

DIAGNOSI SIEROLOGICA IN GASTROENTEROLOGIA

TAVOLA ROTONDA DAL CONVEGNO SATELLITE EUROSPITAL, TRIESTE 1997

È sembrato utile assemblare (così come sono nati, cioè per un simposio ad hoc) una serie di contributi concernenti il significato del laboratorio nella interpretazione patogenetica, nella diagnostica e nel follow-up delle patologie gastrointestinali più comuni (l'infezione, l'ipersensibilità, la celiachia). È venuto fuori qualcosa non tanto di nuovo quanto di abbastanza omogeneo e abbastanza utile; e in ciascuno dei capitoli l'utilizzo pratico si è trovato strettamente connesso alla comprensione delle cause, degli effetti, e dei meccanismi.

Per l'infezione intestinale (sonde genetiche) si individuano le aree di utilizzo pratico (la ricerca epidemiologica, il riconoscimento di patogeni "difficili" come la Giardia) e il contributo delle ricerche relative alla comprensione del danno intestinale tossigenico, attraverso la identificazione dei geni codificanti per le singole tossine.

Per l'infezione da Hp si evidenzia la validità "eziologica" della diagnosi sierologica, ma anche la scarsa correlazione di questa con la clinica, dunque il basso potere predittivo positivo, e semmai la necessità di individuare i ceppi virulenti.

La celiachia, naturalmente, fa la parte del leone, mentre si definiscono le grandi potenzialità e le poco rilevanti limitazioni della diagnostica sierologica; si percepiscono sempre più chiaramente la natura autoimmune della malattia, i perché, il quanto e il come della sua correlazione (di causa ed effetto) con altre malattie autoimmuni e, con qualche difficoltà di lettura, dobbiamo riconoscerlo, ma quello che è difficile è difficile, i meccanismi della sensibilizzazione e del danno a livello molecolare e il significato del substrato genetico della malattia (eterodimeri HLA).

Infine, per l'ipersensibilità al latte vaccino e ad altri trofoallergeni, si approfondisce il diverso significato, e quin-

di la diversa utilità diagnostica, dei test per le IgE specifiche, per le IgA e le IgG, per la sensibilità cellulare, per i prick test e per il patch test (con conclusioni particolarmente interessanti, sia sul piano clinico che sul piano concettuale, per ciò

che concerne la dermatite atopica), e il valore e la sensibilità dei test di scatenamento e di danno mucosale. È un buon concentrato, e ne deriva una lettura "globale", facile e utile.

La diagnosi con sonde genetiche: quale applicabilità pratica?

ALESSIO FASANO

Divisione di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica, Università del Maryland, Baltimore, USA

L'avvento di tecniche di biologia molecolare e di ingegneria genetica ha rivoluzionato vari campi dello scibile umano, incluso quello medico. Grazie a queste nuove metodiche, abbiamo oggi a disposizione tecniche che hanno permesso nuove scoperte o applicazioni inimmaginabili fino a pochi anni fa. Lo studio delle malattie diarroiche non fa eccezione a questa regola. Negli ultimi anni abbiamo assistito a una vertiginosa crescita delle nostre conoscenze sui meccanismi di patogenicità e sull'identificazione di nuovi patogeni enterici. La classe più affascinante e nello stesso tempo eterogenea di enteropatogeni rimane, comunque, quella degli *Escherichia coli*, che variano dal più innocuo commensale intestinale a ceppi estremamente virulenti, responsabili di quadri sindromici gravi che possono portare all'exitus del paziente. L'uso delle sonde genetiche per l'identificazione degli *Escherichia coli* patogeni in corso di malattie diarroiche è divenuto sempre più frequente e sicuramente irrinunciabile per studi epidemiologici in larga scala. L'analisi epidemiologica della fre-

quenza dei diversi *Escherichia coli* patogeni in molte aree del mondo non sarebbe praticamente attuabile attraverso l'uso di metodi convenzionali che si basano essenzialmente su esami biologici costosi e lunghi e che richiedono capacità tecniche per colture cellulari e l'uso di un grande numero di animali da laboratorio.

Nel mondo occidentale, va aggiunto, *Escherichia coli* è diventato sempre meno importante come responsabile di diarrea acuta; e l'interesse allo studio mediante sonda delle diverse tossine batteriche ha più importanza per la produzione di modelli patogenetici della diarrea infettiva che per le applicazioni clinico-epidemiologiche.

Le sonde genetiche possono comunque essere utilizzate per ogni altro tipo di patogeni intestinali, compresi i protozoi, come la *Giardia* e il *Cryptosporidium*, altrimenti di difficile identificazione.

Che cos'è una sonda genetica?

Una sonda genetica è un frammento

di materiale genetico, solitamente DNA, specifico per un determinato microrganismo; in altre parole, può essere paragonata a una sorta di impronta digitale capace di identificare solo ed esclusivamente la classe di microrganismi dalla quale è stata isolata.

Come si costruisce una sonda genetica?

Ogni organismo, non importa se molto semplice (come virus e batteri) o estremamente complesso, contiene nel suo materiale genetico sequenze nucleotidiche uniche (le impronte digitali di cui abbiamo fatto cenno) che lo distinguono da tutti gli altri organismi. La strategia utilizzata per costruire una sonda genetica si basa sull'identificazione e sull'isolamento di tali sequenze, sulla loro produzione in "scala industriale" (clonaggio) da parte di particolari batteri che fungono da "fabbriche di produzione" e sulla loro marcatura (con radioisotopo o enzima) che ne permetta l'identificazione.

Come si usa una sonda genetica?

Piccole quantità di materiale fecale e colonie batteriche pure vanno trasferite a materiale di supporto (ad esempio, filtri di cellulosa). I batteri presenti in tali campioni sono quindi trattati in modo da esporre e denaturare il loro materiale nucleico che diventerà bersaglio eventuale per l'accoppiamento (tecnicamente definito ibridizzazione) con la catena nucleica complementare della sonda specifica.

Quali sono le applicazioni correnti per l'uso delle sonde genetiche?

In considerazione del fatto che nella stragrande maggioranza le malattie diarroiche sono autolimitanti e non richiedono altro intervento che la reidratazione orale con soluzioni gluco-saline, possiamo certamente affermare che le sonde genetiche (come pure la coprocoltura come tipicamente viene fatta nei nostri Ospedali e ambulatori) trovano scarsa applicabilità nella diagnostica delle malattie diarroiche comuni.

Va comunque puntualizzato come esistono condizioni particolari, quali diarree prolungate a eziologia ignota, diarree gravi in pazienti immunocompromessi o in neonati pretermine, o epidemie diarroiche che si verificano in comunità quali asili nido, scuole e anche in servizi ospedalieri, in cui l'identificazione dell'agente causale diviene cruciale per un appropriato intervento terapeutico, di isola-

mento e di sanità pubblica.

È comunque fuor di ogni dubbio che l'utilizzo delle sonde genetiche trova la sua più naturale e immediata applicazione, piuttosto che nel lavoro clinico, negli studi epidemiologici su larga scala dove

un grosso numero di campioni deve essere esaminato in tempi relativamente brevi. Questi studi sarebbero del tutto inimmaginabili se dovessero essere condotti utilizzando metodiche tradizionali di diagnostica microbiologica.

La diagnosi di laboratorio dell'allergia alimentare

RICCARDO TRONCONE, NIVES CAPUTO

Unità Specialistica di Allergologia, Dipartimento Clinico di Pediatria, Università di Napoli "Federico II"

Sotto il termine di intolleranza alimentare sono classificate tutte le reazioni avverse ad alimenti. Esse comprendono reazioni tossiche, idiosincrasiche, metaboliche e allergiche. Il termine allergia alimentare è riservato alle reazioni avverse basate su qualsiasi tipo di risposta immune abnorme nei confronti di antigeni della dieta.

La procedura standard per la diagnosi di allergia alimentare si basa su una attenta analisi del rapporto causa/effetto tra l'assunzione dell'alimento sospetto e i sintomi del paziente¹. In base a questa analisi gli alimenti sospetti sono eliminati, e, se il paziente è effettivamente affetto da allergia alimentare, segni e sintomi scompaiono usualmente entro pochi giorni; se ciò non avviene, la diagnosi di allergia alimentare può essere esclusa. La conferma diagnostica definitiva verrà successivamente dagli appropriati challenge.

La diagnosi di allergia alimentare è quindi squisitamente clinica: è chiaro che in questo contesto il ruolo del laboratorio è ancillare; nondimeno esso può fornire indicazioni importanti per il clinico.

I test di laboratorio per la diagnosi di allergia alimentare possono suddividersi in due gruppi principali: il primo include quei test che esplorano la risposta immune specifica anti-alimenti; il secondo gruppo di indagini mira a valutare la liberazione di mediatori dell'infiammazione e/o i possibili danni indotti dall'alimento incriminato: si tratta di test non specifici, che acquisiscono specificità quando inseriti nell'ambito di procedure cliniche di esclusione/reintroduzione degli alimenti sospetti.

Immunità anti-alimenti: la risposta IgE

Tra i meccanismi immunologici possibilmente responsabili di reazioni avverse ad alimenti, hanno particolare rilievo quelli IgE-mediati, le reazioni da immunocomplessi e i meccanismi di ipersensibilità di tipo ritardato. Di conseguenza i test che possiedono una valenza clinica comprendono quelli basati sulla ricerca delle IgE specifiche, quelli basati sulla ricerca di anticorpi di altri isotipi e infine i test di immunità cellulare. Le reazioni IgE mediate sono senza dubbio quelle per le quali un più chiaro rapporto causale è stato stabilito tra risposta immune e sintomi clinici. Nell'ambito dei test che esplorano l'immunità reaginica i prick test con estratti alimentari standardizzati rappresentano un metodo sensibile ed economico per testare la presenza di IgE specifiche legate a mastcellule. Quando appropriatamente eseguito, esso è provato essere in qualsiasi fascia di età il test di prima scelta per la misura delle IgE specifiche. La sensibilità, specificità e valore predittivo di questi test variano in rapporto ai singoli alimenti, e soprattutto in relazione al tipo di manifestazioni cliniche (*Tabella I*). Infatti, dal momento che la maggioranza delle reazioni ad alimenti a lenta insorgenza non sono causate da anticorpi IgE, il valore di questi test è confinato a pazienti che mostrino reazioni acute.

