Screening della malattia celiaca nei donatori di sangue della provincia di Bergamo: dati preliminari su 18.498 soggetti

Federica Zunino[1], Maria Grazia Alessio[1], Barbara Giussani[2], Silva Grigio[2], Antonella Giudici[2], Maria del Carmen Baigorria Vaca[1], Giovanna Azzarà[1], Tiziana Benedetti[1], Carmela Brascia[1], Giovanna Lazzari[1], Caterina Maestroni[1], Ferdinanda Noris[1], Maurizio Parimbelli[1], Giulia Previtali[1], Davide Barachetti[1], Carlo Catassi[3]

[1]Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedali Riuniti di Bergamo

[2]AVIS Provinciale Bergamo

[3]Università Politecnica delle Marche, Ancona

Questo lavoro è stato in parte presentato al 43° Congresso Nazionale SIBioC, 15-18 Novembre 2011, Parma, sotto forma di poster, ricevendo, nella persona del suo primo autore (F. Zunino), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

Screening of the celiac disease (CD) among blood donors in the Bergamo province: preliminary data on 18.498 subjects. CD is a common cause of hypoferritinemia and anemia. A high percentage of blood donors from the Bergamo district stopped blood donation because of an iron deficiency. The aim of this study was to determine the prevalence of CD in this population. From May 2010 to December 2011, 18,498 donors underwent serological screening with measurement of human anti-recombinant transglutaminase (tTG) IgA and synthetic anti-deamidated gliadin antibodies (AGA DGP) IgG. 440 donors (2.3%) resulted positive either to one or both screening tests. 363 donors showed an isolated positivity for AGA DGP IgG (n=309) or anti-tTG IgA (n=54) and are now following up. 76 (0.4%) were positive for anti-tTG IgA, subsequently confirmed by anti-endomysial antibodies (EMA). A donor was positive for AGA DGP IgG and anti-tTG IgG: the determination of total IgA confirmed the presence of an absolute deficit of IgA. 58 people performed the duodenal biopsy: 95% showed damage to the duodenal mucosa and got a diagnosis of CD. The estimated prevalence of CD was ~1:250. Only 10% of individuals were totally asymptomatic; signs and/or symptoms related to CD were often present at the moment of the diagnosis. Our results suggest the need for screening for CD at the time of blood donor enrollment.

INTRODUZIONE

La malattia celiaca (MC), definita anche sprue celiaca o enteropatia da glutine, è una malattia immunomediata scatenata dall'ingestione di glutine che, in soggetti geneticamente predisposti, determina un processo infiammatorio nell'intestino tenue, con conseguente malassorbimento e manifestazioni intestinali ed extraintestinali (1). Lo scenario epidemiologico della malattia è cambiato radicalmente con l'introduzione di esami sierologici altamente sensibili e specifici, che hanno permesso lo screening di popolazione e l'identificazione di svariate forme di presentazione della malattia, nonché l'associazione con altre patologie. Da malattia rara, la MC si è trasformata in pochi anni in una condizione di frequente osservazione, con possibile insorgenza in ogni età (2-4). Gli studi epidemiologici basati sui nuovi esami autoanticorpali hanno dimostrato che la diagnosi viene più frequentemente effettuata con due picchi tra 1-5 e 20-50 anni e un 20% di diagnosi vengono fatte oltre i 60 anni (5). Tra gli adulti, colpisce più frequentemente le donne, con un rapporto di ~2:1 rispetto ai maschi.

La MC si può manifestare in forma tipica, con segni e sintomi prevalentemente gastrointestinali, quali diarrea, gonfiore e dolore addominale, o in forma atipica, nella quale prevalgono le manifestazioni extraintestinali, che possono interessare diversi organi e distretti dell'organismo. La maggior parte dei pazienti (60%-70%) risultano però asintomatici o paucisintomatici e rappresentano un problema sanitario importante, in quanto la mancata diagnosi di MC è associata a una maggior morbilità e mortalità (4, 6, 7). La diagnosi viene effettuata attraverso la ricerca degli anticorpi specifici nel siero. Gli

Corrispondenza a: Federica Zunino, Laboratorio Analisi, Ospedali Riuniti di Bergamo, Largo Barozzi 1, 24128 Bergamo. Tel. 035266445, Fax 035266525, E-mail zunino_federica@libero.it

Ricevuto: 07.02.2012 Revisionato: 29.06.2012 Accettato: 03.07.2012

anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA (anti-tTG IgA) rappresentano l'esame di screening per eccellenza, essendo dotati di elevata sensibilità e specificità (1, 8-11). Gli anticorpi anti-endomisio (EMA) vengono attualmente proposti solo come esame di conferma, in caso di esito positivo o dubbio degli anti-tTG (9), mentre gli anticorpi anti-gliadina (AGA), con cui furono effettuati i primi studi di screening, non dovrebbero più essere utilizzati nella diagnostica per adulti, ma solo nella diagnostica in età pediatrica al di sotto dei due anni. In presenza di positività allo screening sierologico, biopsie multiple della mucosa della seconda porzione del duodeno di solito confermano la diagnosi, dimostrando la presenza di un infiltrato infiammatorio di linfociti CD3+, presenti in quota >25 linfociti/100 enterociti, associato a ipertrofia delle cripte e a livelli variabili di atrofia dei villi, così come descritto dalla classificazione di Marsh, modificata da Oberhuber (12, 13). L'avvio del trattamento con dieta senza glutine determina nella maggior parte dei casi la normalizzazione del quadro clinico, sierologico e istologico.

