



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SALUTE DONNA E BAMBINO

UOC CLINICA PEDIATRICA

Direttore: Prof. Giorgio Perilongo

TESI DI LAUREA

**Andamento degli anticorpi anti-transglutaminasi dopo avvio di
dieta aglutinata in bambini affetti da malattia celiaca**

**Over time trend of anti-transglutaminase antibodies in children
affected by celiac disease on a gluten - free diet**

RELATORE: Prof. Giorgio Perilongo

CORRELATORE: Dott.ssa Mara Cananzi

LAUREANDA: Beatrice Scapolan

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

<i>ABSTRACT</i>	5
<i>ABSTRACT (ENGLISH VERSION)</i>	7
1. INTRODUZIONE	9
2. CELIACHIA	11
2.1 Definizione	11
2.2 Epidemiologia.....	11
2.3 Eziopatogenesi.....	14
2.4 Quadro clinico.....	16
2.5 Complicanze.....	16
2.6 Patologie associate	18
2.7 Diagnosi.....	19
2.7.1 Test sierologici.....	19
2.7.2 Determinazione dei geni HLA predisponenti	22
2.7.3 Alterazioni laboratoristiche secondarie al malassorbimento intestinale.....	22
2.7.4 La biopsia intestinale.....	23
2.8 Algoritmo diagnostico	24
2.9 Trattamento	26
2.9.1 La dieta senza glutine	26
2.9.2 Sviluppo di terapie alternative alla dieta priva di glutine	27
2.9.3 Gestione della dieta senza glutine.....	28
2.9.4 Follow-up.....	28
3. OBIETTIVI DELLO STUDIO	35
4. MATERIALI E METODI	37
4.1 Identificazione dei casi e raccolta dati	37
4.2 Analisi dei dati.....	38
4.3 Analisi statistica	40
5. RISULTATI	41
5.1 Caratteristiche della popolazione analizzata.....	42
5.2 Sierologia e genetica per celiachia alla diagnosi.....	45
5.3 Analisi degli anticorpi anti-transglutaminasi al follow-up	46
5.4 Valori sierologici al follow-up e confronto con il grado istologico alla diagnosi	55
5.5 Metodiche laboratoristiche per la determinazione sierologica	56
6. DISCUSSIONE	59
7. CONCLUSIONI	67
8. BIBLIOGRAFIA	69

ABSTRACT

Presupposti dello studio. Ad oggi, l'unica terapia disponibile per la malattia celiaca è la dieta priva di glutine. È dimostrato che la normalizzazione dei livelli sierici degli anticorpi anti-transglutaminasi tissutali IgA (anti-TTG) si ottiene escludendo il glutine dalla dieta e il monitoraggio del titolo anticorpale è raccomandato dalle linee guida internazionali per documentare la regressione dell'enteropatia. Ciò nonostante, sono disponibili pochi dati riguardanti il tempo di normalizzazione degli anti-TTG nei bambini affetti da celiachia che seguono una dieta priva di glutine.

Scopo dello studio. Gli scopi del nostro studio sono stati quelli di definire il tempo di negativizzazione degli anti-TTG dopo avvio di dieta aglutinata in una coorte di bambini affetti da malattia celiaca, e di valutare l'influenza di alcuni parametri sulla velocità di normalizzazione degli anti-TTG (sesso, età alla diagnosi, presenza di sintomi, livelli di anti-TTG all'esordio, severità del quadro istologico, metodo analitico usato per la determinazione di anti-TTG).

Materiali e metodi. È stato eseguito uno studio retrospettivo che ha incluso tutti i pazienti, di età compresa tra 0 e 18 anni, diagnosticati per malattia celiachia tra gennaio 2010 e luglio 2022 presso l'Azienda Ospedale Università di Padova. Dallo studio sono stati esclusi tutti i pazienti celiaci con provata o probabile mancata aderenza alla dieta aglutinata e quelli con deficit assoluto di IgA. Per ogni paziente sono stati raccolti dati demografici, clinici, sierologici (i.e. livelli di anti-TTG a 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 anni dalla diagnosi), istologici e relativi all'aderenza alla dieta aglutinata. Per permettere la comparazione dei dati ottenuti con metodiche di laboratorio diverse, i livelli di anti-TTG sono stati valutati come multiplo del limite superiore della soglia di normalità ($x \text{ vn}$). L'analisi statistica è stata eseguita con il software R 4.2.

Risultati. Lo studio ha incluso 315 bambini (200 femmine, 115 maschi) affetti da celiachia. L'età media alla diagnosi è stata di 7.1 anni (DS 3.9) e il tempo mediano

di follow up dei pazienti è stato di 728 giorni (range 92-2325). L'86.3% di questi si presentava sintomatico all'esordio, più frequentemente con manifestazioni gastrointestinali, scarsa crescita e anemia. Alla diagnosi, la mediana degli anticorpi anti-TTG è risultata essere pari a 18,29 x vn (IQR 76.9) ed il tempo mediano di normalizzazione degli anti-TTG è risultato essere pari a 14.9 mesi (IQR 14.3). La percentuale di bambini con anticorpi anti-TTG negativi a 1, 2, 3 e 5 anni dalla diagnosi è risultata essere rispettivamente pari al 37 %, 74 %, 92%, e 99 % dei pazienti. La velocità di normalizzazione degli anticorpi anti-TTG non è risultata essere influenzata dai livelli di anticorpi anti-TTG (< vs. > 10 x vn) alla diagnosi (p=0.22) così come l'età alla diagnosi, il sesso, la sintomatologia, la severità istologica di malattia e la metodica analitica utilizzata per la determinazione degli anticorpi anti-TTG (CLIA vs. FEIA) non sono risultati essere fattori predittivi della velocità di normalizzazione degli anti-TTG nel tempo.

Conclusioni. Per numerosità, il nostro studio è, ad oggi, il terzo che ha investigato il timing di normalizzazione degli anticorpi anti-TTG nei bambini con celiachia. Lo studio ha dimostrato che, a 3 anni dalla diagnosi, il 90% dei bambini affetti da celiachia presenta una normalizzazione degli anticorpi anti-TTG. Inoltre, la velocità di normalizzazione di questi è indipendente da tutti i parametri analizzati. Sono necessari ulteriori studi prospettici, che prevedano misure oggettive di aderenza alla dieta senza glutine, per confermare i nostri risultati ed ottenere dati standardizzati al fine di guidare il clinico nel follow up dei bambini con celiachia.

ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

Assumptions of the study. To date, the only available therapy for coeliac disease is the gluten-free diet. Normalization of serum anti-transglutaminase IgA (anti-TTG) antibody levels is achieved by excluding gluten from the diet, and monitoring of the antibody titer is recommended by international guidelines to document the regression of celiac enteropathy. However, to date, little data on anti-TTG antibodies trends are available for children with celiac disease on a gluten-free diet.

Purpose of the study. The aim of our study was to examine the time to anti-TTG normalization and its possible predictors (sex, age, presence of symptoms, severity of histological biopsy, anti-TTG antibody levels at onset and the analytical method used for anti-TTG determination).

Materials and methods. A retrospective study was performed including all patients, aged 0-18 years, diagnosed with coeliac disease between January 2010 and July 2022 at the University Hospital of Padua. Patients with proven or probable non-adherence to the gluten-free diet and children with IgA deficiency were excluded from the study. For each patient demographic, clinical, serological (i.e., anti-TTG antibody levels at 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 years after diagnosis) and histological data were collected as well as information regarding adherence to the gluten-free diet. In order to allow comparison of data obtained by different laboratory methods, anti-TTG antibodies levels were assessed as a multiple of the upper limit of the normality threshold (x_{nv}). Statistical analysis was performed with the R 4.2 software.

Results. The study included 315 children (200 females, 115 males) diagnosed with coeliac disease. The median age at diagnosis was 7.1 years (SD 3.9) and the median follow-up time of the patients was 728 days (range 92-2325). Of these, 86.3% were symptomatic at onset, most frequently with gastrointestinal manifestations, poor growth, and anemia. At diagnosis, the median of anti-TTG levels was $18.29 \times x_{nv}$ (IQR 76.9) and the median time of anti-TTG normalization was 14.9 months (IQR 14.3). The percentage of children with negative anti-TTG at 1, 2, 3, and 5 years

after diagnosis was 37%, 74%, 92%, and 99% of patients, respectively. The rate of normalization of anti-TTG antibodies was not influenced by anti-TTG levels at diagnosis ($<$ vs. $>$ 10 x nv; $p=0.22$). Similarly, age at diagnosis, sex, symptoms, histological severity of disease and the analytical method used for the determination of anti-TTG (CLIA vs. FEIA) were not found to be predictors of the rate of normalization of anti-TTG antibodies over time.

Conclusions. Our study is the third largest to date that has investigated the timing of anti-TTG antibodies normalization in children with coeliac disease. The study showed that, at 3 years after diagnosis, 90 % of children with coeliac disease achieve anti-TTG antibodies normalization. Moreover, the rate of normalization of these is independent of all the parameters analyzed. Further prospective studies, including objective measures of adherence to the gluten-free diet, are needed to confirm our results and obtain standardized data to guide the clinician in the follow-up of children with coeliac disease.

Our study is the third largest to date that has analyzed the timing of normalization of anti-TTG antibodies in children with coeliac disease. At 3 years after diagnosis, 90% of children with coeliac disease achieve normalization of anti-TTG antibodies. The rate of normalization of these antibodies is independent of all parameters analyzed. Further prospective studies, including objective measures of adherence to the gluten-free diet, are needed to confirm our results and obtain standardized data to guide the physician in the follow-up of children with coeliac disease.

1. INTRODUZIONE

Le patologie glutine-dipendenti, nel loro insieme, rappresentano disturbi comuni nella popolazione generale (frequenza stimata pari al 3-5%).

In base alla loro patogenesi, i disturbi glutine dipendenti sono classificati in patologie con:

- Patogenesi autoimmune:
 - Malattia celiaca
 - Atassia da glutine
 - Dermatite erpetiforme

- Patogenesi allergica:
 - Allergia al grano (respiratoria, alimentare)
 - Dermatite da contatto
 - Anafilassi indotta da esercizio fisico grano-dipendente

- Patogenesi non-autoimmune non-allergica
 - Sensibilità al glutine di tipo non celiaco

Le differenze tra le principali patologie glutine-dipendenti (malattia celiaca, sensibilità al glutine di tipo non celiaco, allergia al grano) sono riportate *in Tabella I*.

Variabili	MC	SGNC	Allergia al grano
Intervallo tra l'esposizione al glutine e l'insorgenza dei sintomi	Da settimane ad anni	Da ore a giorni	Da minuti a ore
Fattore scatenante	Prolammine del glutine; grano, segale e orzo causano la patologia allo stesso modo, mentre l'avena è innocua	Glutine o altri componenti nei cereali (ad esempio, gli inibitori dell'amilasi/tripsina, lievito e additivi)	Proteine del grano (prolammine o altre), l'effetto del grano, della segale o dell'orzo può variare
Patogenesi	Autoimmunità (innata e adattativa)	Possibile immunità innata	Risposta immunitaria allergica
Alleli HLA (HLA-DQ2 o HLA-DQ8)	Il 97% dei casi	Il 50% dei casi	Il 35-40% dei pazienti, simile alla popolazione generale
Autoanticorpi anti-TG2	Quasi sempre presenti	Quasi sempre assenti	Sempre assenti
Enteropatia (atrofia villosa con iperplasia delle cripte)	Quasi sempre presenti	Quasi sempre assenti	Sempre assenti
Sintomi	Sia intestinali che extra-intestinali	Sia intestinali che extra-intestinali	Sia intestinali che extra-intestinali
Complicanze	Condizioni coesistenti, complicanze a lungo termine	Assenza di condizioni e complicanze coesistenti (a meno che non siano dovute a erronee restrizioni alimentari)	Solo complicanze a breve termine. Assenza di condizioni coesistenti
Esito	Intolleranza permanente e necessità di seguire una DSG per tutta la vita, non vi è remissione spontanea	Può migliorare nel tempo	Può migliorare nel tempo

Tabella I Differenze tra malattia celiaca, sensibilità al glutine non celiaca ed allergia al grano.

2. CELIACHIA

2.1 Definizione

La celiachia, o malattia celiaca (MC), è una patologia sistemica, a patogenesi immuno-mediata, caratterizzata dalla presenza di un'enteropatia infiammatoria cronica, indotta e mantenuta dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti (1–11).

2.2 Epidemiologia

La MC, una volta considerata rara, è ad oggi una delle patologie croniche più comuni oltre che la più frequente malattia gastrointestinale cronica dell'età pediatrica. La prevalenza globale di celiachia è pari all'1% (12–14). La prevalenza di MC nella popolazione pediatrica italiana è ben superiore e stimata pari a circa l'1.5% della popolazione in età compresa fra 0 e 18 anni. La siero-prevalenza della celiachia e la prevalenza biotipica della celiachia nel mondo sono rispettivamente dell'1.4% e dello 0.7%. La prevalenza più alta si registra in Europa (0.8%) (*Figura 1*).

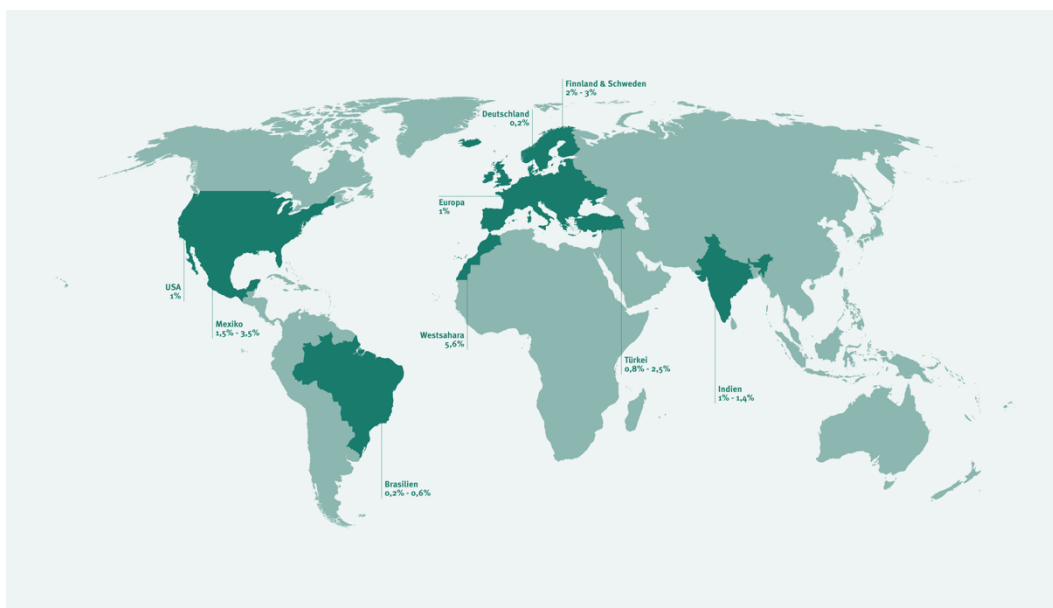


Figura 1 Planisfero che riporta la prevalenza di celiachia nel mondo.

Nel corso degli ultimi decenni, si è osservato non solo un aumento delle nuove diagnosi di MC, grazie all'ampia diffusione dei test diagnostici, ma anche della prevalenza globale di malattia, da correlare verosimilmente ai cambiamenti ambientali, quali le modificazioni nella quantità e qualità del glutine ingerito, dei processi di fermentazione dell'impasto panificatorio e della nutrizione infantile.

La MC può manifestarsi a qualsiasi età dopo l'introduzione del glutine nella dieta, ovvero dalla prima infanzia alla vecchiaia. La patologia ha due picchi di incidenza: il primo si verifica dopo l'introduzione del glutine nella dieta entro i primi due anni di vita, il secondo si manifesta nella seconda - terza decade di vita.

La MC è più frequente nel genere femminile con una prevalenza bioptica di 1.5 volte superiore nelle donne rispetto agli uomini. Il rischio di sviluppare la celiachia è più elevato nei parenti di primo e secondo grado di pazienti affetti da MC (con una prevalenza che raggiunge circa il 10-20%) e nei soggetti con alcune patologie genetiche (sindrome di Down, sindrome di Turner, sindrome di Williams), con deficit di immunoglobuline IgA e con malattie autoimmuni come il diabete mellito di tipo 1 (DM 1). L'utilizzo di test di screening per la celiachia nelle categorie a rischio di MC sopra riportate ha contribuito all'aumento del riconoscimento e quindi della prevalenza della celiachia nella popolazione.

È interessante notare come attualmente solo una parte dei casi di malattia celiaca, in Italia pari a circa il 30% del totale venga riconosciuta su base clinica (15-17).

Per tale ragione si parla spesso di "iceberg celiaco". La parte emersa dell'iceberg, la celiachia "sintomatica", nota anche come "tipica" per la presenza di sintomi tipici quali dolori addominali, diarrea, anomalie della crescita, rappresenta solo una piccola porzione dell'iceberg. Al contrario, la porzione "sommersa", costituita dalla celiachia "atipica" (con sintomi extra-intestinali quali astenia, osteoporosi, disturbi neurologici ecc.) e da quella "silente" (presenza di positività agli anticorpi specifici e di danno intestinale caratteristico in assenza di sintomi) rappresenta la porzione più rilevante dell'iceberg. Per completezza, si è soliti indicare anche un'altra porzione nascosta dell'iceberg, corrispondente alla "celiachia potenziale",

condizione caratterizzata dalla presenza di una sierologia positiva ma dall'assenza di un danno intestinale istologicamente evidente (*Figura 2 e Tabella 2*).

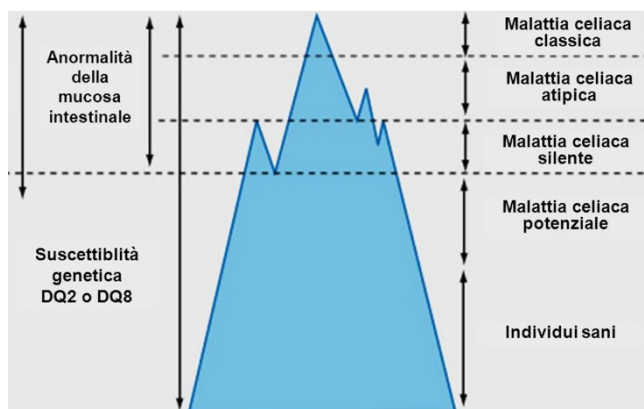


Figura 2 Iceberg celiaco.

Key characteristics	Classic	Non-gastrointestinal*	Silent or subclinical	Potential
Symptoms of malabsorption (eg, weight loss, steatorrhea, or signs of vitamin deficiency)	+	±	-	-
Non-gastrointestinal symptoms (eg, liver disease, skin [¶] , arthritis, or neuropsychiatric)	±	+	-	-
Positive celiac-specific antibody test ^Δ	+	+	+	+
Characteristic intestinal biopsy (villous atrophy)	+	+	+	-
Mucosal healing and resolution of symptoms after beginning a gluten-free diet	+	+	N/A	N/A

N/A: not applicable; tTG: tissue transglutaminase; DGP: deamidated gliadin peptide; IgG: immunoglobulin G; IgA: immunoglobulin A.