Alcuni aspetti pratici della diagnostica IgE vanno sottolineati. Dato il basso valore predittivo positivo è pratica da proscrivere quella di eliminare dalla dieta alimenti sulla sola base della positività di prick test. Al contrario l'elevato

VALORE PREDITTIVO DEGLI SKIN TEST PER LA DIAGNOSI DI ALLERGIA ALIMENTARE IN BAMBINI CON DERMATITE ATOPICA

Alimento	Valore predittivo positivo	Valore predittivo negativo
UOVO	75	95
ARACHIDI	49	100
LATTE	64	89
GRANO	27	100
PESCE	25	100

da Bock et al: *J Pediatr* 117, 561,1990

Tabella I

SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DI PRICK TEST E PATCH TEST PER LA DIAGNOSI DI APLV IN PAZIENTI CON DERMATITE ATOPICA

	Sensibilità (%)	Specificità (%)
Prick + vi	47	83
Patch + vi	59	83
Prick o patch + vi	81	65
Prick e patch + vi	25	100

Da Isolauri et al: *J Allergy Clin Immunol* 97, 9-15, 1996

Tabella II

valore predittivo negativo suggerisce l'utilità di questi test in relazione alla programmazione di challenge clinici: la loro negatività, infatti, rende assai poco probabile l'insorgenza di reazioni acute; d'altra parte, però, la positività dei prick test non costituisce controindicazione assoluta alla effettuazione di un challenge.

Un altro aspetto sul quale vale la pena di richiamare l'attenzione è il fatto che alla pluripositività di test cutanei solo raramente corrisponde un'analoga plurireattività clinica; in altri termini la plurisensibilizzazione è evenienza relativamente rara.

A questo proposito va pure detto che diete di esclusione concepite sulla base di parentele tassonomiche tra alimenti è pratica il più delle volte ingiustificata: ancora una volta, è solo sulla base di challenge clinici che è possibile porre con certezza la diagnosi di allergia e prescrivere la relativa dieta di esclusione.

Infine, per quanto riguarda i test in vitro per la ricerca di IgE specifiche, questi non presentano vantaggi rispetto ai test in vivo e il loro impiego trova limitate indicazioni (estese lesioni cutanee, spiccato dermografismo, impiego di antistaminici). Come già accennato, il valore predittivo di questi test in sogget-

ti che presentano reazioni ritardate è scarso.

Immunità anti-alimenti: le risposte IgG e IgA

Per ciò che concerne anticorpi anti-alimenti di altri isotipi (classi IgG e IgA) va ricordato che la presenza nel siero di IgG rivolte verso antigeni della dieta è segno di avvenuto contatto dell'antigene con il sistema immune, e rappresenta un fenomeno normale. Come gruppo, però, individui allergici al latte vaccino presentano titoli anticorpali più alti di quelli riscontrati negli individui tolleranti³. Nel complesso questi test hanno limitato valore diagnostico, che rimane solamente orientativo. Queste considerazioni valgono anche per il dosaggio di IgA specifiche.

Immunità ritardata anti-alimenti: i test in vitro

I test di laboratorio per la misura dell'immunità di tipo ritardato (test di proliferazione cellulare, test di inibizione della migrazione leucocitaria) sono di difficile impiego routinario. I linfociti ottenuti dal sangue periferico di pazienti con allergia alimentare sono più spesso stimolati dall'antigene in causa in confronto a quelli ottenuti da controlli; tuttavia, la sensibilità e la specificità di

questi test risultano dalla maggior parte dei dati della letteratura molto basse⁴, e ciò ne sconsiglia l'utilizzazione clinica. Meritano invece di essere approfondite le recenti esperienze di gruppi finlandesi basate sull'impiego di patch test per alimenti⁵.

Immunità ritardata anti-alimenti: i patch test

In uno studio molto recente condotto su bambini con dermatite atopica e allergici alle proteine del latte vaccino, sottoposti a prick e patch test, questi ultimi hanno dato risultati piuttosto discrepanti rispetto ai primi. I prick test erano positivi nel 67% dei casi con insorgenza acuta dei sintomi dopo challenge, mentre i patch test tendevano in questi stessi soggetti ad essere negativi.

I patch test erano invece positivi nell'89% di pazienti con reazioni ritardate, ma in questo gruppo i prick risultavano frequentemente negativi. Queste osservazioni indicano che nella dermatite atopica risposte IgE e T mediate possono essere distinte, ma soprattutto suggeriscono che nella dermatite atopica l'uso combinato di prick e patch test può significativamente aumentare l'efficienza nella diagnosi di specifiche allergie alimentari.

I test di danno mucosale: la permeabilità agli zuccheri

Per ciò che riguarda i test che esplorano alterazioni mucosali, particolare interesse offre il test di permeabilità intestinale agli zuccheri. In bambini con allergia alle proteine del latte vaccino in fase attiva, la permeabilità intestinale risulta alterata con aumentato passaggio mucosale di lattulosio o cellobiosio e diminuito assorbimento di piccole molecole (mannitolo, ramnosio, xilosio). La permeabilità si normalizza a dieta di esclusione. Questo test non è specifico dell'allergia alimentare, essendo alterato anche in altre condizioni di danno intestinale, quali la malattia celiaca o il morbo di Crohn. Tuttavia il suo uso nella fase acuta può essere di notevole aiuto; nel lattante con vomito esso si è dimostrato di grande efficacia nella diagnosi differenziale tra reflusso gastroesofageo e allergia alle proteine del latte vaccino⁶. Complementare all'osservazione clinica, il test di permeabilità agli zuccheri è anche di grande aiuto nel corso dell'esecuzione del challenge diagnostico. Durante il challenge, infatti, la positivizzazione del test esprime con molta evidenza e significatività l'effetto

lesivo dell'alimento; lo studio delle modificazioni della permeabilità intestinale, dunque, aumenta consistentemente la sensibilità e specificità del test di scatenamento, risultando significativamente alterato nella grande maggioranza dei casi con diagnosi finale di allergia alimentare⁷.

I test di danno mucosale: il dosaggio dei mediatori dell'infiammazione

Interessanti prospettive sono aperte da recenti studi condotti in Finlandia, e basati sul contenuto, nelle feci, di mediatori dell'infiammazione dopo challenge. Concentrazioni aumentate di proteina cationica eosinofila (ECP), soprattutto nei soggetti con reazioni acute, e di Tumor Necrosis Factor (TNF- α), in quelli con reazioni più tardive, sono state documentate nelle feci⁸.

Ricerche future potranno chiarire se il dosaggio di questi può essere di aiuto nella fase acuta. È molto probabile che ancora una volta questi test siano poco specifici e che debbano essere necessariamente complementati da osservazioni cliniche: in effetti recenti osservazioni compiute nel nostro laboratorio hanno dimostrato livelli intestinali elevati di ECP anche in corso di colite da malattia infiammatoria cronica dell'intestino⁹.

Conclusioni

Il laboratorio può svolgere un ruolo importante nell'approccio diagnostico a pazienti con sospetta allergia alimentare. Esso tuttavia ha limiti importanti: la difficoltà nell'accesso alle mucose, la cui risposta immune è il più delle volte coinvolta e non sempre corrispondente alla risposta immune sistemica; va tenuto inoltre conto della molteplicità dei meccanismi immunologici dell'allergia alimentare che rende improbabile l'aspettativa che un solo test possa offrire sufficiente valore diagnostico. Infine, vale la pena ribadire ancora una volta che l'abnorme risposta immune a un antigene della dieta (sensibilizzazione) non significa necessariamente reattività clinica.

Bibliografia

1. The European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition Working Group for the Diagnostic Criteria for Food Allergy: Diagnostic criteria for food allergy with predominantly intestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 14,108-112, 1992.
2. Bock SA, Atkins FM: Patterns of food hy-

persensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *J Pediatr* 117, 561-7, 1990.

3. Fallstrom SP, Ahlstedt S, Carlsson B, Lonnardal B, Hanson LA: Serum antibodies against native, processed and digested cow's milk proteins in children with cow's milk protein intolerance. *Clin Allergy* 16, 417-23, 1986.
4. Hoffman KM, Ho DG, Sampson HA: Evaluation of the usefulness of lymphocyte proliferation assays in the diagnosis of allergy to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 99, 360-6, 1997.
5. Isolauri E, Turjanmaa K: Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 97, 9-15, 1996.
6. Staiano AM, Troncone R, Simeone D, Mayer M, Finelli E, Cella A, Auricchio S: Differentiation of cow's milk intolerance and ga-

stroesophageal reflux. *Arch Dis Child* 73, 439-442, 1995.

7. Troncone R, Caputo N, Florio G, Finelli E: Increased intestinal sugar permeability after challenge in children with cow's milk allergy or intolerance. *Allergy* 49, 142-6, 1994.
8. Matarazzo P, Kapel N, Guerin S, De Bois-sieu D, Georges P, Gobert JG, Dupont C: Tumor necrosis factor alpha, faecal marker of food allergy in children with intestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 124, 4, 467, 1997.
9. Caputo N, Esposito V, Cucchiardi M, Campanozzi A, De Vizia B, Cucchiara S, Troncone R: Eosinophil cationic protein (ECP) is increased in the whole gut lavage fluid from children with inflammatory bowel disease. *International Meeting of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, Napoli, 11-14 Settembre 1996.

La diagnosi sierologica dell'infezione da Hp

GIUSEPPE MAGAZZÙ

Istituto di Clinica Pediatrica, Università di Messina

Dopo la scoperta di Warren e Marshall della relazione esistente tra gastrite e presenza nello stomaco dell'*Helicobacter pylori* (Hp), è stato subito chiaro che l'infezione induceva una risposta anticorpale locale e sistemica, e che quest'ultima era facilmente evidenziabile con la determinazione di immunoglobuline specifiche anti-Hp.