La diagnosi tempestiva della MC è molto importante per prevenire le possibili manifestazioni sistemiche e le complicanze, consentendo anche un risparmio di spesa nel campo dell'assistenza sanitaria. Molti pazienti adulti giungono infatti alla diagnosi dopo essere stati trattati per anni per colon irritabile o altre patologie, sottoponendosi a visite specialistiche, terapie e indagini anche invasive, costose quanto inutili. La legge nazionale n° 123 del 4 luglio 2005 ("Norme per la protezione dei soggetti malati di malattia celiaca") riconosce questa malattia come malattia sociale e promuove la diagnosi precoce, la prevenzione delle complicanze, l'educazione sanitaria e l'aggiornamento professionale del personale sanitario.

Un'analisi dei dati ematologici relativi ai donatori periodici della provincia di Bergamo, effettuata dall'Associazione Volontari Italiani Sangue (AVIS), ha mostrato come la carenza di ferro costituisca la causa più frequente di sospensione temporanea dalle donazioni. E' noto come ciascuna donazione determini la perdita di 450 mL di sangue, pari a ~200 mL di globuli rossi, con una riduzione della concentrazione di emoglobina pari a 10-15 g/L. In condizioni fisiologiche, tale perdita viene rapidamente compensata attraverso i meccanismi fisiologici di aumentato assorbimento del ferro e aumentata produzione dei globuli rossi. Donatori periodici, che effettuino donazioni frequenti e ravvicinate, possono andare incontro nel tempo a un impoverimento dei depositi marziali (14-16). Tale fenomeno, tuttavia, era in grado di spiegare solo una parte dei casi di anemia e/o ipoferritinemia riscontrati nei donatori periodici della nostra provincia, in particolare in quelli di sesso maschile. Pertanto, essendo nota la relazione tra ridotti depositi di ferro con o senza anemia, malassorbimento intestinale e MC, l'AVIS Provinciale di Bergamo, in collaborazione con gli Ospedali Riuniti, si è fatta promotrice di uno studio volto a valutare l'incidenza della MC tra i ~30.000 donatori periodici che afferiscono alle proprie Unità di Raccolta. Tre gli obiettivi principali dello studio, c'erano la valutazione della presenza di MC in una popolazione asintomatica o paucisintomatica e con bassa probabilità pre-test di malattia e la valutazione dell'impatto che la MC non diagnosticata può avere in relazione a un'eventuale sideropenia del donatore e quindi della prevenzione di tale danno, recuperando alla donazione di sangue intero soggetti ai quali era consentita la sola plasmaferesi.

MATERIALI E METODI

Fase preparatoria

La fase preparatoria dello studio ha richiesto ~18 mesi. E' stato nominato un comitato scientifico con rappresentanti di AVIS e degli Ospedali Riuniti di Bergamo. Si è quindi provveduto alla stesura del progetto dello studio e di tutta la documentazione correlata (scheda informativa, moduli di consenso informato, moduli per la "privacy"). E' stata stesa una convenzione con gli Ospedali Riuniti per l'esecuzione degli esami sierologici e il progetto è stato quindi sottoposto all'approvazione dei comitati etici di AVIS Bergamo e dell'Azienda Socio-Sanitaria di Bergamo.

Ottenuta l'approvazione dello studio, si è dato avvio alla fase organizzativa vera e propria, attraverso la formazione del personale sanitario AVIS, l'informazione ai referenti delle AVIS Comunali e ai donatori; è stata coinvolta anche l'Associazione Italiana Celiachia (AIC). La fase operativa dello studio, di tipo osservazionale, è iniziata a maggio 2010.

Disegno dello studio

Lo screening della MC è stato proposto ai donatori all'atto del prelievo per gli esami annuali, previa acquisizione del Consenso Informato. All'atto dell'adesione, al donatore è stato richiesto di sottoscrivere tre moduli:

- scheda informativa sulla MC e sulla finalità dello screening,
- consenso al prelievo e alla conservazione di una aliquota di siero per eventuali successivi studi,
- consenso ex Dgl 196/03 sulla "privacy" e trattamento dei dati personali.

Una volta raccolta l'adesione, il donatore è stato sottoposto a prelievo e il campione di sangue è stato inviato al Laboratorio Analisi degli Ospedali Riuniti di Bergamo, per lo screening sierologico. E' stata utilizzata la provetta da siero da 7 mL, che in aggiunta alle provette per gli esami di validazione unità di sangue e agli esami annuali, comportava un prelievo totale di sangue di 29,5 mL, conforme al quantitativo massimo consentito per direttive di legge ("Protocolli di accertamento idoneità alla donazione di sangue e emoderivati"). Una volta completato l'iter, il campione è stato rietichettato in forma anonima, contrassegnato unicamente con un codice interno progressivo assegnato al momento dell'ingresso in laboratorio. Le aliquote, due per i campioni negativi e quattro per i campioni positivi a uno o entrambi gli esami effettuati, sono state conservate in congelatore a -80 °C presso l'Unità di Raccolta AVIS.

