

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE

Polo Universitario S. Paolo

SCUOLA DI DOTTORATO

Scienze Biochimiche, Nutrizionali e Metaboliche

CORSO DI DOTTORATO

Fisiopatologia, Farmacologia, Clinica e Terapia delle Malattie Metaboliche

Ciclo XXV

**STUDIO DEI DISTURBI GASTROINTESTINALI
NEI BAMBINI AFFETTI
DA DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO**

Dott.ssa Benedetta OLIVARI

Matricola R08837

TUTOR Chiar.mo Prof. Carlo Lenti

COORDINATORE DEL DOTTORATO Chiar. mo Prof. Alfredo Gorio

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1.0 INTRODUZIONE

- 1.1 Il contesto scientifico: introduzione alla problematica.....p. 4**
- 1.2 Rilevanza del problema.....p. 5**
- 1.3 Argomentazioni.....p. 7**

2.0 AUTISMO E DISTURBI DELLO SPETTRO

- 2.1 Epidemiologia dell'autismo e dei disturbi dello spettro autistico.....p. 9**
- 2.2 Ipotesi eziopatogenetiche dell'autismo.....p. 10**
 - 2.2.1 Gli aspetti biologici
 - 2.2.2 Alterazioni funzionali
 - 2.2.3 Alterazioni morfostrutturali
 - 2.2.4 Alterazioni genetiche
 - 2.2.5 Alterazioni biochimiche
 - 2.2.6 Disordini immunologici ed allergie alimentari

3.0 DISTURBI GASTROENTEROLOGICI NELL'AUTISMO

- 3.1 Evidenze storiche e più recentip. 16**
- 3.2 Il movimento DAN!.....p. 17**
- 3.3 Enterocolite autistica: un'entità clinica in discussionep. 18**
 - 3.3.1 Descrizione clinica
- 3.4 La dieta senza glutine e caseina.....p. 21**
- 3.5 Integratori alimentari ed uso di enzimip. 21**

4.0 OBIETTIVI DELLO STUDIO.....p. 23

5.0 MATERIALI E METODI

- 5.1 Fasi del progetto.....p. 25**
 - 5.1.1 Prima fase: ricerca e validazione del protocollo diagnostico
 - 5.1.2 Seconda fase: somministrazione del protocollo (stima dell'incidenza e arruolamento di due gruppi di pazienti)
 - 5.1.3 Terza fase: esecuzione dei test di permeabilità e di flogosi intestinale
 - 5.1.4 Quarta fase: confronto dei dati clinici con quelli di laboratorio

5.1.5 Quinta fase: impostazione di interventi terapeutici e monitoraggio	
5.2 Protocollo diagnostico	p. 34
6.0 RISULTATI	
6.1 Risultati della Fase I: definizione del protocollo diagnostico	p. 37
6.2 Risultati della Fase II	p. 41
6.2.1 Stima dell'incidenza dei disturbi gastrointestinali	
6.2.2 Arruolamento dei casi e dei controlli	
6.3 Risultati della Fase III	p.48
6.3.1 Esecuzione del Calprest	
6.3.2 Esecuzione del Test di Permeabilità Lattulosio-Mannitolo	
6.4 Risultati della Fase IV	p.49
6.4.1 Analisi statistica	
6.4.2 Correlazione tra CF e IPT	
6.5 Risultati della fase V	p.51
7.0 DISCUSSIONE	
7.1 Rilevanza dei disturbi gastrointestinali nel campione	p. 53
7.2 Possibile interferenza della selettività alimentare e degli aspetti nutrizionali	p. 54
7.3 Calprest e Test di Permeabilità Intestinale	p. 55
7.4 Limitazioni dello studio	p. 57
7.5 Conclusioni generali e prospettive future	p. 58
8.0 BIBLIOGRAFIA	p. 61

1.0 INTRODUZIONE

1.1 Il contesto scientifico: introduzione alla problematica

L'autismo è un disturbo cognitivo e comportamentale che generalmente si manifesta nei primi tre anni di vita ed è caratterizzato da una compromissione grave e generalizzata in diverse aree dello sviluppo: compromissione della socializzazione, della comunicazione verbale e non verbale, dell'attività immaginativa e presenza di modalità di comportamento ristrette e ripetitive.