Una volta definita da numerosi studi l'accuratezza diagnostica delle IgG anti-Hp intorno al 90%, l'uso della sierologia è stato indirizzato sugli obiettivi elencati in *Tabella I*.

Epidemiologia dell'infezione da Hp

I dati riguardanti l'epidemiologia dell'infezione in differenti popolazioni di bambini asintomatici (*Tabella II*) mostrano dei picchi di prevalenza significativamente superiori in alcuni studi rispetto ad altri. Prevalenze più elevate sono dovute al fatto che la popolazione studiata, come nel caso delle casistiche di Fiederek e di Pelsen, era prevalentemente di estrazione socio-economica bassa, a conferma di quanto si sapeva della relazione tra infezione e livello socio-economico. Questi dati sono importanti per ricordare che, laddove si utilizza la sierologia per stimare la prevalenza dell'infezione in una popolazione di bambini dispeptici e quindi dedurre, in-

direttamente, il ruolo dell'Hp nella dispepsia, bisogna avere il raffronto con la popolazione pediatrica dalla quale i bambini provengono, senza far riferimento a valori tratti dalla letteratura.

Attendibilità della diagnosi sierologica

De Giacomo et al. nel 1991 dimostra-

APPLICAZIONI DELLA SIEROLOGIA NELLA DIAGNOSTICA DELL'INFEZIONE DA Hp

- Definizione dell'epidemiologia dell'infezione nella popolazione generale
- Predizione o stima della prevalenza dell'infezione da Hp in soggetti dispeptici con o senza ulcera peptica
- Riduzione del numero delle endoscopie da eseguire in soggetti dispeptici
- Identificazione dei ceppi patogeni
- Predizione dell'avvenuta eradicazione dopo trattamento
- Sviluppo di "near patient tests"
- Verifica dell'attendibilità diagnostica delle IgG salivari

Tabella I

PREVALENZA DI INFEZIONE DA Hp IN BAMBINI ASINTOMATICI

Autori	Area	N. pazienti	Prevalenza	Referenza
DE GIACOMO	Italia	150	12%	<i>J Pediatr</i> '91
FIEDEREK	USA	245	31%	<i>Pediatrics</i> '91
BLECKER	Belgio	466	7%	<i>Lancet</i> '92
CHONG	USA	238	10.5%	<i>Pediatrics</i> '95
DONOHUE	GB	640	16.7%	<i>Acta Paed</i> '96
HARDIKAR	Austria	98	14.3%	<i>JPGN</i> '96
PELSEN	Sud Africa	412	53%	<i>JPGN</i> '97

Tabella II

vano che la sierologia era attendibile anche in età pediatrica, utilizzando un metodo ELISA non commerciale, rivolto alla determinazione delle immunoglobuline seriche nelle classi G e A. In questo lavoro, per la prima volta in età pediatrica, veniva prospettato che la sierologia avrebbe potuto far risparmiare l'esecuzione dell'endoscopia, in accordo con quanto suggerito nell'adulto. Infatti Loeffeld et al., e poi Sobala et al., avevano suggerito di trattare empiricamente con terapia rivolta all'eradicazione dell'Hp i pazienti positivi, riservando l'esame endoscopico solo a quelli Hp negativi o Hp positivi con sintomi persistenti dopo trattamento farmacologico.

Recentemente la Consensus Conference di Maastricht ha confermato tale orientamento, almeno per pazienti afferenti a centri di cura primari, aggiungendo il fattore età (< 45 anni) per minimizzare il rischio che alla base dei disturbi dispeptici ci sia un cancro gastrico. Questo approccio è valido anche nel bambino, a maggior ragione perché il rischio di cancro gastrico è trascurabile? Per rispondere, è opportuno chiedersi che cosa significhi trattare un bambino dispeptico Hp positivo.

Mentre un soggetto adulto dispeptico ha circa il 40% di probabilità di essere Hp positivo e come tale ha circa il 25% di probabilità di avere un'ulcera peptica (la prevalenza di quest'ultima è trascurabile tra gli Hp negativi), nel bambino devono essere tenuti in conto i punti sintetizzati nella *Tabella III*.

Bisogna, allora, formulare la domanda in altri termini e cioè se un bambino positivo per Hp alla sierologia, che nella stragrande maggioranza dei casi ha solo una dispepsia non ulcerosa (DNU), debba veramente essere trattato con terapia empirica rivolta all'eradicazione? Se nell'adulto studi controllati non sono stati capaci di dimostrare dei vantaggi

del trattamento verso placebo, in età pediatrica non esiste alcuno studio controllato verso placebo.

Dunque, e questo va detto chiaramente, in una popolazione in cui il 10-20% dei soggetti è sieropositivo, e in assenza (perché così stanno le cose nella grande maggioranza dei casi) di una correlazione significativa tra sintomi e sieropositività, il valore predittivo positivo di quest'ultima e la conseguente indicazione al trattamento divengono debolissimi.

Ciò malgrado, va detto anche che, negli studi eseguiti in età pediatrica sulla infezione da Hp, dopo l'esecuzione di un'endoscopia che abbia dimostrato nei frammenti biotici gastrici la presenza dell'infezione, mediante o il test rapido all'ureasi o la coltura del frammento biotico o l'esame istologico, i bambini dispeptici sono stati trattati con farmaci rivolti all'eradicazione; la gran parte di questi studi "in aperto" riportano un beneficio sulla sintomatologia. Sarebbe quindi ragionevole trattare allo stesso modo i bambini Hp positivi alla sierologia, che non abbiano segni di allarme (ematemesi, disfagia), senza dover ricorrere all'esecuzione dell'esame endoscopico.

Se dovesse essere accettata tale idea, almeno per i bambini valutati presso l'ambulatorio del pediatra di base o degli ospedali dove l'endoscopia pediatrica non venga effettuata, ci sarebbe da chiedersi se i kit del commercio hanno una sufficiente attendibilità diagnostica.

Come indicano alcuni studi effettuati applicando 5-8 kit sullo stesso siero, non esistono differenze tra i vari kit in commercio. Tuttavia, devono essere rispettate alcune condizioni perché la sierologia sia affidabile, e cioè che i kit siano volti alla ricerca di ceppi di Hp provenienti dalle aree dove si intende poi utilizzare la metodica, e che vengano definiti i valori di cut-off per i bambini, essendo

PREVALENZA DI INFEZIONE DA Hp E DI ULCERA PEPTICA NEL BAMBINO

- La prevalenza di infezione da Hp in bambini dispeptici è intorno al 20%
- La prevalenza dell'ulcera peptica non è superiore al 3-4%
- Solo 1/3-1/2 dei bambini con ulcera peptica sono Hp positivi

Tabella III

la risposta anticorpale in termini quantitativi spesso diversa rispetto agli adulti.

Dalla sierologia sono derivate altre importanti conoscenze sull'Hp.

Infatti, l'osservazione che dal 30 all'80% della popolazione umana studiata abbia anticorpi G anti-Hp ma che, per fortuna, solo una minoranza di casi sviluppi patologia (non solo l'ulcera peptica ma anche quella neoplastica a carico dello stomaco), ha suggerito che oltre a fattori ambientali o dipendenti dall'ospite, possano esserci dei fattori di virulenza dell'Hp determinanti per lo sviluppo di patologia.

Lo studio sierologico è inoltre utile per valutare l'effetto della terapia sulla eradicazione dell'Hp. Infatti quest'ultima si accompagna di regola ad un significativo decremento dei titoli anticorpali.

I dati relativi sono abbastanza omogenei e si possono sintetizzare ricordando che un dimezzamento dei valori di IgG a 6 mesi indica l'eradicazione con un'attendibilità del 98%, a patto che la determinazione delle IgG venga effettuata contemporaneamente sui campioni pre e post-trattamento.

Sei mesi possono essere considerati un tempo troppo lungo per la valutazione di efficacia nel singolo paziente, sul quale può essere più importante valorizzare i sintomi clinici. Lo studio sierologico resta viceversa importante se non obbligatorio negli studi clinici controllati sulla efficacia di singoli protocolli, permettendo di rinunciare a metodi invasivi, quali l'endoscopia, o costosi e non molto diffusi, quali il ¹³C urea-Breath test.

Tossina vacuolizzante e citotossina

L'identificazione del genoma Hp ha consentito di chiarire come, tra i fattori di virulenza, tutti i ceppi abbiano il gene

VacA, a struttura variabile, che codifica per una tossina vacuolizzante, anche se solo metà dei ceppi esprime veramente questa proteina. Alcuni genotipi VacA sembrano altamente correlati all'ulcera gastrica, per cui la genotipizzazione con metodi quali la PCR o l'ibridizzazione del DNA potrebbero essere preziosi ausili diagnostici.

Il 60-70% dei ceppi Hp possiede un gene CagA che codifica per una citotossina. Quasi tutti questi ceppi esprimono la proteina, identificabile all'immunoblot della banda 116 kDa. Molti studi hanno cercato di verificare la correlazione tra la presenza di questa proteina e patologie quali l'ulcera peptica, l'adenocarcinoma dello stomaco, il maltoma gastrico e la dispepsia non ulcerosa (DNU).

Limitandosi alla correlazione tra CagA e DNU, essendo tale condizione clinica l'evenienza più comune nel bambino dispeptico Hp positivo, sembrano interessanti i dati raccolti in una grande casistica di adulti a Hong Kong, dove è stata riscontrata un'umentata prevalenza di CagA positivi tra i pazienti con DNU in comparazione a una popolazione controllo asintomatica. Se confermati in età pediatrica, questi dati potrebbero essere importanti per la selezione dei pazienti con DNU da trattare.

Test "rapidi"

Riguardo ai cosiddetti "near patient tests", metodi fattibili in ambulatorio in presenza del paziente, l'interesse risiede nel fatto che alcuni sono stati realizzati come test su goccia di sangue capillare e non richiedono centrifugazione e altri hanno semplificato la metodica fornendo delle risposte in tempi brevi, anche se solo qualitative.

