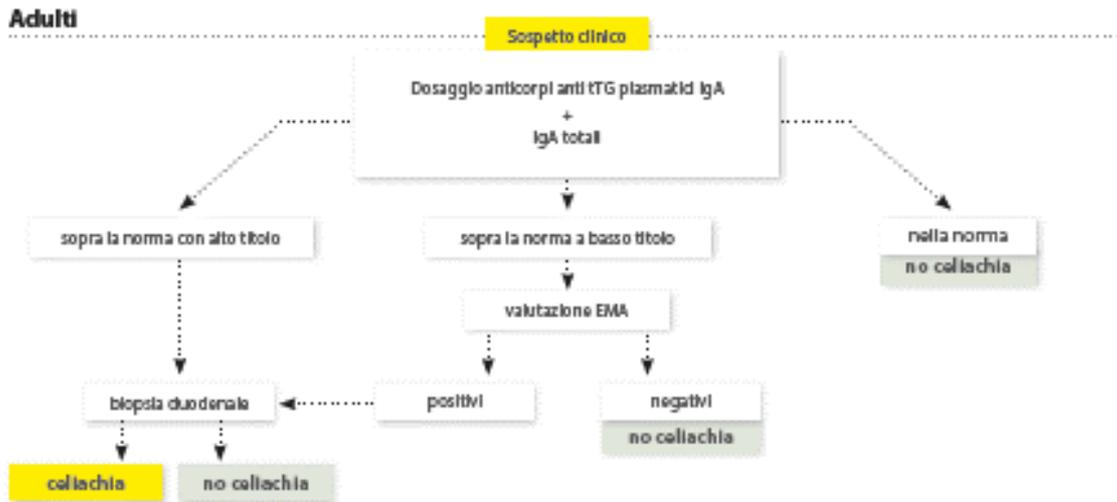


Figura 3. Algoritmo diagnostico per la CD negli adulti.¹⁰

La corretta applicazione del nuovo protocollo prevede l'identificazione del paziente da inviare al percorso diagnostico. Di seguito vengono riportate le tabelle dei sintomi, segni e condizioni cliniche più frequenti che dovrebbero far sospettare la celiachia ed avviare l'applicazione del protocollo diagnostico.

SINTOMI E SEGNI SUGGERITIVI DI CD

- Disturbi intestinali cronici (dolore addominale, stipsi, diarrea, meteorismo, alvo alterno)
- Stomatite aftosa ricorrente
- Ipoplasia dello smalto dentario
- Scarso accrescimento staturale
- Ipertransaminasemia
- Sideropenia (con o senza anemia)
- Stanchezza cronica
- Rachitismo, osteopenia, osteoporosi
- Dermatite erpetiforme

- Artrite, artralgia
- Alopecia
- Anomalie dello sviluppo puberale
- Orticaria ricorrente
- Disturbi della fertilità (abortività spontanea, menarca tardivo, menopausa precoce, infertilità)
- Complicanze della gravidanza
- Iposplenismo
- Epilessia con calcificazioni endocraniche ed altre patologie neurologiche (atassia, polineurite...)
- Disturbi del comportamento alimentare (anoressia nervosa)

GRUPPI A RISCHIO PER CD

- Familiarità di I grado per celiachia
- Deficit selettivo IgA sieriche
- Patologie autoimmuni associate (soprattutto diabete tipo 1 e tiroidite)
- Sindrome di Down
- Sindrome di Turner
- Sindrome di Williams

CASE FINDING

Il peso di malattia non rilevata è molto alto. Una cauta e sottostimata prevalenza ipotetica di 0,5% corrisponde a circa 2,5 milioni di pazienti ancora non diagnosticati in Europa. I ricercatori hanno calcolato che il rapporto tra i pazienti diagnosticati e non diagnosticati è di 1:7. La maggior parte dei soggetti celiaci risultano non ancora diagnosticati o mis-diagnosticati continuando ad assumere glutine con la dieta pur essendo celiaci. L'esposizione al glutine li porta a lamentare i segni e sintomi legati alla malattia non diagnosticata esponendoli al rischio aumentato di svilupparne le complicanze. L'aumento di consapevolezza dei medici sullo spettro clinico di questo disordine e la vigile ricerca di sintomi di sospetto sono quindi necessari. La comunità scientifica si dibatte su quale sia la strategia diagnostica migliore per trovare i celiaci ancora non diagnosticati: lo screening di

massa o il *case-finding*. I ricercatori hanno mostrato che la strategia di *case-finding* mediante la misurazione degli anticorpi anti-endomisio o anti-hTTG seguita da conferma bioptica è un approccio accurato, accettabile e con buon rapporto costo efficacia anche nel sistema di cure primarie.^{71,72} Inoltre, i pazienti con condizioni che sono frequentemente associate alla malattia celiaca dovrebbero essere inquadrati in un protocollo di screening. La strategia di *case-finding* viene preferita allo screening di massa della popolazione generale nonostante la malattia celiaca soddisfa i criteri per lo screening di massa per almeno quattro ragioni: la malattia è abbastanza frequente, esistono test di screening semplici e sufficientemente accurati, esiste una terapia efficace, la condizione è aggravata dal rischio di complicanze. La strategia del *case-finding* si basa sulla selezione degli individui da sottoporre al test in base alla valutazione dei segni e sintomi che presentano, familiarità e presenza concomitante di patologie associate alla celiachia. Con l'utilizzo di questa strategia la prevalenza attuale di diagnosticati è di 0.3% e ci si domanda se non sia vantaggioso passare alla strategia di screening di massa. Comunque, l'efficacia, accettabilità, e i costi dello screening di massa sono sconosciuti e non ci sono evidenze che questa strategia porterebbe a una riduzione di morbilità e mortalità. La strategia di *case-finding* è sicuramente più economica per il SSN ed è meglio accettata dai pazienti rispetto allo screening di massa ma richiede che la formazione e la sensibilità dei medici di famiglia e pediatri di libera scelta sia adeguata a identificare i sintomi e segni precoci suggestivi di celiachia.

ISTOLOGIA

La diagnosi della malattia celiaca si basa sulla presenza di lesioni caratteristiche nella biopsia dell'intestino tenue. Sono necessarie quattro biopsie endoscopiche per una sicurezza diagnostica assoluta e i campioni dovrebbero essere inclusi in paraffina e correttamente orientati e sezionati per evitare artefatti che spesso portano a diagnosi errata. I campioni bioptici vengono generalmente prelevati dal duodeno distale, ma poichè è stata riportata la possibilità di atrofia isolata a chiazze dei villi del bulbo duodenale, un'ulteriore biopsia dovrebbe essere prelevata da questa regione. Per questo motivo sono necessarie almeno quattro prelievi istologici eseguiti nella seconda e terza porzione del duodeno con l'aggiunta di almeno un prelievo dal bulbo.

La patologia della malattia può variare dalle lesioni infiltrative caratterizzate da aumento dei linfociti intraepiteliali con architettura normale alla mucosa totalmente piatta. La classificazione Marsh, così come modificata da Oberhuber et al.,⁷³ viene usata per graduare la severità delle lesioni. Comunque questa classificazione comporta sei categorie diagnostiche e potrebbe essere inaffidabile. Un sistema di graduazione semplificato basato su tre morfologie diverse è stato proposto da Corazza et al.⁷⁴: A, lesioni infiltrative non atrofiche; B1 lesioni atrofiche con accorciamento dei villi ma comunque rilevabili; e B2, lesioni atrofiche con villi non rilevabili. Questo sistema presenta una riproducibilità inter osservatore significativamente migliore della classificazione Marsh-Oberhuber. Le lesioni minori, come l'incremento dei linfociti intraepiteliali, vengono ritenuti importanti per la diagnosi; comunque, le lesioni infiltrative isolate hanno bassa specificità per malattia celiaca e potrebbero essere correlate ad altre cause di linfocitosi intraepiteliale. Inoltre l'atrofia dei villi viene riportata in altre patologie e la diagnosi di celiachia viene quindi confermata soltanto dai sintomi clinici, sierologia positiva o il miglioramento istologico dopo l'istaurazione della dieta priva di glutine. La valutazione del miglioramento clinico nei pazienti con malattia celiaca silente o minore è molto difficile e questi pazienti potrebbero beneficiare di una seconda biopsia post trattamento. La ripetizione della biopsia dopo la terapia dietetica non è sempre necessaria, però la dimostrazione del miglioramento istologico supporta la diagnosi, verifica l'aderenza alla dieta, e rassicura il paziente. Inoltre una seconda biopsia potrebbe essere utile nei pazienti con alterazioni istologiche ambigue, sierologia inizialmente negativa o discrepante, e nei casi di sintomatologia non migliorata.

30

Sulla base dei nuovi algoritmi diagnostici approvati in sede di Conferenza Stato-Regioni, è stata prevista la possibilità di diagnosticare la celiachia in una popolazione pediatrica selezionata senza ricorrere alla biopsia duodenale. I criteri sottoesposti secondo i quali in Europa viene posta diagnosi di celiachia in circa 40% dei casi senza il bisogno di ricorrere a biopsia sono unicamente rivolti alla popolazione pediatrica mentre negli adulti rimane obbligatorio l'accertamento bioptico. Le caratteristiche della popolazione pediatrica dove si può porre diagnosi di celiachia senza ricorrere alla biopsia sono:

1. Livelli di anticorpi anti-transglutaminasi superiore a 10 volte il cut-off di normalità;
2. Positività agli anticorpi anti-endomisio;
3. Positività per gli alleli DQ2/8
4. Sintomi suggestivi di celiachia

SIEROLOGIA

Ci sono stati molti cambiamenti nella diagnosi della CD nell'ultima decade con l'aumento dell'importanza clinica dei test sierologici. L'utilizzo della sierologia è cruciale nell'individuazione e diagnosi di CD e l'introduzione e utilizzo nella pratica clinica dei test sierologici ha fatto aumentare di molto il numero di diagnosi di CD. Inoltre la disponibilità di vari test sierologici con ottime prestazioni analitiche ha cambiato il panorama di stadio clinico di CD al momento della diagnosi riducendo al minimo le forme di presentazione clinica conclamata con sintomi gastrointestinali gravi e malassorbimento. Nei bambini e adolescenti il riscontro ripetuto di TG2-IgA ad alti livelli rende l'endoscopia e le biopsie duodenali non necessarie.⁷⁵

La scoperta della transglutaminasi-2 come il principale autoantigene nella CD ha portato allo sviluppo di saggi per anticorpi di classe IgA anti-transglutaminasi (TG2-IgA). I test sierologici per TG2-IgA sono diventati importanti nella diagnosi della CD con l'aumento della qualità e la riduzione dei costi dei saggi immunometrici. Questi saggi sono supportati da robuste evidenze scientifiche e permettono adeguati livelli di produttività analitica. Il test di anticorpi IgA anti-endomisio (EMA) si basa sulla ricerca della fluorescenza nell'esofago di primato o cordone ombelicale umano dovuta al legame di anticorpi che riconoscono la TG-2 tissutale. Questo test è molto più laborioso ed è influenzato dall'esperienza e giudizio personale dell'esaminatore. È stato dimostrato che i test per la gliadina deamidata presentano buona accuratezza, se pur inferiore al test TG2-IgA. Sono stati sviluppati molti test commerciali per TG2-IgA e i laboratori garantiscono la qualità analitica eseguendo scrupolosamente programmi di controllo di qualità interna (CQI) e verifiche di qualità esterna (VEQ). Il test TG2-IgA è stato utilizzato in molti studi di screening ed in popolazione con bassa incidenza di CD. Il test EMA, in quanto mostra alta specificità, viene utilizzato come conferma di secondo livello. Sono stati sviluppati molti test *Point-of-care* (POCT) utilizzabili nello *screening* con risultati comparabili ai test convenzionali. Nonostante ciò, la produzione rapida di risultati mediante l'utilizzo di POCT generalmente non è decisiva nella diagnosi di CD e potrebbero esserci problematiche nella qualità analitica quando in mano a personale sanitario non esperto.⁷⁵

Hill et al. hanno revisionato gli studi che valutavano l'accuratezza dei test anticorpali. In 32 studi sugli anticorpi IgA anti-endomisio (**Fig. 4**), la sensibilità variava da 85% a 100% (media 95%) e la specificità da 90% a 100% (media 99%); in 27 studi sulle IgA anti-transglutaminasi tissutale, la sensibilità variava da 61% a 100% (media 87%) e la specificità da 86% a 100% (media 95%).