* In the past, non-gastrointestinal celiac disease was termed "atypical" because it was thought to be uncommon, but the advent of serologic screening for celiac disease has identified a substantial proportion of patients with this pattern of symptoms.

[¶] Skin lesions may include dermatitis herpetiformis. Many, but not all, patients with dermatitis herpetiformis have intestinal lesions consistent with celiac disease, with or without intestinal symptoms.

^Δ The celiac-specific antibody tests are tTG, anti-endomysial antibodies, or DGP. Standard IgG- or IgA-anti-gliadin antibodies have low specificity and are not sufficient to support the diagnosis of celiac disease.

Tabella II Nomenclatura dei differenti fenotipi di malattia celiaca (18)

2.3 Eziopatogenesi

I fattori causali necessari allo sviluppo della celiachia sono:

1. La presenza dei geni predisponenti DQ2 e/o DQ8 legati al sistema di istocompatibilità HLA (19). L'assenza di questa componente genetica rende altamente improbabile lo sviluppo di celiachia nel corso della vita. I genotipi DQ2 e DQ8 sono fattori di rischio della malattia celiaca poiché sono presenti nel 30-40% della popolazione generale. Essi spiegano solo il 40% circa della predisposizione genetica in quanto questa risulta essere complessivamente legata anche a molti altri geni (almeno 41).
2. L'ingestione di cereali contenenti glutine (es. frumento, orzo e segale). Il glutine è una proteina ad alto contenuto di prolina e glutammina. Esso, per le sue proprietà visco-elastiche, riveste un ruolo fondamentale per la panificazione ed è la proteina maggiormente presente nella dieta della popolazione europea (intake giornaliero pari a 10-20 g/die). Al contrario, data la sua incompleta digeribilità secondaria all'assenza di prolil-endopeptidasi (PEP) nell'intestino umano, il glutine non possiede alcuna proprietà nutrizionale per l'uomo. La digestione parziale del glutine a livello del piccolo intestino determina la produzione del "33mero", peptide costituito da 33 aminoacidi, contenente numerose sequenze immunodominanti, assorbibile a livello della mucosa digiunale ed in grado di attivare la "catena" di eventi fisiopatologici che portano all'enteropatia celiaca in soggetti geneticamente predisposti.
3. La presenza di fattori scatenanti (trigger) tra i quali rientrano la quantità di glutine consumata durante i primi anni di vita, le infezioni precoci, soprattutto quelle intestinali e le caratteristiche quantitative e qualitative del microbioma intestinale. Non sembrano invece essere coinvolti le modalità del parto (vaginale o cesareo), il tipo di allattamento (materno o artificiale) e l'età di introduzione del glutine nella dieta.

La patogenesi della malattia celiaca (*Figura 3*) dipende da una complessa reazione immunitaria innescata dai peptidi derivanti dalla digestione parziale del glutine ed assorbiti a livello della mucosa intestinale. Questa reazione comprende sia un meccanismo di tipo immune-adattativo che uno innato. La distruzione dell'epitelio intestinale dipende dall'attivazione dei linfociti CD4 nella lamina propria, con conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ , e dall'attivazione IL-15-mediata dei linfociti intraepiteliali (IEL) CD8⁺ (15,16).

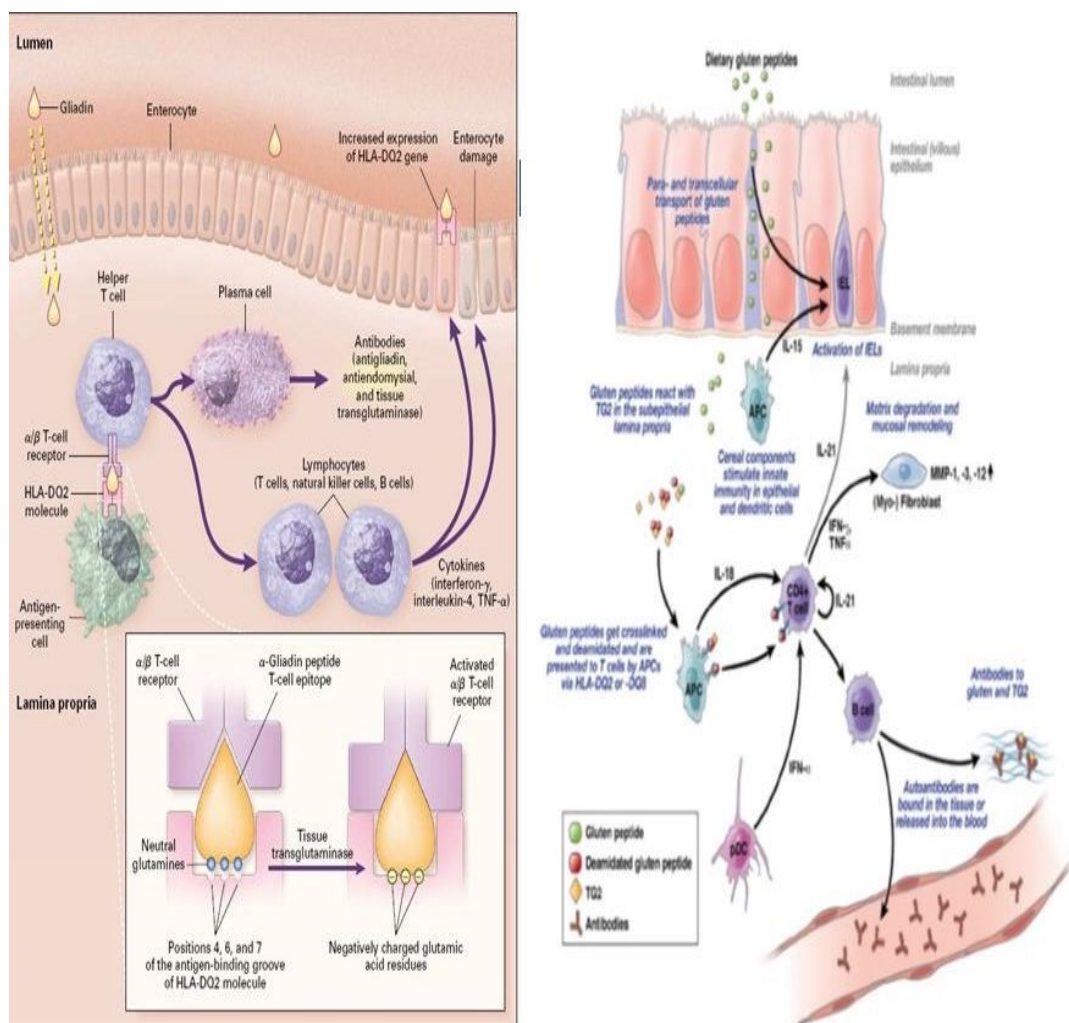


Figura 3 Patogenesi della celiachia

2.4 Quadro clinico

La celiachia si può manifestare in maniera estremamente variabile, tanto da essere definita da alcuni come "un camaleonte clinico". Si distinguono le seguenti forme:

- ❖ Tipica. Si manifesta durante i primi anni di vita, dopo una latenza di alcuni mesi/anni dall'introduzione di cereali contenenti glutine col divezzamento. Si presenta con inappetenza, diarrea cronica, vomito, distensione addominale e arresto della crescita. Nei casi più eclatanti si possono avere manifestazioni di tipo rachitico, edemi da ipoprotidemia, alterazioni glicemiche ed elettrolitiche, riduzione dell'attività protrombinica da carenza di vitamina K ed invaginazione intestinale. La "crisi celiaca" rappresenta una vera urgenza pediatrica che deve essere tempestivamente riconosciuta e trattata.

- ❖ Atipica. Questa forma viene spesso osservata in bambini di età superiore ai 3 anni. Presenta una sintomatologia intestinale aspecifica (ad esempio, dolori addominali ricorrenti, stomatite aftosa ricorrente, stitichezza) e/o prevalenti manifestazioni extraintestinali quali anemia sideropenica resistente alla terapia marziale orale, stanchezza cronica, rallentamento della velocità di crescita staturale, ritardo puberale, ipertransaminasemia isolata o dermatite erpetiforme.

- ❖ Silente. In questa forma è assente una chiara sintomatologia e per questo viene di solito diagnosticata a seguito di screening sierologico in soggetti a rischio, ad esempio in familiari di primo grado di celiaci o pazienti affetti da altre patologie autoimmuni. Sono presenti le stesse alterazioni sierologiche e istologiche della MC tipica e non raramente è presente una sfumata ed aspecifica sintomatologia (ad es. stanchezza cronica) di cui il paziente e i suoi familiari si rendono conto dopo l'avvio del trattamento dietetico.

2.5 Complicanze

Oltre alla crisi celiaca "acuta", le altre complicanze della MC sono conseguenti al malassorbimento intestinale cronico (*Figura 4*). Tra queste vi sono il rallentamento

di crescita staturale, il ritardo dello sviluppo puberale, l'anemia cronica da carenza di ferro e le anomalie del ricambio fosfo-calcico, rachitismo e/o ridotta mineralizzazione ossea. L'infertilità (in entrambi i generi) e la poliabortività sono possibili complicanze post-puberale della celiachia. Le complicanze neurologiche, appannaggio prevalente dell'età adulta, possono colpire anche soggetti in età adolescenziale come sindrome caratterizzata da celiachia, epilessia e calcificazioni occipitali.

Le complicanze più temibili della celiachia (celiachia refrattaria, cioè non responsiva al trattamento dietetico aglutinato, digiuno-ileite ulcerativa e linfoma intestinale) sono rare in età pediatrica (15,16,18).

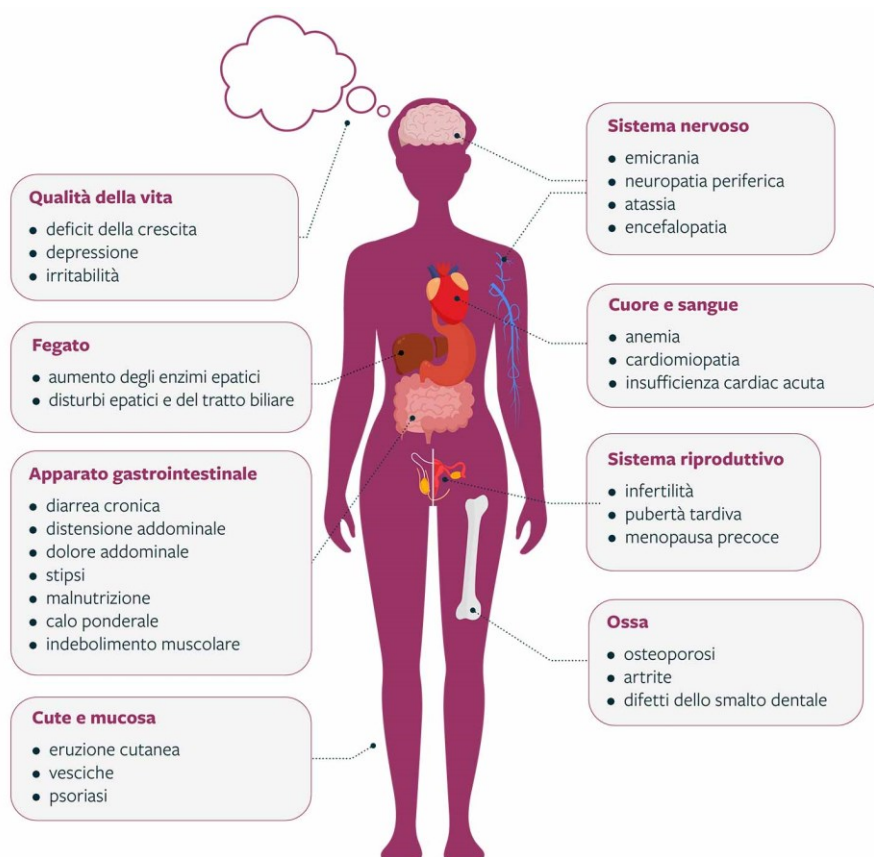


Figura 4 Complicanze della celiachia

2.6 Patologie associate

Una maggiore incidenza di celiachia si osserva in alcune condizioni mediche (*Tabella III*), che pertanto rappresentano un'indicazione allo screening per MC:

Familiarità per celiachia
Malattie immuno-mediate (diabete mellito di tipo 1, malattie tiroidee autoimmuni, epatite autoimmune, malattie infiammatorie croniche intestinali)
Sindrome del Colon Irritabile
Stomatite aftosa ricorrente
Ipoplasia dello smalto dentario
Scarsa crescita
Ipertransaminasemia
Sideropenia (con o senza anemia)
Stanchezza cronica
Rachitismo, osteopenia
Dermatite erpetiforme
Orticaria ricorrente
Epilessia (specie occipitale)
Disturbi del compartimento alimentare
Deficit selettivo di IgA sieriche
S. di Down
S. di Turner
S. di Williams

Tabella III Situazioni nelle quali è indicato lo screening sierologico per la celiachia in età pediatrica.

2.7 Diagnosi

La corretta e tempestiva diagnosi di malattia celiaca è essenziale per l'inizio precoce del trattamento dietoterapico senza glutine, in modo da prevenirne le complicanze a breve e a lungo termine ad essa associate. Il procedimento diagnostico della celiachia, in passato basato soprattutto sulla biopsia intestinale, è cambiato radicalmente nel corso degli ultimi decenni, basandosi oggi sui test sierologici dell'autoimmunità celiaca, pur restando l'esame biopsico fondamentale quando gli accertamenti bioumorali non risultano sufficienti per porre una diagnosi clinica.

2.7.1 Test sierologici

I test sierologici di autoimmunità celiaca hanno assunto un ruolo primario nella diagnosi di celiachia. Semplici e affidabili, trovano indicazione sia nei casi clinicamente sospetti che a scopo di screening nei gruppi a rischio. Per essere diagnostici, questi esami devono essere eseguiti in dieta a normale contenuto di glutine, poiché il titolo anticorpale tende a normalizzarsi dopo l'avvio della dieta senza glutine.

Oggi, la ricerca degli anticorpi antitransglutaminasi (TTG) di classe IgA, poiché presenta elevatissime sensibilità e specificità (superiori al 95%), è considerata il miglior test diagnostico di primo livello (1,2,20–32). Per la diagnosi, oltre alla positività, ricopre un ruolo rilevante anche il livello anticorpale espresso in termini quantitativi. Studi scientifici documentano come elevati valori di anticorpi anti-transglutaminasi ($TTG \geq 10$ volte i valori massimi della norma) si associno alla presenza di atrofia dei villi intestinali (33–35).

Alla ricerca degli anti-TTG-IgA deve essere abbinata la valutazione delle IgA sieriche totali poiché il test può risultare falsamente negativo nei soggetti con deficit selettivo di IgA. Nei bambini con associato deficit di IgA si ricercano gli anticorpi TTG-IgG (16,36).

Come test di conferma, poiché costoso e operatore-dipendente, è utilizzata la determinazione degli anticorpi anti-endomisio di classe IgA (EMA). Poiché la TTG tissutale è l'autoantigene principalmente responsabile della positività EMA, un'eventuale positività di EMA con TTG-IgA negativa è da attribuire, nella maggior parte dei casi, ad un errore di lettura dell'immunofluorescenza.

Nei soggetti con deficit di IgA sieriche, trova indicazione la valutazione degli anticorpi antigliadina deaminata (DGP) di classe IgG.

I metodi analitici più diffusi per la determinazione degli anticorpi TTG-IgA sono l'ELISA e i test immunoenzimatici a fluorescenza e a chemiluminescenza (37–48) ciascuno con diversi range di normalità.

I test immunoenzimatici, o ELISA, sono test semplici e ampiamente utilizzati che si basano su interazioni altamente specifiche tra anticorpo e antigene (*Figura 5*). Esistono quattro tipi principali di ELISA: sandwich, competitivo, diretto e indiretto. Questi metodi differiscono per il modo in cui l'anticorpo o l'antigene vengono fissati alla piastra e per il modo in cui viene rilevato il segnale. In un ELISA a sandwich, ad esempio, un anticorpo viene fissato su una piastra. Si aggiunge il campione contenente l'antigene bersaglio che si lega all'anticorpo. Successivamente, viene aggiunto un secondo tipo di anticorpo, che si lega anch'esso all'antigene bersaglio, formando un "sandwich" con l'antigene bersaglio al centro. Il secondo anticorpo è legato a un enzima, chiamato "enzima reporter", il quale permette di misurare la reazione di legame tramite un segnale di colore. Per creare questo segnale, prima si lava via l'anticorpo non legato e poi si aggiunge un substrato colorimetrico. L'enzima catalizza la reazione del substrato, creando un cambiamento di colore. Un segnale di colore più forte indica la presenza di una maggiore quantità di antigene bersaglio.

Nei test immunologici a fluorescenza (FEIA), molto veloci e altamente sensibili, si utilizzano sonde fluorescenti, che si illuminano alla luce UV, per marcare gli anticorpi. I complessi anticorpo-antigene vengono isolati e viene misurata l'intensità della fluorescenza.

I principi di un immunodosaggio a chemiluminescenza (CLIA) sono gli stessi di un ELISA o di un fluoroimmunosaggio, ma la luminescenza si ottiene grazie all'emissione di un fotone da parte di un elettrone che viene portato verso uno stato energetico superiore (49).

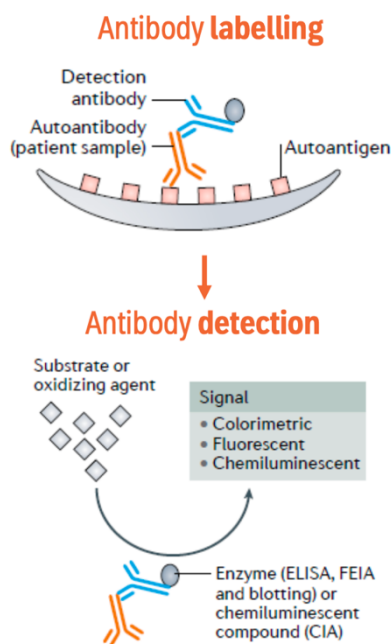


Figura 5 Meccanismo alla base dei principali immuno-assay: gli immunodosaggi sono test che rilevano la presenza di una molecola specifica in un campione utilizzando reazioni di legame anticorpo-antigene. Gli anticorpi si legano alla struttura specifica di un particolare antigene rendendo i test immunologici altamente specifici: l'anticorpo si legherà solo alla struttura specifica di un particolare antigene. Ciò rende gli anticorpi reagenti efficaci per rilevare le molecole bersaglio.

Nella Tabella IV sono riportate le performance delle metodologie che utilizzano la chemiluminescenza (chemiluminescence immunoassay, CLIA [QF]) e i test immunoenzimatici (fluorescent enzyme immunoassays, FEIA) per la determinazione dei marcatori sierologici di malattia ottenute dallo studio di Lakos et al. (50).