Esami sierologici

L'algoritmo diagnostico applicato allo studio è illustrato nella Figura 1. Come esame di screening si è utilizzata la determinazione in parallelo di anti-tTG IgA ricombinante umana (Quanta Lite R h-tTG IgA ELISA, Inova) e di anticorpi anti-gliadina deaminata (AGA DGP IgG) sintetici (Anti-Gliadin IgG, DiaMetra). I due esami erano eseguiti simultaneamente su preparatore automatico di micropiastre (Quanta Lyser 160), con metodica immunoenzimatica. I cut-off applicati sono stati rispettivamente 4 U/mL per anti-tTG IgA e 30 UA/mL per AGA DGP IgG, come da indicazione dei produttori.

La ricerca di EMA è stata eseguita come esame di conferma sui donatori positivi a uno o entrambi gli esami di screening, utilizzando la metodica di immunofluorescenza indiretta su terzo distale di esofago di scimmia (Inova) partendo dalla diluizione iniziale di 1:10.

Anti-tTG IgG (ELiA Celikey IgG, ThermoFisher Scientific) sono stati utilizzati per escludere/confermare un eventuale sospetto di MC in soggetti risultati positivi solo ad AGA DGP IgG, l'esame è stato eseguito con metodica fluoroimmunometrica su Immunocap EliA 250, utilizzando un cut-off di 7 U/mL.

La determinazione delle IgA totali è stata effettuata su nefelometro Immage 2000 (Beckman Coulter) solo nei soggetti con positività isolata per AGA DGP IgG, riconfermata su un secondo prelievo effettuato a distanza di almeno 6-8 mesi.

Gli esami endoscopici e le indagini istologiche eseguite sui donatori con sospetto di MC sono stati centralizzati rispettivamente presso l'Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva e l'Unità di Anatomia Patologica degli Ospedali Riuniti di Bergamo, per uniformare le modalità di esecuzione e di interpretazione.

"Counselling" del donatore positivo

Al donatore risultato positivo per anti-tTG IgA, con o senza positività per AGA DGP IgG, ma con EMA positivo, è stata proposta la gastroduodenoscopia (EGDS), nel corso della quale sono state effettuate biopsie multiple della seconda porzione del duodeno (almeno quattro). Una volta effettuata la biopsia e avuta la conferma della diagnosi, il paziente è stato preso in carico dall'Ambulatorio per la Malattia Celiaca dell'Adulto, attivo presso il servizio di Gastroenterologia degli Ospedali Riuniti di Bergamo. Il protocollo stabilito dal Comitato Scientifico prevedeva:

- un "counselling" approfondito sulla malattia,
- il rilascio della certificazione per l'esenzione prevista dalla legge,
- la raccolta di dati clinico-anamnestici e la somministrazione di due questionari standardizzati (sullo stato di benessere psicofisico e sui sintomi gastrointestinali),
- la visita presso il servizio di Dietologia per la formulazione di una dieta aglutinata personalizzata,
- l'esecuzione della mineralografia ossea computerizzata (MOC),
- l'esecuzione di esami ematochimici (emocromo

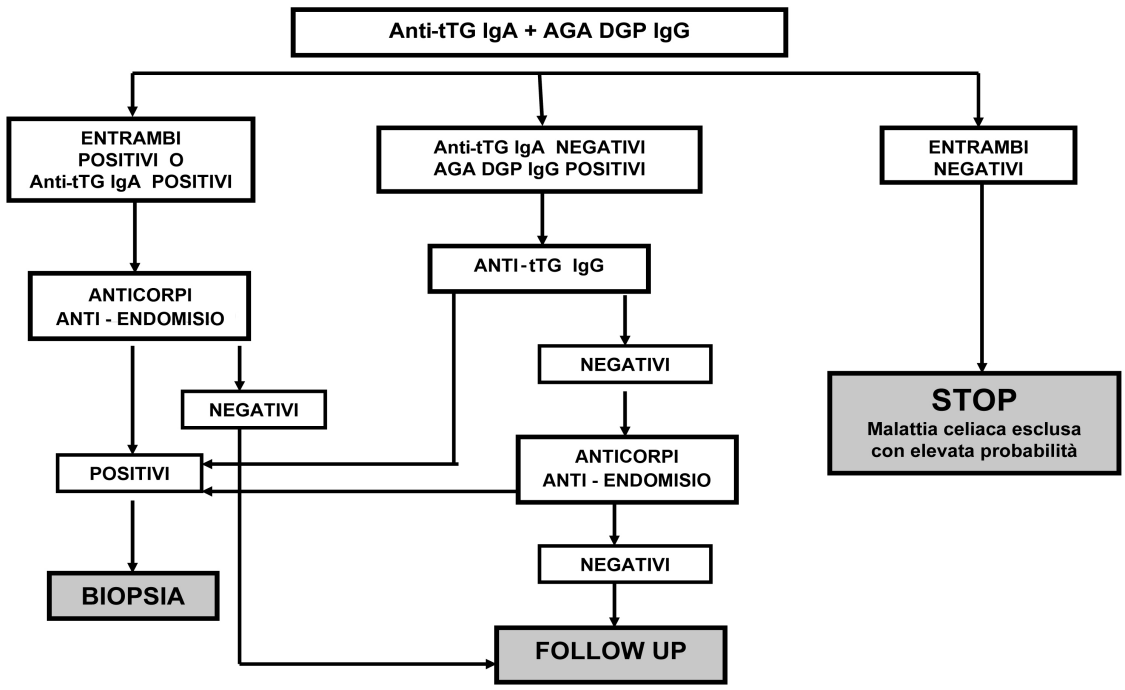


Figura 1
Algoritmo diagnostico applicato allo screening della malattia celiaca nei donatori della provincia di Bergamo.