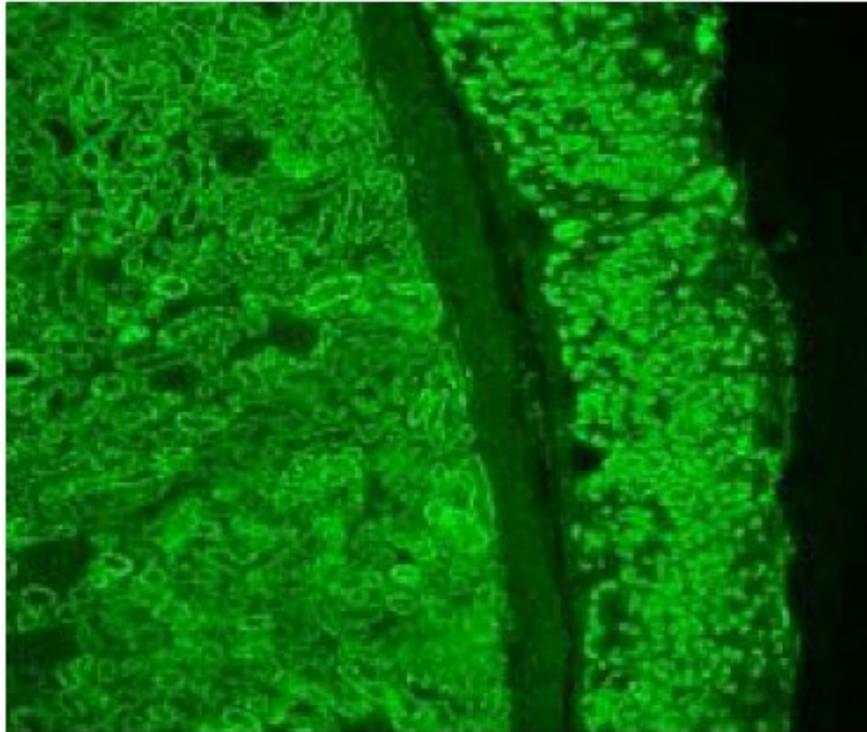


Figura 4. Immagine rappresentativa di positività per gli anticorpi anti-endomisio o EMA¹⁰

Questi studi dovrebbero comunque essere interpretati con cautela: tutti sono stati eseguiti in condizioni sperimentali dove l'accuratezza è maggiore rispetto alle situazioni di pratica clinica, la maggior parte degli studi hanno valutato campioni preselezionati e non individui arruolati prospettivamente, e l'utilizzo dell'enzima di *guinea-pig* invece di quello ricombinante umano potrebbe aver ridotto la specificità dei risultati riguardanti la transglutaminasi tissutale. I ricercatori di uno studio prospettico che si poneva come obiettivo il confronto dei risultati ottenuti con l'utilizzo degli anticorpi IgA anti-endomisio con quelli IgA anti-hTTG hanno riportato risultati ottimi e molto simili per quanto riguarda la sensibilità ma una più bassa specificità per le IgA hTTG.⁷⁶ Gli anticorpi anti-actina, che correlano con il danno intestinale, non hanno un ruolo nello screening della malattia celiaca,⁷⁷ mentre gli anticorpi contro i peptidi deamidati della gliadina ne rafforzano l'accuratezza e danno risultati migliori degli anticorpi anti-hTTG e anti-endomisio nel valutare la compliance dietetica e recupero mucosale post terapia.⁷⁸ Una potenziale trappola della sierologia è l'aumento di 10-16 volte di deficienza di IgA nella CD. Per questo motivo dovrebbe sempre essere dosata la concentrazione di IgA totali. Quando queste sono assenti viene raccomandata la misurazione delle IgG anti-endomisio e anti-hTTG. La misurazione delle IgA totali e le IgA anti-endomisio o anti-hTTG rappresenta un approccio valido per lo screening della malattia celiaca.

Comunque anche se la sierologia è un buon metodo per selezionare i pazienti candidati alla biopsia, la sierologia negativa non dovrebbe precludere l'esame biotico negli individui in cui la malattia viene sospettata dalla valutazione clinica.^{71 30}

ENDOSCOPIA

Due maggiori alterazioni del quadro endoscopico, la scomparsa o riduzione dei pieghe di Kerckring⁷⁹ e lo smerlo delle pieghe ridotte,⁸⁰ sono state identificate contemporaneamente. È plausibile che negli studi iniziali i ricercatori hanno sovrastimato le performance dei marcatori endoscopici a causa dell'alta probabilità pre test di malattia celiaca. Gli studi successivi hanno ridimensionato l'iniziale sensibilità e specificità.⁸¹

La CD coinvolge prevalentemente l'intestino tenue prossimale ma l'atrofia dei villi può essere irregolare e saltare il duodeno presentandosi più distalmente. L'endoscopia con video capsula è più sensibile dell'endoscopia standard nel rilevare l'atrofia dei villi e può definire l'estensione della malattia nonostante non consenta il prelievo biotico. Anche se la biopsia duodenale rappresenta il *"gold standard"*, l'endoscopia con video capsula può essere di ausilio in condizioni particolari quando la biopsia non è possibile e la diagnosi è equivoca. Le procedure endoscopiche sono raccomandate nella valutazione della CD complicata, specialmente nella CD refrattaria di tipo II.⁸²

Le controversie potrebbero essere risolte definendo l'inquadramento appropriato della biopsia nella malattia celiaca. I marcatori endoscopici non hanno ruolo nella diagnosi quando c'è il sospetto clinico o sierologico di malattia celiaca. In questi pazienti la decisione di eseguire le biopsie non dovrebbe dipendere dall'endoscopia. Comunque il riconoscimento di alterazioni caratteristiche all'endoscopia eseguita per altri motivi potrebbe essere importante nei pazienti dove non c'è il sospetto di malattia celiaca. L'endoscopia ad immersione è stata proposta da Cammarota et al.⁸³ come una tecnica che consente di evitare la biopsia, con buona accuratezza e con riduzione dei costi anche se non è in grado di rilevare le lesioni infiltrative, e il suo utilizzo non è possibile nei contesti di postazioni endoscopiche di routine. Questa tecnica prevede che, in corso di intubazione, anziché aria venga utilizzata acqua per ottenere la distensione del lume intestinale.

TIPIZZAZIONE HLA

Il valore predittivo negativo di HLA-DQ2/DQ8 è pressoché assoluto ed è utile per escludere la malattia celiaca negli individui ad alto rischio come i parenti di primo grado e i pazienti con diabete di tipo 1. Un risultato negativo evita preoccupazioni future riguardo a questa condizione e riduce il costo di test sierologici in futuro. Il valore predittivo negativo PVN è prossimo al 100% ma l'utilità diagnostica varia con il cambiamento del contesto clinico. L'efficacia diagnostica è maggiore nei pazienti con linfocitosi intraepiteliale e anticorpi anti-transglutaminasi negativi mentre risulta praticamente inutile nei pazienti con IgA anti-hTTG e atrofia dei villi.⁸⁴ L'alta frequenza di questi geni di predisposizione in molti dei gruppi a rischio dove è motivato il *case-finding* comporta la difficoltà di applicarlo su larga scala anche considerando i costi⁸⁵ mentre la possibilità rara di porre diagnosi di CD in pazienti negativi per HLA riporta l'attenzione sulla valutazione complessiva del quadro non tralasciando aspetti clinici e sierologici. Recentemente sono state validati dei metodi a basso costo di *screening* dei haplotipi HLA associati alla CD con la produzione del risultato finale in meno di 2 ore. I risultati di concordanza con le tecniche convenzionali di tipizzazione HLA-DQ basate sulle costosissime metodiche di reazione a catena della polimerasi (PCR) sono stati eccellenti. La semplicità delle varie fasi del procedimento, la velocità nella interpretazione dei risultati e il basso costo di questo metodo potrebbe renderlo un utile ausilio nello screening di HLA associato a CD disponibile in tutte le condizioni dove le limitazioni di budget non consentono l'utilizzo di questa importante informazione diagnostica.⁸⁶

Terapia della CD

L'unico trattamento di provata efficacia per la malattia celiaca è l'osservazione stretta e per tutta la vita di una dieta priva di glutine. Tutti i cibi e farmaci che contengono glutine derivante da grano, segale, orzo e loro derivati devono essere eliminati in quanto anche piccole quantità potrebbero essere dannose. La contaminazione da glutine nei prodotti *gluten-free* non può essere evitata completamente; i risultati di un trial doppio-cieco placebo-controllo hanno stabilito che vengono tollerati 10 mg di glutine al giorno mentre 50 mg sono dannosi.⁸⁷ Posizionare un limite di sicurezza universale è comunque difficile tenendo presente la variabilità individuale tra i pazienti.³⁰

Sono stati fatti molti tentativi per sviluppare strategie di detossicazione del grano efficienti senza deteriorarne le caratteristiche tecnologiche e alimentari ma i risultati non sono del tutto soddisfacenti. Una recente ricerca propone un approccio multidisciplinare nella individuazione di genotipi di grano naturale a basso contenuto di glutine e ridotto numero di epitopi tossici per i pazienti celiaci. Focalizzando l'attenzione sulla gliadina come la principale responsabile della immunoreattività nei pazienti celiaci gli autori hanno effettuato un *profiling* preliminare delle proteine gluteiniche mediante quantificazione basata su saggi immunologici e cromatografia associata a rilevazione UV. In aggiunta sono stati raccolti dati sulle proprietà nutrizionali e tecnologiche. Attraverso una analisi statistica di tutti i dati sono stati selezionati cinque candidati con genotipo a bassa tossicità da sottoporre a digestione gastroduodenale simulata in vitro e identificazione peptidica. In definitiva è stata effettuata in silico la valutazione sull'effetto potenzialmente tossico nei pazienti con CD. I genotipi selezionati che presentano basso contenuto gluteinico conservando le caratteristiche reologiche dovranno essere testati in studi immunologici in vitro per la attivazione della tossicità mediata dai linfociti T. Questi potrebbero rappresentare una valida scelta per le pratiche di impanatura e le strategie di detossificazione, riducendo la necessità dell'utilizzo di additivi per migliorare le qualità dell'impasto e i valori dietetici dei prodotti.