Assay	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)
QF h-tTG IgA	90.5 (81.5–96.1)	99.3 (96.0–100.0)
h-tTG IgA FEIA (equivocal = positive)	90.5 (81.5–96.1)	99.3 (96.0–100.0)
h-tTG IgA FEIA (equivocal = negative)	75.7 (64.3–84.9)	99.3 (96.0–100.0)
QF h-tTG IgG	35.1 (24.4–47.1)	99.3 (96.0–100.0)
h-tTG IgG FEIA (equivocal = positive)	37.8 (26.8–49.9)	100.0 (97.4–100.0)
h-tTG IgG FEIA (equivocal = negative)	27.0 (17.4–38.6)	100.0 (97.4–100.0)
QF DGP IgA	70.3 (58.5–80.3)	98.6 (94.9–99.8)
DGP IgA FEIA (equivocal = positive)	62.2 (50.1–73.2)	97.1 (92.7–99.2)
DGP IgA FEIA (equivocal = negative)	52.7 (40.7–64.4)	97.1 (92.7–99.2)
QF DGP IgG	75.7 (64.3–84.9)	96.4 (91.7–98.8)
DGP IgG FEIA (equivocal = positive)	73.0 (61.4–82.6)	98.6 (94.9–99.8)
DGP IgG FEIA (equivocal = negative)	56.8 (44.7–68.2)	98.6 (94.9–99.8)

Tabella IV Performance dei metodi analitici CLIA e FEIA (tabella ottenuta da Lakos et. al.)

2.7.2 Determinazione dei geni HLA predisponenti

La determinazione dei geni HLA DQ2 e DQ8 ha scarso valore per la conferma della diagnosi poiché questi alleli sono comuni anche nella popolazione generale.

Il test genetico, invece, a causa del suo elevato valore predittivo negativo, trova indicazione nei soggetti a rischio poiché l'assenza degli alleli esclude, con una probabilità vicina al 100%, la possibilità di sviluppare la malattia anche in epoche successive della vita (1,15,16).

2.7.3 Alterazioni laboratoristiche secondarie al malassorbimento intestinale

A seguito del generale quadro di malassorbimento, si possono riscontrare alterazioni ematologiche quali la sideropenia secondaria al malassorbimento di ferro a livello intestinale (con o senza anemia). La carenza di ferro, testimoniata dai ridotti valori di sideremia e ferritina dopo l'avvio del trattamento dietetico, può rappresentare un marcatore di scarsa aderenza alla dieta priva di glutine per il persistere del danno istologico a carico della mucosa intestinale. Altre possibili alterazioni nutrizionali sono l'ipoprotidemia, il lieve aumento delle transaminasi e

più raramente la riduzione dell'attività protrombinica (secondaria a malassorbimento della vitamina K) e le anomalie del ricambio fosfo-calcico (secondarie a malassorbimento della vitamina D e del calcio).

2.7.4 La biopsia intestinale

La biopsia intestinale rimane, ad oggi, il "gold standard" per la diagnosi di MC. Viene effettuata una gastroduodenoscopia, con prelievi multipli a livello del bulbo (n = 2) e della seconda porzione del duodeno (n = 4). Per evitare artefatti diagnostici, è opportuno che i frammenti biopistici siano orientati su carta da filtro con i villi rivolti verso l'alto. L'esame istologico comprende la valutazione dell'altezza dei villi e la profondità delle cripte, nonché la conta dei IEL (CD3 positivi). In condizioni normali il rapporto di altezza villo/cripta è > 3 e la conta dei IEL, espressa x 100 enterociti, è < 25 .

Nella celiachia si osservano atrofia dei villi di grado variabile e aumento della conta IEL (*Figura 6*). Queste alterazioni sono classificate in base allo schema Marsh-Oberhuber:

- Grado 1: aumento isolato di IEL con rapporto villo/cripta normale;
- Grado 2: aumento di IEL, con aumento della profondità delle cripte e villi di altezza pressoché normale (lesione di raro riscontro);
- Grado 3: atrofia villare variabile, da parziale (3a) a totale dei villi (3c), associata ad aumento dei IEL.

Il quadro istologico, e in particolare la lesione "Marsh 1", non è patognomico poiché presente anche in altre situazioni quali le malattie infiammatorie croniche intestinali, l'infezione da *Helicobacter*, la diarrea protratta post-enteritica e l'allergia alimentare o enteropatia autoimmune.

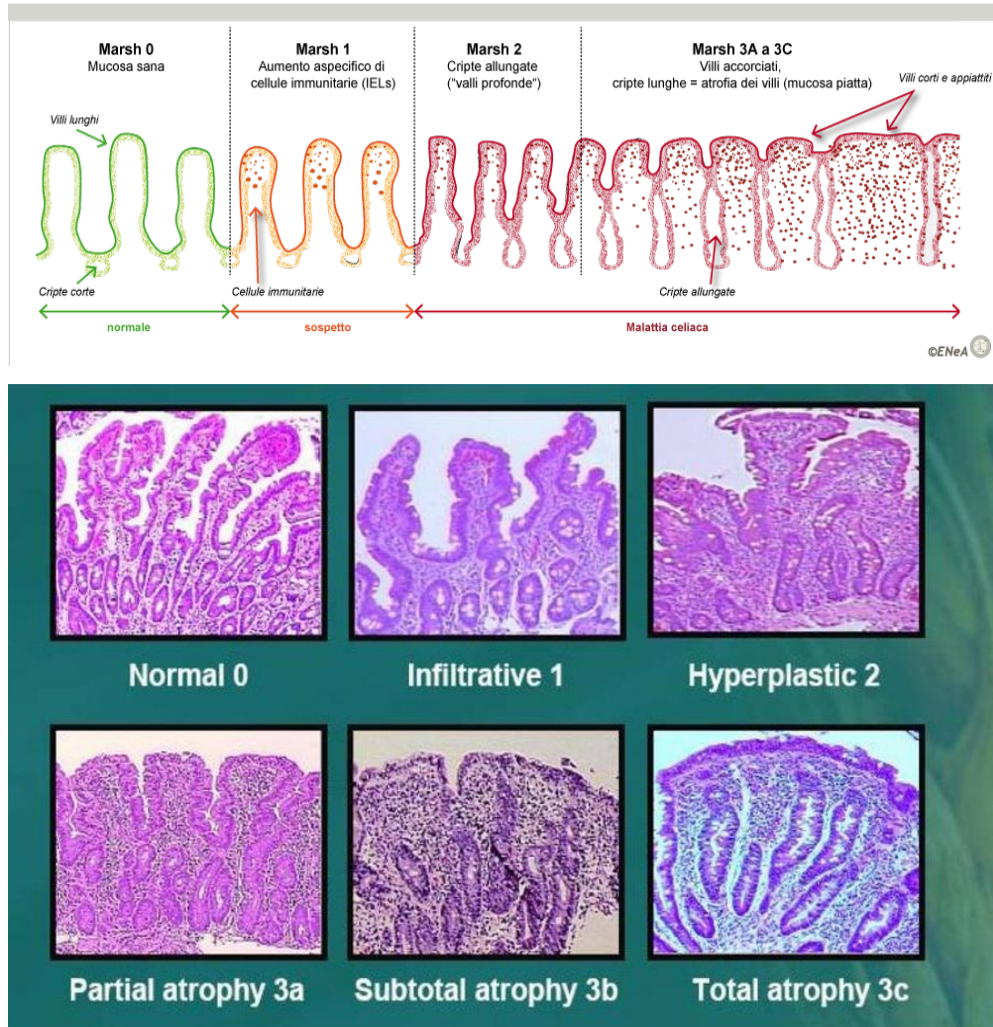


Figura 6 Alterazioni istopatologiche della mucosa intestinale nella malattia celiaca secondo la classificazione di Marsh-Oberhuber.

La biopsia intestinale può essere utilizzata, dopo incubazione con anticorpi specifici a 37°C per 24-48 ore, per ricercare i depositi di IgA anti-TTG a livello sub-epiteliale in situazioni particolari, ad esempio nei soggetti con celiachia potenziale (15).

2.8 Algoritmo diagnostico

Secondo le linee guida ESPGHAN (Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica; *Figura 7*) il test di primo livello, per lo screening della celiachia, è il dosaggio degli anticorpi anti-TTG associato al

dosaggio delle IgA sieriche (per escludere un eventuale deficit selettivo di IgA, nel qual caso è necessaria l'esecuzione degli anticorpi anti-DGP-IgG o TTG-IgG). Il riscontro di titoli molto elevati di anti-TTG-IgA >10 volte il limite di normalità, confermato dalla positività degli EMA su un secondo prelievo, permette di porre diagnosi definitiva di celiachia, senza necessità di praticare la biopsia intestinale. La biopsia è indispensabile nei casi in cui i valori di TTG-IgA siano $> 1x$ ma $< 10x$ in quanto questa permette di distinguere i casi di celiachia conclamata dai pazienti affetti da celiachia potenziale.

A differenza delle linee guida ESPGHAN, quelle americane NASPGHAN suggeriscono di eseguire sempre almeno una biopsia intestinale.

Il dosaggio degli anticorpi DGP-IgG trova spazio in caso di bambini con deficit selettivo di IgA. Rimane ancora aperto il problema della diagnosi nei bambini di età inferiore ai 2-3 anni e a questo riguardo le linee guida ESPGHAN, a differenza di quelle NASPGHAN, indicano che la misurazione degli anticorpi TTG-IgA e IgA totali siano l'esame di screening appropriato anche in questa fascia di età; alcuni studi suggeriscono però che la positivizzazione delle DGP-IgG possa talora precedere quella della TTG-IgA di alcune settimane/mesi.

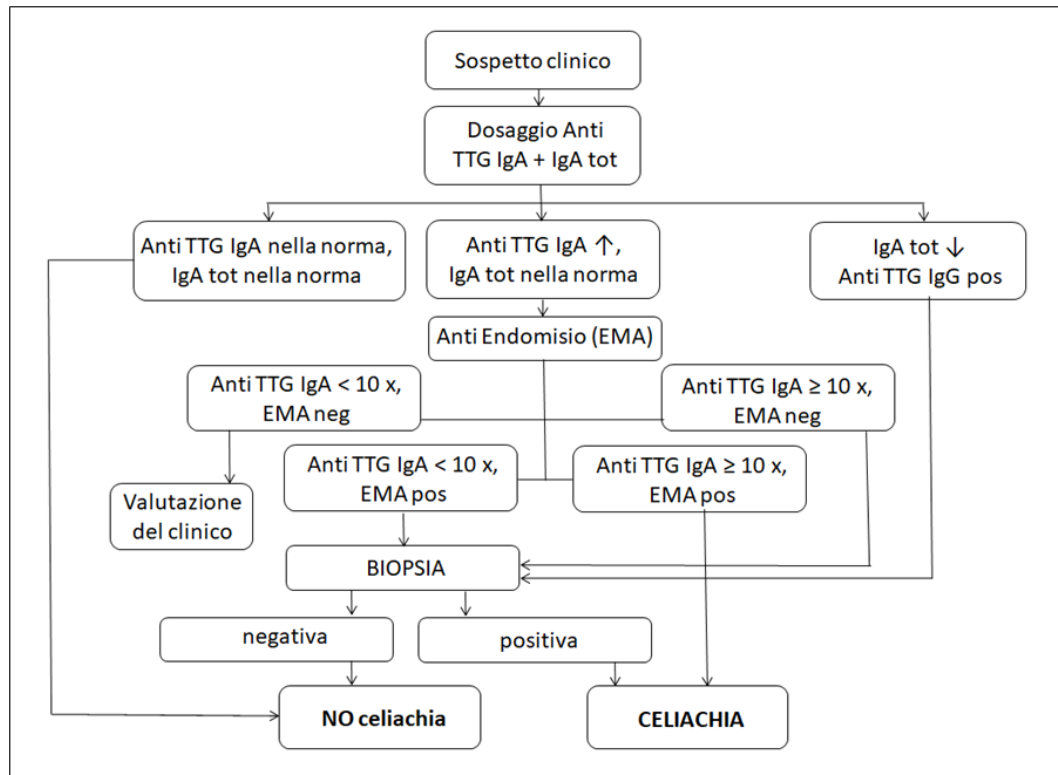


Figura 7 Algoritmo del percorso diagnostico della celiachia nel paziente pediatrico (51).

2.9 Trattamento

2.9.1 La dieta senza glutine

Il trattamento della celiachia si basa sulla dieta priva di glutine (gluten-free diet, GFD), cioè sull'esclusione permanente e completa di tutti i cereali contenenti glutine dalla dieta (es. grano, segale, orzo, farro) (35,52–56). Tutti gli altri alimenti naturali, compresi i cereali naturalmente privi di glutine quali riso e mais, verdure, legumi, frutta, latticini, carne e pesce, sono liberamente concessi (Tabella V).

È stato dimostrato che minime quantità di glutine, nell'ordine di 10-50 mg al giorno, se introdotte ripetutamente, possono causare danno istologico della mucosa intestinale. Pertanto, l'esclusione del glutine dalla dieta deve essere il più completa possibile e particolare attenzione deve essere prestata alla ristorazione fuori casa (16,36).

ALIMENTI DA EVITARE	ALIMENTI PERMESSI
Frumento	Riso
Orzo	Mais
Segale	Avena
Farro	Miglio
Kamut	Grano saraceno
Spelta	Teff
Malto	Manoca/tapioca
Seitan	Amaranto
Bulgur	Quinoa

Tabella V Cereali e pseudo-cereali permessi/da evitare nella dieta senza glutine.

2.9.2 Sviluppo di terapie alternative alla dieta priva di glutine

Le recenti acquisizioni in tema di patogenesi della celiachia hanno indotto a sperimentare terapie alternative rispetto a quella dietetica. Allo stato attuale sono in corso di valutazione vari tipi di farmaci, quali gli enzimi in grado di idrolizzare i peptidi tossici del glutine (PEP di origine fungina o vegetale), gli inibitori della permeabilità intestinale (larazotide), gli inibitori della transglutaminasi, i "vaccini" in grado di bloccare i recettori HLA sulle cellule presentanti l'antigene, le nanoparticelle contenenti peptidi gliadinici ed i farmaci anti-IL-15. La mancanza di un modello animale della celiachia rende necessaria la sperimentazione umana, con conseguente allungamento dei tempi della ricerca ed elevati oneri economici. Alcuni dei farmaci sopra menzionati, quali gli enzimi PEP e la larazotide, sono in fase III di sperimentazione con risultati promettenti, soprattutto quali possibili presidi complementari rispetto alla dieta priva di glutine (per la protezione del danno causato dalle trasgressioni volontarie e involontarie)(57,58).

2.9.3 Gestione della dieta senza glutine

La GFD è del tutto sicura sul piano nutrizionale poiché il glutine non possiede alcuna proprietà nutrizionale. Tuttavia, la necessità di praticare una stretta dieta senza glutine può incidere negativamente sul piano psico-sociale e, in definitiva, sulla qualità di vita del bambino, specie nel lungo termine. In casi selezionati può essere utile un supporto psicologico.

2.9.4 Follow-up

L'avvio del trattamento dietetico determina la progressiva scomparsa dei sintomi e degli anticorpi sierici, nonché la normalizzazione del quadro istologico intestinale, generalmente nell'arco di 12-24 mesi (59), ma i primi segni di miglioramento (quali la ripresa dell'appetito e la modificazione dei caratteri delle feci) si osservano già dopo pochi giorni/settimane dall'avvio della GFD.

Un controllo clinico periodico del bambino celiaco è opportuno per:

- Monitorare l'aderenza al trattamento sulla base della clinica, l'andamento della sierologia e, in particolare, degli anticorpi anti-TTG-IgA. Minime od occasionali assunzioni di glutine non alterano i livelli anticorpali.
- Monitorare la crescita e lo stato di nutrizione.
- La terapia con prodotti a base di ferro orale, per sopperire alla carenza marziale, è indicata dopo almeno 6 mesi dall'avvio della GFD, poiché prima risulterebbe scarsamente efficace per la presenza dell'enteropatia celiaca.
- Monitorare le possibili complicanze.

Agli esami ematochimici è indicato il monitoraggio con emocromo completo e stato micronutrizionale (ad esempio, emoglobina, ferro, vitamina B12 e vitamina D) e la misurazione delle ALT; lo screening delle malattie tiroidee con TSH e tiroxina (e gli autoanticorpi, se indicati) può essere preso in considerazione durante il follow-

up poiché è frequente lo sviluppo di una tiroidite autoimmune a causa della comune predisposizione genetica.

La mancata diminuzione dei livelli di anticorpi TTG IgA dopo 6-12 mesi di GFD o il persistere di livelli positivi di TTG devono essere valutati esaminando attentamente la compliance alla dieta e analizzando i marcatori sierologici con lo stesso test dello stesso produttore. Inoltre, la persistente positività degli anti-TTG valutati con chemiluminescenza dovrebbe essere confrontata con il dosaggio tramite ELISA, per la maggior disponibilità di dati, ad oggi, riguardanti l'utilizzo di ELISA.

Nello specifico, in letteratura non sono disponibili indicazioni standardizzate sui valori e sui tempi di normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi nel tempo. Questa carenza di informazioni risulta quindi essere di scarso supporto all'attività clinica di *follow-up* del paziente celiaco.

Pochi sono gli studi, tutti di tipo retrospettivo, che hanno concentrato la loro attenzione su questi aspetti:

- Hogen Esch et al. (60), nei Paesi Bassi. In un lavoro del 2011 hanno valutato 129 bambini con diagnosi di celiachia riscontrando che l'80% di essi presentava normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi a due anni dall'avvio della dieta aglutinata e una diminuzione della concentrazione media degli anticorpi anti-TG2 del 74% a 3 mesi dall'avvio della stessa; dal punto di vista diagnostico, i limiti di questo studio sono stati un lungo intervallo di tempo (> 1 anno) tra le differenti misurazioni sierologiche e quindi la conseguente non certezza che i pazienti non fossero già sieronegativi al momento della misurazione anticorpale e l'utilizzo di ben 8 kit differenti per la determinazione dei marcatori sierologici (con substrati di TTG di cavia in 1 kit e nei restanti kit TTG umani ricombinanti), ciascuno con valori di cut-off differenti;
- Isaac et al.(61), autori canadesi. Hanno studiato 487 pazienti documentando la normalizzazione dei valori di TTG nell'80.5% dei pazienti a 364 giorni dall'avvio della dieta aglutinata. Nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e

valori anticorpali alla diagnosi più elevati i tempi furono decisamente superiori (1204 giorni);

- Sansotta et al.(38), Gastroenterologia di Bergamo. In un lavoro del 2021, hanno analizzato retrospettivamente 260 pazienti riscontrando una normalizzazione degli anticorpi TTG a 30 mesi nell'86% dei pazienti testati con metodo ELISA e nel 70% dei pazienti testati con metodo CLIA (mediana 11.7 mesi nel primo gruppo e 14.7 mesi nel gruppo CLIA). Il grado della biopsia Marsh non è stato associato con il tempo di normalizzazione anticorpale mentre un'età più avanzata alla diagnosi e valori di anticorpi TTG più elevati alla diagnosi sono predittori di un tempo di normalizzazione maggiore;
- Ebrahim et al.(55), da Tehran in Iran. Hanno analizzato 71 pazienti con diagnosi di celiachia riscontrando un tempo mediano di normalizzazione dei valori di TTG di 31.36 ± 2.89 mesi. ELISA è stata la tecnica utilizzata per la determinazione degli anti-TTG in questo lavoro. Lo studio non ha dimostrato nessuna differenza significativa tra l'età alla diagnosi, il sesso, il grado della biopsia Marsh e familiarità per celiachia con i tempi di normalizzazione anticorpali;
- Sbravati et al. (62,63), Gastroenterologia pediatrica dell'Ospedale Maggiore di Bologna. Hanno analizzato una popolazione di 1024 pazienti celiaci afferenti ai nosocomi di Bologna, Modena e Imola tra il 2000 e il 2019. In questo studio si segnala che fino al 2013 gli anticorpi anti-TTG erano analizzati tramite ELISA, successivamente con FEIA; pertanto, i valori dei marcatori sierologici sono stati valutati come numero di volte il cut-off. Veniva riscontrato un tempo mediano di normalizzazione dei valori di anticorpi anti-TTG pari a 9 mesi. Fattori predittivi come valori anticorpali TTG $>10x$ alla diagnosi, fascia d'età 7-12 anni, povera compliance alla dieta, sesso femminile, etnia non caucasica e comorbidità sono risultati significativamente associati con tempi di normalizzazione più lunghi;
- Gidrewicz et Al. (35), autori canadesi. Hanno investigato se i livelli di TTG (analizzati tramite ELISA) al momento della diagnosi e la severità del quadro istopatologico iniziale influenzassero la velocità di normalizzazione degli anticorpi anti- transglutaminasi. In particolare, il campione di studio (228 pazienti) è stato diviso in tre sottogruppi:

- > Gruppo A: pazienti con $TTG \geq 10$ volte i valori superiori della norma, positività degli EMA $\geq 1:80$ e biopsia;
- > Gruppo B: pazienti con $TTG \geq 10$ volte i valori superiori della norma, positività degli EMA $\leq 1:40$ e biopsia;
- > Gruppo C: pazienti con $TTG < 10$ volte i valori superiori della norma e biopsia.