completo, ferritina, transaminasi, colesterolo totale, trigliceridi, glucosio, vitamina D e B_{12}, folati, paratormone, fosfatasi alcalina ossea, desossipiridinolina urinaria, calcemia, rapporto calcio/creatinina su campione di urina estemporaneo; tireotropina (TSH) "reflex" [con determinazione di triiodotironina libera (FT3) e tiroxina libera (FT4) solo in caso di esito al di fuori dell'intervallo di riferimento], profilo autoanticorpale [anticorpi anti-nucleo (ANA), anticorpi anti-muscolatura liscia (ASMA), anticorpi anti-microsomi epatici e renali (LKM), anticorpi anti-mitocondrio (AMA), anticorpi anti-tiroide],
- lo screening dei familiari di I° grado, effettuato attraverso la determinazione di anti-tTG IgA e delle IgA totali e la ricerca di HLA DQ2-DQ8 (quest'ultimo solo nei soggetti di età <50 anni),
- l'illustrazione delle finalità dell'AIC e delle modalità per eventuali contatti.

Una relazione dettagliata era infine inviata al medico curante al momento della diagnosi.

"Follow-up"

Il primo controllo sierologico dei donatori celiaci per la valutazione della risposta alla dieta aglutinata è stato effettuato dopo 6 mesi e, in caso di persistente positività, dopo 12 mesi dalla diagnosi. Per i successivi controlli, i soggetti sono stati presi in carico dall'Ambulatorio per la Malattia Celiaca dell'Adulto. I soggetti con risultati contradditori (anti tTG IgA positivo/EMA negativo) o positivi solo per AGA DGP IgG sono stati lasciati a dieta libera e sono stati rivalutati successivamente. Per il solo gruppo di donatori con positività isolata di AGA DGP IgG, in caso di successiva riconferma della positività, è stata effettuata anche la determinazione delle IgA totali.

RISULTATI

Al 31 dicembre 2011 sono stati sottoposti a screening sierologico 18.498 donatori, 14.262 maschi e 4236 femmine, con un rapporto M/F di 3,36:1 (età 19-62 anni). 13 donatori (0,07%) hanno rifiutato il consenso allo screening; i motivi della mancata adesione sono stati rispettivamente il timore di doversi sottoporre a endoscopia e il rifiuto preventivo ad aderire alla dieta senza glutine.

18.058 donatori (97,7%) sono risultati negativi allo screening e la presenza di MC è stata esclusa. 440 donatori (2,3%) sono invece risultati positivi a uno o a entrambi gli esami di screening. Tra questi, 76 soggetti (0,4%, 52 uomini e 24 donne, età 20-62 anni) erano positivi per anti-tTG IgA ed EMA; 46 (60%) erano positivi anche per AGA DGP IgG. Un donatore è risultato positivo per AGA DGP IgG e anti-tTG IgG; la determinazione delle IgA totali ha confermato la presenza di un deficit assoluto di IgA. A tutti i donatori di questo gruppo è stato proposto l'EGDS per l'esecuzione della biopsia duodenale; al momento della stesura di questo articolo, un solo paziente si è rifiutato di effettuare l'esame endoscopico e di seguire la dieta senza glutine; degli altri, 58 (76%) hanno completato l'iter diagnostico. La Tabella 1 riassume i risultati dello screening, mentre la Tabella 2 l'esito delle indagini istologiche e la diagnosi finale nei 58 donatori sottoposti a endoscopia.

Per quanto riguarda i questionari somministrati al momento del "counselling", la valutazione è stata necessariamente parziale. La Tabella 3 riporta una sintesi dei principali dati anamnestici e la frequenza dei segni/sintomi presenti al momento della diagnosi. La Tabella 4 illustra le alterazioni ematochimiche e le patologie di nuovo riscontro rilevate attraverso gli accertamenti eseguiti contestualmente alla diagnosi.

Lo screening dei familiari di I° grado è stato effettuato su 189 soggetti; sono risultati positivi allo screening, e successivamente confermati come celiaci, 12 familiari (2 genitori, 4 fratelli, 6 figli).