88

Oltre alla ubiquitaria presenza del glutine negli alimenti, un altro limite importante della dieta priva di glutine è la *compliance* dei pazienti, che non è perfetta, specialmente negli adolescenti, adulti, e pazienti diagnosticati in programmi di screening. Questi ultimi probabilmente

non sono pienamente coscienti dell'importanza della dieta priva di glutine come unica strategia terapeutica in grado di ridurre il danno intestinale con manifestazione evidente della malattia fino ad allora silente. Inoltre, questi soggetti andrebbero meglio informati sull'effettivo aumento di probabilità di complicanze dovute a malattie autoimmuni associate alla celiachia ma diverse da essa e proliferazioni neoplastiche linfocitarie, se costantemente esposti al glutine anche in assenza di sintomi alla diagnosi. I fattori principali associati alla scarsa aderenza sono quelli che riducono maggiormente la qualità di vita. Ansietà, costipazione e gonfiore intestinale, cambiamenti nella costituzione corporea, nell'introito di cibo e carenze vitaminiche, sono ulteriori effetti collaterali minori ma ben definiti della terapia a vita.

Sebbene gli anticorpi nella CD generalmente scompaiono dopo l'inizio della dieta priva di glutine, la loro rilevazione non è accurata per rilevare errori dietetici⁸⁹ o il recupero della mucosa.⁹⁰ Gli anticorpi anti-endomisio sono più precisi degli anticorpi anti-HTTG, e gli anticorpi anti-gliadina deamidata potrebbero essere efficaci. L'aderenza alla dieta valutata da un intervistatore esperto viene considerata la misura migliore del controllo della malattia celiaca perché ha un costo basso, non è invasiva ed è correlata al danno intestinale.⁹¹ L'utilizzo dell'avena nell'alimentazione sembra essere sicuro nella malattia celiaca, anche dopo 5 anni di esposizione, sebbene il suo utilizzo nelle diete prive di glutine è limitato da alcuni report di pazienti sensibili all'avena.⁹² In questi pazienti sono stati identificati cellule T della mucosa reattive all'avenina, i cui peptidi dell'avenina hanno sequenze ricche di prolina e residui di glutamina che assomigliano molto agli epitopi del glutine del grano. L'educazione dei pazienti, la stretta supervisione con regolari sedute di consulenza nutrizionale sono cruciali per raggiungere l'aderenza.³⁰

La nuova collocazione della CD tra le malattie croniche invalidanti prevede che le prestazioni specialistiche per giungere alla diagnosi non siano più in esenzione, mentre, una volta diagnosticata la malattia gli assistiti possono usufruire, in regime di esenzione, di tutte le prestazioni sanitarie appropriate per il monitoraggio della malattia, delle sue complicanze e per la prevenzione degli ulteriori aggravamenti.

In questo senso, ai fini di garantire ai celiaci un'alimentazione corretta ed equilibrata, sul fronte dell'assistenza integrativa alla dieta è stato confermato che i pazienti con diagnosi di CD hanno diritto all'erogazione gratuita di prodotti senza glutine specificatamente formulati per celiaci o specificatamente formulati per intolleranti al glutine. Trattandosi di una vera e propria terapia e

non di un regime dietetico sono state normate anche le caratteristiche specifiche di composizione di questi prodotti (contenuto di glutine inferiore ai 20 mg/kg, o parti per milione - ppm) e le modalità di commercializzazione.¹⁰

Anemia da carenza di ferro e CD

È stato dimostrato in uno studio che molti dei pazienti celiaci diagnosticati in stadio precoce hanno depositi di ferro ridotti. In particolare, 46% dei pazienti con nuova diagnosi di CD in stadio precoce presentavano depositi di ferro ridotti e 32% avevano anemia, mentre l'anemia da carenza di ferro era presente in 25% dei pazienti.⁹³ Questi dati sono in linea con quelli riportati in studi Europei su larga scala dove l'anemia, generalmente attribuibile a malassorbimento veniva riscontrata in 20%-34% dei pazienti con CD non trattati ⁹⁴.

L'anemia da carenza di ferro può complicare la CD chiaramente inquadrata ma può anche essere, in assenza di diarrea, perdita di peso ed altri sintomi, l'unica forma di presentazione clinica. L'anemia da carenza di ferro è la più frequente forma di presentazione clinica della celiachia ⁹⁵.

In una recente revisione sistematica e metanalisi è stato riportato che in circa 1 paziente su 31 con anemia da carenza di ferro c'è evidenza di CD ⁹⁶. Questo giustifica la pratica clinica basata sulle più recenti linee guida dove viene raccomandato di sottoporre i pazienti, con anemia da carenza di ferro non spiegata altrimenti, ad accertamenti per la CD ^{97,98}.

Questa recente metanalisi arriva dopo diversi anni dall'ultima citatissima pubblicazione di questo tipo⁹⁹ nella quale veniva riportata una prevalenza di CD di 2,9% - 6% nei pazienti asintomatici con anemia da carenza di ferro (IDA). Nello stesso studio la prevalenza era più alta 10% - 15% quando venivano sottoposti a screening pazienti con presenza di IDA e sintomi gastrointestinali concomitanti ⁹⁹.

Gli studi che sono comparsi successivamente alla metanalisi del 2005 e che vengono presi in considerazione dalla ultima revisione sistematica e metanalisi ⁹⁶ sono numerosi e riportano una prevalenza di CD nei pazienti con IDA che varia da 1,8%¹⁰⁰ a 20%¹⁰¹. In questa metanalisi sono stati selezionati soltanto gli studi che riportavano diagnosi di CD in seguito all'esame della biopsia dell'intestino tenue indipendentemente dai dati sierologici. Nella valutazione quantitativa sono stati inclusi 18 studi con 2998 pazienti complessivi con IDA. Di questi pazienti 143 avevano CD portando ad una proporzione non pesata per grandezza dello studio di 4,8%. Come riportato sopra, la

prevalenza complessiva di CD nei pazienti con IDA in questo studio è risultata essere 3,2% (95% CI = 2,6-3,9%) con alto grado di eterogeneità tra gli studi.

Nonostante nessuna delle maggiori società di gastroenterologia propone lo screening per CD nella popolazione generale c'è abbastanza consenso nell'esaminare i pazienti con IDA ^{97,98,102}.

Ci sono poche evidenze riguardo alla prevalenza di CD nella popolazione di donatori di sangue non anemici con carenza di ferro. In uno dei pochi studi presenti in letteratura vengono riportati valori di prevalenza superiori a quelli riscontrati nella popolazione generale¹⁰³

Equilibrio del ferro nei donatori di sangue

CRITERI DI DONAZIONE

Prima di ogni donazione di sangue in tutti i donatori viene valutata la concentrazione di emoglobina (Hb), differendo la donazione in caso di valori sotto soglia in modo da impedire la comparsa di anemia da carenza di ferro. Questo criterio è indispensabile dal punto di vista etico per una procedura dove si dona parte del proprio sangue senza nessun corrispettivo e nella quale non si vorrebbe causare nessun danno al donatore. Inoltre così viene garantito che le unità di sangue raccolte soddisfino gli standard richiesti per quanto riguarda la quantità di Hb¹⁰⁴. Il criterio necessario per la donazione di sangue è stato stabilito da una Direttiva della Commissione Europea¹⁰⁵ dove è richiesto una concentrazione di Hb maggiore o uguale a 8,4 mmol/L (13,5 g/dL) per i maschi e 7,8 mmol/L (12,5 g/dL) per le femmine.

DEPLEZIONE DI FERRO E CARENZA DI FERRO SUBCLINICA IN ASSENZA DI ANEMIA

Nei donatori di sangue che presentano livelli di emoglobina accettabili per proseguire con la donazione è frequente il riscontro di carenza di ferro subclinica^{106,107}. La maggior parte del ferro nel corpo è distribuita in tre compartimenti: compartimento di deposito, compartimento di trasporto e il compartimento funzionale. Quando si sviluppa una carenza di ferro questi compartimenti vengono coinvolti consecutivamente dando origine a tre diversi quadri di gravità crescente della carenza di ferro: deplezione di ferro, eritropoiesi da carenza di ferro e anemia da carenza di ferro¹⁰⁸. Un bilancio negativo del ferro riduce inizialmente le riserve del corpo. Quando le riserve sono finite ma il compartimento funzionale non è ancora coinvolto siamo di fronte alla deplezione del ferro. Una volta che le riserve sono deplete e la quantità di ferro nel compartimento di trasporto inizia a ridursi si presenta la eritropoiesi in carenza di ferro. Il rifornimento del midollo ematopoietico con ferro non è sufficiente per l'eritropoiesi, ma i livelli di Hb rimangono normali. Questa condizione viene

chiamata anche carenza di ferro subclinica. Quando si arriva al coinvolgimento del compartimento funzionale e la quantità di ferro non è più sufficiente alla produzione di una quantità adeguata di emoglobina diviene apparente l'anemia da carenza di ferro. I livelli di emoglobina sono ridotti soltanto nell'ultimo stadio di carenza di ferro. Come conseguenza può succedere che i donatori con livelli adeguati di Hb possono avere depositi di ferro depleti¹⁰⁹ o anche eritropoiesi in carenza di ferro^{108,110}. Queste condizioni possono non essere rilevate dalla valutazione dell'Hb mettendo questi donatori ad alto rischio di sviluppare anemia da carenza di ferro dopo la donazione e molto probabilmente ad essere rinviati alla successiva visita al centro donazione sangue.

VALUTAZIONE DELLA DEPLEZIONE DI FERRO E CARENZA DI FERRO SUBCLINICA

Esistono diverse variabili correlate al ferro utili a valutare la deplezione di ferro o la eritropoiesi da carenza di ferro. La deplezione di ferro può essere valutata misurando i livelli sierici di ferritina¹¹¹. Gli esami per la valutazione della eritropoiesi da carenza di ferro comprendono il dosaggio del ferro plasmatico¹⁰⁸, la capacità totale legante il ferro o la transferrina¹⁰⁸, la saturazione della transferrina, la concentrazione del recettore solubile della transferrina (sTfR)¹¹², il sTfR index (sTfR diviso per il logaritmo del valore della ferritina)^{113,114} e la zincoptoporfirina (ZPP)¹¹⁵. Un'altra variabile utile nell'inquadramento della carenza subclinica di ferro è la proteina regolatrice hepcidina^{116,117}.

Scopo dello studio

Considerando il miglioramento delle tecniche diagnostiche per la diagnosi di CD, le forme asintomatiche sono attualmente le più frequenti modalità di presentazione della malattia e sono sette volte maggiori rispetto ai pazienti diagnosticati clinicamente. L'anemia e la diarrea rappresentano, in base alle evidenze, gli unici fattori predittivi indipendenti di una eventuale diagnosi di CD tra le varie forme di presentazione clinica negli anni che precedono la diagnosi di CD. C'è stato un marcato aumento nella proporzione di soggetti classificati come celiaci che non hanno manifestazioni cliniche classiche della malattia ma hanno anemia da carenza di ferro. La carenza di ferro è frequente nella popolazione generale. Nelle femmine è spesso dovuta alle perdite mestruali e viene somministrata la terapia empirica con ferro per via orale. Comunque nelle pazienti più anziane o in quelli dove l'anemia è refrattaria alla terapia si prosegue con le indagini.¹¹⁸

Nonostante c'è abbastanza consenso nelle comunità scientifiche internazionali nell'esaminare i pazienti con IDA rimane da investigare l'utilità dello screening nella popolazione generale che presenta livelli di ferritina al di sotto dei valori normali in assenza di anemia e altri segni o sintomi suggestivi di CD.