Rappresenta un capitolo molto complesso e dibattuto, soprattutto sul piano eziopatogenetico.

Viene riconosciuta all'autismo una genesi multifattoriale con una rilevante componente genetica ed ambientale, tuttavia la sua patogenesi non è ancora sufficientemente conosciuta.

Sebbene non siano presenti tra i criteri diagnostici, vi sono nella recente letteratura molte segnalazioni relative alla presenza di sintomi gastrointestinali nei bambini autistici [1-3] con una prevalenza che può variare, secondo le diverse statistiche, da una frequenza pressoché normale rispetto alla popolazione generale fino alla quasi totalità dei pazienti (dal 9 fino all'84%) [4, 5].

Già nel 1961 Asperger ipotizzò un possibile legame tra l'autismo e la celiachia [6]; successivamente Goodwin mise in evidenza segni e sintomi di malassorbimento [7] e Walker-Smith e Andrews riportarono bassi livelli di α -1 antitripsina [8] nei bambini autistici.

Nel 1979 Panksepp formulò una teoria neurochimica dell'autismo secondo la quale l'elevata concentrazione ematica ed encefalica dei peptidi presenti in alcuni cibi (come la caseina, l'orzo, la segale e l'avena), secondaria ad un incompleto catabolismo ed un eccessivo assorbimento, potesse esercitare un effetto simil-oppioido a livello del sistema nervoso centrale [9].

Reichelt e Shattock suggerirono che tali peptidi intestinali potessero, direttamente o tramite la formazione di ligandi, portare ad una alterazione della neuroregolazione e dello sviluppo cerebrale [10, 11].

Nel 1993 Murch e collaboratori ipotizzarono che un deficit dei sistemi di fenil-sulfur-trasferasi a livello della parete intestinale potesse portare ad un incremento della permeabilità intestinale ai peptidi alimentari con effetti sia sull'infiammazione intestinale che sulle disfunzioni neuropsichiatriche [12].

Nel 1998 Wakefield pubblicò un articolo in cui descriveva la presenza, in un campione di bambini autistici, di un'iperplasia nodulare linfoide a livello ileale e una colite aspecifica (l'autore parlò di "enterocolite autistica") e ne ipotizzava un possibile causa scatenante ambientale [13], come ad esempio il vaccino contro il morbillo, la parotite e la rosolia (MPR); successivamente la presenza di

un'associazione tra l'autismo e il vaccino MPR fu studiata da altri autori che però esclusero l'esistenza di una correlazione [14-18].

Nel 2009 Campbell riportò che una variante funzionale del promotore del gene che codifica per il fattore di transizione mesenchimo-epiteliale (MET) risulterebbe associata ai disturbi dello spettro autistico e che un'alterazione nel segnale del MET [19] potrebbe contribuire al rischio, per gli autistici, di sviluppare una disfunzione gastrointestinale familiare. Questo studio è il primo a dimostrare una possibile causa genetica alla base dell'associazione tra autismo e disturbi gastrointestinali.

Per quanto riguarda la realtà italiana, vanno segnalati gli studi condotti a partire dal 2000 da un gruppo di ricerca di Torino [20-23] con l'iniziale intento di verificare la presenza della malattia intestinale nei soggetti autistici italiani.

I risultati finora ottenuti, seppur su un campione non sufficientemente omogeneo, sembrano essere importanti ed incoraggianti e possono essere così riassunti:

- 1) circa il 50% dei 250 pazienti giunti all'osservazione presentava aspetti clinici o sintomatici suggestivi per patologia intestinale;
 - 2) più del 50% dei 30 pazienti esaminati con tecniche endoscopiche e biotiche ha mostrato la presenza di una malattia intestinale rilevabile endoscopicamente;
 - 3) in circa il 75% di questi 30 pazienti, si sono rilevate lesioni microscopiche del tratto gastroenterico con le biopsie intestinali su mucosa apparentemente normale;
 - 4) in un sottogruppo di pazienti a cui è stata proposta una terapia farmacologica per l'infiammazione intestinale (adattata in base al grado istologico di infiammazione e alla sede intestinale di malattia) insieme ad una dieta senza glutine e caseina, si sono evidenziati importanti miglioramenti sia dal punto di vista gastroenterologico (in termini di riduzione/scomparsa dei sintomi clinici e di regressione endoscopica ed istologica della malattia intestinale) che da quello neuropsichiatrico (riduzione dei sintomi comportamentali disfunzionali e miglioramento dell'attenzione e del sonno).
- Alcuni studi, infine, stanno concentrando l'attenzione sulla presenza di un fattore di predisposizione genetica della alterata permeabilità intestinale, studiandola attraverso il test di permeabilità intestinale nei pazienti autistici e nei loro familiari di primo grado [24].