In *Tabella IV* sono sintetizzati i risultati di recenti studi concernenti tali test.

A parte la variabilità dei risultati, è importante ricordare che i dati disponibili sono stati ottenuti in centri specialistici e non in centri periferici o ambulatori per i quali i test sono stati messi in commercio. Inoltre, i risultati sono qualitativi e non quantitativi e come tali non possono servire per il follow-up.

Sembra, quindi, ancora presto poterli raccomandare; se sarà dimostrata l'accuratezza diagnostica anche in ambulatorio e in età pediatrica, tali test potrebbero essere uno strumento rapido e poco costoso per la diagnosi.

Da qualche anno sono stati avviati degli studi concernenti la diagnosi basata sulla determinazione di IgG anti-

ATTENDIBILITÀ DIAGNOSTICA DEI "NEAR PATIENT TESTS"

Autori	Campione	Sensibilità	Specificità	Referenza
BORODY	Sangue	82	91	<i>Am J Gastr '96</i>
GRAHAM	Siero	93	87	<i>Am J Gastr '96</i>
GRAHAM	Siero	88	79	<i>Am J Gastr '96</i>
STONE	Sangue	92	62	<i>Eur J Gastr Hep '97</i>
REILLY	Sangue	85	78	<i>GUT '97</i>

Tabella IV

ATTENDIBILITÀ DIAGNOSTICA DELLE IgG SU SALIVA E SIERO

Metodo	Saliva		Siero		Referenza
	sens.	spec.	sens.	spec.	
KIT SERICO COMM.	85	85	90	90	PATEL, <i>Lancet '94</i>
IN-HOUSE SERICO	82	71	97	91	LUZZA, <i>Am J Gastr '95</i>
KIT SALIVARE	66	74	66	83	FALLONE, <i>Am J Gastr '96</i>
KIT SALIVARE	88	71	85	78	CHRISTIE, <i>GUT '96</i>
KIT SALIVARE	84	70	95	70	REILLY, <i>GUT '97</i>

Tabella V

Hp su saliva. I risultati ottenuti sono sintetizzati nella *Tabella V*.

Anche per questi test esiste un'ampia variabilità nell'accuratezza diagnostica, indipendentemente che si usino kit sierici adattati per la determinazione su saliva o sviluppati originariamente per questa. La non-invasività della raccolta della saliva indicherebbe l'utilizzo di tali metodi come mezzo ideale per lo screening di comunità. Fino a quando la sensibilità dei test non sarà migliorata, tale proposta non potrà essere accettabile. Al riguardo sembrano promettenti i primi dati della ricerca della CagA su saliva con immunoblot, che attendono una conferma su una casistica più ampia.

In conclusione, laddove vengano utilizzati dei kit rivolti alla ricerca di ceppi prevalenti nell'area geografica di affezione dei bambini e, soprattutto, una volta definito il cut-off di normalità per l'età pediatrica, la sierologia potrà far risparmiare il numero di endoscopie da eseguire in bambini dispeptici. Sembra importante conoscere la relazione tra dispepsia non ulcerosa, la condizione clinica nella quale si trova quasi sempre un bambino dispeptico Hp positivo, e l'infezione mediante uno studio placebo-controllato che valuti la correlazione tra sintomatologia e stato dell'infezione; quest'ultimo potrebbe essere valutato con la sierologia.

Bibliografia

- Cutler AF, Havstad S, Ma CK et al: Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 109, 136-41, 1995.
- Tolia V: *Helicobacter pylori* in pediatric non-ulcer dyspepsia: pathogen or commensal. *Am J Gastr* 90, 865-7, 1995.
- Briggs AH, Sculpher MJ, Logan RPH, Aldous J, Ramsay ME, Baron JH: Cost effectiveness of screening for and eradication of *Helicobacter pylori* in management of dyspeptic patients under 45 years of age. *BMJ* 312, 1321-5, 1996.
- Olson AD, Fendrick M, Deutsh D et al: Evaluation of initial noninvasive therapy in pediatric patients presenting with suspected ulcer disease. *Gastrointest Endosc* 44, 554-61, 1996.
- Mègraud F: The most important diagnostic modalities for *Helicobacter pylori*, now and in the future. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9 (Suppl. 1), S13-S15, 1997.
- Atherton JC: The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *GUT* 40, 701-3, 1997.
- Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *GUT* 41, 8-13, 1997.
- Atherton JC: Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 11 (Suppl. 1), 11-2079, 1997.

La diagnosi immunologica di malattia celiaca

CARLO CATASSI

Istituto di Clinica Pediatrica, Università di Ancona

Nel corso di questi ultimi anni si è assistito a una continua evoluzione delle indagini immunologiche per la diagnosi non invasiva di malattia celiaca (Tabella 1). Sebbene sia generalmente riconosciuto che l'accertamento diagnostico definitivo è ancora oggi rappresentato dalla biopsia intestinale, la diffusione di tali indagini ha contribuito a mettere in evidenza l'estremo polimorfismo clinico della malattia celiaca, favorendo al tempo stesso la comprensione dei meccanismi patogenetici di questa affezione.

La ricerca degli anticorpi sierici anti-gliadina (AGA) di classe IgA e IgG con metodo immunoenzimatico rappresenta un valido test di screening per la celiachia¹. I vantaggi maggiori di questo esame sono l'elevata sensibilità (specie se AGA-IgG e AGA-IgA vengono ricercati in parallelo), la possibilità di individuare anche le forme di celiachia a esordio precoce (sotto i 2 anni di vita) o associate a deficit selettivo di IgA sieriche, nonché il dosaggio automatizzato. Quest'ultima peculiarità è particolarmente rilevante negli screening di popolazione, laddove è necessario analizzare un numero elevato di campioni in tempi

brevi. Dati recenti indicherebbero che anche il test rapido per la ricerca degli AGA (alfa-gliastick, Eurospital, Trieste), praticabile a livello ambulatoriale, conserva l'affidabilità del metodo ELISA convenzionale².

Una indagine multicentrica della Società Italiana di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica (SIGEP), svolta in collaborazione con l'Eurospital, consentirà entro breve tempo di disporre di un cut-off su base quantitativa per gli AGA (Figura 1).

La specificità non molto elevata rappresenta tuttavia il limite maggiore della ricerca degli AGA. Tra le situazioni che possono causare una "falsa" positività di questo test ricordiamo la diarrea acuta, le enteropatie croniche di origine non celiaca (ad esempio malattie infiammatorie croniche intestinali), l'atopia, i disordini su base immunitaria, la sindrome di Down e la fibrosi cistica.

La ricerca degli anticorpi antiendomisio (EMA) di classe IgA costituisce attualmente il test più affidabile per la diagnosi sierologica di celiachia. Numerosi lavori hanno dimostrato che l'utilizzo del cordone ombelicale umano, quale substrato per la reazione di immunofluorescenza, è altrettanto valido che l'esofago distale di scimmia, tessuto di difficile reperimento per evidenti motivi etici³. Il pregio maggiore degli EMA è rappresentato da una specificità che raggiunge il 100%, in virtù della possibilità di evidenziare, con questo test, anche le forme di celiachia potenziale. La sensibilità non è tuttavia ottimale, poiché l'esame può risultare negativo, anche in assenza di deficit selettivo di IgA, durante i primi 2 anni di vita o nel soggetto adulto. La falsa negatività degli EMA sembrerebbe da attribuire, almeno in una parte dei casi, alla possibile interferenza con altri autoanticorpi sierici, soprattutto l'anti-muscolo liscio.

Assai promettente appare la possibilità di dosare gli EMA nel liquido di coltura di biopsia intestinale incubata per 48 ore⁴. Se verrà

confermata la validità di tale indagine, una possibile applicazione pratica potrebbe essere quella di confermare la persistenza della sensibilità al glutine con una sola biopsia intestinale, senza necessità della prova di riesposizione (challenge).

La vera novità in tema di diagnostica sierologica di celiachia è rappresentata dalla ricerca degli anticorpi anti-transglutaminasi, diretti contro l'autoantigene primario della malattia celiaca. In un prossimo futuro potrebbe essere disponibile un test ELISA per la ricerca degli anticorpi sierici anti-transglutaminasi, la cui affidabilità sembra essere sovrapponibile, secondo alcuni dati preliminari, a quella degli EMA⁵.

In tema di diagnostica sierologica della celiachia meritano infine un cenno alcuni problemi ancora aperti:

a) *Il problema dei soggetti con deficit di IgA.* Questi non possono essere riconosciuti celiaci né con il dosaggio degli EMA (che sono di classe IgA) né con il dosaggio degli AGA-IgA. Il dosaggio degli AGA-IgG rappresenta l'unico test utilizzabile: tuttavia, e specialmente in questi pazienti, a causa della ridotta immunoesclusione di antigeni a livello intestinale, la positività per IgG, pur mantenendo un'elevata sensibilità, ha una bassa specificità diagnostica, con potere predittivo solo del 30%. In questi soggetti, dunque, la biopsia intestinale non

INDAGINI IMMUNOLOGICHE PER LA DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

- Anticorpi anti-gliadina IgA e IgG
AGA quantitativi
Gliastick
AGA salivari
- Anticorpi antiendomisio IgA
su cordone ombelicale
su coltura di biopsia
- Anticorpi antireticolina R1
- Anticorpi antidigiuno
- Anticorpi anti-transglutaminasi

Tabella 1

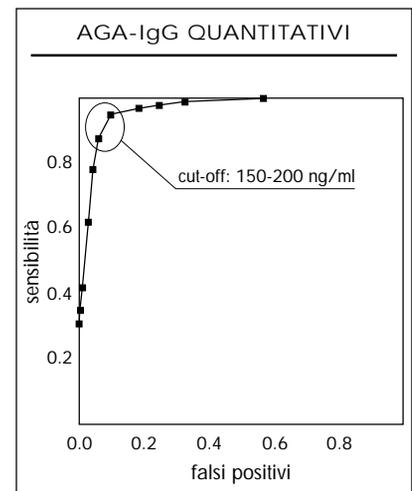


Figura 1. Analisi ROC (Receiver Operating Characteristic) della performance degli AGA-IgG determinati con metodica quantitativa. I dati sono tratti da una indagine multicentrica SIGEP, svolta in collaborazione con l'Eurospital. Valori di cut-off prossimi a 150 ng/ml di AGA-IgG sierici sembrano presentare la migliore discriminazione tra i soggetti celiaci e i controlli.

rappresenta soltanto un test di conferma, ma rimane l'unico vero test diagnostico attendibile di fronte a una sintomatologia sospetta. I soggetti con deficit selettivo di IgA, dunque, sfuggiranno facilmente allo screening se asintomatici, e dovranno comunque essere sottoposti a biopsia se sintomatici.

b) *Il monitoraggio della aderenza alla dieta aglutinata nel celiaco in trattamento.* È ormai comprovato che, dopo l'avvio del trattamento dietetico, né gli AGA né gli EMA consentono di individuare eventuali trasgressioni di lieve entità o l'ingestione di glutine "nasco-^{to}".