Non ci sono studi esaustivi che riportano la prevalenza della celiachia nella popolazione non anemica con carenza di ferro. Non c'è consenso unanime sulla necessità di investigare i pazienti non anemici che presentano carenza di ferro nell'intento di smascherare forme non diagnosticate di CD.

Valutare la prevalenza della carenza di ferro, misurata come livelli di ferritina al di sotto dei livelli di normalità, in assenza di anemia in un campione di donatori di sangue, seguiti per un periodo complessivo di tre anni. Verificare nel sottogruppo di soggetti che presentano tali caratteristiche la prevalenza di positività per anticorpi diagnostici per CD, e confrontarla con quella riportata in letteratura come stima della prevalenza di CD nella popolazione generale.

Metodi ed elaborazione statistica

Per lo studio sono stati valutati tutti i soggetti afferenti ai centri di donazione sangue di Ancona tra gennaio 2015 e dicembre 2017 e di questi sono stati valutati gli esami riguardanti l'emocromo. Sono stati raccolti dati relativi a: età, sesso e i principali parametri ematologici, quali WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, PIASTRINE e ferritina. Questi parametri sono stati valutati con strumentazione automatica utilizzando uno strumento conta globuli in commercio (Sysmex® XN-9000) o strumentazione automatizzata di chimica clinica (Siemens® Dimension Vista 1500). Il livello soglia per considerare la concentrazione di emoglobina nel range di normalità è $> 12,5$ g/dl. Sono stati considerati ferrocarenti tutti i casi in cui il valore di ferritina era <12 ng/ml per le femmine e <16 ng/ml per i maschi.

Su un campione di 65 soggetti ferrocarenti nei quali sono stati eseguiti alcuni test di screening per CD quali la ricerca di anticorpi anti-tTGA IgA, anti-tTGA IgG, anti-gliadina deamidata IgA, anti-gliadina deamidata IgG e anti-Endomisio IgA. I risultati di questi test sono stati inseriti nell'analisi. In questo caso sono stati considerati positivi valori >10 U/ml per gli anticorpi anti-tTGA e anti-Gliadina mentre per gli anticorpi anti-Endomisio è stata utilizzata una classificazione della fluorescenza in Negativo, Positivo medio e Positivo alto. I saggi anti-tTGA e anti-gliadina sono stati eseguiti su analizzatore Phadia™ 250.

I dati vengono presentati come media e deviazione standard o numero assoluto e percentuale in base al tipo di dato (continuo od ordinale). Sono state condotte delle valutazioni di statistica descrittiva per valutare gli indici di centralità e dispersione dei parametri continui nei gruppi di soggetti analizzati. Il t-test per variabili indipendenti è stato utilizzato per valutare le differenze nelle medie per l'età e gli indici di laboratorio (WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC e PIASTRINE) nei gruppi. Il test del Chi-quadrato è stato utilizzato per valutare le frequenze osservate. La correlazione di Spearman è stata utilizzata per valutare la correlazione lineare fra i parametri. Sono state opportunamente elaborate le tabelle e i grafici che meglio riassumevano i dati. Le elaborazioni sono state condotte con il software SPSS.

Risultati

PREVALENZA DELLA CARENZA DI FERRO IN ASSENZA DI ANEMIA NELLA POPOLAZIONE DI DONATORI

Sono stati valutati in modo prospettico i dati ematochimici dei soggetti afferenti ai centri donatori di Ancona, Osimo, Loreto, Castelfidardo e Chiaravalle nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2017.

Da questa valutazione risultano eseguiti 58387 emocromi di cui 41465 a soggetti di sesso maschile e 16922 a soggetti di sesso femminile. Questi dati corrispondono a 10534 soggetti i quali nel corso del periodo di osservazione per lo studio hanno eseguito l'emocromo più di una volta e includono 6727 (64%) maschi e 3807 (36%) femmine con età media di 42 anni. Questa distribuzione tra maschi e femmine è coerente con quanto riportato in letteratura. La distribuzione di frequenza dei valori di emoglobina nella popolazione maschile e femminile si presenta con forma molto prossima alla distribuzione normale con media e (deviazione standard) rispettivamente di 14,94 (1,078) per i maschi e 13,8 (1,039) per le femmine (**Fig.5**).

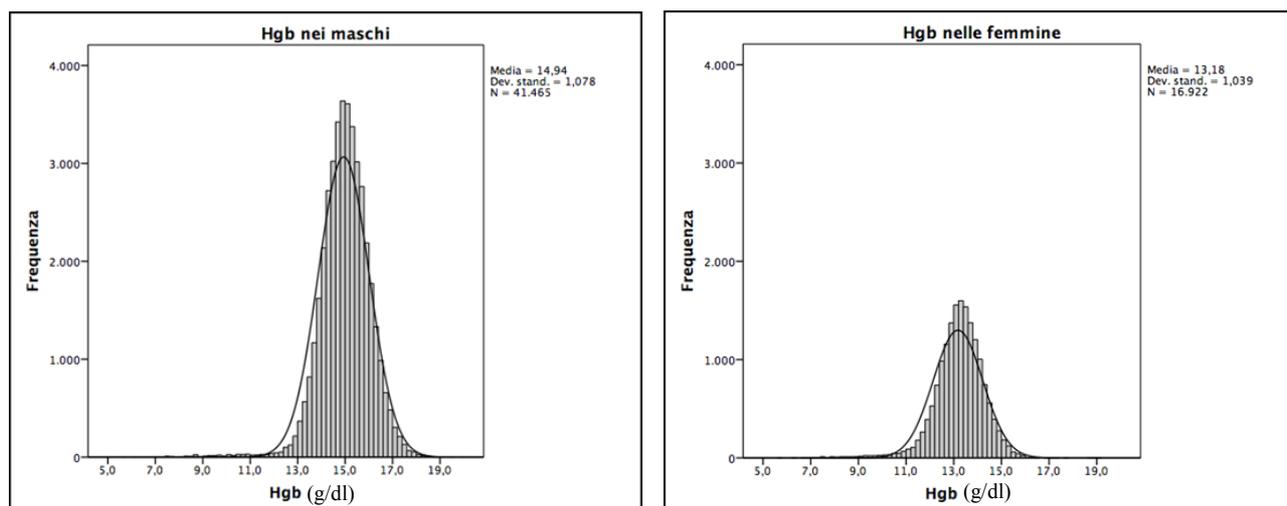


Figura 5. Distribuzione di frequenza dei valori di Hgb (g/dl) nella popolazione totale (n=58387)

Nello stesso periodo sono stati eseguiti 22677 dosaggi di ferritina dai quali sottraendo i dosaggi di ferritina eseguiti senza l'emocromo (276 dosaggi) risultano 22401 casi in cui è stato eseguito l'emocromo contestualmente al dosaggio della ferritina. In 15131 casi, questi dosaggi riguardavano il sesso maschile mentre in 7270 casi il sesso femminile. La distribuzione di frequenza di valori di ferritina risulta leggermente asimmetrica verso i valori più alti (riportati a sinistra nei grafici) (**Fig.6**).

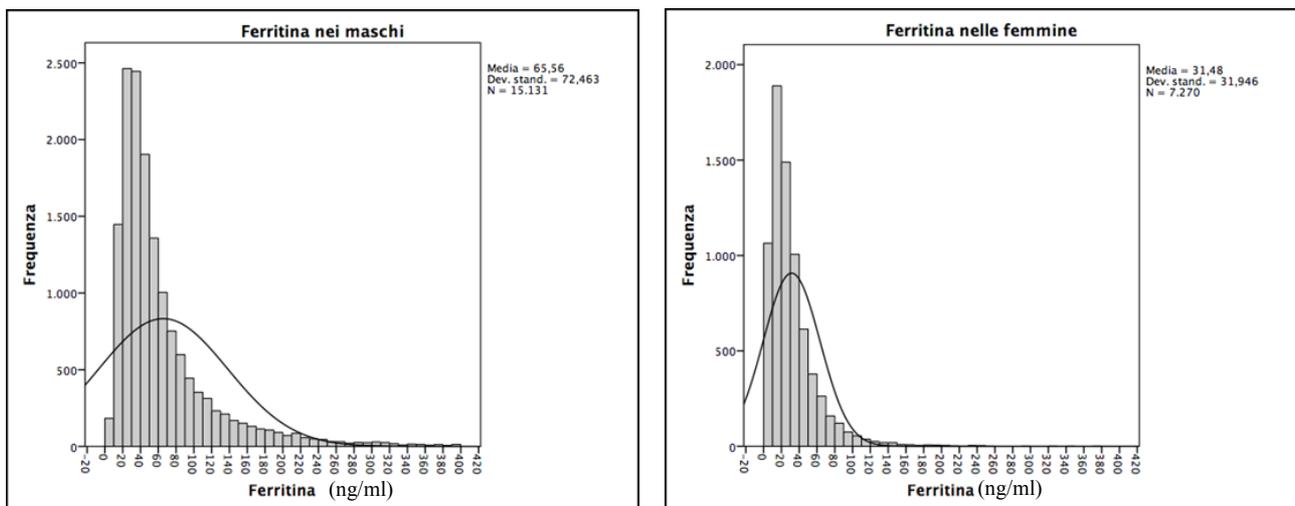


Figura 6. Distribuzione di frequenza dei valori di ferritina (ng/ml) nella popolazione totale (n=22401)

Poiché l'obiettivo era quello di valutare la prevalenza di CD in una popolazione non anemica sono stati esclusi dalle valutazioni statistiche successive i casi che avevano un livello di emoglobina <12,5. Risultano così 19866 casi totali dove è stato eseguito l'emocromo e la ferritina e non è presente anemia. Di questi, 1954 (10%) casi presentano valori di ferritina sotto i valori di normalità, mentre 17912 (90%) presentano valori normali di ferritina (Tabella 1).

Il campione risulta composto da 5772 prelievi eseguiti a soggetti di sesso femminile e 14094 prelievi eseguiti a soggetti di sesso maschile. In totale le femmine rappresentano il 29,1% del campione, mentre i maschi ammontano al 70,9 %. Conseguentemente, nonostante nel gruppo con ferritina bassa la percentuale di femmine (48%) e maschi (52%) sia equiparabile, la differenza di prevalenza dei valori di ferritina sotto i livelli di normalità fra i due sessi risulta essere molto significativa. In caso di campionamento di numerosità simile per i due sessi la percentuale di dosaggi

con ferritina bassa di sesso femminile sarebbe stata molto più alta in quanto le femmine presentano carenza di ferro nel 16,3% dei casi studiati mentre i maschi solo nel 7,2%.

Tabella 1. Caratteristiche dei soggetti valutati per carenza di ferro con livelli di emoglobina normali e dei relativi parametri ematologici di laboratorio.