In 54 donatori (0,3%) si è riscontrata positività di anti-tTG IgA a basso titolo, con EMA e AGA DGP IgG negativo; a tutti questi soggetti è stato proposto il "follow-up" a dieta libera. Al momento della stesura di questo lavoro, solo 7 soggetti di questo gruppo hanno ripetuto gli esami: in 5 casi gli anti-tTG IgA si sono riconfermati positivi a basso titolo, con EMA persistentemente negativo, mentre in due casi si è avuta la negativizzazione. 309 donatori (1,6%) hanno mostrato una positività isolata di AGA DGP IgG e sono risultati negativi alla ricerca di anti-tTG IgG ed EMA. Anche in questo caso, i soggetti sono stati messi in "follow-up" a dieta libera. Al 31 dicembre 2011, 54 donatori avevano ripetuto gli esami sierologici, a distanza variabile tra 8 e 12 mesi dal primo prelievo. In nessun caso si è avuta la negativizzazione di AGA DGP IgG, ma nella quasi totalità dei soggetti si è registrato un incremento del titolo autoanticorpale. Tutti risultavano ancora anti-tTG IgA, IgG ed EMA negativi; la concentrazione delle IgA totali, misurata per escludere in modo definitivo la presenza di un deficit assoluto di IgA, è risultata in ambito fisiologico in tutti i soggetti.

DISCUSSIONE

La percentuale di adesione allo studio è risultata altissima (>99%), in linea con la tradizione che vuole i donatori di sangue particolarmente responsabili e attenti alla loro salute e pertanto disponibili a interventi sanitari di carattere preventivo.

Se nei soggetti di cui non abbiamo ancora a disposizione la biopsia si dovesse confermare la diagnosi, il dato provvisorio di prevalenza della MC risulterebbe essere pari a ~1:250 donatori. Il dato è senz'altro inferiore rispetto a quello indicato per la popolazione generale (4), ma comunque superiore alle attese. Nel valutare la prevalenza bisogna tener conto infatti di una serie di aspetti. Innanzitutto, si tratta di una popolazione prevalentemente di sesso maschile, quando è noto che la malattia colpisce maggiormente il sesso femminile; inoltre, l'età dei soggetti sottoposti a screening esclude un'ampia fascia di popolazione in cui la MC è comunque frequente (4). L'altro elemento importante per la valutazione del dato di prevalenza è che soggetti con malattie autoimmuni, che costituiscono

Tabella 1
Riepilogo dei risultati dello screening della malattia celiaca nei donatori studiati

	n	%
Totale soggetti sottoposti a screening	18.498	100
Mancata adesione	13	0,07
Negativi allo screening	18.058	97,7
Positivi allo screening	440	2,3
- Positivi anti-tTG IgA/EMA	76	0,4
- Positivi AGA DGP IgG/anti-tTG IgG e deficit di IgA	1	0,0
- Positivi solo anti-tTG IgA	54	0,3
- Positivi solo AGA DGP IgG	309	1,6

Tabella 2
Risultati dell'esame istologico su 58 donatori positivi allo screening di malattia celiaca (MC) e con biopsia disponibile

Esito biopsia	Marsh 0	Marsh 1	Marsh 2	Marsh 3		
				3a	3b	3c
	3	3	5	10	10	27
Diagnosi finale di MC	0	3	5		47	

Tabella 3
Principali dati anamnestici, segni e sintomi nei donatori di sangue sottoposti a biopsia e con questionari disponibili (n=49)

	n	%
Dati anamnestici		
Pregressa diagnosi di malattia celiaca (MC) o dermatite erpetiforme (no dieta)	6	12
MC in familiari di I° grado	8	15
MC in familiari di II° grado	8	15
Familiarità per patologie autoimmuni	27	55
Segni e sintomi		
Distensione addominale	34	70
Borborigmi, flatulenza	31	63
Astenia	30	61
Irritabilità, difficoltà di concentrazione	27	55
Ipoferritinemia	27	55
Ridotta consistenza delle feci	20	40
Alterazione stato psicofisico con interferenza sulle normali attività	20	40
Afte ricorrenti	16	32
Disturbi digestivi (rigurgito, crampi, eruttazioni)	16	32
Turbe dell'alvo con aumentato numero di scariche	16	32
Dolore addominale	15	30
Diarrea	13	26
Calo dell'umore, tristezza	13	26
Agitazione	11	22
Cefalea	7	14
Stitichezza	6	12
Ipertransaminasemia inspiegata	5	10
Anemia	4	8
Infertilità, poliabortività	3	6
Poliallergie	3	6
Calo ponderale	3	6
Artrite	2	4

Tabella 4
Alterazioni biochimiche e patologie di nuovo riscontro nei donatori positivi allo screening per malattia celiaca e sottoposti a biopsia (n=58)

	n	%
Alterazioni biochimiche		
Carenza/Insufficienza vitamina D	26	44
Carenza di vitamina B_{12}	-	-
Carenza di folati	6	1
Presenza di autoanticorpi (no tiroide)	15	26
Presenza di anticorpi anti-tiroide	6	10
Alterazione ormone tireotropo	5	8
Riduzione concentrazioni calcio sierico	-	-
Riduzione concentrazioni calcio urinario	9	15
Paratormone aumentato	18	31
Alterazioni desossipiridinolina urinaria	10	17
Alterazioni fosfati alcalina ossea	6	10
Patologie di nuovo riscontro		
Tiroidite autoimmune	5	8
Infezione da *Helicobacter pylori*	4	7
Mineralografia ossea (su 34 disponibili)		
Normale	10	29
Normale con riduzione contenuto di calcio	7	20
Osteopenia	14	42
Osteoporosi	3	9

un noto fattore di rischio per la MC, non possono donare sangue in base a quanto stabilito dal Protocollo per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti (Ministero della Salute, Decreto 3 marzo 2005). Analogamente, soggetti con anemia o ipertransaminasemia cronica (due tra i segni di più frequente riscontro al momento della diagnosi di MC) vengono in genere esclusi dalla donazione.