1.2 Rilevanza della problema

L'autismo, e più in generale i Disturbi Generalizzati dello Sviluppo (altrimenti detti "dello spettro autistico"), hanno un impatto sociale e sanitario enorme per il drammatico aumento del numero di soggetti affetti nei paesi più industrializzati emerso negli ultimi anni. Si è passati infatti da una

prevalenza di 1:5000 negli anni '80 fino all'allarmante stima americana di 1:150 di oggi, non riconducibile soltanto ad una migliore capacità diagnostica o di diagnosi precoce, come sottolineato in numerosi studi epidemiologici [25].

Mentre da un punto di vista neurologico l'autismo è caratterizzato da disturbi qualitativi nelle interazioni sociali, difetti nella comunicazione verbale e non-verbale con particolari aspetti comportamentali ripetitivi e peculiari stereotipie, non ci sono dati concordanti al riguardo dei sintomi gastrointestinali associati.

Questa discordanza è presumibilmente dovuta in parte alle difficoltà interpretative o di comunicazione da parte dei pazienti, soprattutto nei bambini più piccoli, in parte al fatto che per molti anni i sintomi gastrointestinali, non previsti tra i criteri diagnostici, non sono stati ricercati in modo sistematico e secondo un metodo rigoroso o a volte, qualora notati, correlati a stereotipie o a comportamenti propri dell'autismo.

I sintomi clinici possono essere di entità e frequenza estremamente variabile senza una vera e propria correlazione con gli indici infiammatori o i marcatori ematici od istologici, così come già avviene anche per le altre malattie infiammatorie croniche dell'apparato digerente.

Nello specifico, i più comuni sono: stipsi, diarrea con steatorrea e segni macroscopici di malassorbimento, alvo alternato con stipsi/diarrea, disbiosi intestinale per gli aerobi ed anaerobi, distensione addominale, insufficienza enzimatica digestiva, reflusso gastroesofageo, vomito alimentare, dolore addominale, megarecto, magrezza patologica con riduzione della massa magra, scarso accrescimento ponderale.

Vi sono inoltre alcune condizioni cliniche (posizioni antalgiche addominali peculiari, posizione evacuativa atipica con aumentato torchio addominale) od abitudini alimentari peculiari (anoressia/selezione dei cibi per consistenza, elevata introduzione di liquidi, autoriduzione di latticini e/o carboidrati) per le quali va valutata attentamente la genesi gastroenterologica rispetto a quella neuropsichiatria.

Sebbene esistano pochi studi in letteratura sui tentativi di trattamento farmacologico dell'eziologia dell'autismo, da molti anni è di uso comune, da parte di molti genitori - con aneddoto, ma importante beneficio - l'esclusione del glutine e della caseina dalla dieta dei loro figli sulla base di segnalazioni in letteratura riguardanti l'eccessiva presenza di sostanze di origine digestiva in grado di interagire a livello del sistema nervoso centrale di questi soggetti. Tale trattamento consiste nell'esclusione dei cibi da cui originerebbero la β -caseomorfinina e β -gliadomorfinina, sostanze ad azione oppioide in grado di passare la barriera ematoencefalica ed interagire con il sistema di neurotrasmissione centrale.

Gli studi che hanno indicato la presenza di una patologia infiammatoria cronica intestinale insieme ad un'alterata permeabilità intestinale precedentemente descritta, confermerebbero, da un punto di vista patogenetico, l'efficacia della terapia dietetica segnalata in questi soggetti. D'altra parte, non essendo ancora disponibili in letteratura studi controllati sull'efficacia della terapia farmacologica e dietetica sull' "enterocolite autistica" e di conseguenza sull'autismo, l'impiego di farmaci non convenzionali e l'utilizzo di diete specifiche costituisce un'importante problematica terapeutica.