I valori di anticorpi anti-TTG per ciascun gruppo di pazienti sono stati analizzati a 6, 12, 24 e 36 mesi. *Il Grafico*, tratto dallo stesso lavoro, visualizza i valori mediani delle sierologie nei tre diversi gruppi ai vari controlli di *follow-up*.

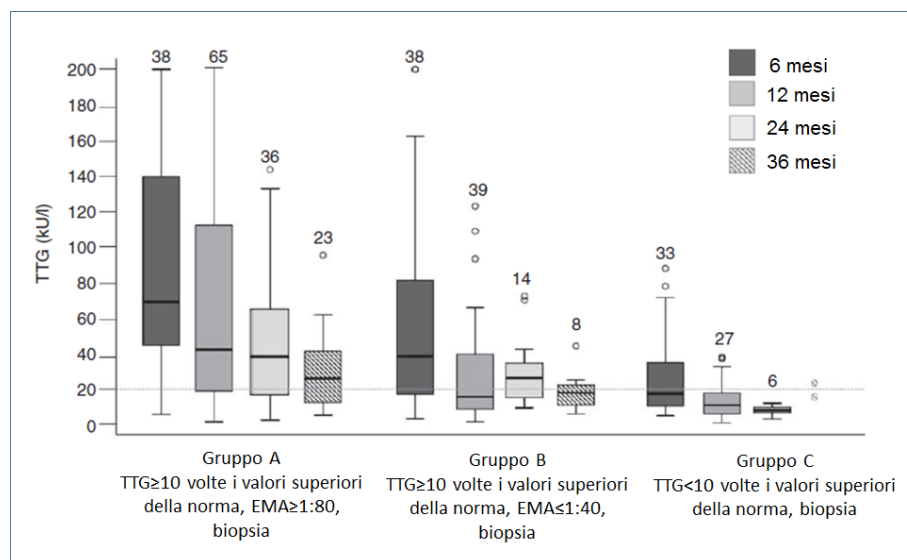


Grafico 1 Grafico a scatole rappresentante i valori di: primo quartile, mediana, terzo quartile, minimo e massimo degli anticorpi anti-transglutaminasi (KU/L) ai vari controlli di *follow-up* dei tre gruppi di pazienti considerati nello studio di *Gidrewicz* (35).

Lo studio di *Gidrewicz* ha messo in evidenza come circa il 75% dei pazienti celiaci con anticorpi anti-TTG elevati all'esordio o quadri bioptici severi necessitasse di più di un anno di dieta aglutinata per giungere alla normalizzazione sierologica. Gli stessi hanno sottolineato come i pazienti che per l'ESPGHAN venivano etichettati come "*biopsy-sparing*", cioè che non necessitavano di biopsia per la diagnosi dati

gli elevati valori di TTG e la positività di EMA, rientrerebbero nel Gruppo A o B di questo studio, avendo analoghe caratteristiche cliniche e sierologiche. Di questi, però, a 6 e 12 mesi, meno del 5% e solo il 15% presentava sierologie normali. A 2 anni il 40% e a 3 anni il 14% di questi pazienti presentava sierologie ancora sopra i valori normali. Tra i pazienti del terzo gruppo (Gruppo C), quasi tutti presentavano valori di TTG normalizzati al controllo dei 18 mesi. Gli Autori hanno inoltre valutato il trend di normalizzazione di anticorpi anti-TTG nei pazienti con quadri istologici più severi: solo il 26% dei pazienti classificati come Marsh 3C presentava valori di anti-TTG normali a 12 mesi, rispetto al 45% dei Marsh 3A e 3B. A 2 anni dall'avvio di dieta aglutinata, un terzo dei pazienti Marsh 3C presentava ancora valori anormali.

Potenziati limiti a questo studio retrospettivo sono rappresentati dal fatto che i tempi dei campionamenti degli anticorpi anti-TTG non sono stati uniformi per tutti i pazienti. Inoltre, i pazienti riconosciuti come non aderenti alla dieta aglutinata e pertanto esclusi dallo studio, sono stati il 13%; dei restanti, tuttavia solo una parte ha eseguito una valutazione dietistica per valutare eventuali cause di contaminazione o scarsa aderenza alla dieta. Gli Autori concludono pertanto che queste fonti di errore possono aver determinato una stima dei tempi di normalizzazione degli anticorpi anti-TTG più lunga.

Le percentuali dei pazienti con valori di anticorpi anti-TTG elevati ai vari controlli di *follow-up* e nei vari studi fin qui illustrati, sono riportate a confronto nel *Grafico 2*.

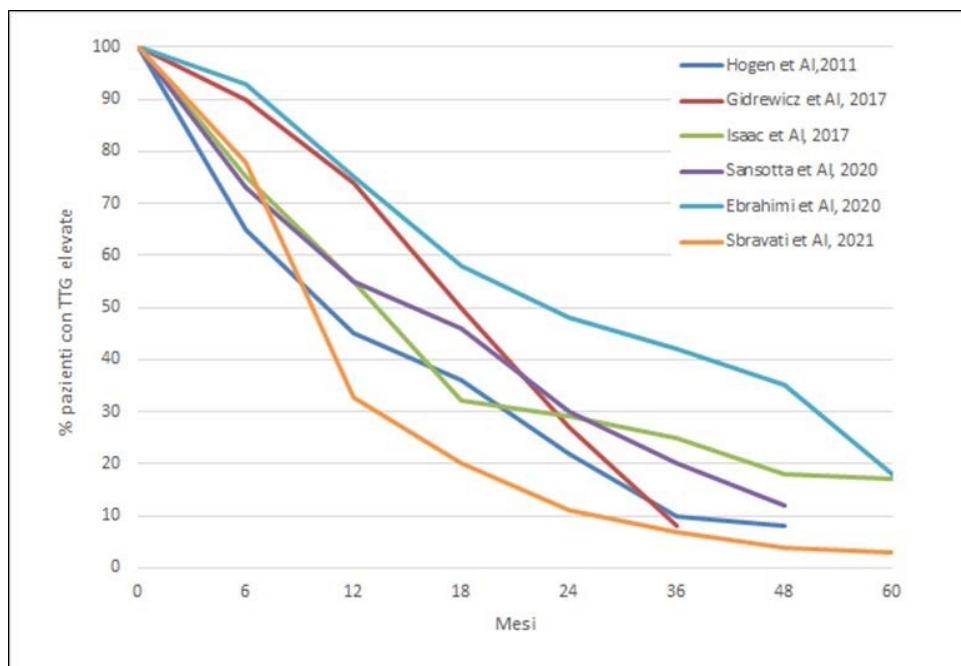


Grafico 2 Percentuale di pazienti con sierologie di anticorpi anti-TTG anormali ai vari controlli di follow-up estrapolati dai vari studi descritti nel testo (35,38,55,60,61,63).

L'esecuzione di biopsie intestinali di controllo non è raccomandata nei bambini con malattia celiaca che seguono una dieta aglutinata (1). Un position paper ESPGHAN 2022 consiglia la ripetizione di un'endoscopia con prelievi biotipici solo in casi selezionati, ad esempio in caso di dubbi sulla diagnosi iniziale o di sospetto di insorgenza di una condizione aggiuntiva (52). Viene inoltre raccomandato di indagare eventuali altre cause in caso di un'apparente "celiachia refrattaria" nei bambini, tra cui l'ingestione involontaria di glutine e altre possibili enteropatie concomitanti, come la malattia di Crohn, l'enteropatia autoimmune, la sovracrescita batterica dell'intestino tenue, l'allergia alle proteine del latte vaccino e l'insufficienza pancreatica.

3. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli scopi del nostro studio sono riportati di seguito:

1. Valutare i tempi di normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA (TTG) in una popolazione pediatrica di pazienti affetti da malattia celiaca dopo avvio di dieta aglutinata.
2. Valutare l'influenza di diversi fattori (valori degli anticorpi anti-transglutaminasi alla diagnosi, sesso, età alla diagnosi, presenza di celiachia sintomatica, severità del quadro istologico) sulla velocità di normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi.
3. Valutare l'influenza delle metodiche laboratoristiche utilizzate per la determinazione dei valori di anti- transglutaminasi (CLIA vs FEIA) sulla velocità di normalizzazione degli stessi.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Identificazione dei casi e raccolta dati

È stata eseguita un'analisi retrospettiva che ha incluso tutti i pazienti di età compresa tra 0 e 18 anni valutati per sospetta malattia celiaca presso il Servizio di Gastroenterologia, Endoscopia Digestiva, Epatologia e Cura del Bambino con Trapianto di Fegato, afferente all'UOC Clinica Pediatrica del Dipartimento di Salute Donna e del Bambino dell'Azienda Ospedale Università di Padova (AOUPD) tra gennaio 2010 e luglio 2022.

I **criteri di inclusione** sono stati:

- positività degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA alla diagnosi e ai controlli di *follow-up* (almeno 1), considerando positivi valori superiori al cut-off del laboratorio di riferimento;

Nei pazienti in cui sono stati eseguiti, sono anche stati valutati la determinazione degli EMA, l'esito dell'esame endoscopico e il referto istologico delle biopsie duodenali secondo la classificazione di Marsh-Oberhuber.

I **criteri di esclusione** dallo studio sono stati:

- diagnosi diversa da quella di celiachia;
- diagnosi di celiachia potenziale;
- pazienti per i quali non erano disponibili dati relativi al *follow-up* (<1 controllo post- diagnosi);
- pazienti con deficit di IgA;
- pazienti non aderenti alla dieta aglutinata e/o con valori di anti-transglutaminasi IgA in aumento al *follow-up*.

Le informazioni sono state raccolte utilizzando il *database* del Servizio di Gastroenterologia, Endoscopia Digestiva, Epatologia e Cura del Bambino con Trapianto di Fegato.

I dati raccolti sono stati registrati ed elaborati in fogli di calcolo mediante il software *Microsoft Excel*.

Per ogni paziente sono stati raccolti i seguenti dati anagrafici, clinico-anamnestici, di laboratorio, istologici e relativi all'aderenza alla dieta aglutinata:

- dati anagrafici: nome, cognome, data di nascita, sesso;
- dati anamnestici: familiarità per celiachia in parenti di I e II grado, presenza di eventuali co-morbidità;
- dati clinico-laboratoristici: età alla diagnosi, sintomatologia alla diagnosi di celiachia, aderenza alla dieta aglutinata, valore degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA alla diagnosi e ai successivi controlli di *follow up*, positività o meno degli anticorpi anti-endomisio alla diagnosi, presenza di predisposizione genetica alla malattia celiaca (analisi alleli HLA DQ2 e DQ8), metodica utilizzata per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi;
- dati istologici: data della biopsia duodenale, esito dell'esame istologico e classificazione in base allo schema proposto da Marsh-Oberhuber.

4.2 Analisi dei dati

Per ciascun paziente sono stati raccolti tutti i dati relativi ai controlli laboratoristici degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA alla diagnosi e al *follow-up* (almeno 1 valore nei 5 anni successivi alla diagnosi).

Facendo riferimento alla classificazione e alla nomenclatura riportate nello studio di Gidrewicz et al. (35), i pazienti sono stati classificati in 3 gruppi:

- **Gruppo A:** valori di anticorpi anti-transglutaminasi alla diagnosi superiori o uguali a 10 volte i valori normali, presenza di biopsia duodenale;

- **Gruppo C:** valori di anti-transglutaminasi alla diagnosi inferiori a 10 volte i valori normali, presenza di biopsia duodenale;
- **Gruppo DC** (diagnosi clinica): valori di anti-transglutaminasi superiori o uguali a 10 volte i valori normali alla diagnosi in almeno due determinazioni, EMA positivi, biopsia duodenale non eseguita, secondo le linee guida ESPGHAN successive al 2012.

Non è stato invece riprodotto il Gruppo B del lavoro di Gidrewicz et al. in quanto il nostro laboratorio non fornisce dati di titolazione degli anticorpi anti-endomisio ma il solo risultato: positivo/negativo.

In base alla metodica analitica usata per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi, i pazienti sono stati ulteriormente suddivisi in due gruppi:

- 1) pazienti in cui la prima determinazione degli anti-TTG alla diagnosi di malattia celiaca e tutte le successive misurazioni ai controlli di *follow-up* sono stati valutati con metodica fluoroimmunoenzimatica FEIA;
- 2) pazienti in cui la determinazione sierologica alla diagnosi e tutti i successivi controlli sono stati valutati tramite chemiluminescenza CLIA.

Data l'eterogeneità fra le metodiche analitiche utilizzate ed in linea con le Linee Guida ESPGHAN per la diagnosi di malattia celiaca, i livelli degli anticorpi anti-transglutaminasi sono stati analizzati non solo come valore assoluto ma anche come multiplo del limite superiore della soglia di normalità indicata nel test di laboratorio utilizzato.

I risultati della determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi sono stati classificati temporalmente facendo riferimento alla data di diagnosi di malattia come tempo zero (t0). I controlli successivi sono stati nominati come segue:

- T1: controllo dei 6 mesi (range: 2-8 mesi);
- T2: controllo a 1 anno dalla diagnosi (range: 9-18 mesi);
- T3: controllo a 2 anni dalla diagnosi (range: 19-30 mesi);
- T4: controllo a 3 anni dalla diagnosi (range: 31-42 mesi);
- T5: controllo a 4 anni dalla diagnosi (range: 43-54 mesi);

- T6: controllo a 5 anni dalla diagnosi (range: 55-66 mesi).

4.3 Analisi statistica

I dati sono stati raccolti in fogli di calcolo utilizzando il software *Microsoft Excel Versione 16.64*. L'analisi statistica è stata eseguita con il software *R 4.2*. Le variabili continue distribuite in modo normale sono state analizzate attraverso Anova test (analisi della varianza) e Log-Rank test (riportando media \pm DS) mentre le variabili categoriche attraverso il test chi-quadrato. Valori di $p \leq 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi degli eventi cumulativi è stata possibile utilizzando le curve di sopravvivenza di Kaplan-Maier e il Log-Rank test. Dove appropriato, sono stati calcolati i seguenti parametri: media, mediana, range interquartile (IQR).

5. RISULTATI

Al 31.07.2022, il *database* del Servizio di Gastroenterologia, Endoscopia Digestiva, Epatologia e Cura del Bambino con Trapianto di Fegato includeva 628 pazienti con diagnosi di celiachia, celiachia potenziale o valutati per sospetta celiachia. Le cartelle cliniche di tutti suddetti pazienti sono state revisionate individualmente per verificare i criteri di inclusione e di esclusione dello studio.

Del gruppo iniziale, 313 pazienti su un totale di 628 pazienti (49%) sono stati esclusi per le seguenti ragioni: positività transitoria agli anticorpi anti-transglutaminasi, diagnosi di celiachia potenziale o diagnosi diversa da quella di celiachia (n=65; 20.8% degli esclusi); mancanza di dati riguardanti il *follow-up* sierologico (n=144; 46%); deficit di IgA (20; 6.4%); non aderenza alla dieta aglutinata o valori di TTG in aumento durante il *follow-up* (n= 45; 14.4%); pazienti con mancata negativizzazione di TTG a 5 anni dalla diagnosi (39; 12.5%) (*Vedere il Grafico 3 seguente*).

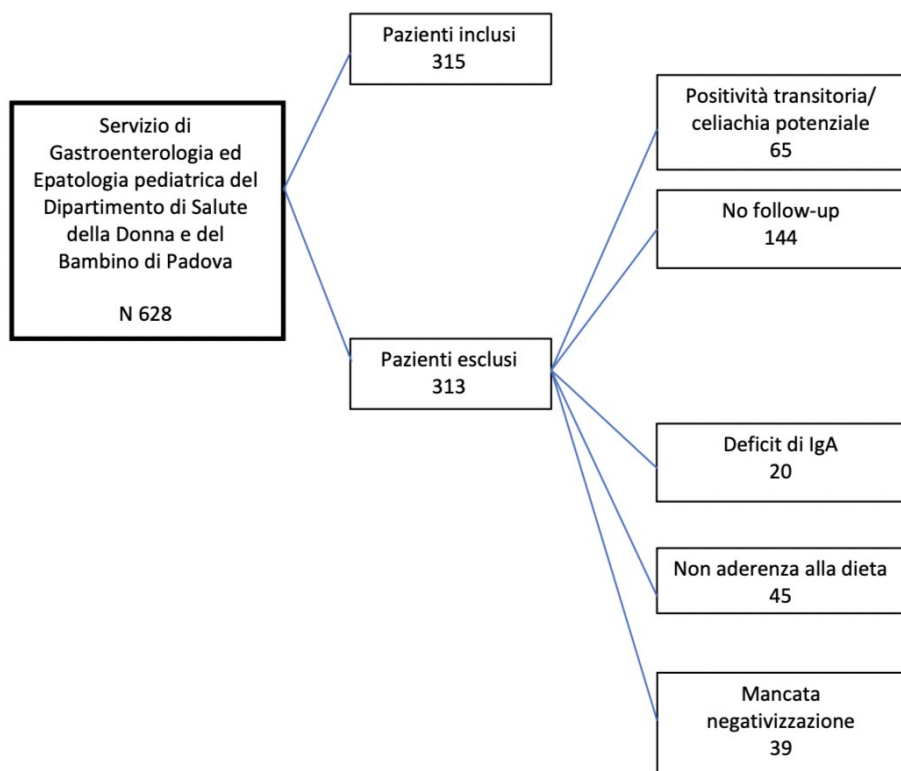


Grafico 3 Flow diagram dello studio.