	Ferritina normale media (SD) (n=17912)	Ferritina bassa media (SD) (n=1954)	p
Età (anni)	42 (13)	41 (12)	<0,001
WBC (x10 ³ /mmc)	6,1 (1,4)	6,0 (1,4)	<0,002
RBC (x10 ⁶ /mmc)	5,0 (0,4)	4,9 (0,4)	<0,001
Hgb (g/dl)	14,7 (1,1)	14,0 (1,0)	<0,001
Hct (%)	44,1 (2,9)	42,8 (2,8)	<0,001
MCV (fl)	88,1 (3,7)	87,0 (3,8)	<0,001
MCH (pg)	29,3 (1,4)	28,6 (1,5)	<0,001
MCHC (g/dl)	33,3 (1,0)	32,8 (1,0)	<0,001
PIASTRINE (x10 ³ /mmc)	223 (47)	231 (50)	<0,001
Ferritina (ng/ml)	51,28 (36,21)	10,87 (3,17)	<0,001
Sesso F ^a	4832 (27)	940 (48)	<0,001 ^b
Sesso M ^a	13080 (73)	1014 (52)	

Abbreviazioni: WBV, leucociti; RBC, eritrociti; Hgb, emoglobina; Hct, ematocrito; MCV, volume corpuscolare medio; MCH, contenuto medio di emoglobina; MCHC, concentrazione cellulare media di emoglobina; F, femmina; M, maschi; SD, deviazione standard; p, significatività.

^aLe variabili sesso sono espresse come numero e percentuale tra parentesi.

^bIl valore di significatività indica il risultato di Chi-quadrato su tavola di contingenza per sesso e stato di ferritina.

Le analisi di correlazione hanno evidenziato significatività statistica fra i livelli di ferritina e i livelli di tutti i parametri rilevati (età, sesso, WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC e PIASTRINE).

Come atteso, tutti i dati come sesso, età e i dati di laboratorio riguardanti i parametri strettamente correlati con i depositi di ferro risultano significativamente diversi nel gruppo di casi con ferritina normale rispetto a quello dei casi con ferritina bassa. Va sottolineato che i valori medi dei parametri non si differenziano in maniera clinicamente significativa fra i due gruppi, ma le differenze risultano comunque statisticamente significative dato l'elevatissimo numero di casi analizzati.

È stato dimostrato in vari studi svolti in precedenza che il parametro ampiezza di distribuzione eritrocitaria (RDW) aumenta significativamente e precocemente rispetto ai altri indici eritrocitari e alla concentrazione di emoglobina nei soggetti dove c'è un forte sospetto di CD.^{119,120} il valore di RDW viene generalmente fornito dagli analizzatori per l'esame emocromocitometrico compreso quello utilizzato nello studio ed è in parametro integrato nel referto dell'emocromo. Nel dataset disponibile per la conduzione del presente studio non era però disponibile il parametro RDW e per questo motivo non si è potuto prendere in considerazione. È probabile che nella valutazione dei soggetti non anemici considerati nello studio questo parametro potrebbe non essere rilevante e rimanga sostanzialmente invariato. Considerando però la numerosità del campione si poteva riscontrare allo stesso modo dei altri parametri presi in considerazione una differenza significativa se pur minima confrontando il gruppo di soggetti non anemici con ferritina bassa con quelli con ferritina normale.

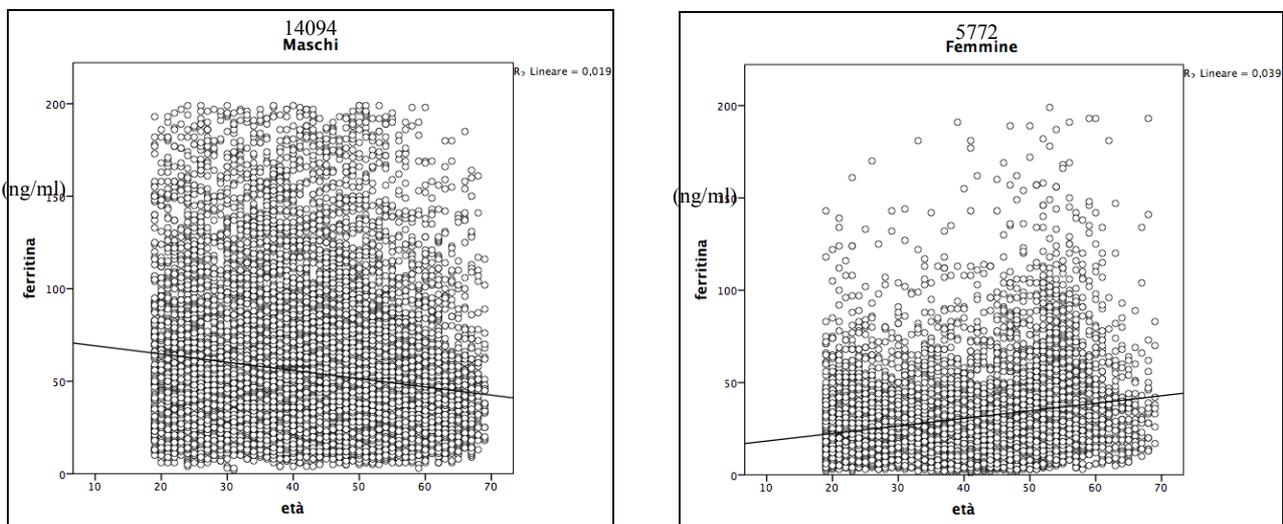


Figura 7. Correlazione tra i livelli di ferritina (ng/ml) ed età nei casi divisi per sesso.

Eliminando i valori *outliers* di ferritina del campione, è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa dei valori di ferritina con l'età. Questa correlazione ha un andamento diverso nei maschi rispetto alle femmine (**Fig 7**). Nella popolazione maschile c'è una tendenza statisticamente significativa alla riduzione dei valori medi di ferritina con l'avanzare dell'età mentre nelle femmine l'andamento è opposto con aumento dei valori di ferritina con l'avanzare dell'età.

Per meglio indagare le differenze età-correlate dei valori di ferritina la popolazione è stata suddivisa in gruppi di diversa età. Le fasce di età sono state così suddivise: 18-30 anni, 31-40 anni, 41-50 anni, 51-60 anni, e 61-75 anni (Tabella 2).

Tabella 2. Valori medi di ferritina e intervallo di confidenza al 95% nelle diverse fasce di età dei casi divisi per sesso.

	Maschi		Femmine	
Età (anni)	Media ferritina (ng/ml)	IC 95%	Media ferritina (ng/ml)	IC 95%
18-30	62,5	61,0-64,0	26,8	25,8-27,9
31-40	58,6	57,3-60,0	26,8	25,5-28,1
41-50	52,6	51,5-53,7	26,7	25,7-27,8
51-60	48,5	47,1-49,9	44,4	43,1-45,8
61-75	48,7	46,2-51,1	39,1	36,1-42,1

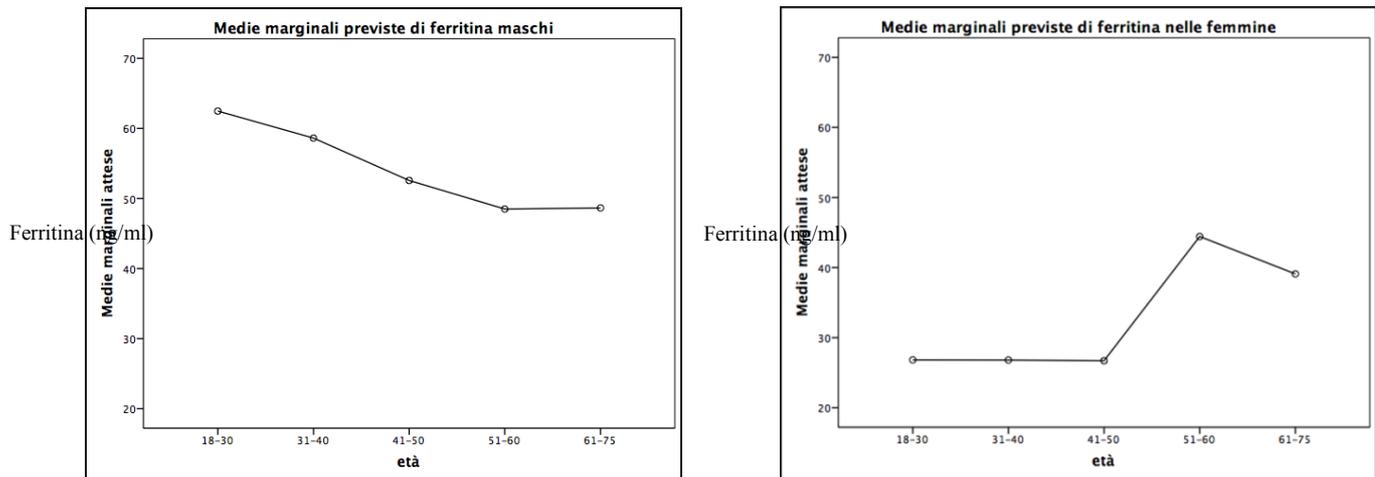


Figura 8. Andamento del valore medio di ferritina (ng/ml) per fascia di età nei casi di sesso maschile e femminile.

Dai grafici (**Fig. 8**) si evince chiaramente che c'è una tendenza, nella popolazione maschile studiata, alla riduzione dei livelli medi di ferritina con l'aumentare dell'età. Nella popolazione di sesso femminile, invece, dopo un iniziale andamento non variabile nelle prime fasce di età, si osserva un aumento dei valori medi di ferritina nel passaggio dalla fascia 41-50 anni a quella 51-60 anni per poi virare verso una discesa con il passaggio nella fascia di età 61-75. Bisogna osservare che i valori di ferritina sono significativamente più bassi nella popolazione femminile rispetto a quella maschile (31,5 ng/ml vs 65,6 ng/ml). La stessa differenza si osserva anche confrontando ogni fascia di età tra maschi e femmine ($p < 0,001$) nonostante si noti una tendenza ad avvicinarsi dei valori medi di ferritina una volta superati i 50 anni.

L'incremento dei livelli medi di ferritina delle femmine dopo l'età fertile potrebbe essere determinato dalla riduzione della perdita di ferro dovuto alle menstruzioni e alle gravidanze. Alla luce di questi dati si può ipotizzare che potendo sottrarre l'effetto peggiorativo sui depositi di ferro che si osserva nell'età fertile nelle donne, l'andamento globale dei valori medi di ferritina potrebbe risultare simile nei due sessi, con una tendenza alla riduzione dei valori con l'età.