A tutti i 76 donatori risultati positivi per anti-tTG IgA ed EMA è stato chiesto di sottoporsi a endoscopia; uno solo ha rifiutato l'esame, dichiarando che in ogni caso non avrebbe seguito la dieta priva di glutine. L'alta adesione a proseguire l'iter diagnostico con un esame invasivo e generalmente poco gradito non era affatto scontata; infatti, la quasi totalità dei soggetti al momento della diagnosi dichiarava di trovarsi in stato di assoluto benessere e negava la presenza di sintomi.

In 52 su 58 soggetti (86%) di cui era disponibile l'esame istologico, la diagnosi di MC è stata posta in seguito al riscontro di un danno della mucosa duodenale fortemente suggestivo per MC (Marsh ≥2); in tre casi il danno era limitato (Marsh 1) ma la presenza di segni/sintomi suggestivi, abbinati agli alti livelli di autoanticorpi e alla risposta alla dieta aglutinata, hanno consentito di porre comunque la diagnosi di MC. Per i tre donatori con biopsia normale si è deciso di proseguire la dieta libera e di procedere a una successiva rivalutazione sierologica e clinica, sulla base della quale si deciderà per l'eventuale ripetizione della biopsia.

34 donatori celiaci hanno già effettuato i controlli a sei mesi; in tutti i casi si è avuta una risposta alla dieta aglutinata con significativa riduzione dei titoli autoanticorpali e, ove presente, della sintomatologia; in 14 casi la completa negativizzazione ha già consentito la riammissione alle donazioni.

Alcune interessanti considerazioni emergono anche dalla valutazione dei dati anamnestici. Dall'analisi della storia familiare e personale risulta evidente come una parte significativa dei donatori risultati celiaci avrebbe potuto ricevere una diagnosi più precoce se solo si fossero tenute in giusta considerazione le notizie relative all'anamnesi. Il caso più eclatante riguarda i sei soggetti che avevano già avuto una diagnosi di MC o di dermatite erpetiforme in epoca precedente (in tre casi in età infantile): tutti erano a dieta libera al momento dello screening, a seguito di indicazioni errate fornite dai curanti o da medici specialisti, pur in presenza di esami istologici a suffragio della diagnosi. Ancora, tra gli otto donatori con familiari di I° grado affetti da MC già nota, solo due erano stati sottoposti a screening al momento della diagnosi nel familiare, senza peraltro ricevere alcuna indicazione circa l'opportunità di ripetere lo screening successivamente, e in ogni caso alla comparsa di segni e/o sintomi suggestivi per MC; negli altri sei lo screening non era stato nemmeno effettuato. Anche gli otto donatori con familiari di II° grado affetti da

MC e i 27 con familiari affetti da malattie autoimmuni non avevano mai ricevuto alcuna informazione circa l'aumentato rischio di sviluppare MC e quindi sull'utilità di uno screening sierologico in caso di comparsa di segni e/o sintomi potenzialmente riconducibili alla presenza di MC. Tali segni e/o sintomi erano già presenti al momento della diagnosi nella maggior parte di questi soggetti e, in associazione al dato anamnestico, avrebbero potuto far scattare le indagini di screening in epoca antecedente il nostro studio.

Si è già detto come la quasi totalità dei donatori con MC confermata negasse la presenza di sintomi al momento della diagnosi; queste dichiarazioni sono state successivamente smentite dalla compilazione dei questionari, che hanno evidenziato l'assenza di segni e sintomi, sia gastrointestinali che extraintestinali, solo nel 10% dei soggetti. Evidentemente i sintomi presenti non erano percepiti come significativi dal paziente o tali da dover richiedere l'intervento del medico di famiglia: infatti, dal questionario anamnestico è emerso come nessuno dei donatori con MC si fosse rivolto al curante o avesse fatto accertamenti strumentali e/o ematochimici o avesse subito ricoveri nell'anno precedente lo screening. I sintomi lamentati con maggior frequenza sono risultati essere la distensione addominale associata alla presenza di borborigmi e a flatulenza; una parte dei donatori celiaci lamentava dolore addominale. Più della metà dei soggetti presentava astenia, generalmente presente da mesi e spesso associata a irritabilità e difficoltà di concentrazione; in tre casi le alterazioni dello stato psichico configuravano una vera e propria sindrome ansioso-depressiva. Nonostante questo, e nonostante il 40% dei soggetti dichiarasse che l'astenia e/o le alterazioni dello stato psicofisico avessero interferito con le normali attività fisiche e di relazione, alla domanda su come giudicassero il proprio stato di salute la quasi totalità rispondeva con definizioni che andavano da "buona" a "ottima". Un discreto numero di donatori riferiva afte buccali ricorrenti e disturbi digestivi.