I 315 pazienti, su un totale di 628 pazienti, inclusi nello studio sono stati analizzati e suddivisi in tre gruppi in base alle caratteristiche definite precedentemente.

5.1 Caratteristiche della popolazione analizzata

L'età media alla diagnosi è risultata essere pari a 7.1 anni (DS 3.9). In totale, 147 bambini (pari al 46.7 % della popolazione in studio) hanno ricevuto la diagnosi di celiachia prima dei 5 anni di età mentre 168 (pari a 53.3% del totale) dopo i 5 anni di vita.

Nel confronto tra i 3 gruppi è emersa una età significativamente inferiore nei pazienti afferenti al gruppo DC rispetto ai gruppi A e C ($p < 0.001$). In questo gruppo, infatti, i bambini di età inferiore ai 5 anni hanno costituito il 58% del totale rispetto al 34.7% e al 38.2% dei gruppi C e A rispettivamente.

Il tempo mediano di *follow up* della popolazione generale è stato di 728 giorni pari a circa 2 anni (range 92-2325 giorni). Rispettivamente nel gruppo A il tempo mediano di follow- up è stato di 2.8 anni (range 194-2317 giorni), nel gruppo C è stato di 1.6 anni (range 92-2325 giorni), mentre nel gruppo DC è stato di 2 anni (range 93-2253 giorni).

Il 63.5% della popolazione è risultato essere di sesso femminile ed il 36.5% di sesso maschile, dato non significativamente differente nel confronto fra i gruppi A, C e DC. Il 25.7 % dei pazienti è risultato avere un familiare di I o II grado affetto da celiachia (dato anche in questo caso non significativamente diverso fra i gruppi A, C e DC) (*Vedere la Tabella VI alla pagina seguente*).

	Tutti	Gruppo A (>10 x ULN e EMA pos. con biopsia)	Gruppo C (<10 x ULN con biopsia)	Gruppo DC (>10 x ULN e EMA pos. senza biopsia)	p
N	315	55	98	162	
Femmine (N,%)	200 (63,5%)	35 (63,6%)	66 (67,3%)	99 (61,1%)	
Maschi (N,%)	115 (36,5%)	20 (36,4%)	32 (32,7%)	63 (38,9%)	0.446
Familiarità (I e II grado)	81 (25,7%)	15 (27,3%)	23 (23,5%)	47 (29,0%)	0.620
Età alla diagnosi					<0.001
Media, aa	7.1 (DS 3.9)	8.19 (3.89)	8.17 (3.89)	6.08 (3.76)	
≤5 aa	147 (46,7%)	21 (38,2%)	34 (34,7%)	94 (58%)	
>5 aa	168 (53,3%)	34 (61,8%)	64 (65,3%)	68 (42%)	
Sintomatici all'esordio	272 (86,3%)	42 (76,4%)	82 (83,7%)	148 (91,4%)	
Asintomatici	43 (13,7%)	13 (23,6%)	16 (16,3%)	14 (8,6%)	
Marsh score (N,%)*	135 (42,9%)	49 (89,1%)	86 (87,8%)		
0-2 (n, %)	13 (9,6%)	2 (4,1%)	11 (12,8%)	/	
3A (n, %)	13 (9,6%)	5 (10,2%)	8 (9,3%)	/	
3B (n, %)	50 (37,1%)	18 (36,7%)	32 (37,2%)	/	
3C (n, %)	59 (43,7%)	24 (49,0%)	35 (40,7%)	/	

* riportati i casi in cui il dato è noto; nei restanti casi il dato non è noto

Tabella VI Caratteristiche cliniche dei pazienti celiaci inclusi nello studio, suddivisi nei tre gruppi oggetto di studio (nell'ultima colonna viene indicata la significatività statistica quando $p \leq 0.05$). Per il Gruppo A e C (quando il dato è disponibile) è inoltre riportato l'esito della biopsia intestinale (Marsh score).

Alla diagnosi l'86.3% dei pazienti risultava sintomatico mentre il 13.7% dei pazienti non presentava alcuna sintomatologia e aveva eseguito lo screening per celiachia in merito a familiarità per la stessa. Tra i sintomi riportati, *mostrati nel Grafico 4*, la presenza di scarsa crescita/calcolo ponderale e l'anemia hanno mostrato una rilevanza statisticamente significativa nel confronto tra i tre gruppi ($p \leq 0.05$), entrambi con una prevalenza maggiore nel gruppo DC rispetto agli altri due gruppi (*Grafico 4 e Tabella VII*).

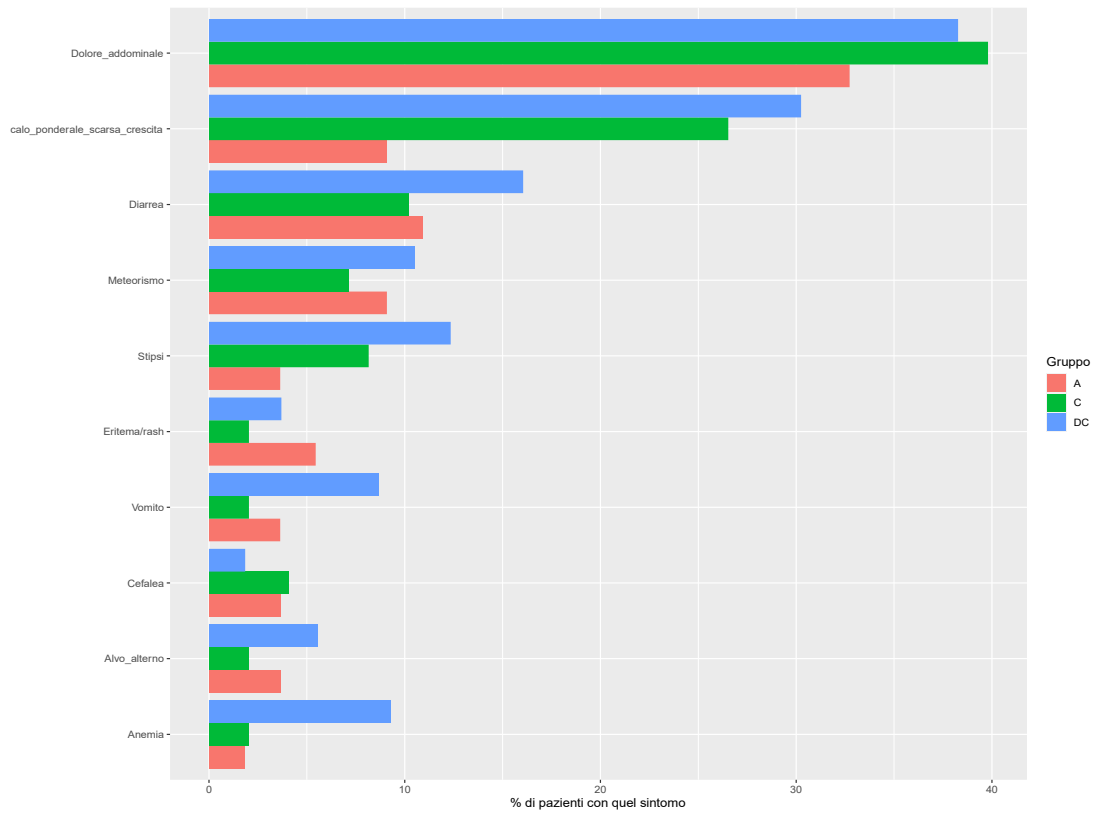


Grafico 4 Sintomatologia riportata all'esordio dai pazienti inclusi nello studio suddivisi nei tre gruppi d'interesse.

	A	C	DC	p value
Dolore addominale	32.7%	39.8%	38.3%	0.676
Diarrea	10.9%	10.2%	16.0%	0.342
Meteorismo	9.1%	7.1%	10.5%	0.663
Vomito	3.6%	2.0%	8.6%	0.065
Stipsi	3.6%	8.2%	12.3%	0.141
Alvo alterno	3.6%	2.0%	5.6%	0.378
Calo ponderale - scarsa crescita	9.1%	26.5%	30.2%	0.007
Anemia	1.8%	2.0%	9.3%	0.020
Cefalea	3.6%	4.1%	1.9%	0.538
Eritema/rash	5.5%	2.0%	3.7%	0.532

Tabella VII Sintomatologia riportata dai pazienti inclusi nello studio suddivisi nei tre gruppi d'interesse. Nell' ultima colonna viene indicata la significatività statistica quando $p \leq 0.05$.

Per quanto riguarda le comorbidità, il 3% della popolazione considerata presentava patologie associate: tiroidite di Hashimoto 1.9 % (2 pazienti nel Gruppo A e 4 pazienti nel Gruppo DC), diabete mellito di tipo 1 0.9 % (1 paziente nel Gruppo A, 1 nel gruppo C e 1 nel gruppo DC), epatite autoimmune 0.3 % (1 paziente nel gruppo DC).

5.2 Sierologia e genetica per celiachia alla diagnosi

L'analisi delle sierologie per celiachia ha mostrato una mediana di valori di anticorpi anti-TTG (valutati come multiplo del limite superiore della soglia di normalità) all'esordio complessivamente pari a 18,29 (IQR 76.9) volte per il limite di normalità (x VN), rispettivamente: 35.57 (IQR 63) nel Gruppo A, 3.14 (IQR 3.78) nel Gruppo C e 47.2 (IQR 146.5) nel Gruppo DC.

Tutti i pazienti del gruppo DC presentavano positività agli anticorpi anti-endomisio. Nel gruppo A il 40.7% presentava EMA positivi, il 5.5% era negativo e nei restanti pazienti il dato non era noto. Per quanto concerne il gruppo C, è stata riscontrata una positività agli anticorpi anti- endomisio nel 60.6% dei pazienti, nel 8.1% erano negativi e nei restanti casi il dato non era noto.

La genetica per celiachia ha mostrato complessivamente la presenza della predisposizione genetica HLA alla celiachia (alleli HLA-DQ2/DQ8) in 265 pazienti (pari all'84.1%) e la sua assenza in un solo paziente (0.31%). In 49 pazienti (15.6%) l'analisi genetica non è stata eseguita.

Rispettivamente nei vari gruppi è emerso:

- nel **Gruppo A**: presenza di positività ai geni HLA DQ2/DQ8 in 38 pazienti (69.1%) di cui in eterozigosi 16 pazienti (circa il 42.1%), in omozigosi 2 pazienti (circa il 5.3%) e positività non meglio specificata in 20 (52.6%). Non è noto il dato riguardante la genetica in 16 pazienti (29.1%) mentre è risultata negativa la ricerca dei geni HLA DQ2/DQ8 in 1 soggetto, pari al 1.82%;
- **Gruppo C**: presenza di positività ai geni HLA DQ2/DQ8 in 84 pazienti (pari al 85.7%) di cui in eterozigosi 33 pazienti (39.3%), in omozigosi 6 pazienti (7.1%) e positività non meglio specificata in 45 pazienti (53,6%). Non è noto il dato riguardante la genetica in 14 pazienti (14.3%);
- **Gruppo DC**: presenza di positività ai geni HLA DQ2/DQ8 in 143 pazienti (pari al 88.3%) di cui in eterozigosi 39 pazienti (27.3%), in omozigosi 23 pazienti (16.1%) e positività non meglio specificata in 81 pazienti (56.6%). Non è noto il dato riguardante la genetica in 19 pazienti (11.7%).

5.3 Analisi degli anticorpi anti-transglutaminasi al follow-up

La mediana del tempo di normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi nella popolazione in studio è stata di 14.9 mesi (IQR 14.3). Nei vari sottogruppi la mediana è risultata rispettivamente pari a:

- **Gruppo A**: 17.8 mesi (IQR 18.6);
- **Gruppo C**: 14.4 mesi (IQR 11.3);
- **Gruppo DC**: 14.3 mesi (IQR 14.7)

con p 0.06 al limite della significatività (valutato con Log-Rank test) nel confronto fra tutti i tre gruppi.

La mediana del numero di volte il limite superiore di normalità degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA ai controlli di follow-up per ciascun gruppo di studio sono riportati nella *Tabella VIII*. Anche in questo caso non si è riscontrata una differenza significativa ($p=0.063$) nel confronto fra i tre gruppi.

	Gruppo A	Gruppo C	Gruppo DC
6 mesi	6 (IQR 38.7)	2.7 (IQR 6.3)	6.8 (IQR 38)
1 anno	1.1 (IQR 1.8)	0.4 (IQR 0.8)	0.97 (IQR 1.6)
2 anni	0.5 (IQR 0.8)	0.4 (IQR 1.2)	0.5 (IQR 0.7)
3 anni	0.4 (IQR 0.6)	0.5 (IQR 0.8)	0.4 (IQR 0.4)
4 anni	0.7 (IQR 1.2)	1.2 (IQR 0.6)	0.4 (IQR 0.5)
5 anni	0.4 (IQR 0.1)	0.4 (IQR 0)	0.4 (IQR 0)
p 0.063			

Tabella VIII Sierologia per celiachia degli anticorpi anti-transglutaminasi espressi come numero di volte il limite superiore di normalità nel corso del follow-up. Nell'ultima riga viene indicata la significatività statistica quando $p \leq 0.05$.

Vedere il Grafico 5 alle pagine seguenti.

Controllo a sei mesi dalla diagnosi

A 6 mesi dalla diagnosi, la percentuale cumulativa di pazienti con TTG elevati nel gruppo A è stata pari a 98%, rispetto al 95% del gruppo C e al 98% del Gruppo DC. La mediana del numero di volte il limite superiore di normalità degli anticorpi anti-transglutaminasi è stata significativamente maggiore nel Gruppo A (6, range 1.3-38.7) e DC (6.8, range 1-37) rispetto al gruppo C (2.7, range 0.4-6.7).

Controllo a 1 anno dalla diagnosi

Ad 1 anno dalla diagnosi, la percentuale cumulativa di pazienti con TTG elevati nel gruppo A è stata pari a 73%, rispetto al 65% del gruppo C e al 58% del Gruppo DC.

La mediana del numero di volte il cut-off degli anticorpi anti-transglutaminasi è nel Gruppo A pari a 1.1 (range 0.4-2.2), nel Gruppo C è pari a 0.4 (range 0.4-1.2) mentre nel gruppo DC è pari a 0.97 (range 0.4-2).

Controllo a 2 anni dalla diagnosi

A 2 anni dalla diagnosi, la percentuale cumulativa di pazienti con TTG elevati nel gruppo A è stata pari a 35%, rispetto al 20% del gruppo C e al 26% del Gruppo DC. Le mediane del numero di volte il cut-off degli anticorpi anti-transglutaminasi nei vari gruppi sono risultate nel Gruppo A pari a 0.5 (range 0.4-1.2), nel Gruppo C pari a 0.4 (range 0.4-1.6) mentre nel Gruppo DC è risultata pari a 0.5 (range 0.4-1.1).

Controllo a 3 anni dalla diagnosi

A 3 anni dalla diagnosi, la percentuale cumulativa di pazienti con TTG elevati nel gruppo A è stata pari al 5%, rispetto al 6% del gruppo C e al 7% del Gruppo DC. L'analisi degli anticorpi anti-transglutaminasi valutati come numero di volte il cut-off ha mostrato le seguenti mediane: nel Gruppo A è risultata pari a 0.4 (range 1-0.3), nel Gruppo C pari a 0.5 (range 0.4-1.2) e nel Gruppo DC pari a 0.4 (range 0.4-0.9).

Controllo a 4 anni dalla diagnosi

A 4 anni dalla diagnosi, la percentuale cumulativa di pazienti con TTG elevati nel gruppo A è stata pari al 7%, rispetto al 3% del gruppo C e all'1% del Gruppo DC. La mediana del numero di volte il cut-off degli anti-transglutaminasi è risultata nel Gruppo A pari a 0.7 (range 0.4-1.6), nel Gruppo C pari a 1.2 (range 0.9-1.5) mentre nel Gruppo DC paria 0.4 (range 0.4-0.9).

Controllo a 5 anni dalla diagnosi

A 5 anni dalla diagnosi, la percentuale cumulativa di pazienti con TTG elevati nel Gruppo A è stata del 2% e nel Gruppo C è stata pari all'1%, rispetto allo 0% del gruppo DC. La mediana del numero di volte il cut-off degli anti-transglutaminasi è

risultata nel Gruppo A pari a 0.4 (range 0.3— 0.9) e nel Gruppo C e DC pari a 0.4 (IQR 0).

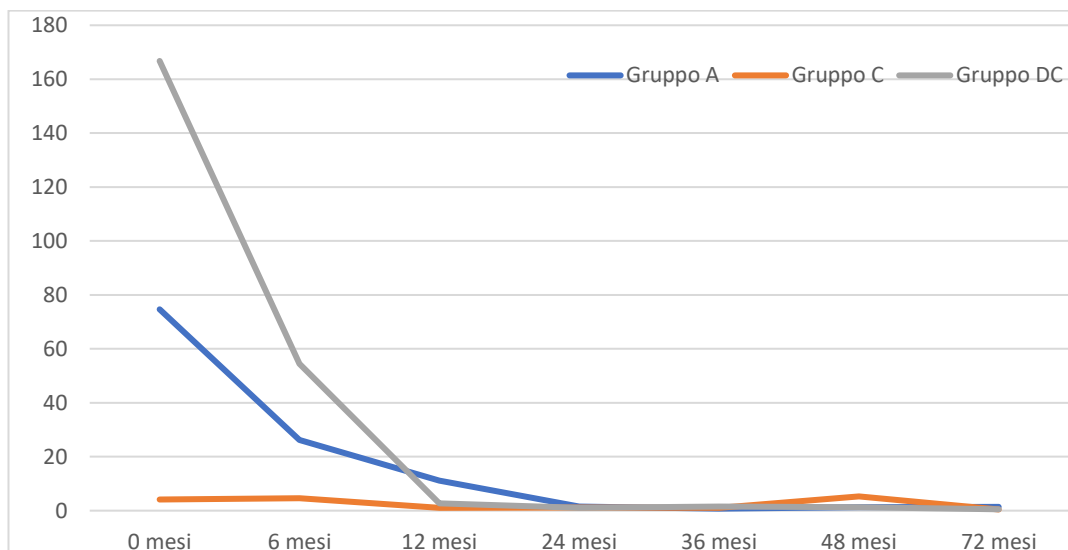


Grafico 5 Andamento dei valori medi degli anticorpi anti-transglutaminasi dei tre diversi gruppi di pazienti al follow-up (espressi come numero di volte il limite superiore di normalità). Sull'asse y sono riportati i valori di anticorpi anti-TTG espressi come numero di volte il limite superiore di normalità.

I Grafici 6 e 7 riportano per ciascun gruppo mediana, percentili (25° e 75° percentile), massimo e minimo dei livelli di anticorpi anti-transglutaminasi (valutati come numero di volte il limite inferiore di normalità) per ciascuna valutazione nei tre gruppi di studio, riportati come logaritmo, rispetto al cut-off.