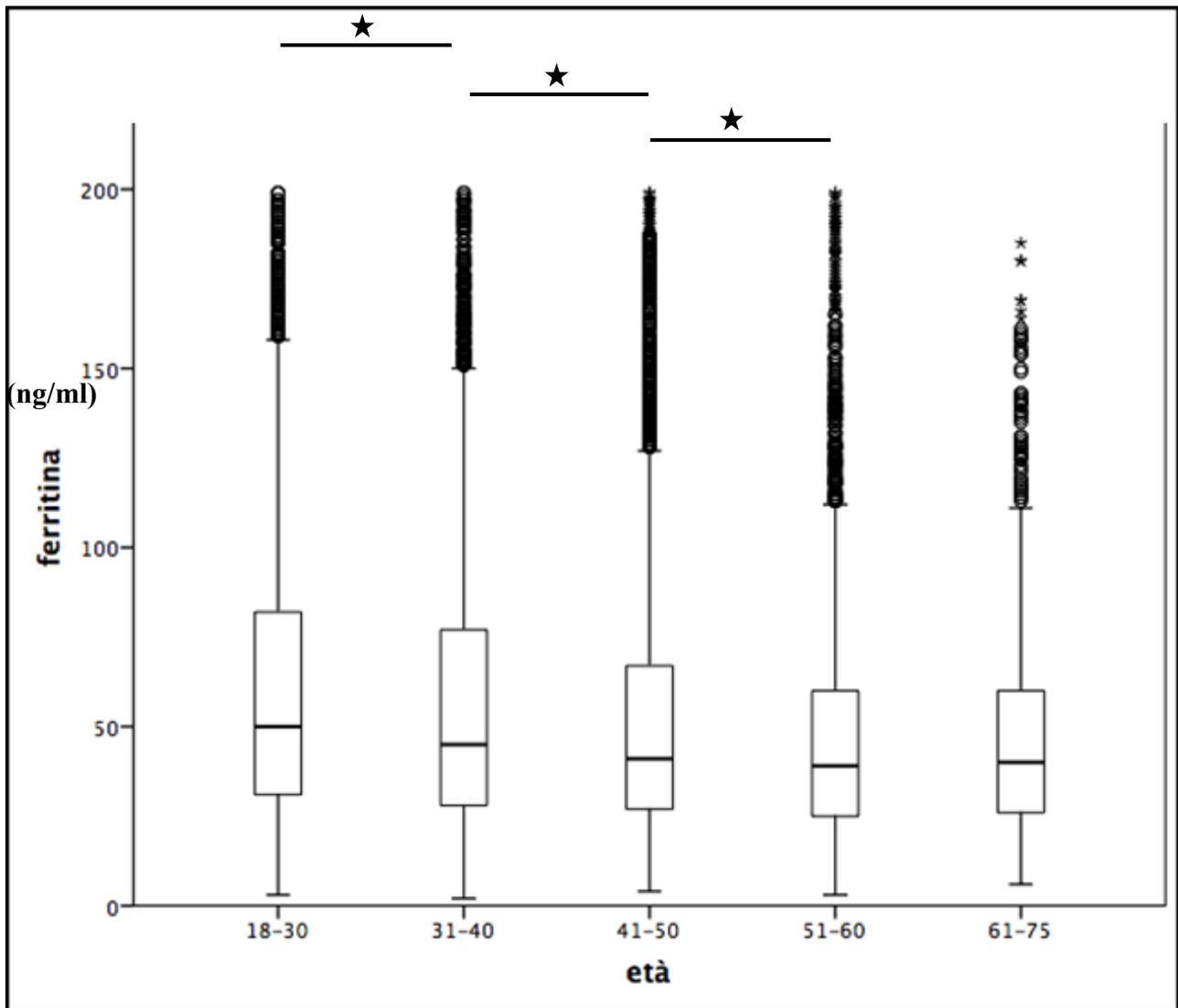


Figura 9. Distribuzione dei valori di ferritina (ng/ml) per fascia di età nei maschi.
[*p < 0,001]

Guardando in dettaglio i dati dei valori di ferritina divisi per fasce di età nei maschi (**Fig. 9**), risulta significativa la differenza dei valori medi di ferritina nelle prime quattro fasce di età, mentre non risulta significativa la differenza dei valori tra la fascia 51-60 anni e 61-76 anni, confermando una sostanziale stabilizzazione dei valori di ferritina dopo i sessanta anni.

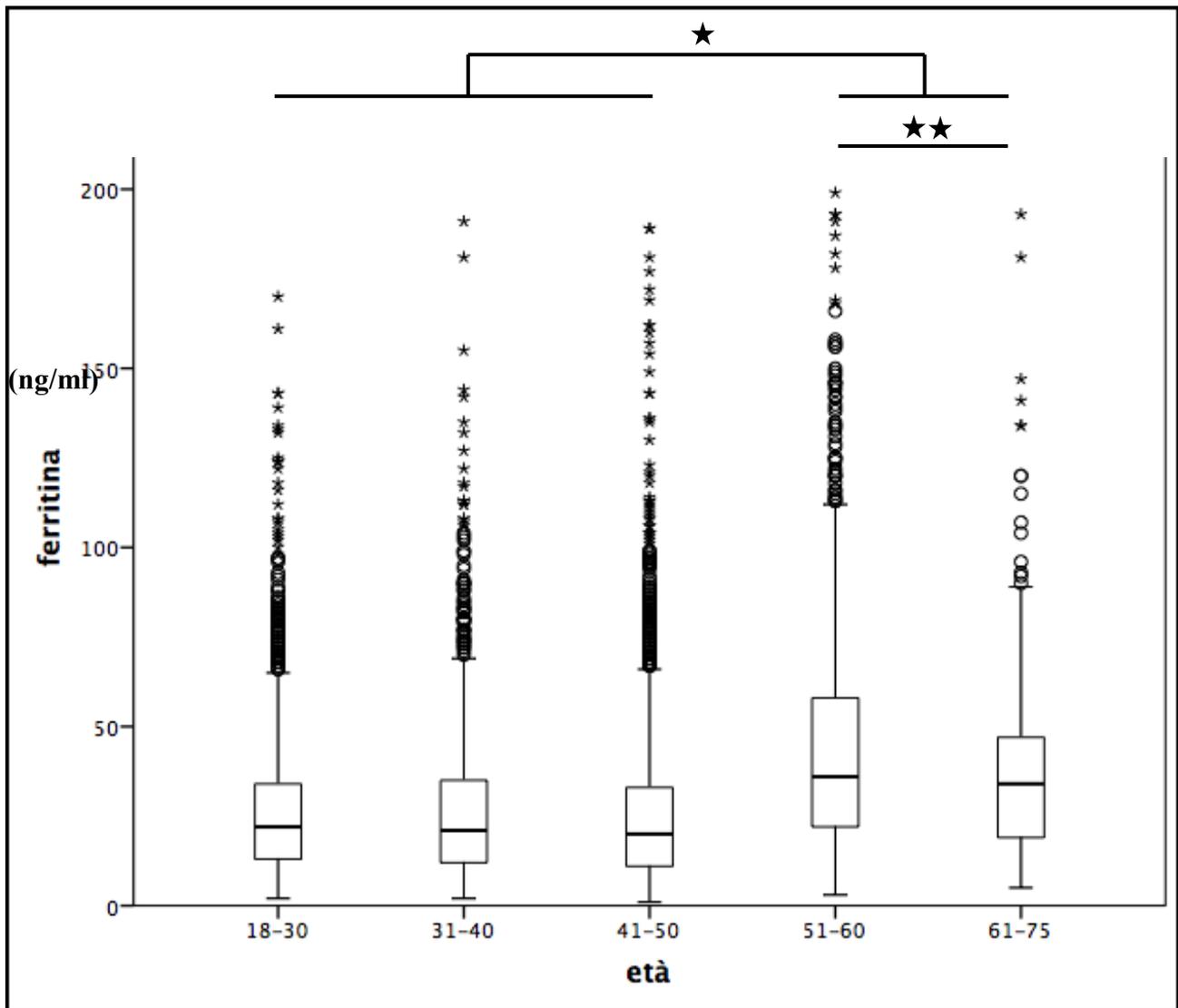


Figura 10. Distribuzione dei valori di ferritina (ng/ml) per fascia di età nelle femmine.
[*p < 0,001, ** p = 0,001]

Per quanto riguarda i dati dei soggetti di sesso femminile (**Fig. 10**), se confrontiamo le differenze delle medie di valori di ferritina nelle prime tre fasce di età con le altre due, queste risultano significativamente diverse. Le prime tre fasce presentano valori di ferritina media significativamente più bassi rispetto alla fascia di età 51-60 e 61-75 anni. La fascia di età 61-75 anni presenta valori medi di ferritina significativamente più bassi della fascia di età 51-60 anni.

PREVALENZA DI CELIACHIA NELLA POPOLAZIONE DI DONATORI NON ANEMICI CON CARENZA DI FERRO.

Una volta valutata la prevalenza della carenza di ferro nella popolazione non anemica di donatori, che è risultata essere in base ai dati riportati sopra complessivamente del 10%, si è voluto vedere se questa condizione potesse aiutare ad individuare una popolazione maggiormente a rischio per positività ai marcatori sierologici associati alla CD.

In un sottogruppo di 65 donatori che presentano carenza di ferro in assenza di anemia sono stati eseguiti i dosaggi di IgA e IgG anti-trans glutaminasi e anti-gliadina e gli anticorpi anti-endomisio. Il gruppo è composto da donatori arruolati in modo casuale durante la presentazione alle visite per la donazione quando si riscontravano valori di ferritina indicativi di carenza di ferro in assenza di valori di Hb che sconsigliassero la donazione secondo i criteri attualmente in uso. Sono stati eseguiti in questa fase i dosaggi per marcatori sierologici di CD in 65 donatori non anemici con livelli di ferritina inferiori ai livelli di normalità in uno o più dosaggi effettuati nel periodo di osservazione dello studio. Dei 65 soggetti valutati, 6 (9,2%) sono risultati positivi per i marcatori sierologici di celiachia (Tabella 4). L'età media dei soggetti era rispettivamente di 41 anni (SD=12) per i soggetti con sierologia negativa e 44 anni (SD=3) per i soggetti con sierologia positiva. Una prevalenza del 9,2% risulta essere molto più alta di quella riportata in letteratura e riferita alla prevalenza di celiachia nel mondo e in Italia nello specifico. Molti studi sulla prevalenza della celiachia nella popolazione sana sono eseguiti proprio su donatori. Il confronto di questi valori porta a ipotizzare che nel sottogruppo di donatori con carenza di ferro subclinica la prevalenza di celiachia è maggiore rispetto a quella della popolazione di riferimento.

Tabella 3. Caratteristiche dei soggetti valutati per carenza di ferro con livelli di emoglobina normali e dei relativi parametri ematologici di laboratorio.

	Sierologia negativa	Sierologia positiva	p
	media (SD)	media (SD)	
	(n=59)	(n=6)	
Età (anni)	41 (12)	44 (3)	NS
WBC (x10 ³ /mmc)	5,9 (1,1)	6,1 (1,4)	NS
RBC (x10 ⁶ /mmc)	4,9 (0,5)	5,0 (0,5)	NS
Hgb (g/dl)	14,1 (1,2)	13,9 (1,3)	NS
Hct (%)	42,7 (3,5)	43,1 (3,8)	NS
MCV (fl)	87,0 (4,4)	86,7 (3,1)	NS
MCH (pg)	28,8 (1,8)	27,8 (0,9)	NS
MCHC (g/dl)	33,1 (1,1)	32,2 (1,1)	NS
PIASTRINE (x10 ³ /mmc)	225 (45)	258 (64)	NS
Ferritina (ng/ml)	32,6 (37,8)	14,7 (16,0)	<0,05
Sesso F ^a	23 (39)	1 (16,7)	NS
Sesso M ^a	36 (61)	5 (83,3)	

Abbreviazioni: WBV, leucociti; RBC, eritrociti; Hgb, emoglobina; Hct, ematocrito; MCV, volume corpuscolare medio; MCH, contenuto medio di emoglobina; MCHC, concentrazione cellulare media di emoglobina; F, femmina; M, maschi; SD, deviazione standard; NS, non significativo statisticamente; neg, negativa; pos, positiva.

^aLe variabili sesso sono espresse come numero e percentuale tra parentesi.

Nella nostra casistica sono risultati 9,2% dei soggetti positivi per i marcatori sierologici di celiachia (6 casi su 65 studiati).