1.3 Argomentazioni

Affrontare la problematica dell'autismo nella sua molteplicità è molto complesso. Si tratta, infatti, di un capitolo vasto sia dal punto di vista strettamente neuropsichiatrico che da quello medico più generale poiché le problematiche cliniche e di gestione che i pazienti affetti da tale patologia comportano sono numerose.

Nella pratica clinica, ci troviamo, come neuropsichiatri, a dover fronteggiare una grossa richiesta che viene dal "basso", dalle famiglie, da chi cioè deve gestire quotidianamente una patologia a eziopatogenesi parzialmente sconosciuta e senza terapie risolutive. I genitori, da soli o attraverso le associazioni, reclamano risposte da parte degli specialisti sull'efficacia di cure innovative, intraprese in altri paesi, di cui vengono a conoscenza attraverso i sistemi di comunicazione. Spesso queste informazioni giungono ai genitori dei nostri pazienti in modo dirompente ed accattivante; qualsiasi possibilità viene lecitamente vissuta come provvedimento potenzialmente efficace e quindi da provare al di fuori di ogni controllo medico-sanitario. Vi sono genitori che dedicano le proprie risorse economiche, lavorative e familiari non solo alla gestione del figlio, ma anche alla ricerca continua e spasmodica di risoluzioni valide.

Senza voler avvallare ogni informazione o nuova proposta, riteniamo che sia doveroso rispondere in modo scientifico alle nuove esigenze delle famiglie coinvolte da questa patologia.

E' necessario riuscire a consolidare le conoscenze sugli aspetti fisiopatologici emergenti correlati all'asse infiammatorio/immunologico tra intestino e sistema nervoso centrale.

I bambini con nuova diagnosi dovrebbero venire studiati per la possibile compresenza di una malattia intestinale, indagando la presenza dei sintomi gastrointestinali sottostanti sia con lo screening eziologico standard alla diagnosi sia successivamente in presenza di sintomi emergenti.

Sarebbe utile promuovere una campagna di sensibilizzazione per il riconoscimento precoce dei sintomi gastrointestinali da parte dei pediatri di base e dei neuropsichiatri.

Sarebbe altresì importante promuovere studi clinici su larga scala volti a confermare l'efficacia della dieta senza glutine e caseina e ad approfondire il ruolo terapeutico degli integratori alimentari già proposti o in uso in molti centri di ricerca americana, ma senza dati solidi pubblicati.

Questo progetto vorrebbe portare un contributo alla semplificazione di un aspetto problematico dell'autismo. L'obiettivo può sembrare riduttivo rispetto alla complessità di tale patologia, ma riteniamo che qualsiasi approccio diagnostico e terapeutico che porti ad un miglioramento anche minimo sia molto importante in questi pazienti che così potranno trarre più vantaggio dalle terapie riabilitative già disponibili.

2.0 AUTISMO E DISTURBI DELLO SPETTRO

2.1 Epidemiologia dell'autismo e dei disturbi dello spettro

Nonostante sia ormai condiviso che l'Autismo Infantile rappresenta una sindrome comportamentale causata da un disordine dello sviluppo biologicamente determinato [Linee Guida SINPIA 26], non essendo ancora chiaro quale esso sia, la diagnosi si avvale di criteri comportamentali riportati dalle principali classificazioni internazionali [DSM IV e ICD 10, 27-28].

L'Autismo è incluso nel gruppo dei "Disturbi Pervasivi dello Sviluppo (DPS)" secondo il DSM IV, o delle "Sindromi da alterazione globale dello sviluppo psicologico" secondo l'ICD 10. Queste definizioni raccolgono diverse categorie diagnostiche che si caratterizzano per l'insorgenza precoce e per la compromissione grave e generalizzata di diverse aree dello sviluppo psicologico del bambino e si presentano con:

- menomazione qualitativa nell'interazione sociale reciproca
- menomazione qualitativa nella comunicazione verbale e non verbale e nell'attività immaginativa
- marcata limitazione del repertorio di attività e di interessi

La nomenclatura adottata dalle principali classificazioni internazionali specifica che le alterazioni presenti in queste patologie coinvolgono diverse aree di funzionamento e compromettono il normale sviluppo del bambino, distorcendolo.