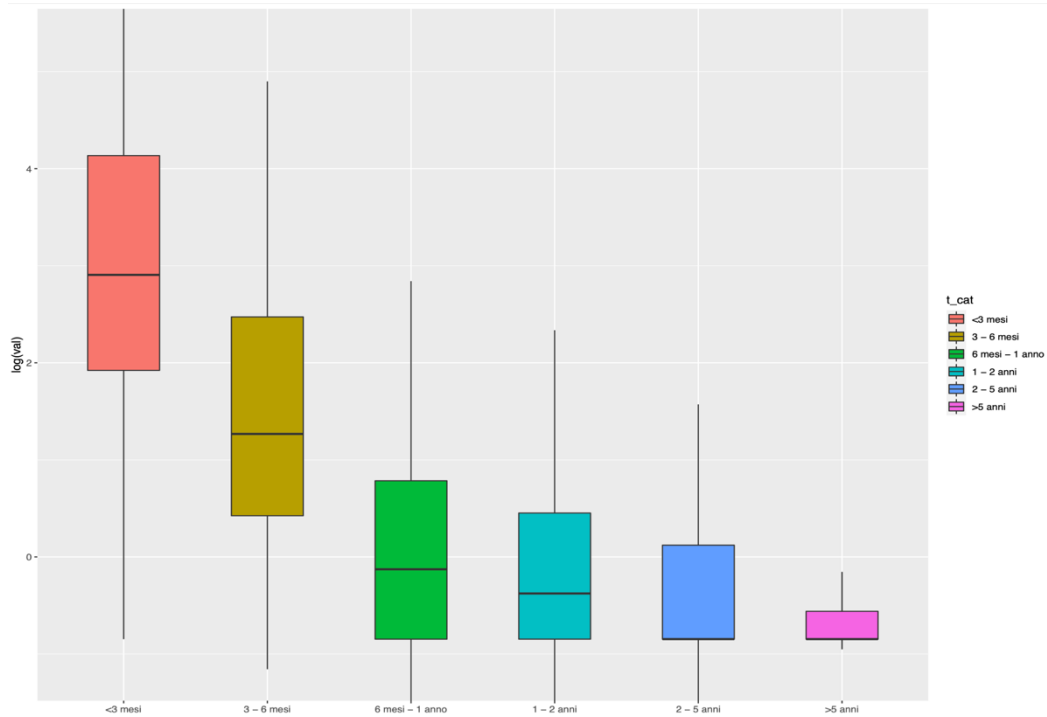


Grafico 6 Diagramma a scatole e baffi raffigurante mediana, minimo, massimo e percentili (25° e 75° centile) dei TTG (x VN), riportati come logaritmo, per ciascuna valutazione nel totale dei pazienti oggetto di studio.

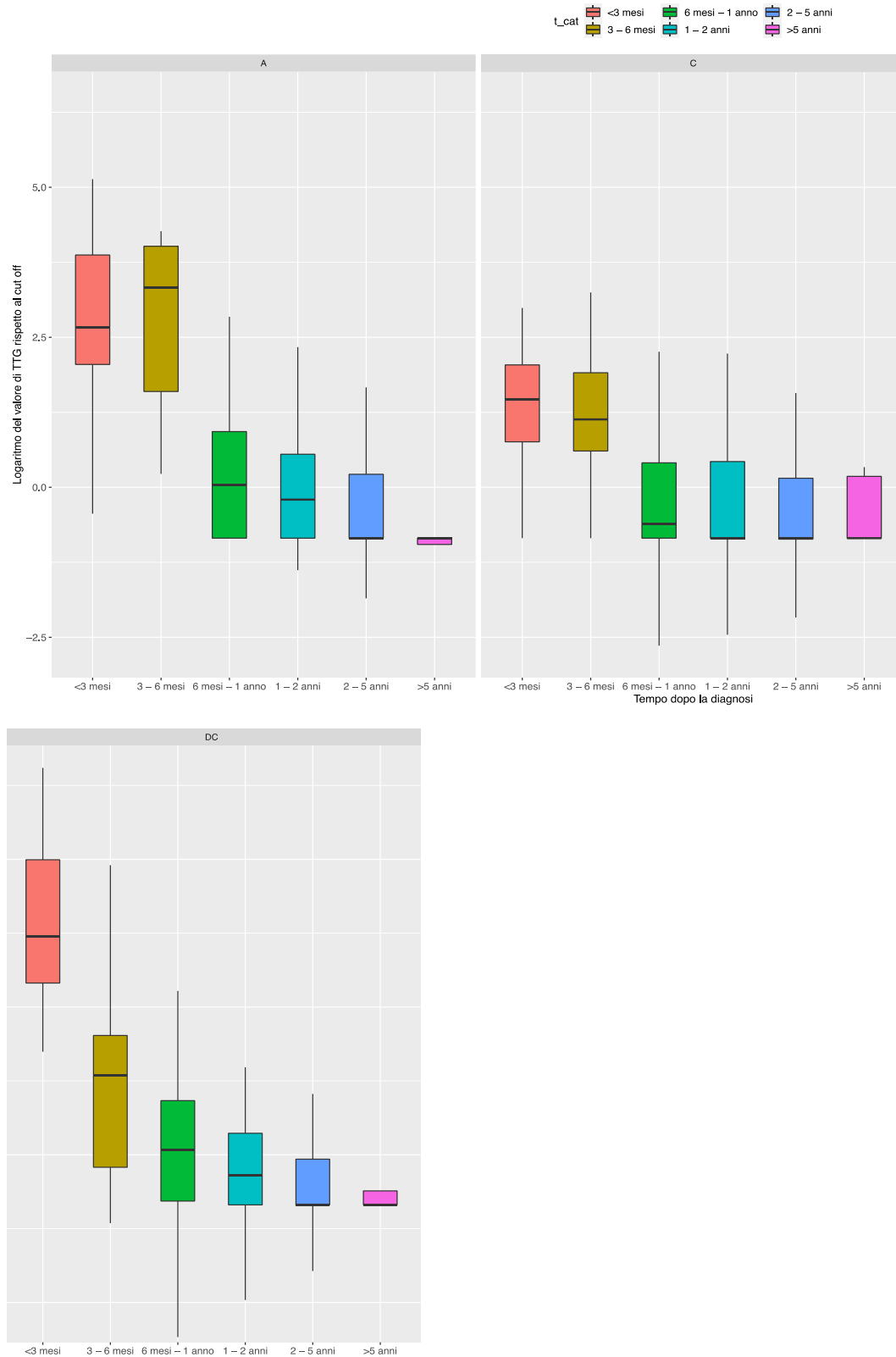


Grafico 7 Diagramma a scatole raffigurante mediana, minimo, massimo e percentili (25° e 75° centile) delle TTG (x VN), riportati come logaritmo, per ciascuna valutazione nei tre gruppi di paziente oggetto di studio.

Nel Grafico 8 è riportato l'andamento nel tempo degli anticorpi anti-transglutaminasi nella popolazione oggetto di studio: circa il 50% della popolazione è andato incontro a normalizzazione in 1 anno e 2 mesi circa.

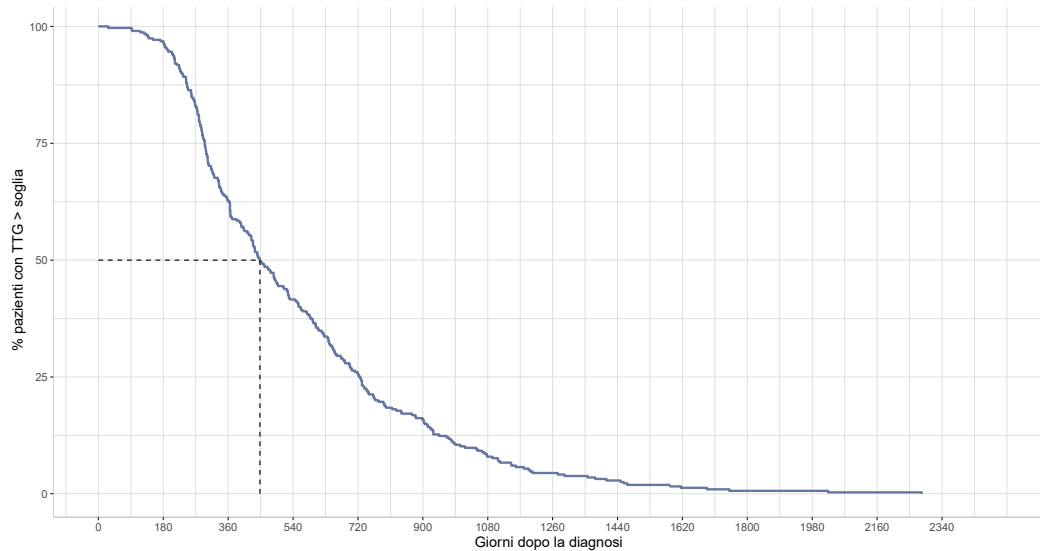


Grafico 8 Curva di Kaplan-Meier dei pazienti pediatrici con celiachia: il loro andamento mostra la normalizzazione degli anticorpi anti-TTG nel tempo dopo l'avvio della dieta aglutinata.

Nel Grafico 9 è riportato l'andamento nella popolazione degli anticorpi antitransglutaminasi nei tre gruppi di pazienti. I risultati sono ai limiti della significatività statistica con Log-Rank test ($p=0.063$).

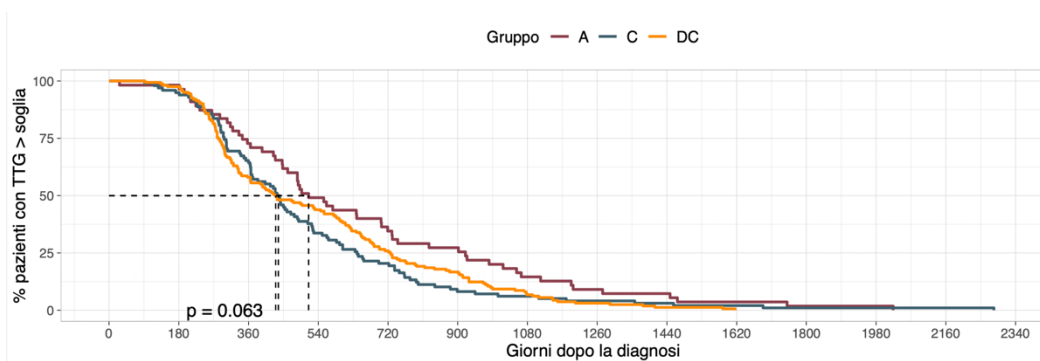


Grafico 9 Curve di Kaplan-Meier dei tre gruppi di pazienti pediatrici con celiachia che mostrano la normalizzazione degli anticorpi antitransglutaminasi.

Nel Grafico 12 si può osservare come non sia stata rilevata una differenza statisticamente significativa nei tempi di normalizzazione delle transglutaminasi tra pazienti sintomatici e asintomatici alla diagnosi (Log-Rank, $p=0.39$).

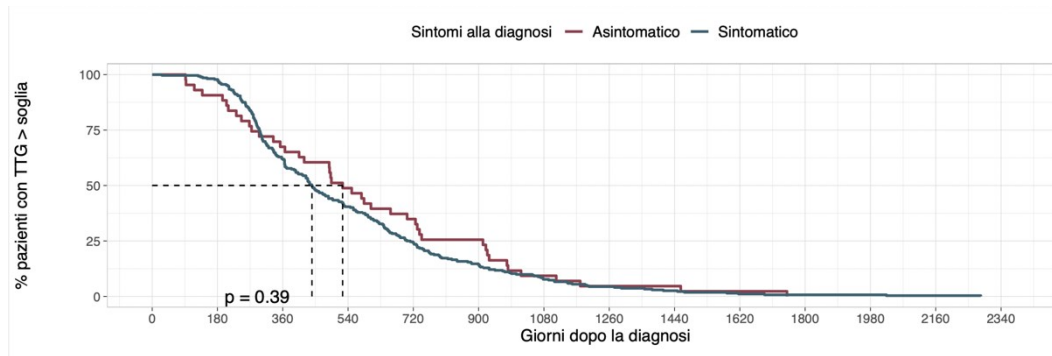


Grafico 12 Curve di Kaplan-Meier di pazienti pediatrici con celiachia distinti tra sintomatici e asintomatici all'esordio: il loro andamento mostra la normalizzazione degli anticorpi anti-TTG nel tempo dopo l'avvio della dieta aglutinata.

Nei Grafici 13 e 14 si evidenzia inoltre, come non sia emersa una differenza statisticamente significativa tra pazienti che alla diagnosi presentavano un'età minore o maggiore di 5 anni (Log-Rank, $p=0.53$) e tra pazienti di sesso femminile e maschile (Log-Rank, $p=0.11$).

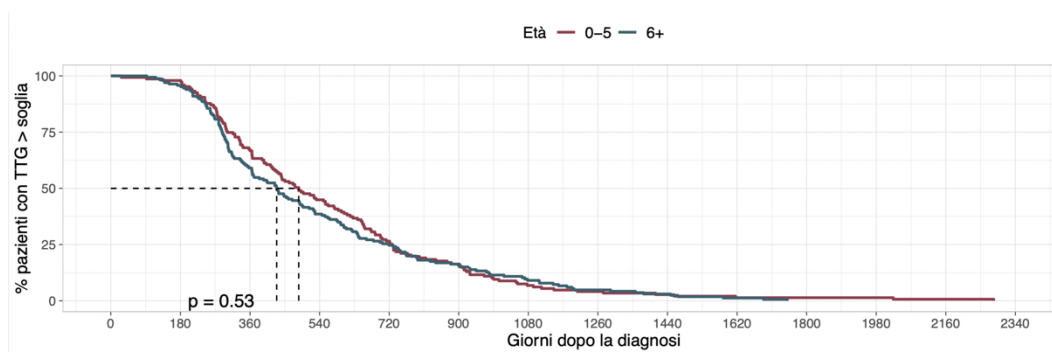


Grafico 13 Curve di Kaplan-Meier mostranti l'andamento nel tempo degli anticorpi anti-TTG in pazienti pediatrici con celiachia dopo avvio di dieta aglutinata distinti in due gruppi in base all'età alla diagnosi (età minore o maggiore di 5 anni).

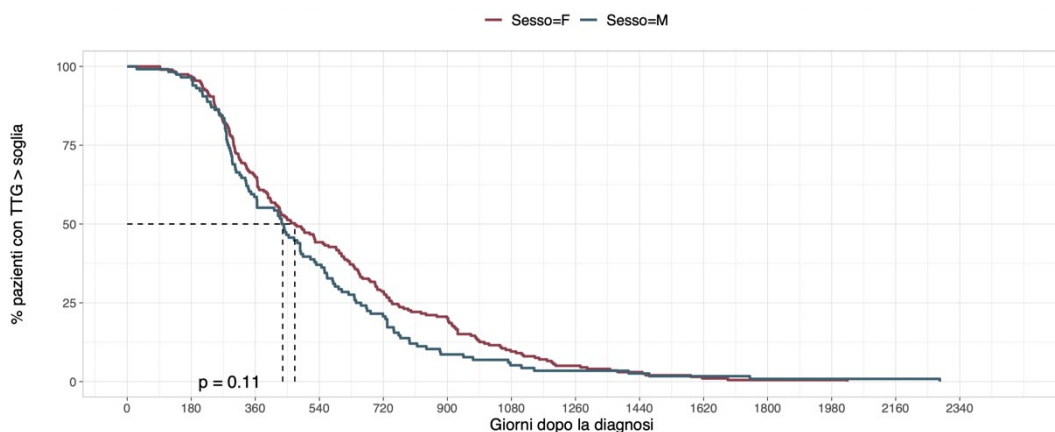


Grafico 14 Curve di Kaplan-Meier mostranti l'andamento nel tempo degli anticorpi anti-TTG in pazienti pediatrici con celiachia dopo avvio di dieta aglutinata distinti in due gruppi in base al sesso.

5.4 Valori sierologici al follow-up e confronto con il grado istologico alla diagnosi

In totale 135 pazienti sono stati sottoposti a biopsia (pari al 42.9%). Nel dettaglio, 13 pazienti hanno mostrato un grado di malattia lieve 1-2 (9.6%) secondo Marsch, 13 pazienti hanno mostrato un grado 3A secondo Marsch (9.6%), 50 pazienti un grado 3B (37.1%) e 59 pazienti un grado 3C (43.7%). L'analisi statistica con Log-Rank test dell'andamento degli anticorpi anti-TTG nei pazienti con differente grado di severità è stata valutata tramite le curve di sopravvivenza di Kaplan- Meier che sono risultate essere sovrapponibili tra loro (*Grafico 15*) senza riscontro di una differenza statisticamente significativa (Log-Rank, $p=0.52$).

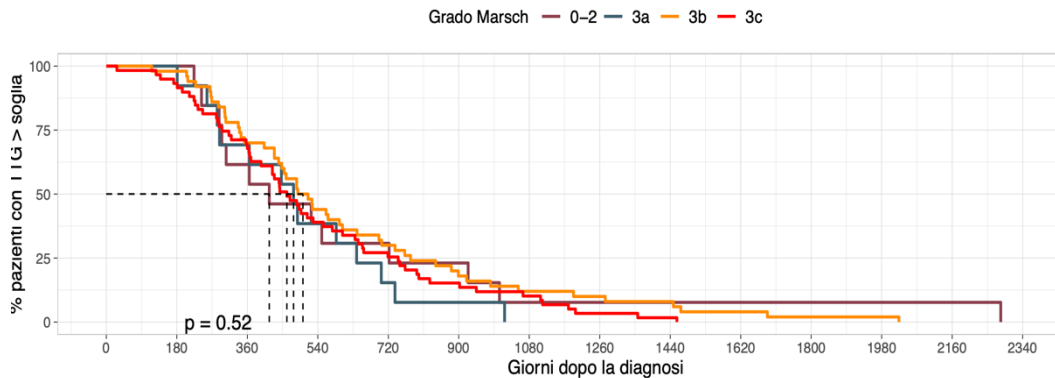


Grafico 15 Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier dei pazienti pediatrici con celiachia che erano stati sottoposti a biopsia intestinale. Il loro andamento mostra la normalizzazione degli anticorpi anti-TTG nel tempo dopo l'avvio della dieta aglutinata secondo i vari gradi della biopsia.

5.5 Metodiche laboratoristiche per la determinazione sierologica

Per ciascun paziente sono state valutate le tecniche laboratoristiche utilizzate per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi alla diagnosi e nel corso del follow-up. Le tecniche più diffuse nei diversi laboratori sono state FEIA (*EliA Celikey IgA WellThermoFisher*) e CLIA (*QuantaFlash tTG IgA, Wefen*). In 242 pazienti (76.8% dei casi) tutte le determinazioni dei livelli di anti-transglutaminasi sono state eseguite con la medesima metodica nel corso dell'intero *follow-up*. Nel dettaglio, in 226 casi (93.4%) è stata utilizzata una tecnica immunofluoroenzimatica (FEIA) di cui 43 nel gruppo A (19%), 70 nel gruppo C (31%) e 113 nel gruppo DC (50%). Nei restanti 16 casi (6.6%) la determinazione è stata effettuata tramite CLIA, di cui 1 paziente nel gruppo A (6.25%), 3 pazienti del gruppo C (18.75%) e 12 pazienti del gruppo DC (75%). Nei restanti 73 pazienti (23.2% dei casi) sono stati utilizzati metodi analitici differenti per la valutazione degli anti-TTG all'esordio e nei controlli di follow-up.