Bibliografia

1. Catassi C, Fabiani E, Räscht IM, et al: The coeliac iceberg in Italy. A multicentre anti-gliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr* 85 (Suppl 412), 29-35, 1996.
2. Corazza GR, Biagi F, Andreani ML, Gabbarrini G: Screening test for coeliac disease. *Lancet* 349, 325-6, 1997.
3. Kolho KL, Savilahti E: IgA antiendomysium antibodies on human umbilical cord: an excellent diagnostic tool for coeliac disease in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24, 563-7, 1997.
4. Picarelli A, Maiuri L, Frate A, Greco M, Auricchio S: Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestinal biopsy samples from patients with coeliac disease. *Lancet* 348, 1065-7, 1996.
5. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nature Medicine* 3, 797-801, 1997.
6. Troncone R, Mayer M, Spagnuolo F, Maiuri L, Greco L: Endomysial antibodies as unreliable markers for slight dietary transgressions in adolescents with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21, 69-72, 1995.

Celiachia: diagnosi genetica?

LUIGI GRECO, BARBARA DI CAPRIO

Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli "Federico II"

C'è bisogno di ancora qualche anno di lavoro per poter disporre di un utile strumento per la diagnosi genetica di celiachia. L'unico gene attualmente conosciuto è il complesso dell'HLA.

Attualmente disponiamo di un marcatore genetico (l'HLA di classe II, DR-DQ), la cui presenza è obbligatoria nella celiachia. Questo marcatore è presente anche nel 30-40% della popolazione non-celiaca e nel 50-70% dei familiari di primo grado di celiaci, non malati: sicché la loro presenza non ha nessun valore predittivo positivo, mentre la loro assenza ha un elevatissimo valore predittivo negativo (99%). In altre parole la presenza del marcatore ci permette di dire solo che il paziente può essere celiaco; la sua assenza ci assicura, con l'approssimazione del 99%, che non lo è. Per questo la valutazione dell'aplotipo HLA di classe II ci permette di dire che è compatibile con la celiachia, dunque la diagnosi è possibile, o, in sua assenza, ci permette, con un margine di sicurezza del 99%, di escludere la celiachia.

L'assenza, dunque, dello specifico aplotipo HLA di classe II serve a escludere la malattia specialmente in:

- familiari di soggetti celiaci
- pazienti con iter diagnostico incerto
- impossibilità di eseguire una biopsia intestinale.

Qual è l'aplotipo specifico dell'HLA?

I vari geni che codificano per le singole specificità dell'HLA di classe II sono molto vicini tra di loro sul cromosoma 6. Essi vengono per questo ereditati come "aplotipi estesi" che comprendono diversi sottotipi dell'HLA, spesso composti da geni che sono necessariamente in linkage genetico tra loro perché contigui sul cromosoma 6. È il caso dei geni della specificità DR e quelli DQ.

Il 90-92% dei pazienti celiaci sono portatori di geni, in monodose o in doppia dose, di un tipo specifico di DQ in linkage genetico con specifici geni DR. Questo aplotipo è composto da due geni (DQA*0501 e DQB*0201) che portano alla produzione di un eterodimero composto da una catena alfa e da una catena beta, che formano il complesso HLA

MA L'HLA NON SERVE PIÙ A DIFENDERE CHE A NUOCERE?

Le differenze nella risposta immune dell'individuo sono spesso associate a specifici polimorfismi del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA). L'HLA DRB1*1302 è associato a protezione contro la infezione persistente da HBV. Lo stesso aplotipo è anche associato a un rischio ridotto di malaria in forma grave nei bambini del Gambia.

Sia la malaria che l'epatite virale sono importanti cause di morte precoce nell'Africa Occidentale. È dunque verosimile che l'HLA DRB1*1302 fornisca un vantaggio selettivo alle popolazioni africane.

L'HLA di classe II, attraverso la sua funzione di presentazione dell'antigene, svolge un ruolo critico nello sviluppo della risposta immune mediata dai linfociti T-helper. La variabilità dell'HLA di classe II di presentare antigeni potrebbe apparire come una variabilità (o una specificità) legate alla cellula T-helper.

I pazienti che sviluppano un'epatite B persistente, e che dunque sono incapaci di attivare una risposta efficace contro gli antigeni virali, hanno infatti realmente una scarsa produzione di anticorpi contro l'antigene 'e' e quello di superficie del virus e sono inoltre incapaci di produrre un numero sufficiente di linfociti T citotossici specifici contro il virus B. Questo deficit può essere dovuto, almeno in parte, alla mancanza di una risposta del linfocita T-helper perché mediata da molecole di HLA di classe II con una scarsa capacità di presentare antigeni specifici.

In conclusione la variazione nei geni che controllano la risposta immune è uno dei fattori che può spiegare la diversa prognosi di malattie gravi quali l'epatite B e la malaria.

espresso sulla superficie della cellula che presenta antigeni (APC). Tale complesso forma una "pinza" proteica, nella cui bocca si va ad ancorare il peptide specifico presentato nella celiachia.

I geni DQ specifici sono quelli associati alle specificità DR3, che formano l'eterodimero in "cis" sullo stesso allele, e le specificità DR5 e DR7 che formano su ciascun allele una catena alfa e una beta (dunque in "trans") con lo stesso risultato finale.



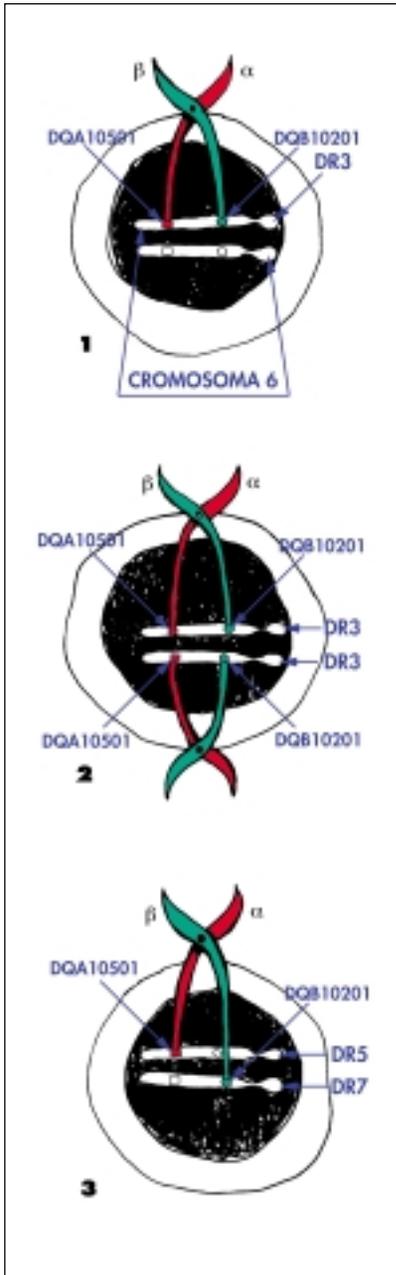


Figura 1. Vengono illustrate le tre situazioni più classiche per la costituzione di un eterodimero, le cui branche (le tenaglie) possono essere codificate dagli aplotipi DR3, DR5 e DR7 localizzati sul cromosoma 6. L'aplotipo DR3, associato (in linked disequilibrium) a DQA1 0501 e DQB1 0201, può essere in situazione di omozigosi (1), o di eterozigosi (2), sempre in posizione "cis" (coi due aplotipi sempre sullo stesso cromosoma). Gli aplotipi DR5 e DR7 si trovano invece sempre in posizione "trans" (3) (coi due aplotipi collocati nei due diversi cromosomi della coppia 6), in linked disequilibrium rispettivamente con DQA1 0501 e DQB1 0201.

LE BASI MOLECOLARI DELLA SENSIBILITÀ AL GLUTINE

È attualmente documentato con certezza che almeno alcuni dei geni coinvolti nella patogenesi della malattia celiaca mappano nella regione del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA), sul cromosoma 6. L'aplotipo più fortemente associato alla malattia è il DQ2-DR3 o il DQ2-DR5/7. I geni che codificano per la molecola DQ2 e quelli che codificano per il DR3 o per il DR7 sono associati più spesso dell'atteso sullo stesso cromosoma per il fenomeno noto come "linkage disequilibrium". Solo in una stretta minoranza dei casi non è presente il DQ2 e la suscettibilità alla malattia risulta correlata ai geni che codificano per le molecole DQ8 in genere correlato al DR4.