L'Autismo non presenta prevalenze geografiche e/o etniche in quanto è stato descritto in tutte le popolazioni del mondo, di ogni razza o ambiente sociale. Presenta invece una prevalenza di sesso, in quanto colpisce i maschi in misura da 3 a 4 volte superiore rispetto alle femmine [29].

Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente dibattito ed ad un fiorire di studi epidemiologici per determinare la reale incidenza dell'Autismo e dei Disturbi dello Spettro Autistico. Una recente pubblicazione situa in maniera allarmante la prevalenza dei Disturbi dello Spettro Autistico a circa l'65:10000 della popolazione infantile [30].

Analisi italiane controbilanciano questo dato e situano i DPS allo 7,2:10000 nella popolazione di 0-18 anni della Regione Piemonte [31]. In ogni caso, vi è accordo in letteratura sul fatto che si sia assistito negli anni ad un aumento dell'incidenza, come Fombonne conferma in diverse pubblicazioni [32-33].

L'analisi condotta da Fombonne [32] del trend in UK in un intervallo di 24 anni (dal 1973 al 1997 suddividendo in 5 gruppi di anni) permette di riconoscere come negli anni si sia assistito ad un crescere di diagnosi di casi di Autismo con migliore funzionamento intellettuale e con una maggior proporzione di casi maschili. L'autore considera che quest'aumento possa essere dovuto a diversi

fattori quali un miglioramento delle capacità di diagnosi ed un allargamento dei criteri diagnostici, un aumento della diagnosi di Disturbi dello Spettro Autistico rispetto alla diminuzione di quella di Ritardo Mentale e, infine, un effettivo incremento della prevalenza, le cui cause però rimangono per lo più sconosciute.

In realtà, una recente metanalisi degli studi di prevalenza ha mostrato una grande eterogeneità nelle stime di prevalenza dell'Autismo Tipico e dei Disturbi dello Spettro Autistico e ne ha attribuito nel 61% dei casi le cause ad una differenza nei criteri diagnostici (DSMIV/ICD10/altro), nell'età di screening e nella regione geografica [34]. L'eterogeneità dei processi diagnostici nella pratica clinica e dell'età di diagnosi erano state peraltro rilevate già in altri studi [35].

2.2 Ipotesi eziopatogenetiche dell'autismo

Leo Kanner, psichiatra infantile, nel 1943, è il primo ad utilizzare il termine di “autismo” per indicare una specifica sindrome da lui osservata in 11 bambini, sindrome che chiamò “autismo precoce infantile” e che ancora oggi, nella sua forma più classica, porta il suo nome. Nelle sue prime osservazioni descrisse dettagliatamente alcune peculiarità dell'autismo e per la prima volta venne così definito un gruppo di soggetti affetti da una sindrome particolare. Inizialmente Kanner aveva ipotizzato un'innata incapacità a comunicare quale causa del comportamento di chiusura; in seguito, l'analisi delle famiglie indusse Kanner ad ipotizzare che alla base dell'autismo dei figli vi fosse il comportamento dei genitori, ma in seguito egli ritrattò queste ipotesi.

Hans Asperger, quasi contemporaneamente, ma indipendentemente, utilizzò il termine di “autistischen psychopathen” [36]. per definire un disturbo che interessava una determinata popolazione infantile con sintomatologia in gran parte simile a quella descritta da Kanner per i suoi soggetti, ma con capacità cognitive nettamente superiori. Asperger ipotizzò che alla base vi fosse un disturbo del contatto a livello altrettanto profondo dell'affetto e/o dell'istinto. Nel ventennio successivo alle osservazioni di Kanner, anche grazie all'impostazione teorica di quest'ultimo, furono le teorie psichodinamiche il principale punto di riferimento nello studio dell'autismo. Bettelheim [37] fu uno dei primi autori ad interessarsi a quest'argomento, sviluppando il concetto di “madre frigorifero” per descrivere un tipo di rapporto caratterizzato da carenza di contatto fisico, pratiche alimentari anomale, difficoltà nel linguaggio e/o del contatto oculare con il figlio; l'autismo risulterebbe in quest'ottica un meccanismo di difesa.