Come già discusso in precedenza, la bassa frequenza di ipertransaminasemia, presente nel 10% di soggetti, e di anemia, riscontrata solo nel 8% dei casi, appare giustificata dal fatto che questo tipo di alterazioni ematochimiche escludono dall'idoneità alla donazione, se presenti al momento dell'arruolamento del donatore. Tra i donatori con MC, il 75% aveva comunque nello storico un riscontro di sideropenia o modesta anemia sideropenica e per tale motivo era stato avviato alla donazione in aferesi. Nonostante questo, il 55% di questi aveva ancora ipoferritinemia al momento della diagnosi. L'evidenza che tre dei quattro donatori celiaci con anemia e la maggior parte di quelli con ipoferritinemia fossero uomini, conferma come la presenza di queste alterazioni nel donatore maschio dovrebbe sempre suggerire la ricerca di una causa di anemia e/o ipoferritinemia diversa dalla riduzione dei depositi di ferro conseguente alle ripetute donazioni.

Per quanto riguarda gli accertamenti svolti al momento della diagnosi, una carenza di vitamina D era riscontrata nel 44% dei donatori affetti da MC, mentre solo 1% aveva carenza di folati e nessuno mostrava bassi livelli di vitamina B_{12}. Il paratormone era aumentato nel 31% dei casi e nel 15% si riscontrava una severa ipocalciuria, ma nessuno presentava alterazione delle concentrazioni della calcemia .

Autoanticorpi, in genere ANA a basso titolo, sono stati riscontrati nel 26% dei soggetti celiaci e nel 10% erano presenti anticorpi anti-tiroide; in 5 casi (8%) questi erano associati ad alterazione del TSH e degli ormoni tiroidei, consentendo di porre diagnosi di tiroidite autoimmune, fino a quel momento ignorata. In 14 (42%) dei 34 donatori di cui era disponibile il dato della MOC è stata riscontrata una osteopatia severa e in 3 (5%) un quadro di vera e propria osteoporosi. In generale, appare utile sottolineare come, oltre all'indubbio merito di aver diagnosticato la MC in soggetti (compresi i familiari) fino a quel momento ignari della presenza della malattia, gli accertamenti messi in atto al momento della diagnosi hanno consentito di diagnosticare altre patologie, che pure non avevano dato alcun segno della loro presenza.

Per il gruppo di donatori con positività isolata per anti-tTG IgA a basso titolo, il "follow-up" proseguirà nel tempo. In caso di incremento dei titoli autoanticorpali o di comparsa di positività per EMA, si procederà suggerendo la biopsia duodenale dopo valutazione dei dati clinici e anamnestici, eventualmente supportati dalla presenza o meno di HLA di suscettibilità.

309 soggetti, pari al 1,6% del totale dei donatori sottoposti a screening, sono risultati positivi per AGA DGP IgG, ma EMA e anti-tTG IgG negativi, con esclusione quindi sia di una ipotetica falsa negatività di anti-tTG IgA che di un possibile deficit di IgA totali. Ai donatori di questo gruppo è stato suggerito di ripetere lo screening a distanza di almeno sei mesi, continuando la normale alimentazione. Al momento attuale, dei 54 donatori che hanno ripetuto gli esami nessuno ha negativizzato gli autoanticorpi; cinque donatori hanno mostrato una riduzione del titolo, mentre in tutti gli altri questo è risultato incrementato con persistente negatività agli altri esami (EMA e anti-tTG IgA e IgG). La disponibilità di kit allestiti con quello che sembra essere il vero antigene scatenante la risposta autoanticorpale a livello della sottomuncosa intestinale – la gliadina deaminata dall'azione della transglutaminasi – ha fatto parlare di "resurrezione" degli AGA, ormai considerati obsoleti (17). La gliadina deaminata dalla transglutaminasi tissutale gioca infatti un ruolo centrale nella patogenesi della MC, possedendo un'elevata affinità per le molecole HLA DQ2 e DQ8 e rappresentando l'autoantigene responsabile della stimolazione dei linfociti B, con produzione di anticorpi contro i peptidi deaminati. Numerosi studi hanno dimostrato come gli anticorpi anti-peptidi deaminati della gliadina, e in particolare l'isotipo IgG, siano dotati di modesta sensibilità, ma elevata specificità per MC, potendo comparire in una fase precoce della malattia (18-20). Inoltre, recenti studi hanno evidenziato come lo screening effettuato associando AGA DGP IgG e anti-tTG IgA avrebbe una sensibilità quasi assoluta nell'individuare i soggetti affetti dalla malattia (18, 21). Infine, AGA DGP

IgG si è rivelato un esame utile anche nello screening dei soggetti con deficit assoluto di IgA (22). La scelta dal comitato scientifico di utilizzare per lo screening dei donatori di sangue l'associazione dei due esami è scaturita proprio da queste considerazioni. La riconferma a distanza di tempo della positività a un esame altamente specifico come AGA DGP IgG, quasi sempre con un titolo autoanticorpale aumentato, suscita interesse. Di conseguenza, è nostra intenzione approfondire la conoscenza delle caratteristiche di questi soggetti, integrando gli esami già eseguiti con la determinazione di HLA DQ2-DQ8 e con AGA DGP IgA. Sulla base dei risultati e delle informazioni clinico-anamnestiche che verranno raccolte nei prossimi mesi, si valuterà se e a quali di questi soggetti proporre la biopsia duodenale.