Per quanto possibile, vista la discrepanza numerica tra i due gruppi, è stato analizzato l'andamento dei marcatori sierologici di celiachia nel tempo (tramite Log-Rank). Il *Grafico 16* ne mostra l'andamento con il tentativo di valutare un'eventuale differenza nell'andamento delle sierologie per malattia celiaca con le

due metodiche; tuttavia, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nell'utilizzo di una metodica FEIA piuttosto che CLIA (Log-Rank, $p=0.18$).

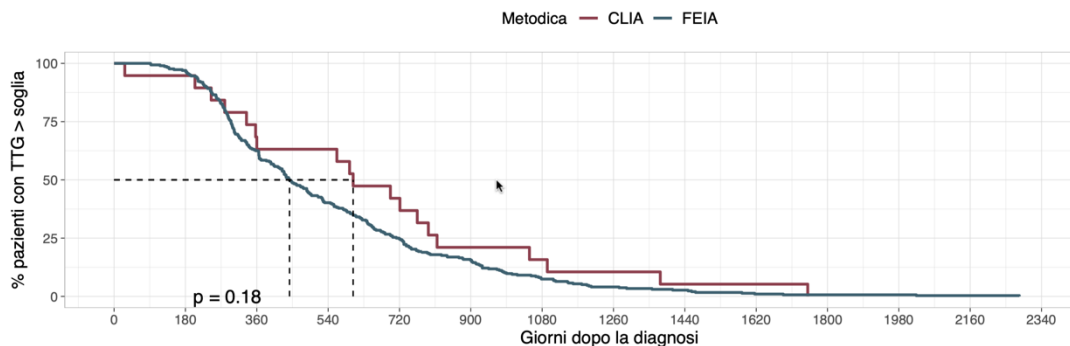


Grafico 16 Le curve riportate nel grafico mettono in relazione l'andamento degli anticorpi anti-TTG valutati con metodica FEIA e CLIA.

Nel Grafico 17 si evidenzia come l'analisi dei pazienti in cui sono stati utilizzati metodi analitici differenti durante il follow-up (73 pazienti) abbia confermato come la tecnica non sembra essere un fattore predittivo per la normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi (Log-Rank, $p=0.14$).

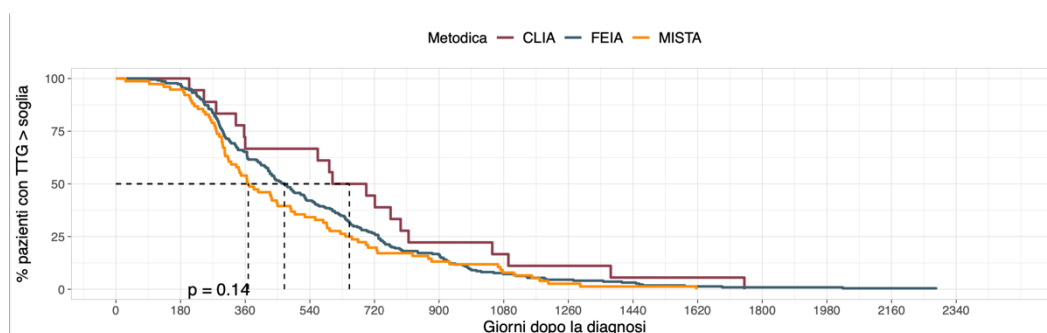


Grafico 17 Curve di Kaplan Meier che confrontano l'andamento degli anticorpi anti-TTG valutati con metodica FEIA e CLIA e con metodi analitici differenti ai vari controlli di follow-up.

6. DISCUSSIONE

La dieta priva di glutine rappresenta attualmente l'unica terapia per la malattia celiaca. L'esclusione del glutine dalla dieta comporta un calo graduale dei livelli sierici degli anticorpi anti-transglutaminasi, il cui monitoraggio è, pertanto, raccomandato nel paziente celiaco per documentare indirettamente la progressiva regressione del processo infiammatorio (38) e per monitorare la guarigione del paziente prevenendo così le complicanze a lungo termine della malattia (35,52–56).

Tuttavia, nonostante l'importanza del ruolo degli anticorpi anti-transglutaminasi nella diagnosi e nel follow-up del paziente celiaco, gli studi dedicati al loro monitoraggio in ambito pediatrico sono limitati (35,38,60,61,64,65) e, nei lavori disponibili, è stata notata un'ampia variabilità del tempo di normalizzazione dei marcatori sierologici di MC (55,61). La revisione della più recente Letteratura ha infatti mostrato come il *timing* di normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi sia un argomento ancora molto dibattuto e affrontato secondo criteri differenti (*i.e.*, strutturazione della popolazione analizzata secondo parametri variabili).

Le linee guida ESPGHAN 2020 e il position paper ESPGHAN 2022 riportano che la normalizzazione degli anticorpi dovrebbe essere raggiunta entro 18-24 mesi (59,60,64,66–69) dall'avvio di una dieta priva di glutine (1,59) e che la mancanza di una diminuzione dei livelli di anti-TTG IgA dopo 6-12 mesi di GFD o il persistere di livelli positivi di anti-transglutaminasi richiedono un'attenta valutazione esaminando l'aderenza della dieta e analizzando i livelli di anti-transglutaminasi con lo stesso tipo di test dello stesso produttore (2,35,59). Le linee guida americane per pazienti adulti raccomandano la necessità di ulteriori indagini se la sierologia persiste alterata dopo 1 anno dalla diagnosi (2,63). In ogni caso, studi recenti hanno dimostrato che possono sussistere prolungati elevati livelli di anticorpi antitransglutaminasi anche in pazienti aderenti alla terapia (35,38,60,61,63–65).

Nel nostro studio il tempo mediano di normalizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi è risultato di 14.9 mesi (IQR 14.3); maggiore rispetto a quanto riportato dal gruppo bolognese di Sbravati et al. (63), secondo cui si registrava un tempo medio di negativizzazione di 9 mesi, secondo gli autori grazie all'efficacia del counseling dietetico effettuato dai centri partecipanti e alla conseguente maggiore aderenza alla GFD (35,38,61). Tali dati appaiono invece molto diversi rispetto a quanto descritto da Ebrahimi et al. (55) (mediana 31.3 mesi) probabilmente, come suggerito dagli stessi autori, per l'utilizzo di metodiche analitiche con differente sensibilità/specificità e per una ridotta aderenza alla dieta aglutinata (55,61,63). Il nostro risultato appare invece più simile a quanto riportato da Sansotta et al. (38) e Isaac et al. (61) in cui la mediana del tempo necessario per la normalizzazione era di circa 13.5 mesi.

Nello specifico, nel nostro lavoro, nel 50% dei casi si è assistito ad una normalizzazione anticorpale in 1 anno e 2 mesi (14 mesi). A un anno dall'avvio della dieta priva di glutine la percentuale di pazienti con anticorpi anti-transglutaminasi negativi era pari al 27% nel gruppo A, al 35% nel gruppo C e al 42% nel gruppo DC; a due anni nel 65%, nell'80% e nel 64% rispettivamente nei gruppi A, C e DC.

Tali dati risultano in linea con quanto descritto da Hogen Esch et al. (60), secondo cui l'80% dei casi si negativizza dopo 2 anni e con quanto dimostrato in uno studio canadese del 2017 (35), secondo il quale la normalizzazione anticorpale richiede più di un anno in > 75% dei pazienti, con una negativizzazione nel 20,3% dei casi a 12 mesi e nel 58,3% a 2 anni. In tale studio viene inoltre mostrato come nei pazienti con livelli anticorpali maggiori alla diagnosi fossero necessari anche tre anni, mentre nei casi con bassi livelli dei marcatori alla diagnosi, la negativizzazione richiedeva solo 12 mesi nella maggior parte dei casi (35). La relazione tra livelli anticorpali maggiori alla diagnosi e un tempo di normalizzazione maggiore è stato messo in evidenza anche in altri studi (38,61,63). Nel nostro lavoro, tuttavia, confrontando pazienti con titoli elevati di anti-TTG all'esordio rispetto a pazienti con titoli bassi, non è emersa una correlazione significativa tra valori anticorpali all'esordio e normalizzazione degli anticorpi anti-TTG.

Analizzando le caratteristiche cliniche della popolazione oggetto di studio, la maggioranza dei pazienti è risultata essere di sesso femminile (63.5%), in linea con gli altri studi presenti in letteratura (35,38,55,61,63). Seppure alcuni studi abbiano riportato un'associazione fra il sesso femminile ed un tempo di negativizzazione degli anticorpi anti- TTG più lungo (38,63), in accordo con Isaac et al (55,61), il nostro studio non ha evidenziato alcuna correlazione di questo tipo.

Come riportato in precedenza, l'età media alla diagnosi dei nostri pazienti è risultata essere pari a 7.1 anni con una diagnosi posta prima dei 5 anni di vita nel 46.7% della popolazione in studio, senza che la fascia di età alla diagnosi influisse in modo statisticamente significativo sull'andamento anticorpale. Anche in letteratura viene descritta un'età media alla diagnosi per lo più compresa in epoca scolare. In particolare, secondo lo studio di Isaac et al. (61), l'età media è di 9.3 anni e, in accordo con i nostri dati, non risulta essere un fattore predittivo nella normalizzazione dei marcatori della celiachia (55). Nello studio di Gidrewicz et al. (35) viene calcolata un'età media di 10.4 anni (DS 4.3), tuttavia con diagnosi posta sotto i 5 anni solo nel 12.3% dei casi (35,61). L'età alla diagnosi risulta essere un fattore significativo nell'analisi bergamasca di Sansotta et al. (38), in cui si descrive come in età pediatrica siano necessari tempi di negativizzazione anticorpali maggiori rispetto agli adulti (38,63). Lievemente inferiore risultava l'età media alla diagnosi nello studio bolognese di Sbravati et al. (63), ossia pari a 5.9 anni, con una maggiore probabilità di presentare un grado anticorpale più elevato nei pazienti con diagnosi posta prima dell'età scolare. In tale lavoro viene evidenziata una relazione significativa tra un'età compresa tra i 7 e i 12 anni e tempi più lunghi di normalizzazione (63); probabilmente, come descritto dagli stessi Autori, per un minor controllo dell'aderenza alla dieta aglutinata da parte del caregiver rispetto ai bambini più piccoli. La letteratura riporta infatti che l'età è il fattore che incide maggiormente sull'aderenza alla *gluten free diet*, con una minore compliance alla stessa tra gli adolescenti (62,63,70,71).

Per quanto riguarda la sintomatologia che ha condotto alla diagnosi, nella nostra casistica l'86.3% dei pazienti è risultato essere sintomatico al tempo zero, mentre il 13.7% dei pazienti non presentava sintomatologia e ciò non ha influito sulla normalizzazione anticorpale, in accordo con quanto riportato in letteratura da

Gidrewicz et al. (35), nella cui popolazione tuttavia l'81% dei pazienti presentava sintomatologia all'esordio e da Sbravati et al. (63) dove il 75.8% dei pazienti risultava sintomatico. Tra i sintomi, la presenza di scarsa crescita e calo ponderale e l'anemia hanno mostrato una rilevanza statisticamente significativa nel confronto tra i tre gruppi ($p \leq 0.05$).

A differenza di quanto riportato in Letteratura, secondo la quale la frequenza di comorbidità associate è dell'8-14% (35,61,63), nel nostro caso queste erano presenti solo nel 3% della popolazione considerata, in particolare erano presenti: tiroidite di Hashimoto nell'1.9 % dei casi (simile a quanto riportato da Isaac et al. (61), ovvero 2.7%), diabete mellito di tipo 1 nello 0.9 % dei casi ed epatite autoimmune nello 0.3 % dei casi. Contrastanti sono i dati disponibili in Letteratura: alcuni studi non riportano correlazione tra la presenza di comorbidità e l'andamento dei marcatori specifici di malattia (35,55) mentre in altri è descritta un'associazione tra la presenza di malattie autoimmuni (DM tipo I e tiroidite autoimmune) e tempi più lunghi di negativizzazione sierologica (55,61,63). In particolare, Isaac et al. (61) ha osservato come i pazienti con DM1 avessero titoli anticorpali alla diagnosi più elevati, una peggiore compliance alla dieta e tempi di normalizzazione più lunghi. Questi risultati potrebbero suggerire che la malattia celiaca sia più difficile da controllare nei pazienti con DM1 in quanto le esigenze dietetiche che questa malattia metabolica richiede potrebbero influire sull'aderenza alla dieta aglutinata (61,72).

In aggiunta pazienti con DM di tipo I possono presentare un rischio maggiore di avere un'inflammazione continua a livello intestinale rispetto ai pazienti non diabetici e quindi un aumentato rischio di malassorbimento, crescita ritardata, fragilità ossea e linfoma intestinale (61,73). Inoltre, negli ultimi anni diversi autori hanno sollevato la problematica della sovrapposizione biochimica tra gli anticorpi della malattia celiachia e quelli del diabete mellito di tipo 1 suggerendo che i livelli di anticorpi anti-transglutaminasi rilevabili nei bambini con DM tipo I possano variare nel tempo anche in coloro in cui non si evidenzia una istologia compatibile con malattia celiachia alle biopsie. Pertanto, valori anomali di anticorpi anti-transglutaminasi nei bambini celiaci e con DM tipo I potrebbero non essere correlati solo ad uno scarso controllo della malattia (61,74–77).

È possibile quindi affermare che questi pazienti appartengano a categorie ad alto rischio e che quindi richiedano un'educazione specifica; tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini (63). Data la bassa prevalenza di comorbidità associate alla malattia celiaca, nel nostro studio non abbiamo eseguito alcuna analisi statistica per valutare un'eventuale correlazione tra la presenza di patologie associate e l'andamento dei TTG dopo l'avvio di dieta aglutinata.

Dibattuta è l'influenza della severità di malattia intestinale, valutata con la stadiazione secondo Marsh, nei confronti dell'andamento anticorpale; allo stesso tempo contrastanti risultano essere i dati riguardanti la correlazione tra la remissione sierologica di malattia e la *mucosal healing*. Su 135 pazienti sottoposti a biopsia (pari al 42.9% della popolazione totale), il 9.6% presentava un grado di malattia lieve (grado 1-2 secondo Marsh), il 9.6% un grado 3A, il 37.1% un grado 3B e il 43.7% un grado 3C, senza che vi fosse alcuna correlazione tra il tempo di normalizzazione della sierologia specifica e lo stadio di Marsh. Tuttavia, ad oggi gli anticorpi anti-TTG sono a tutti gli effetti considerati dei marcatori di guarigione e non ci sono evidenze o raccomandazioni a supporto della ripetizione della biopsia intestinale a distanza in pazienti asintomatici con anti-TTG normalizzati (1).

Gidrewicz et al. hanno osservato che una lesione mucosale più severa alla diagnosi è associata ad un tempo di normalizzazione sierologico più lungo (35). Precedenti studi hanno dimostrato che livelli anticorpali più elevati alla diagnosi correlano con un più grave coinvolgimento intestinale (33,34,78). Al contrario, quattro studi recenti dimostrano, come nel nostro caso, che lo stadio di Marsh non è un predittore indipendente significativo del tempo della normalizzazione (38,55,60,61,63). Questi risultati suggeriscono che la remissione sierologica potrebbe non corrispondere alla guarigione intestinale. Questa analisi trova supporto in uno studio di Ghazzawi et al., che osservò che la guarigione mucosale in bambini affetti da malattia celiaca potrebbe non completarsi mentre la negativizzazione sierologica si trova nella maggior parte dei pazienti (79). In un altro studio, Vecsei et al. riporta che i test sierologici hanno poco valore nel predire lo stato mucosale nei primi anni post-diagnosi (66). Infine, Bannister et al. riporta come la maggior parte dei pazienti con sierologia positiva dopo un anno di dieta aglutinata presenta biopsie duodenali normali (64). Alla luce di tali dati, riteniamo possibile affermare che sono necessari

ulteriori studi per meglio definire la correlazione tra andamento anticorpale e guarigione mucosale.

In letteratura pochi studi hanno confrontato l'utilizzo delle tecniche di chemiluminescenza (CLIA) e immunoenzimatiche (FEIA) per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi in età pediatrica. Entrambi questi metodi analitici hanno prestazioni diagnostiche eccellenti (30,40,41,46,47,52,54,56,80). Tuttavia, uno studio ha dimostrato che, negli adulti, CLIA (*QuantaFlash TTG IgA*, *Wefen*) ha tempi di esecuzione rapidi ed una sensibilità maggiore rispetto a FEIA nella rilevazione degli anticorpi specifici della MC (42–44,81). Ciò consente di rilevare un maggior numero di pazienti celiaci con valori di anticorpi $> 10 \times \text{VN}$, riducendo così la necessità di biopsia duodenale per la diagnosi di malattia celiaca (50). Analogamente, secondo Previtali et al. CLIA presenta sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo adeguati alla determinazione degli anticorpi anti-TTG IgA, i quali, utilizzando tale metodica, se elevati $>10 \times \text{VN}$ sembrano effettivamente correlare con un grado istologico di malattia severo, consentendo quindi di formulare una diagnosi clinica di malattia celiaca senza l'esecuzione di una biopsia (42). Relativamente al *follow-up*, lo studio di Sansotta et al. suggerisce che i livelli di anticorpi anti-TTG misurati con CLIA presentano rispetto a ELISA una maggiore sensibilità e quindi una riduzione più lenta nel tempo (38,42). Inoltre, secondo uno studio condotto dal nostro laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova nel 2013, è emerso come la metodologia CLIA (*Qflash TTG IgA*, *Inova*) sia più accurata della metodologia ELISA nel monitoraggio degli anti-transglutaminasi nei pazienti pediatrici con CD in trattamento con dieta aglutinata (37). Nonostante la discrepanza numerica tra i due gruppi analizzati, nel nostro studio non è emersa una differenza statisticamente significativa nell'utilizzo delle due metodiche per la determinazione degli anticorpi anti-transglutaminasi durante il follow-up.

Il nostro studio presenta diverse limitazioni. In primo luogo, si tratta di uno studio di tipo retrospettivo monocentrico. Le misurazioni di anticorpi anti-transglutaminasi durante il follow-up non sono state effettuate a scadenze programmate, di conseguenza il tempo di normalizzazione sierologica potrebbe essere sovra- o sottostimato. Le determinazioni anticorpali sono state effettuate con metodiche analitiche diverse, quindi, non è stato possibile utilizzare il valore

assoluto dei valori di anti-transglutaminasi, bensì, sulla scia delle linee guida più recenti, è stato utilizzato il numero di volte superiore al limite di normalità. Per valutare l'aderenza alla dieta sono disponibili solo i dati relativi all'intervista clinica durante la valutazione ambulatoriale di controllo nonostante l'eventuale integrazione con un eventuale questionario dietetico potrebbe fornire risposte più affidabili. Inoltre, la valutazione degli anticorpi anti-transglutaminasi non è sufficientemente sensibile per rivelare trasgressioni occasionali; quindi, non tutti i pazienti che normalizzano la sierologia sono necessariamente aderenti alla dieta. Infine, i prodotti senza glutine erano più difficili da reperire nei primi anni duemila rispetto al periodo attuale. Si segnala inoltre che, per molti pazienti, la determinazione sierologica ai vari controlli è avvenuta con metodologie differenti e non possiamo essere certi che questo non influisca nei risultati. Per quanto riguarda coloro per cui è stata utilizzata la stessa tecnica laboratoristica per la determinazione anticorpale alla diagnosi e a tutti i successivi controlli, è necessario considerare l'importante discrepanza numerica dei due campioni (16 casi solo CLIA rispetto a 226 casi solo FEIA).