Le molecole controllate dai geni del sistema HLA di II classe (DR, DQ, DP) sono principalmente espresse sulle cellule immunocompetenti (linfociti B, monociti, macrofagi, cellule dendritiche) ma, sotto lo stimolo dell'INF-g e del TNF-a, possono essere occasionalmente espresse anche su altri tipi di cellule, inclusi i fibroblasti e le cellule epiteliali. Si tratta di glicoproteine legate alla membrana cellulare, deputate ad accogliere antigeni proteici "processati" (il che vuol dire modificati dall'azione delle proteasi endocellulari) e a presentarli ai linfociti T. Queste molecole sono conformate a doppia valva, con le caratteristiche di un eterodimero. Ciò vuol dire che ognuna delle due valve è diversa dall'altra (una catena alfa e una catena beta) ed è codificata da alleli diversi, di ognuno dei due loci, A e B, di cui ogni gene che codifica per le molecole HLA di II classe è provvisto. I geni che codificano per le catene alfa e beta sono polimorfi (tranne che nel caso di quello che codifica per la catena alfa delle molecole DR che è non polimorfa) e pertanto esiste una grossa variabilità nella composizione degli eterodimeri che appartengono ad ognuna delle molecole (DR, DQ e DP) degli HLA di II classe.

La struttura terziaria dell'eterodimero conferisce a quest'ultimo la sua specificità e la possibilità di accogliere soltanto antigeni conformati in una determinata maniera, mai comunque più di uno per volta.

Ognuna delle due componenti di un eterodimero codificato da un gene HLA viene identificato, all'analisi del DNA, da una sigla che indica il locus di appartenenza (ad esempio locus A del gene per la molecola DQ = DQA) e da un numero preceduto da asterisco che indica l'allele: così l'allele 0501 del locus A della specificità antigenica DQ, che codifica per la catena alfa dell'eterodimero più fortemente correlato alla celiachia, viene indicato come DQA1*0501. L'allele che codifica per l'altra componente (catena beta) dello stesso eterodimero risponde alla sigla DQB*020. La specificità molecolare dell'eterodimero codificato dagli alleli DQB1*0201-DQA1*0501, viene indicata sinteticamente DQ (alfa1*0501, beta1*0201).

Di recente, è stata data effettivamente dimostrazione che la malattia celiaca è ristretta ai soggetti capaci di esprimere sulle cellule immunocompetenti una molecola DQ costituita dall'eterodimero DQ (alfa1*0201, beta1*0501). Questo eterodimero può essere presente sia nel caso di un aplotipo DQ2-DR3 che di un aplotipo DQ2- DR5/DR7, ma non nel caso in cui il DR5 o il DR7 siano rappresentati singolarmente.

È stato documentato che i soggetti celiaci DR3 positivi esprimono entrambi gli alleli DQA1*0501-DQB1*0201 sullo stesso cromosoma: si usa dire pertanto che l'eterodimero, nel caso dei DR3, è codificato in posizione "cis" (tutto da loci genici posti su un cromosoma solo). La specificità DR5 è correlata solo al locus DQA*0501 e quella DR7 solo al locus DQB*0201 e, quindi, nessuna delle due specificità, da sola, potrà esprimere l'eterodimero completo a meno che non siano copresenti, di necessità, una su un cromosoma e una sull'altro: si usa dire, in questo caso, che l'eterodimero DQ (alfa1*0501, beta1*0201) è codificato in posizione "trans" (da loci genici A e B posti su due cromosomi) (Figura 1).

Circa il 10% dei celiaci sono DQ2-DR3 o DQ2-DR5/7 negativi. Nella maggioranza di questi casi è presente un eterodimero DQ (alfa1*0301, beta1*0302) correlato all'aplotipo DQ8-DR4 e molto simile dal punto di vista conformazionale a quello più classicamente associato alla malattia.

E chi non ha lo specifico eterodimero?

Il 10% circa dei pazienti che non portano l'eterodimero descritto sono invero portatori di geni che, alla fine, producono un altro tipo di eterodimero, con una struttura assolutamente sovrapponibile a quella dell'eterodimero alfa-beta descritto. Si tratta dei pazienti che hanno specificità DR7 o DR4 o quella denominata DQ8.

Essi infatti hanno un gene DRB, de-

nominato DRB4, che, associato al gene DRBA produttore di una catena alfa invariante, produce una catena beta4 e può costituire così un eterodimero alfa-beta4. Questo eterodimero è del tutto simile a quello della maggioranza dei pazienti (il DQA*0501-DQB*0201), avendo pochi aminoacidi di differenza in siti non critici per il legame col peptide.

Esistono infine solo rarissimi pazienti (meno dell'1%) che non hanno geni per produrre né il primo né il secondo tipo

di eterodimero: essi hanno una specificità del tipo DRB1-DQB1, che forma probabilmente un diverso tipo di eterodimero.

In conclusione, tutti i celiaci hanno un HLA di classe II molto specifico e obbligatorio, ma non sufficiente a produrre la malattia. Questo HLA ha però una enorme importanza nella genesi stessa della malattia e non solo nella "predisposizione", un'importanza molto maggiore di quasi tutte le malattie HLA correlate finora conosciute. Esso è obbligatorio nella celiachia, ma è presente anche nella popolazione normale.

Il prossimo futuro

Ci manca dunque un anello della catena genetica che porta alla manifestazione della celiachia: abbiamo il gene che presenta l'antigene (l'HLA) ma non conosciamo ancora quel gene che da questa reazione specifica, ma "fisiologica", scatena una catena di eventi che portano all'autoimmunità, con il suo corredo patologico.

In realtà, dallo screening del genoma umano appena concluso ad opera dei membri della SIGEP, si evidenzia una regione, sul cromosoma 11, che sembra differenziare i casi pienamente sintomatici da quelli identificati per screening.

Esiste inoltre, sul cromosoma 5, una ampia area genetica in linkage genetico con la celiachia.

È in queste due aree che saranno individuati i geni che, uniti all'HLA, costituiscono il background genetico sul quale si instaura il meccanismo fisiopatologico che causa la celiachia.

Abbiamo finalmente le zone cromosomiche da esplorare per giungere a una migliore definizione della "diagnosi genetica", oggi non ancora disponibile, ma verosimilmente già iscritta nel nostro prossimo futuro (Figura 1).

Bibliografia

1. Thursz MR, Kwiatowski D, Allsopp CEM, Greenwood BM, Thoma HC, Hill AVS: Association between an MCH Class II allele and clearance of Hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 332, 1065-1069, 1995.
2. Hill AVS, Elvin J, Willis AC, et al: Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 360, 434-9, 1992.



Celiachia e autoimmunità

ALESSANDRO VENTURA

Coordinatore, per il Gruppo di Studio su Celiachia e Autoimmunità della Società Italiana di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica (SIGEP)

G. Magazzù (Messina); P. Bertolani (Modena); L. Greco, M. Ciccarelli (Napoli); F. Cataldo (Palermo); C. Ughi, G. Chiaravalloti (Pisa); G.F. Bottazzo (Londra); C. Betterle (Padova); E. Buratti, A. Leopaldi, S. Martelossi, T. Not, M. Pocecco, G. Torre (Trieste)

Celiachia come modello di malattia autoimmune

Nei soggetti celiaci l'assunzione di glutine determina la comparsa di autoanticorpi, diretti contro polipeptidi che sono presenti nella matrice extracellulare di tutti gli organi, definiti come anticorpi antiendomio (EMA). Il fenomeno è così costante che il dosaggio degli EMA è considerato il test più affidabile per la diagnosi di malattia celiaca, con una sensibilità e una specificità superiori al 95%¹.

Questi autoanticorpi, la cui produzione appare prerogativa esclusiva dei soggetti caratterizzati da alcuni aplotipi HLA come quello "esteso" B8-DR3-DQ2, coincidono con quelli che si depositano sulla membrana basale dell'epitelio digiunale (JAB) e del tessuto perivascolare del cordone ombelicale (UCA)². Il significato patogenetico degli EMA nella malattia celiaca (e di conseguenza l'ipotesi che la malattia celiaca stessa rappresenti un vero e proprio modello di malattia autoimmune glutine-dipendente) è suggerito dal fatto che la mucosa intestinale di soggetti celiaci, incubata con alfa-gliadina, produce anticorpi antiendomio in maniera assolutamente costante e precoce, mentre invece la produzione di anticorpi antigliadina è un fenomeno incostante e tardivo³.

Di fatto, dal punto di vista clinico, la comparsa degli EMA può anche precedere quella di una enteropatia conclamata (subatrofia dei villi con ipertrofia delle cripte), venendosi a configurare, in questo caso, una condizione (EMA +, biopsia morfologicamente normale), oggi nota col nome di celiachia latente⁴. Questi soggetti, se rimangono esposti al glutine con la dieta, hanno una elevatissima probabilità di sviluppare la classica enteropatia, mediamente entro un paio di anni.

Recentemente, è stato dimostrato che gli anticorpi antiendomio sono diretti contro l'enzima transglutaminasi

umana tissutale (TTG) ed è stato ipotizzato che questo enzima (coinvolto in funzioni riparative e nel fenomeno dell'apoptosi cellulare) costituisca l'autoantigene della malattia celiaca⁵ (le caratteristiche degli EMA sono riassunte in Tabella 1).

La gliadina rappresenta un substrato ad alta affinità per la TTG e potrebbe indurre una risposta autoanticorpale specifica verso l'enzima TTG modificandone la struttura e formando dei neo-epitopi o, agendo da carrier proteico per la TTG stessa, smascherandola dal suo stato di antigene "self" (vedi anche l'editoriale di M. Maki in questo stesso numero).

La celiachia verrebbe così a soddisfare i requisiti per essere considerata a pieno titolo una malattia autoimmune di cui conosciamo la predisposizione genetica (HLA), l'agente esogeno scatenante (glutine) e l'autoantigene (TTG). È possibile peraltro che, nel soggetto celiaco, la transglutaminasi sia solo uno degli autoantigeni coinvolti a catena nella reazione autoimmune glutine-dipendente. Altri autoantigeni, normalmente "criptici", possono essere resi riconoscibili e innescare una risposta immunologica autoaggressiva, a seguito del processo infiammatorio primariamente innescato dalla gliadina. Infatti, la persistente sti-

ANTICORPI ANTIENDOMISIO (EMA)

- Autoanticorpi glutine-dipendenti (predisposizione genetica)
- Fenomeno costante e precoce (patogenetici?)
- Predicono l'enteropatia
- Endomio = transglutaminasi umana tissutale

Tabella 1

molazione da parte di alcune citochine flogogene, quali l'interferon-gamma e il TNF- α , sarebbe capace di indurre una ulteriore processazione di autoantigeni e la loro presentazione ai T linfociti da parte di cellule immunocompetenti di tipo macrofagico (le cosiddette APC = *antigen presenting cells*). Questo fenomeno del moltiplicarsi a catena degli autoantigeni (noto con la dizione inglese di *antigen spreading*) trova dei modelli ben definiti in natura (il piú noto è quello del diabete insulino-dipendente che compare clinicamente dopo che l'individuo ha montato una risposta autoimmune ad autoantigeni diversi: GAD, anti-insulina, anti-betacellula ecc.), potrebbe applicarsi anche alla malattia celiaca e aiuterebbe a spiegare la presenza di una larga serie di autoanticorpi organo-specifici in una percentuale variabile di soggetti celiaci a dieta contenente glutine.