Si può notare dalla tabella (**Tab. 3**) che l'unico parametro che risulta significativamente diverso, oltre a quelli sierologici, confrontando il gruppo con sierologia negativa con quello che presenta marcatori sierologici suggestivi di CD, sia il livello medio di ferritina. Infatti, nonostante il gruppo di 65 casi sia composto da soggetti ai quali sono stati eseguiti i dosaggi sierologici per CD perché presentavano valori di ferritina almeno una volta sotto i livelli di normalità, il livello medio di ferritina nei casi positivi per anticorpi associati a CD è significativamente più basso rispetto ai casi negativi, rispettivamente 14,7 (SD=16,0) e 32,6 (SD=37,8).

Nonostante dei 6 casi positivi sierologicamente per anticorpi indicativi di CD soltanto 1 sia di sesso femminile, considerata l'esiguità del campione (65 soggetti) e la preponderanza di soggetti di sesso maschile (63%) nella popolazione studiata, non risulta significativo il tasso di nuove diagnosi sierologiche di celiachia in base al sesso. Sono stati applicati test per campioni esigui, non potendo applicare il test del Chi quadrato. Allo stesso modo, anche gli altri parametri presi in considerazione non risultano significativamente diversi confrontando il gruppo con marcatori sierologici di CD negativi con quelli positivi.

Tabella 4. Valori dei marcatori sierologici nei casi con sierologia positiva (n=6)

Esame	media	range
TTG IgA (U/ml)	136,0	12,0-256,0
TTG IgG (U/ml)	14,4	0,1-42,0
AGA IgA (U/ml)	181,0	5,7-498,0
AGA IgG (U/ml)	112,1	4,7-311,0

Sono stati rilevati livelli di anticorpi IgA-anti hTTG positivi in sei casi, con una media di 136,0 U/ml (range: 12,0-256,0). La media degli anticorpi IgG anti-hTTG era di 14,4 U/ml (range: 0,1-42,0). Per quanto riguarda gli anticorpi anti-AGA è stata rilevata una media di 181,0 U/ml (range: 5,7-498) per quanto riguarda le IgA e 112,1 U/ml (range: 4,7-311,0) per quanto riguarda gli anticorpi di classe IgG. In tutti e sei i casi positivi per anti-hTTG di classe IgA sono stati ricercati gli anticorpi anti-endomisio risultando in un caso "negativo", un caso "positivo medio" e i restanti quattro casi "positivo alto".

Discussione

Molti studi sulla prevalenza della celiachia nella popolazione sana sono eseguiti proprio su donatori. La valutazione dei risultati della presente tesi porta a ipotizzare che nel sottogruppo di donatori con carenza di ferro subclinica la prevalenza di celiachia è maggiore di quella che si osserva nella popolazione presa come riferimento negli studi precedenti. Questo dato è importante perché giustificherebbe vista l'alta prevalenza, l'esecuzione di saggi per la celiachia in tutti i donatori non anemici che presentano carenza di ferro.

Si può constatare che la carenza di ferro in assenza di anemia è chiaramente un forte fattore predittivo di positività alle indagini sierologiche per celiachia. Il valore predittivo dei livelli bassi di ferritina sembrerebbe aumentare ulteriormente nei soggetti di sesso maschile, visto che sono in media nella popolazione generale proprio quelli che presentano valori di ferritina significativamente superiori rispetto alla femminile. Quindi un soggetto maschio con valori di ferritina bassa in assenza di anemia sarebbe un candidato ideale da sottoporre allo screening per CD.

La rilevanza clinica dei risultati di questo studio pilota risiede principalmente nel fatto che si potrebbe facilmente individuare una popolazione a rischio aumentato di celiachia semplicemente valutando i livelli di ferritina e di emoglobina. Considerando che i donatori eseguono molto frequentemente tali test nel corso della loro attività di donazione, l'individuazione dei soggetti a rischio di CD nell'ambito dei donatori risulterebbe facile ed economica.

Inoltre, poiché l'emocromo e il dosaggio della ferritina sono fra degli esami maggiormente prescritti anche da pediatri e medici di base, il rilevamento di livelli bassi di ferritina in assenza di anemia potrebbe essere un valido pre screening per celiachia, da applicare anche a soggetti non donatori.

Lo sforzo della pratica attiva della metodologia di *case-finding* è utilissimo nell'aumentare il numero di nuove diagnosi di CD. La ricerca attiva dei casi di celiachia non diagnosticati è sicuramente da incoraggiare e ci sono studi recenti che documentano l'utilità di questo approccio anche mediante l'utilizzo di test rapidi.¹²¹ È stato anche dimostrato l'ottimale rapporto costo efficacia dei

dosaggi POCT degli anticorpi anti-gliadina deamidata IgA e IgG prima della endoscopia nei pazienti anemici.¹²²

La percezione dei medici di base e dei pediatri di libera scelta riguardo alla presentazione della CD è sicuramente cambiata negli ultimi anni anche grazie ai programmi per consapevolizzare nei riguardi della celiachia. Si è passati dalla forma ormai rara di presentazione, inizialmente descritta da Gee nel 1888¹²³, con quadri classici di malassorbimento di una volta ad una delle forme non classiche di presentazione con sintomi tenui e aspecifici. Questo è dovuto al miglioramento degli strumenti e test diagnostici che sono facilmente accessibili al medico di base e presentano caratteristiche ottimali di sensibilità e specificità nel selezionare i pazienti da indirizzare alla conferma biptica di CD. È stato sicuramente importante lo sforzo della comunità scientifica e dei sistemi sanitari nazionali ad investire nella conferma della reale prevalenza della CD nella popolazione, progettando anche percorsi diagnostici e terapeutici specifici riconoscendo l'importanza e configurando la celiachia come malattia cronica e invalidante.¹⁰

I risultati presentati in questa tesi riguardano uno studio pilota e sono quindi preliminari, necessitando di ulteriori verifiche. In ogni caso, tali risultati meritano attenzione nell'ottica di cercare ed arrivare ad una maggiore e migliore diagnosi di celiachia nella popolazione generale, consentendo ai pazienti di migliorare la loro qualità e prospettiva di vita e di salute.

Bibliografia

1. Fasano, A. Where have all the American celiacs gone? *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl.* **412**, 20–24 (1996).
2. Mäki, M. *et al.* Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2517–2524 (2003).
3. Tommasini, A. *et al.* Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch. Dis. Child.* **89**, 512–515 (2004).
4. West, J. *et al.* Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut* **52**, 960–965 (2003).
5. Fasano, A. *et al.* Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch. Intern. Med.* **163**, 286–292 (2003).
6. Hoffenberg, E. J. *et al.* A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J. Pediatr.* **143**, 308–314 (2003).
7. Catassi, C. *et al.* Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet Lond. Engl.* **354**, 647–648 (1999).
8. Singh, P. *et al.* Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **16**, 823-836.e2 (2018).
9. Jansson-Knodell, C. L. *et al.* Sex Difference in Celiac Disease in Undiagnosed Populations - a Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* (2018). doi:10.1016/j.cgh.2018.11.013
10. Relazione annuale al Parlamento sulla celiachia. (2016).
11. Carlo Catassi. Screening della celiachia nel bambino in età scolare.
12. Stefano Guadalinì. A Brief History of Celiac Disease. (2007).
13. The extant works of Aretaeus, the Cappodocian. Adams F, trans. London: Sydenham Society, 1856.
14. Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **24**, 115–119 (2007).
15. Kagnoff, M. F. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 41–49 (2007).
16. Molberg, Ø. *et al.* Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* **125**, 337–344 (2003).
17. Dewar, D. H. *et al.* The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 483–491 (2006).
18. Wieser, H. The precipitating factor in coeliac disease. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* **9**, 191–207 (1995).
19. Shan, L. *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **297**, 2275–2279 (2002).
20. Corazza, G. *et al.* Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of celiac patients. *Gastroenterology* **103**, 1517–1522 (1992).
21. Nisticò, L. *et al.* Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* **55**, 803–808 (2006).
22. Sollid, L. M. *et al.* Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J. Exp. Med.* **169**, 345–350 (1989).
23. Sollid, L. M. & Lie, B. A. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **3**, 843–851 (2005).
24. Wolters, V. M. & Wijmenga, C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 190–195 (2008).

25. Greco, L. *et al.* Genome search in celiac disease. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 669–675 (1998).
26. Holopainen, P. *et al.* Candidate gene region 2q33 in European families with coeliac disease. *Tissue Antigens* **63**, 212–222 (2004).
27. Monsuur, A. J. *et al.* Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat. Genet.* **37**, 1341–1344 (2005).
28. van Heel, D. A. *et al.* A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat. Genet.* **39**, 827–829 (2007).
29. Hunt, K. A. *et al.* Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat. Genet.* **40**, 395–402 (2008).
30. Di Sabatino, A. & Corazza, G. R. Coeliac disease. *Lancet Lond. Engl.* **373**, 1480–1493 (2009).
31. Fernandez-Jimenez, N. *et al.* The methylome of the celiac intestinal epithelium harbours genotype-independent alterations in the HLA region. *Sci. Rep.* **9**, 1298 (2019).
32. Cammarota, G., Cuoco, L., Cianci, R., Pandolfi, F. & Gasbarrini, G. Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet Lond. Engl.* **356**, 1494–1495 (2000).
33. Malfertheiner, P., Ripellino, C. & Cataldo, N. Severe intestinal malabsorption associated with ACE inhibitor or angiotensin receptor blocker treatment. An observational cohort study in Germany and Italy. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* **27**, 581–586 (2018).
34. Adike, A. *et al.* Olmesartan-Induced Enteropathy. *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* **12**, 230–232 (2016).
35. Onteddu, N. K., Pulivarthi, V. S. K. K., Ginnavaram, M. & Kedika, R. Olmesartan-induced enteropathy. *BMJ Case Rep.* **2018**, (2018).
36. Forsberg, G. *et al.* Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* **99**, 894–904 (2004).
37. Stene, L. C. *et al.* Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 2333–2340 (2006).
38. Zanoni, G. *et al.* In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med.* **3**, e358 (2006).
39. Ivarsson, A., Hernell, O., Stenlund, H. & Persson, L. A. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**, 914–921 (2002).
40. Norris, J. M. *et al.* Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA* **293**, 2343–2351 (2005).
41. Crespo Escobar, P. *et al.* Ten years of follow-up of the Spanish cohort of the European PreventCD study: the lessons learned. *Rev. Espanola Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Espanola Patol. Dig.* **110**, 493–499 (2018).
42. Elli, L. *et al.* Management of celiac disease in daily clinical practice. *Eur. J. Intern. Med.* (2018). doi:10.1016/j.ejim.2018.11.012
43. Rubio, C. A., Buhrkhul, D., Perdiki, M. & Idestrom, M. An easy method to quantify plasma cells in caeliac disease. *Vivo Athens Greece* **26**, 859–862 (2012).
44. Lammers, K. M. *et al.* Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* **135**, 194-204.e3 (2008).
45. Ciccocioppo, R. *et al.* Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am. J. Clin. Pathol.* **125**, 502–511 (2006).
46. Wapenaar, M. C. *et al.* Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis. *Gut* **57**, 463–467 (2008).
47. Schumann, M. *et al.* Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut* **57**, 747–754 (2008).
48. Matysiak-Budnik, T. *et al.* Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides

- via the transferrin receptor in celiac disease. *J. Exp. Med.* **205**, 143–154 (2008).
49. Dieterich, W. *et al.* Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.* **3**, 797–801 (1997).
 50. Molberg, O. *et al.* Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat. Med.* **4**, 713–717 (1998).
 51. Kim, C.-Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C. & Sollid, L. M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4175–4179 (2004).
 52. Di Sabatino, A. *et al.* Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut* **49**, 380–386 (2001).
 53. Di Sabatino, A. *et al.* Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. *Gastroenterology* **133**, 1175–1187 (2007).
 54. Mention, J.-J. *et al.* Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* **125**, 730–745 (2003).
 55. Maiuri, L., Vilella, V. R., Piacentini, M., Raia, V. & Kroemer, G. Defective proteostasis in celiac disease as a new therapeutic target. *Cell Death Dis.* **10**, 114 (2019).
 56. Monguzzi, E. *et al.* Gliadin effect on the oxidative balance and DNA damage: An in-vitro, ex-vivo study. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **51**, 47–54 (2019).
 57. Moretti, S. *et al.* Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **9**, 157 (2018).
 58. Corazza, G. R. *et al.* Subclinical celiac sprue. Increasing occurrence and clues to its diagnosis. *J. Clin. Gastroenterol.* **16**, 16–21 (1993).
 59. Murray, J. A. *et al.* Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **1**, 19–27 (2003).
 60. Jinga, M., Popp, A., Balaban, D. V., Dima, A. & Jurcut, C. Physicians' attitude and perception regarding celiac disease: A questionnaire-based study. *Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol.* **29**, 419–426 (2018).
 61. Johnston, S. D., Watson, R. G., McMillan, S. A., Sloan, J. & Love, A. H. Coeliac disease detected by screening is not silent--simply unrecognized. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* **91**, 853–860 (1998).
 62. Jelsness-Jørgensen, L.-P., Bernklev, T. & Lundin, K. E. A. Fatigue as an Extra-Intestinal Manifestation of Celiac Disease: A Systematic Review. *Nutrients* **10**, (2018).
 63. Zanchetta, M. B., Longobardi, V. & Bai, J. C. Bone and Celiac Disease. *Curr. Osteoporos. Rep.* **14**, 43–48 (2016).
 64. Corazza, G. R. *et al.* Bone mass and metabolism in patients with celiac disease. *Gastroenterology* **109**, 122–128 (1995).
 65. Mora, S. *et al.* A prospective, longitudinal study of the long-term effect of treatment on bone density in children with celiac disease. *J. Pediatr.* **139**, 516–521 (2001).
 66. Jafri, M. R. *et al.* Long-term fracture risk in patients with celiac disease: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Dig. Dis. Sci.* **53**, 964–971 (2008).
 67. Ventura, A., Magazzù, G. & Greco, L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* **117**, 297–303 (1999).
 68. Sategna Guidetti, C., Solerio, E., Scaglione, N., Aimo, G. & Mengozzi, G. Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. *Gut* **49**, 502–505 (2001).
 69. Rubio-Tapia, A. & Murray, J. A. The liver in celiac disease. *Hepatol. Baltim. Md* **46**, 1650–1658

(2007).

70. Majumdar, K. *et al.* Coeliac disease and the liver: spectrum of liver histology, serology and treatment response at a tertiary referral centre. *J. Clin. Pathol.* **71**, 412–419 (2018).
71. Hin, H., Bird, G., Fisher, P., Mahy, N. & Jewell, D. Coeliac disease in primary care: case finding study. *BMJ* **318**, 164–167 (1999).
72. Korponay-Szabó, I. R. *et al.* Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. *BMJ* **335**, 1244–1247 (2007).
73. Oberhuber, G., Granditsch, G. & Vogelsang, H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 1185–1194 (1999).
74. Corazza, G. R. *et al.* Comparison of the interobserver reproducibility with different histologic criteria used in celiac disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **5**, 838–843 (2007).
75. Husby, S., Murray, J. A. & Katzka, D. A. AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease: Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review. *Gastroenterology* (2018). doi:10.1053/j.gastro.2018.12.010
76. Carroccio, A. *et al.* Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: a prospective study. *Clin. Chem.* **48**, 1546–1550 (2002).
77. Fabbro, E. *et al.* Uselessness of anti-actin antibody in celiac disease screening. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **390**, 134–137 (2008).
78. Kaukinen, K. *et al.* Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. *Scand. J. Gastroenterol.* **42**, 1428–1433 (2007).
79. Brocchi, E. *et al.* Endoscopic demonstration of loss of duodenal folds in the diagnosis of celiac disease. *N. Engl. J. Med.* **319**, 741–744 (1988).
80. Jabbari, M. *et al.* Scalloped valvulae conniventes: an endoscopic marker of celiac sprue. *Gastroenterology* **95**, 1518–1522 (1988).
81. Bardella, M. T. *et al.* Reevaluation of duodenal endoscopic markers in the diagnosis of celiac disease. *Gastrointest. Endosc.* **51**, 714–716 (2000).
82. Lewis, S. K. & Semrad, C. E. Capsule Endoscopy and Enteroscopy in Celiac Disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **48**, 73–84 (2019).
83. Cammarota, G. *et al.* High accuracy and cost-effectiveness of a biopsy-avoiding endoscopic approach in diagnosing coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 61–69 (2006).
84. Pallav, K. *et al.* Clinical utility of celiac disease-associated HLA testing. *Dig. Dis. Sci.* **59**, 2199–2206 (2014).
85. Rashtak, S. & Murray, J. A. Tailored testing for celiac disease. *Ann. Intern. Med.* **147**, 339–341 (2007).
86. Validation of a novel single-drop rapid human leukocyte antigen-DQ2/-DQ8 typing method to identify subjects susceptible to celiac disease. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619943>. (Accessed: 13th February 2019)
87. Catassi, C. *et al.* A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 160–166 (2007).
88. Pilolli, R. *et al.* Scouting for Naturally Low-Toxicity Wheat Genotypes by a Multidisciplinary Approach. *Sci. Rep.* **9**, 1646 (2019).
89. Vahedi, K. *et al.* Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 1079–1087 (2003).

90. Sategna-Guidetti, C., Grosso, S., Bruno, M. & Grosso, S. B. Reliability of immunologic markers of celiac sprue in the assessment of mucosal recovery after gluten withdrawal. *J. Clin. Gastroenterol.* **23**, 101–104 (1996).
91. Pietzak, M. M. Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance with treatment. *Gastroenterology* **128**, S135–141 (2005).
92. Arentz-Hansen, H. *et al.* The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med.* **1**, e1 (2004).
93. Wierdsma, N. J., van Bokhorst-de van der Schueren, M. A. E., Berkenpas, M., Mulder, C. J. J. & van Bodegraven, A. A. Vitamin and mineral deficiencies are highly prevalent in newly diagnosed celiac disease patients. *Nutrients* **5**, 3975–3992 (2013).
94. Harper, J. W., Holleran, S. F., Ramakrishnan, R., Bhagat, G. & Green, P. H. R. Anemia in celiac disease is multifactorial in etiology. *Am. J. Hematol.* **82**, 996–1000 (2007).
95. Farrell, R. J. & Kelly, C. P. Celiac sprue. *N. Engl. J. Med.* **346**, 180–188 (2002).
96. Mahadev, S. *et al.* Prevalence of Celiac Disease in Patients With Iron Deficiency Anemia-A Systematic Review With Meta-analysis. *Gastroenterology* **155**, 374–382.e1 (2018).
97. Goddard, A. F., James, M. W., McIntyre, A. S., Scott, B. B. & British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* **60**, 1309–1316 (2011).
98. Rubio-Tapia, A. *et al.* ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* **108**, 656–676; quiz 677 (2013).
99. Dubé, C. *et al.* The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* **128**, S57–67 (2005).
100. Mandal, A. K., Mehdi, I., Munshi, S. K. & Lo, T. C. N. Value of routine duodenal biopsy in diagnosing coeliac disease in patients with iron deficiency anaemia. *Postgrad. Med. J.* **80**, 475–477 (2004).
101. Ertekin, V., Tozun, M. S. & Küçük, N. The prevalence of celiac disease in children with iron-deficiency anemia. *Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol.* **24**, 334–338 (2013).
102. Ludvigsson, J. F. *et al.* Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* **63**, 1210–1228 (2014).
103. Cannizzaro, R. *et al.* Improving detection of celiac disease patients: a prospective study in iron-deficient blood donors without anemia in north Italy. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 721–724 (2014).
104. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, European Committee (partial agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS). Recommendation No. R(95) 15. 15th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2009. p. 1899.
105. The Commission of the European Communities. European Commission Directive 2004/33/EC. 2004.
106. Cable, R. G. *et al.* Iron deficiency in blood donors: the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. *Transfusion (Paris)* **52**, 702–711 (2012).
107. Baart, A. M. *et al.* High prevalence of subclinical iron deficiency in whole blood donors not deferred for low hemoglobin. *Transfusion (Paris)* **53**, 1670–1677 (2013).
108. Skikne, B., Lynch, S., Borek, D. & Cook, J. Iron and blood donation. *Clin. Haematol.* **13**, 271–287 (1984).
109. Finch, C. A., Cook, J. D., Labbe, R. F. & Culala, M. Effect of blood donation on iron stores as evaluated by serum ferritin. *Blood* **50**, 441–447 (1977).
110. Simon, T. L., Garry, P. J. & Hooper, E. M. Iron stores in blood donors. *JAMA* **245**, 2038–2043 (1981).

111. Cook, J. D. Clinical evaluation of iron deficiency. *Semin. Hematol.* **19**, 6–18 (1982).
112. Kohgo, Y. *et al.* Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood* **70**, 1955–1958 (1987).
113. Beguin, Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **329**, 9–22 (2003).
114. Punnonen, K., Irjala, K. & Rajamäki, A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* **89**, 1052–1057 (1997).
115. Labbe, R. F. & Rettmer, R. L. Zinc protoporphyrin: a product of iron-deficient erythropoiesis. *Semin. Hematol.* **26**, 40–46 (1989).
116. Kemna, E. H. J. M., Tjalsma, H., Willems, H. L. & Swinkels, D. W. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* **93**, 90–97 (2008).
117. Nemeth, E. & Ganz, T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* **122**, 78–86 (2009).
118. Çekın, A. H., Çekın, Y. & Sezer, C. Celiac disease prevalence in patients with iron deficiency anemia. *Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol.* **23**, 490–495 (2012).
119. Guglielmi, V., Manchisi, M., Pellegrini, V., Tutino, M. & Guerra, V. [RDW: new screening test for coeliac disease?]. *Minerva Med.* **93**, 419–421 (2002).
120. Sategna Guidetti, C., Scaglione, N. & Martini, S. Red cell distribution width as a marker of coeliac disease: a prospective study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 177–181 (2002).
121. Esteve, M. *et al.* Case-finding in primary care for coeliac disease: Accuracy and cost-effectiveness of a rapid point-of-care test. *United Eur. Gastroenterol. J.* **6**, 855–865 (2018).
122. Lau, M. S. Y. *et al.* 'Pre-endoscopy point of care test (Simtomax- IgA/IgG-Deamidated Gliadin Peptide) for coeliac disease in iron deficiency anaemia: diagnostic accuracy and a cost saving economic model'. *BMC Gastroenterol.* **16**, 115 (2016).
123. Gee S. On the coeliac disease.