Punti di forza del nostro studio sono l'omogeneità delle caratteristiche cliniche del campione analizzato e l'alta numerosità del campione, seconda solo, tra i pochi dati disponibili in Letteratura, agli studi di Sbravati et al. e Isaac et al. (61,63). Di rilievo la possibilità di identificare per ciascun paziente il metodo analitico utilizzato per le determinazioni degli anticorpi anti-TTG, nonostante l'esecuzione in molti laboratori diversi e, in più di metà casi, l'uso della medesima tecnica laboratoristica ai vari controlli di follow-up, così da poter confrontare due dei principali metodi analitici attualmente utilizzati per la determinazione anticorpale.

7. CONCLUSIONI

Nella pratica clinica l'utilizzo dei test sierologici è fondamentale per monitorare la risposta del paziente celiaco alla dieta aglutinata e per documentare la remissione di malattia. Di conseguenza, la conoscenza da parte del medico del tempo previsto per la negativizzazione dei marcatori sierologici di celiachia è uno strumento importante per guidare il *follow-up*. Indispensabile risulta, inoltre, identificare i pazienti con probabile esposizione involontaria al glutine sulla base di un aumento o di un declino più lento del previsto dei marcatori sierologici di malattia, al fine di poter attuare una revisione dietetica e un intervento tempestivi.

Ad oggi, tuttavia, non sono disponibili né un gold standard per definire l'aderenza alla GFD né dati standardizzati sulla velocità di normalizzazione anticorpale né valori di anticorpi anti-transglutaminasi di riferimento per ciascun controllo di follow-up. In base ai nostri risultati, e coerentemente con gli studi precedenti e con il più recente position paper ESPGHAN 2022, possiamo affermare che la persistenza di una sierologia anormale può essere riscontrata entro 6-24 mesi dalla diagnosi anche nei pazienti con buona aderenza alla dieta priva di glutine. I livelli di anti-transglutaminasi alla diagnosi, il sesso, l'età, l'eventuale presenza di sintomi, la severità di malattia mucosale all'esordio non sembrano essere con certezza fattori determinanti l'andamento sierologico.

La valutazione dei livelli di anti-TTG IgA espressi come numero di volte il limite di normalità, piuttosto che come valore assoluto, appare un approccio affidabile e ragionevole nella pratica clinica. Tuttavia, studi prospettici sono necessari per valutare simultaneamente le diverse metodiche analitiche (FEIA vs. CLIA) e compararne la validità diagnostica.

In conclusione, ulteriori studi appaiono indispensabili in questo panorama variegato, al fine di ottenere dati standardizzati sull'andamento degli anticorpi anti-transglutaminasi dopo avvio di dieta aglutinata in bambini affetti da malattia celiaca, per poter guidare al meglio il clinico e le famiglie nella pratica quotidiana ed evitare l'esecuzione di esami o indagini invasive che potrebbero rivelarsi non necessari.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Dec 6];70(1):141–56.
2. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines: Diagnosis and management of celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2013 May;108(5):656–76.
3. Armstrong MJ, Robins GG, Howdle PD. Recent advances in coeliac disease. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2023 May 7];25(2):100–9.
4. Mearin ML. Celiac disease among children and adolescents. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* [Internet]. 2007 Mar [cited 2023 May 7];37(3):86–105.
5. Green PHR, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 [cited 2023 May 7];357(17).
6. Lebwohl B, Rubio-Tapia A, Assiri A, Newland C, Guandalini S. Diagnosis of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* [Internet]. 2012 Oct [cited 2023 May 7];22(4):661–77.
7. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2023 May 7];107(10):1538–44.
8. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* [Internet]. 1992 [cited 2023 May 7];102(1):330–54.
9. Oberhuber G. Histopathology of celiac disease. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2000 [cited 2023 May 7];54(7):368–72.
10. Vriezinga SL, Schweizer JJ, Koning F, Mearin ML. Coeliac disease and gluten-related disorders in childhood. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015 Sep 4 [cited 2023 May 7];12(9):527–36.
11. Lundin KEA, Qiao SW, Snir O, Sollid LM. Coeliac disease - from genetic and immunological studies to clinical applications. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 May 7];50(6):708–17.

12. Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, Eisenbarth GS, Bao F, Haas JE, et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *Journal of Pediatrics* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2023 May 7];143(3):308–14.
13. Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 Jun 19 [cited 2023 May 7];348(25):2517–24.
14. McGowan KE, Castiglione DA, Butzner JD. The changing face of childhood celiac disease in north america: impact of serological testing. *Pediatrics* [Internet]. 2009 Dec [cited 2023 May 7];124(6):1572–8.
15. Cucchiara Salvatore, Staiano Annamaria, Maggiore G, Catassi Carlo. *Manuale SIGENP di gastroenterologia ed epatologia pediatrica*. 2014;
16. Catassi C, D'Antiga L, Fasano A. *Gastroenterologia ed epatologia pediatrica: una guida pratica*. 2021.
17. Sahin Y. Celiac disease in children: A review of the literature. *World J Clin Pediatr* [Internet]. 2021 Jul 9 [cited 2023 Jan 29];10(4):53–71.
18. *Epidemiology, pathogenesis, and clinical manifestations of celiac disease in adults - UpToDate* [Internet]. [cited 2023 Jan 29].
19. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* [Internet]. 1989 Jan 1 [cited 2023 May 7];169(1):345–50.
20. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: A systematic review. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 [cited 2023 May 7];128(4 SUPPL. 1).
21. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* [Internet]. 1990 [cited 2023 May 7];65(8):909–11.
22. Fabiani E, Catassi C, De Rosa S, Litwin N, Ellemunter H, Eder J, et al. The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of coeliac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2001 [cited 2023 May 7];13(6):659–65.
23. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM. Lack of usefulness of anti-transglutaminase antibodies in assessing histologic recovery after gluten-free diet in celiac disease. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2003 Nov [cited 2023 May 7];37(5):387–91.

24. Ciacci C, Cirillo M, Cavallaro R, Mazzacca G. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. *Digestion* [Internet]. 2002 [cited 2023 May 7];66(3):178–85.
25. Kaukinen K, Sulkanen S, Mäki M, Collin P. IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2002 [cited 2023 May 7];14(3):311–5.
26. Sugai E, Nachman F, Vázquez H, González A, Andrenacci P, Czech A, et al. Dynamics of celiac disease-specific serology after initiation of a gluten-free diet and use in the assessment of compliance with treatment. *Digestive and Liver Disease*. 2010 May;42(5):352–8.
27. Troncone R, Mayer M, Spagnuolo F, Maiuri L, Greco L. Endomysial antibodies as unreliable markers for slight dietary transgressions in adolescents with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 1995 [cited 2023 May 7];21(1):69–72.
28. Martín-Pagola A, Martín-Pagola A, Ortiz-Paranza L, Martín-Pagola A, Ortiz-Paranza L, Bilbao JR, et al. Two-year follow-up of anti-transglutaminase autoantibodies among celiac children on gluten-free diet: comparison of IgG and IgA. *Autoimmunity* [Internet]. 2007 Jan 7 [cited 2023 May 7];40(2):117–21.
29. Hansson T, Dahlbom I, Rogberg S, Dannæus A, Höpfl P, Gut H, et al. Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease. *Pediatr Res* [Internet]. 2002 Jun [cited 2023 May 7];51(6):700–5.
30. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* [Internet]. 1998 [cited 2023 May 7];115(6):1317–21.
31. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2005 Jan [cited 2023 May 7];40(1):1–19.
32. Gidrewicz D, Potter K, Trevenen CL, Lyon M, Butzner JD. Evaluation of the ESPGHAN Celiac Guidelines in a North American Pediatric Population. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2015 May 8 [cited 2023 May 7];110(5):760–7.
33. Donaldson MR, Book LS, Leiferman KM, Zone JJ, Neuhausen SL. Strongly positive tissue transglutaminase antibodies are associated with Marsh 3 histopathology in adult and pediatric celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Mar;42(3):256–60.

34. Ziv-Baran T, Dubov Y, Weinberger R, Guz-Mark A, Shamir R, Assa A. Anti-tissue transglutaminase titers are associated with endoscopic findings and severity of mucosal damage in children with celiac disease. *Eur J Pediatr* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 May 7];180(1):263–9.
35. Gidrewicz D, Trevenen CL, Lyon M, Decker Butzner J. Normalization time of celiac serology in children on a gluten-free diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Mar 1;64(3):362–7.
36. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*. 2001;120(3):636–51.
37. Aita A, Rossi E, Basso D, Guariso G, Bozzato D, Pellosso M, et al. Chemiluminescence and ELISA-based serum assays for diagnosing and monitoring celiac disease in children: a comparative study. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2013 Jun 5 [cited 2022 Dec 6]; 421:202–7.
38. Sansotta N, Alessio MG, Norsa L, Previtali G, Ferrari A, Guerra G, et al. Trend of Antitissue Transglutaminase Antibody Normalization in Children with Celiac Disease Started on Gluten-free Diet: A Comparative Study between Chemiluminescence and ELISA Serum Assays. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020 Jan 1;70(1):37–41.
39. Röss K, Harro J, Uibo O, Uibo R. Use of a fully automated immunoassay for celiac disease screening in a pediatric population. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2022 Dec 6];49(6):983–7.
40. Hopper AD, Hadjivassiliou M, Hurlstone DP, Lobo AJ, McAlindon ME, Egner W, et al. What is the role of serologic testing in celiac disease? A prospective, biopsy-confirmed study with economic analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2023 May 7];6(3):314–20.
41. Lakos G, Norman GL, Mahler M, Martis P, Bentow C, Santora D, et al. Analytical and clinical comparison of two fully automated immunoassay systems for the diagnosis of celiac disease. *J Immunol Res* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 7];2014.
42. Previtali G, Licini L, D'Antiga L, Marseglia A, Ravasio R, Nembrini F, et al. Celiac Disease Diagnosis Without Biopsy: Is a 10× ULN Antitransglutaminase Result Suitable for a Chemiluminescence Method? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Dec 6];66(4):645–50.
43. Daves M, Cemin R, Perkmann V, Bernard P, Caprioli G, Platzgummer S, et al. Fully automated, chemiluminescence IgA and IgG anti-tissue transglutaminase (tTG) antibodies serum assays for the screening of celiac disease. *J Immunol Methods* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 May 7]; 429:57–9.
44. Basso D, Guariso G, Fasolo M, Pittoni M, Schiavon S, Fogar P, et al. A new indirect chemiluminescent immunoassay to measure anti-tissue

- transglutaminase antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2006 [cited 2023 May 7];43(5):613–8.
45. Fasano A. Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 [cited 2023 May 7];128(4 SUPPL. 1).
 46. Hussain S, Sabir M ud din, Afzal M, Asghar I. Coeliac disease--clinical presentation and diagnosis by anti-tissue transglutaminase antibodies titre in children. *J Pak Med Assoc* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 7];64(4):437–41.
 47. Leffler DA, Edwards George JB, Dennis M, Cook EF, Schuppan D, Kelly CP. A prospective comparative study of five measures of gluten-free diet adherence in adults with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2007 Nov [cited 2023 May 7];26(9):1227–35.
 48. LERNER A, KUMAR V, IANCU TC. Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1994 Jun 28 [cited 2023 May 7];95(1):78–82.
 49. Different types of Immunoassays [Internet]. [cited 2023 Jan 29].
 50. Lakos G, Norman GL, Mahler M, Martis P, Bentow C, Santora D, et al. Analytical and clinical comparison of two fully automated immunoassay systems for the diagnosis of celiac disease. *J Immunol Res* [Internet]. 2014 [cited 2022 Dec 6];2014.
 51. 2020 New Guidelines for the Diagnosis of Paediatric Coeliac Disease | ESPGHAN [Internet]. [cited 2023 Jan 29].
 52. Haines ML, Anderson RP, Gibson PR. Systematic review: The evidence base for long-term management of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2008 Nov [cited 2023 May 7];28(9):1042–66.
 53. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2006 [cited 2023 May 7];131(6):1981–2002.
 54. Rubio-Tapia A, Rahim MW, See JA, Lahr BD, Wu TT, Murray JA. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 May 7];105(6):1412–20.
 55. Ebrahimi MP, Alimadadi H, Najafi M, Vasei M, Rahmani P. Investigation of Tissue Transglutaminase Antibody Normalization in Response to Gluten-Free Diet in Children with Celiac Disease. *Journal of Child Science* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Jan 29];11(1): E60–4.

56. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2005 Jan [cited 2023 May 7];40(1):1–19.
57. Segura V, Ruiz-Carnicer Á, Sousa C, Moreno M de L. New insights into non-dietary treatment in celiac disease: Emerging therapeutic options. *Nutrients*. 2021 Jul 1;13(7).
58. Caio G, Ciccocioppo R, Zoli G, de Giorgio R, Volta U. Therapeutic options for coeliac disease: What else beyond gluten-free diet? *Digestive and Liver Disease*. 2020 Feb 1;52(2):130–7.
59. Mearin ML, Agardh D, Antunes H, Al-Toma A, Auricchio R, Castillejo G, et al. ESPGHAN Position Paper on Management and Follow-up of Children and Adolescents With Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 Jan 29];75(3):369–86.
60. Hogen Esch CE, Wolters VM, Gerritsen SAM, Putter H, Von Blomberg BM, Van Hoogstraten IMW, et al. Specific celiac disease antibodies in children on a gluten-free diet. *Pediatrics*. 2011 Sep;128(3):547–52.
61. Isaac DM, Rajani S, Yaskina M, Huynh HQ, Turner JM. Antitissue Transglutaminase Normalization Postdiagnosis in Children with Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Aug 1;65(2):195–9.
62. Sbravati F, Pagano S, Retetangos C, Spisni E, Bolasco G, Labriola F, et al. Adherence to Gluten-free Diet in a Celiac Pediatric Population Referred to the General Pediatrician After Remission. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Dec 3];71(1):78–82.
63. Sbravati F, Cosentino A, Lenzi J, Fiorentino M, Ambrosi F, Salerno A, et al. Antitissue transglutaminase antibodies' normalization after starting a gluten-free diet in a large population of celiac children-a real-life experience. *Digestive and Liver Disease*. 2022 Mar 1;54(3):336–42.
64. Bannister EG, Cameron DJ, Ng J, Chow CW, Oliver MR, Alex G, et al. Can celiac serology alone be used as a marker of duodenal mucosal recovery in children with celiac disease on a gluten-free diet? *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Dec 6];109(9):1478–83.
65. Rajani S, Alzaben A, Shirton L, Persad R, Huynh HQ, Mager DR, et al. Exploring anthropometric and laboratory differences in children of varying ethnicities with celiac disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jan 30];28(7):351–4.
66. Vécsei E, Steinwendner S, Kogler H, Innerhofer A, Hammer K, Haas OA, et al. Follow-up of pediatric celiac disease: Value of antibodies in predicting

- mucosal healing, a prospective cohort study. *BMC Gastroenterol*. 2014 Feb 13;14(1).
67. Galli G, Esposito G, Lahner E, Pillozzi E, Corleto VD, Di Giulio E, et al. Histological recovery and gluten-free diet adherence: a prospective 1-year follow-up study of adult patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 7];40(6):639–47.
 68. Lanzini A, Lanzarotto F, Villanacci V, Mora A, Bertolazzi S, Turini D, et al. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 Jun [cited 2023 May 7];29(12):1299–308.
 69. Wahab PJ, Meijer JWR, Mulder CJJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2002 Sep 1 [cited 2023 May 7];118(3):459–63.
 70. Czaja-Bulsa G, Bulsa M. Adherence to gluten-free diet in children with celiac disease. *Nutrients*. 2018 Oct 4;10(10).
 71. Dimitrios C, Panayiotou J, Chouliaras G, Zellos A, Kyritsi E, Roma E. Determinants of adherence to gluten-free diet in Greek children with coeliac disease: A cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr*. 2013 Jun;67(6):615–9.
 72. Sud S, Marcon M, Assor E, Palmert M, Daneman D, Mahmud F. Celiac disease and pediatric type 1 diabetes: diagnostic and treatment dilemmas. *Int J Pediatr Endocrinol* [Internet]. 2010 [cited 2023 May 7];2010(1):161285.
 73. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2005 Jan [cited 2023 Jan 30];40(1):1–19.
 74. Simell S, Hoppu S, Hekkala A, Simell T, Ståhlberg MR, Viander M, et al. Fate of five celiac disease-associated antibodies during normal diet in genetically at-risk children observed from birth in a natural history study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2007 [cited 2023 Jan 30];102(9):2026–35.
 75. Waisbourd-Zinman O, Rosenbach Y, Shalitin S, Hojsak I, Mozer-Glassberg Y, Phillip M, et al. Spontaneous normalization of anti-tissue transglutaminase antibody levels is common in children with type 1 diabetes mellitus. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2012 May [cited 2023 Jan 30];57(5):1314–20.
 76. Unal E, Demiral M, Baysal B, Ağin M, Devecioğlu EG, Demirbilek H, et al. Frequency of celiac disease and spontaneous normalization rate of celiac serology in children and adolescent patients with type 1 diabetes. *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2021;13(1):72–9.

77. Maltoni G, Salardi S, Zucchini S. COMMENT ON CASTELLANETA ET AL. High rate of spontaneous normalization of celiac serology in a cohort of 446 children with type 1 Diabetes: A prospective study. *Diabetes care* 2015; 38:760-766. *Diabetes Care*. 2015 Nov 1;38(11): e188.
78. Ciacci C, Cavallaro R, Della Valle N, D'Argenio G. The use of serum tTG-ab assay in patients on gluten-free diet as a measure of dietetic compliance. *Gastroenterology* [Internet]. 2002 [cited 2023 May 7];122(2):588.
79. Ghazzawi Y, Rubio-Tapia A, Murray JA, Absah I. Mucosal healing in children with treated celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59(2):229–31.
80. Bogaert L, Cauchie M, van Hoovels L, Vermeersch P, Fierz W, de Hertogh G, et al. Optimization of serologic diagnosis of celiac disease in the pediatric setting. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2023 Jan 29];19(5).
81. Aita A, Rossi E, Basso D, Guariso G, Bozzato D, Pelloso M, et al. Chemiluminescence and ELISA-based serum assays for diagnosing and monitoring celiac disease in children: a comparative study. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2013 Jun 5 [cited 2023 May 7]; 421:202–7.

*Alle difficoltà, alle delusioni e alle gioie ma soprattutto ai traguardi raggiunti.
A tutta la mia famiglia per l'amore, l'aiuto, il supporto e il sostegno continuo
ricevuto.*