Autoimmunità glutine-dipendente

Oltre alla enteropatia celiaca esistono altri esempi di manifestazioni autoimmuni glutine-dipendenti (quello noto da piú tempo è la dermatite erpetiforme), così come oltre agli EMA esistono altri autoanticorpi correlati all'assunzione di glutine con la dieta.

Un'augmentata prevalenza di malattie autoimmuni tra i soggetti celiaci, così come di celiaci tra i soggetti con malattie autoimmuni, è da tempo nota (*Tabella II e III*) ed è stata attribuita alla condivisione di fattori genetici predisponenti, principalmente di alcuni antigeni HLA. Peraltro un largo studio italiano ha recentemente dimostrato che la prevalenza di malattie autoimmuni in adolescenti celiaci è effettivamente molto piú elevata che nella popolazione coetanea generale (13.6% contro 3.6%, $p < 0.000001$) ma, ciò che è piú interessante, dipende dall'età alla diagnosi, vale a dire dalla durata dell'esposizione al glutine. Infatti, i celiaci esposti al glutine per meno di due anni non sembrano avere una prevalenza di malattie autoimmuni significativamente superiore a quella dei controlli, mentre il rischio sale (proporzionalmente con l'età alla diagnosi) fino ad oltre il 25% nella popolazione di celiaci esposta al glutine piú di 10 anni.

Queste evidenze clinico-epidemiologiche dell'esistenza di un largo spettro clinico di autoimmunità glutine-dipendente sono rinforzate da altre evidenze che si riferiscono alla dimostrazione, nel siero di soggetti celiaci, di diversi tipi di autoanticorpi, in parte dipendenti dall'assunzione di glutine con la dieta.

In uno studio prospettico inglese su 107 celiaci adulti, 15 presentavano alla diagnosi una disfunzione tiroidea autoimmune (14%) contro una prevalenza attesa nella popolazione inglese coetanea del 2%. Ventotto (26%) presentavano positività per almeno un autoanticorpo tiroide-correlato (antitireoglobulina o antitireoperossidasi) contro una prevalenza attesa del 10% nella popolazione generale. Analogamente, il fattore reumatoide IgA è stato documentato rispettivamente nel 18.2% e nel 13.5% di sog-

getti adulti con celiachia e dermatite erpetiforme, contro il 2.5% della popolazione generale. Più interessanti appaiono i dati del gruppo romano coordinato da Bonamico, in quanto non solo documentano un'elevata prevalenza di positività di autoanticorpi correlati alla tiroide e al pancreas in soggetti celiaci (nel complesso almeno una positività risulta presente nel 47.4% dei celiaci in dieta libera) ma anche una prevalenza significativamente piú bassa degli stessi autoanticorpi nei celiaci a dieta senza glutine

PREVALENZA (%) DI ALCUNE MALATTIE AUTOIMMUNI IN CELIACI ADULTI (DA COLLIN, MODIFICATA)

Autori	Diabete tipo I	Tireopatie autoimmuni	Connettiviti
Lancaster '74 (23)	3.5	5.2	1.8
Cooper '78 (6)	3.2	3.2	6.1
Midhagen '88 (21)	n.d.	10.8	3.6
Snook '89 (24)	1.4	4.1	n.d.
Collin '94 (7)	5.4	5.4	7.2

Tabella II

PREVALENZA DELLA CELIACHIA IN ALCUNE MALATTIE AUTOIMMUNI

Tireopatie autoimmuni (Collin '94, Berti '97) (7,22)	2.4-4.8%
Artrite cronica giovanile (Lepore '96) (9)	3.5%
Alopecia (Corazza '95) (15)	1.8%
Colangite sclerosante (Kingham '98) (25)	6%
Atassia con anticorpi anti-cellule di Purkinje (Hadjvassiliou '96) (16)	>50%
Epilessia con calcificazioni endocraniche serpiginoze (Gobbi '92) (17)	72%

Tabella III

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ENTRATI NEI TRE FILONI DI STUDIO SU " AUTOANTICORPI E CELIACHIA "

1. Studio retrospettivo multicentrico (ambito SIGEP)

Dosaggio autoanticorpi (panel Eurospital)

(ANA, ENA, DSDNA, anticardiolipina IgM-IgG, antitireoglobulina, antiperoossidasi tiroidea)

a) Celiaci in dieta libera	EMA + = 89
b) Celiaci in dieta SG	EMA - = 422
c) Controlli	EMA - = 250

2. Studio retrospettivo multicentrico (ambito SIGEP)

Dosaggio ICA (Londra-Padova)

a) Celiaci in dieta libera	EMA + = 174
b) Celiaci in dieta SG	EMA - = 671
c) Controlli	EMA - = 50

3. Studio prospettico (Clinica Pediatrica di Pisa)

Dosaggio ICA, GAD, anti-insulina (Trieste)

a) Celiaci alla diagnosi in dieta libera	EMA + = 89
b) Stessi celiaci dopo 3-6 mesi di dieta senza glutine	EMA - = 89
c) Controlli sani	EMA - = 50

Tabella IV

PREVALENZA DI DIVERSI AUTOANTICORPI IN SOGGETTI CELIACI A DIETA LIBERA E A DIETA SENZA GLUTINE E IN CONTROLLI SANI

Autoanticorpo	a: celiaci a dieta libera (totale 89)	b: celiaci a dieta senza glutine (totale 422)	c: controlli sani (totale 250)	Significatività statistica
ANA	12 (13.5%)	58 (13.7%)	25 (10%)	a-b: n.s. a-c: n.s.
ENA	7 (7.9%)	30 (7.1%)	3 (1.2%)	a-b: n.s. a-c: p = 0.03
Anticardiolipina IgM	15 (16.8%)	38 (9%)	6 (2.4%)	a-b: p = 0.05 a-c: p = 0.019
Anticardiolipina IgG	9 (10.2%)	16 (3.8%)	0	a-b: p = 0.05 a-c: p = 0.02
Antitireoglobulina	5 (5.7%)	15 (36%)	3 (1.2%)	a-b: n.s. a-c: n.s.
Antitireoperossidasi	20 (25%)	32 (7.6%)	13 (5.2%)	a-b: p = 0.03 a-c: p = 0.03
	a: celiaci a dieta libera (totale 174)	b: celiaci a dieta senza glutine (totale 671)	c: controlli sani (totale 50)	
ICA	9 (5%)	15 (2.2%)	0	

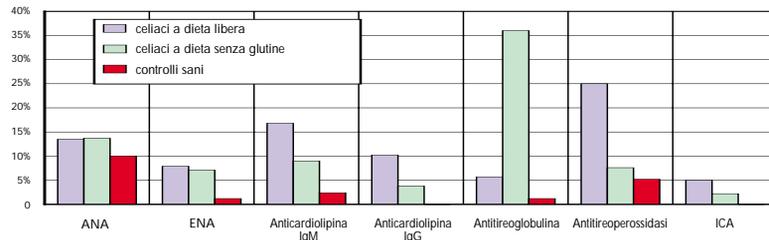


Figura 1

PREVALENZA DI AUTOANTICORPI CORRELATI AL DIABETE DI TIPO I IN UNA COORTE DI 89 CELIACI VALUTATI ALLA DIAGNOSI E DOPO UN PERIODO DI DIETA SENZA GLUTINE DI 3-6 MESI

Autoanticorpo	a: celiaci in dieta libera EMA + (totale 89)	b: celiaci dopo 3-6 mesi di dieta senza glutine (totale 89)	c: controlli (totale 50)	Significatività
ICA	5 (5.6%)	3 (3.4%)	0	n.s.
anti-insulina	3 (3.4%)	0	0	n.s.
GAD	2 (2.2%)	0	0	n.s.
Almeno un positivo	9 (10%)	3 (3.4%)	0	a-b: p<0.05 a-c: p<0.05

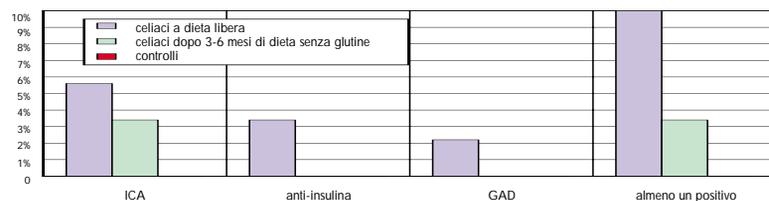


Figura 2

(13.5%). L'ipotesi che autoanticorpi glutine-dipendenti, diversi dagli EMA, possano avere significato patogenetico per diversa patologia autoimmune non è stata definitivamente documentata. Peraltro, molto suggestivi a questo riguardo sono i dati relativi a pazienti con celiachia e atassia cerebellare, in cui è stata documentata la presenza di autoanticorpi anti-cellule di Purkinje e in cui la dieta senza glutine porta alla scomparsa della sintomatologia atassica parallelamente alla negativizzazione di questo tipo di autoanticorpi.

Autoanticorpi e celiachia: una esperienza italiana

Obiettivo dello studio è stato quello di valutare la prevalenza di una larga serie di autoanticorpi in soggetti celiaci e di verificare se questa correla con l'assunzione di glutine con la dieta.