CONCLUSIONI

Nonostante i risultati qui presentati siano parziali, gli spunti di interesse sono molteplici e riguardano sia i dati epidemiologici che quelli sierologici, istologici e clinico-anamnestici. Da un lato, c'è l'utilità di aver fatto emergere una parte significativa dell'"iceberg celiaco" in una popolazione adulta, come quella dei donatori di sangue, considerata "sana" per definizione. I dati raccolti ci dicono come solo il 10% dei soggetti diagnosticati come celiaci fossero effettivamente asintomatici e come in molti casi una valutazione più accorta dell'anamnesi familiare e personale avrebbe potuto consentire una diagnosi più precoce. Questo studio riconferma come la sorveglianza sanitaria, la conoscenza di fattori di rischio, segni, sintomi e condizioni cliniche associate rappresentino l'unico strumento atto a garantire una diagnosi precoce di MC in soggetti pauci o asintomatici, con ricadute importanti sulla qualità della vita individuale e sull'economia sanitaria.

I risultati di questo lavoro, se confermati, potrebbero avere delle ricadute significative anche sul mondo della donazione di sangue, con particolare riguardo all'utilità dello screening per MC sia al momento dell'arruolamento del donatore che, successivamente, a cadenze periodiche; protocolli specifici potrebbero essere definiti per monitorare la presenza di MC nei donatori con sideropenia e/o anemia non giustificate dalla frequenza delle donazioni. Infine, la possibilità di seguire i soggetti di potenziale interesse – non solo quelli con MC accertata, ma anche quelli con positività sierologica a un singolo esame o con sierologia dubbia – consentirà di trarre utili informazioni anche sul ruolo diagnostico e prognostico dei marcatori utilizzati.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per la preziosa collaborazione Rita Mattia, responsabile amministrativa del Laboratorio Analisi, e tutti i tecnici che hanno contribuito alla gestione della fase pre e postanalitica dello studio. Lo studio è stato interamente finanziato da AVIS Bergamo. Si ringraziano inoltre Diametra srl, Instrumentation Laboratories, ThermoFisher, Medical Systems, Siemens e DiaSorin per il supporto fornito.

BIBLIOGRAFIA

1. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement Celiac Disease, June 28-30, 2004. Gastroenterology 2005;128:S1-9.
2. Catassi C, Fabiani E, Ratsh IM, et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for celiac disease in school-age subjects. Acta Pediatric Suppl 1996;412:29-35.
3. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. Ann Med 2010;42:587-95.
4. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations and treatment. Int Rev Immunol 2011;30:219-31.
5. Cranney A, Rostom A, Sy R, et al. Consequences of testing for celiac disease. Gastroenterology 2005;128:S109-20.
6. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. Lancet 1994;343:200-3.
7. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. Gastroenterology 2001;120:636-51.
8. Guidelines 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 2005;40:1-19.
9. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, et al. Linee guida per la diagnosi di laboratorio e istologica della malattia celiaca. RIMeL/IJLaM 2005;2:110-22.
10. Conferenza Permanente Stato, Regioni e Provincie Autonome. Documento di inquadramento per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia e relative patologie associate. Gazzetta Ufficiale, 7 Febbraio 2008, n 32.
11. Van Meensel B, Hiele M, Hoffman I, et al. Diagnostic accuracy of ten second-generation (human) tissue transglutaminase antibody assay in celiac disease. Clin Chem 2004;50:2125-35.
12. Marsh MN, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. Baillieres Clin Gastroenterol 1995;9:273-93.
13. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999;11:1185-94.
14. Simon TL, Garry PJ, Hooper EM. Iron stores in blood donors. JAMA 1981;245:2038-43.
15. Grazzini G, Marchionne A, Tofanelli G. Studio della ferritina sierica in una popolazione di donatori di sangue periodici. La Trasfusione del sangue 1984;29:313-6.
16. Bertola F, Busato MG, Cazzavillan M. Trattamento con ferro solfato di donatrici di sangue ferro-carenti. La Trasfusione del sangue 2000;45:110-4.
17. Kaukinen K, Collin P, Laurila K, et al. Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. Scand J Gastroenterol 2007;42:1428-33.
18. Sugai E, Vazquez H, Nachman F, et al. Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-peptides in celiac disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4:1112-7.
19. Volta U, Granito A, Fiorini E, et al. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. Dig Dis Sci 2008;53:1582-8.
20. Lewis NR, Scott BB. Meta-analysis: deamidated gliadin

peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for celiac disease. Aliment Pharmacol Ther 2010;31:73-81.
21. Niveloni S, Sugai E, Cabanne A, et al. Antibodies against synthetic deamidated gliadin peptides as predictor as celiac disease: prospective assessment in an adult population with a high pre-test probability of disease. Clin Chem 2007;53:2186-92.
22. Villalta D, Alessio MG, Tampoia M, et al. A comparison of the diagnostic accuracy of 9 IgG anti-tissue transglutaminase, 1 IgG anti-gliadin and 1 IgG anti-deaminated gliadin peptide antibody assay. Clin Chim Acta 2007;382:95-9.