Pazienti e metodi

Lo studio consta di una parte retrospettiva (multicentrica, con la collaborazione di 6 centri nell'ambito del gruppo di studio su celiachia e autoimmunità della SIGEP) e di una parte prospettica (che riguarda unicamente pazienti seguiti presso l'Istituto di Clinica Pediatrica dell'Università di Pisa). Per il dosaggio degli autoanticorpi ci si è giovati di diverse collaborazioni, e più precisamente del laboratorio Eurospital per il dosaggio di ANA, ENA, DSDNA, anticardiolipina IgM, anticardiolipina IgG, antitireoglobulina (ATG), antiperoossidasi tiroidea (TPO), del laboratorio del dott. G.F. Bottazzo (Londra) e del dott. C. Betterle (Padova) per il dosaggio degli ICA e, infine, del laboratorio dell'Ospedale Infantile di Trieste per il dosaggio degli anticorpi anti-insulina pancreatici e anti-GAD (Tabella IV).

Complessivamente sono entrati nello studio retrospettivo 885 soggetti celiaci di età compresa tra 10 e 25 anni (età media 16.4, 538 femmine) (di cui 174, EMA positivi, a dieta libera contenente glutine, e 671, EMA negativi, a dieta senza glutine da almeno 9 mesi) e 250 controlli sani EMA negativi (età compresa tra 14 e 34 anni, età media 19.4, 151 femmine). I celiaci con diabete insulino-dipendente e con tireopatia autoimmune clinicamente riconosciuta sono stati esclusi dallo studio. Tutti i pazienti e 50 controlli hanno ricevuto il dosaggio degli ICA, mentre 411 pazienti e tutti i 250 controlli hanno ricevuto solo il dosaggio degli altri autoanticorpi (panel Eurospital).

Nello studio prospettico sono entrati 89

celiaci (59 femmine, età compresa tra 15 mesi e 14 anni, età media 5.2), diagnosticati presso la Clinica Pediatrica dell'Università di Pisa, che hanno ricevuto dosaggio degli anticorpi diabete-correlati (ICA, anti-insulina, GAD) alla diagnosi e dopo un periodo variante tra 3 e 6 mesi di dieta senza glutine.

Stesso dosaggio è stato eseguito in 50 controlli sani. Anche in questo caso i pazienti con diabete insulino-dipendente già diagnosticato sono stati esclusi dallo studio.

Nella *Tabella IV* vengono schematicamente sintetizzati i tre filoni dello studio.

Risultati e commento

La *Figura 1* riassume l'andamento degli autoanticorpi nei due studi retrospettivi e la *Figura 2* in quello prospettico.

Appare evidente che per una larga serie di autoanticorpi (ENA, anticardiolipina IgM e IgG, antitiroperossidasi) i soggetti celiaci a dieta contenente glutine presentano una positività significativamente più frequente che nei controlli. Nel caso degli anticorpi antiperoxidasi tiroidea, la positività riguarda un quarto dei casi. La prevalenza degli stessi autoanticorpi (tranne nel caso degli ENA) appare significativamente inferiore nei celiaci in dieta senza glutine rispetto a quelli in dieta libera, pur essendo evidente che il soggetto celiaco presenta comunque, anche a dieta senza glutine, una maggior prevalenza di positività rispetto alla popolazione di controllo.

Nessuno dei casi ICA positivi né di quelli con anticorpi anti-tiroide dimostrava sintomatologia clinica o indici di laboratorio riferibili a diabete insulino-dipendente o alterazioni della funzione tiroidea.

Piuttosto interessante appare il dato della relativamente elevata prevalenza di anticorpi anticardiolipina di classe IgM e IgG nel soggetto celiaco a dieta libera, specie in relazione alla aumentata frequenza di aborti nella donna con celiachia misconosciuta, evento clinico che potrebbe essere messo in correlazione alla presenza di questo tipo di autoanticorpi.

Anche nel caso degli ICA, va sottolineato che il trend sembra quello di una maggior prevalenza nei celiaci a dieta libera rispetto a quelli in dieta aglutinata e, ancor di più, rispetto ai soggetti di controllo, ma la prevalenza appare in assoluto piuttosto bassa (5% nei soggetti celiaci a dieta libera) e impedisce delle conclusioni a riguardo. I risultati rispetto agli ICA sono comunque confermati, con prevalenze del tutto sovrapponibili,

anche nello studio prospettico che, protratto nel tempo, potrà dare una risposta più conclusiva rispetto all'ipotesi che i soggetti celiaci ICA positivi possano liberarsi di questo tipo di autoanticorpo dopo un tempo più lungo di dieta senza glutine.

Gli anticorpi anti-insulina e i GAD sono risultati positivi in una piccolissima quota di soggetti celiaci a dieta libera (rispettivamente 3.4% e 2.2%) ma in nessun soggetto sano di controllo. Un solo soggetto presentava positività per più di un autoanticorpo diabete-correlato (ICA + GAD) e non presentava risposta anomala al carico di glucosio. In tutti e 5 i soggetti che presentavano GAD o antinsulina in dieta libera, questi autoanticorpi si sono negativizzati dopo un breve periodo di dieta senza glutine. Nel complesso 9 degli 89 (10%) bambini celiaci entrati nello studio prospettico sono risultati positivi per almeno un autoanticorpo diabete-correlato al momento della diagnosi, in dieta libera contenente glutine, mentre questa positività è rimasta presente solo in 3 casi dopo un periodo di dieta senza glutine inferiore ai 6 mesi, con trend statisticamente significativo.

Nel complesso, l'insieme dei dati raccolti nel nostro studio indica l'aumentata prevalenza di diversi tipi di autoanticorpi nel soggetto celiaco e della dipendenza di almeno una parte di questi dall'assunzione di una dieta aglutinata. Questi dati, assieme alla dimostrazione che l'aumentata prevalenza di malattie autoimmuni nel celiaco dipende dalla durata dell'esposizione al glutine, rafforzano fortemente l'ipotesi che lo spettro della patologia autoimmune glutine-dipendente, in cui possono incorrere soggetti geneticamente determinati, sia molto più largo della sola enteropatia.

Bibliografia

- Cataldo F, Ventura A, Lazzari R et al: Antiendomysium antibodies and coeliac disease: solved and unsolved questions. An Italian multicentre study. *Acta Paediatr* 84, 1125, 1995.
- Maki M, Collin P: Coeliac Disease. *Lancet* 349, 1755, 1997.
- Picarelli A, Maiuri L, Frate A, et al: Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. *Lancet* 348, 1065, 1996.
- Troncone R: Latent coeliac disease in Italy. *Acta Paediatr* 84, 1252, 1995.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nature Medicine* 3, 797, 1997.

- Cooper BT, Holmes GKT, Cooke WT: Coeliac disease and immunological disorders. *BMJ* 1, 537, 1978.
- Collin P, Reunala T, Pukkala E, et al: Coeliac Disease-associated disorders and survival. *GUT* 35, 1215, 1994.
- Pocecco M, Ventura A: Coeliac disease and insulin dependent diabetes mellitus: a causal association. An Italian multicentre study. *Acta Paediatr* 84, 1432, 1995.
- Lepore L, Martellosi S, Pennesi M, et al: Prevalence of coeliac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *J Pediatr* 129, 1311, 1996.
- Collin P, Salmi J, Hallstrom O, et al: Autoimmune thyroid disorders and coeliac disease. *Eur J Endocrinol* 130, 137, 1994.
- Counsell CE, Taha A, Ruddel WSJ: Coeliac disease and autoimmune thyroid disease. *GUT* 35, 844, 1994.
- Cronin CC, Fergus S: Insulin dependent diabetes mellitus and coeliac disease. *Lancet* 349, 1096, 1997.
- Collin P, Maki M: Associated disorders in coeliac disease: clinical aspects. *Scand J Gastroenterol* 29, 769, 1994.
- Sokjeer M, Jonsson T, Bodvarsson S, et al: Selective increase of IgA rheumatoid factor in patients with gluten sensitivity. *Acta Derm Venereol* 75, 130, 1995.
- Corazza GR, Andreani ML, Venturo N, et al: Coeliac disease and alopecia areata: report of a new association. *Gastroenterology* 109, 1333, 1995.
- Hadjivassiliou M, Gibson A, Grunewald RA, et al: Gluten sensitivity: exploring the neurological iceberg. *Proceedings of the seventh international symposium on coeliac disease*, Tampere, 5-7 september 1996, A41.
- Gobbi G, Bouquet F, Greco L, Lambertini A, Ventura A, Zaniboni MG: Coeliac disease, epilepsy and cerebral calcifications. *Lancet* 340, 439, 1992.
- Scott BB, Losowsky MS: Coeliac disease: a cause of various associated diseases. *Lancet* ii, 956, 1975.
- Ventura A, Magazzù G, Greco G, et al: Autoimmune disorders in coeliac disease: relationship with duration of gluten exposure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24, 463, 1997.
- Bonamico M, Anastasi E, Calvani L, et al: Endocrine autoimmunity and function in adolescent coeliac patients: importance of the diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24, 467, 1997.
- Sher KS, Jayanthi V, Probert CS, et al: Infertility, obstetric and gynecological problems in coeliac sprue. *Dig Dis* 12, 186, 1994.
- Berti I, Not T, Trevisiol C, et al: Coeliac disease and autoimmune thyroiditis. *It J Gastroenterol Hepatol* 29, suppl, A59, 1997.
- Lancaster-Smith MJ, Perrin J, Swarbrick ET, et al: Coeliac disease and autoimmunity. *BMJ* 1, 537, 1978.
- Snook JA, de Silva HJ, Jewell DP: The association of autoimmune disorders with inflammatory bowel disease. *Q J Med* 72, 835, 1989.
- Kingham JGC, Parker DR: The association between primary biliary cirrhosis and coeliac disease: a study of relative prevalences. *GUT* 42, 120, 1998.
- Mihagen G, Jareneroth G, Krantz W, et al: Adult coeliac disease within a definite area in Sweden. *Scand J Gastroenterol* 23, 100, 1988.