Pur restando sempre alla base del modello psichodinamico, questo concetto subì delle modifiche in relazione ai sempre crescenti indizi che sembravano implicare un substrato biologico nella sindrome. Il primo autore a sostenere in modo sistematico che la causa della sindrome autistica non

fossero i genitori ma che il disturbo avesse una base organica è stato Rimland [38]: per l'autore infatti l'autismo era causato da alterazioni morfologiche e funzionali a base organica. Ne scaturì l'approccio "organicista" che cercava di individuare alterazioni organiche alla base della sindrome. Nonostante la varietà di elementi raccolti congruenti con quest'ipotesi, non ne è stato ancora isolato uno in particolare che possa essere considerato come caratteristico di tutte le forme di autismo, tanto che attualmente si è portati a credere che non esista un unico autismo ma che in questa categoria siano invece comprese diverse patologie e manifestazioni sintomatiche, provocate da diverse cause organiche.

E' comunque ormai condiviso che l'autismo è una sindrome comportamentale causata da un disordine dello sviluppo biologicamente determinato, non ancora noto e il cui esordio avviene molto precocemente. L'autismo sarebbe causato da un disordine dello sviluppo del Sistema Nervoso Centrale la cui origine potrebbe risiedere in diversi fattori [39].

2.2.1 Gli aspetti biologici

In quasi mezzo secolo di ricerche si sono susseguiti accesi dibattiti ma ancora oggi l'origine e lo sviluppo patogenetico dell'autismo non sono noti, anche se si concorda ormai sull'idea di una multifattorialità di cause psico-neuro-biologiche.

Alterazioni organiche sono state riscontrate solo in una piccola percentuale di casi (poco più del 10% circa). In alcuni casi il disturbo autistico è stato infatti ricondotto ad una malattia organica, quali per esempio l'X Fragile, la Sclerosi Tuberosa, la Fenilchetonuria e la Rosolia intrauterina [40]. Gli unici dati biochimici che sono stati confermati su numerosi soggetti affetti da autismo sono l'iperserotoninemia [41] e l'alterazione dei peptidi urinari [42], pur essendo quest'ultima probabilmente più frequente nei soggetti del Nord America e del Nord Europa.

2.2.2 Alterazioni funzionali

La maggior parte delle ricerche che riportano dati relativi all'Elettroencefalografia di soggetti affetti da autismo hanno riscontrato una maggiore frequenza di anomalie del tracciato elettroencefalografico (EEG) con un rallentamento focale, punte e scariche parossistiche punta-onda [43]. Tuttavia le ricerche effettuate non hanno permesso di individuare caratteristiche significative generalizzabili.

Insufficienza di modulazione centrale

Un'ipotesi suggestiva risiede nella Teoria dell'insufficienza di modulazione centrale. I disturbi legati alla comunicazione ed all'interazione sarebbero in realtà secondari ad un deficit in alcune funzioni di base come l'attenzione, la percezione, l'intenzione, l'imitazione, il contatto. Tale deficit può essere evidenziato già nei primi anni di vita del bambino, prima che compaiano i sintomi classici dell'autismo. Alla base vi sarebbe un'alterazione dello sviluppo delle strutture del sistema nervoso centrale preposte alla filtrazione e alla modulazione sensoriale, emotiva e posturo-motoria, nel tempo e nello spazio. Gli studi neuropsicologici a conferma di questa teoria hanno dimostrato l'esistenza di difficoltà sensoriali di base e complesse [44].

Più recentemente i ricercatori si sono orientati verso l'ipotesi di difetti di interconnettività cerebrale, comprovata da numerosi studi neurofunzionali [45].

Neuroni specchio

La scoperta dei neuroni specchio da parte di Rizzolatti [46] nella corteccia parietale laterale inferiore e la loro implicazione nei meccanismi dell'apprendimento e dell'empatia (attivazione riflessa per azioni motorie ma anche per espressioni facciali e per sensazioni) e gli studi che sono stati condotti successivamente su soggetti affetti da autismo ad alto funzionamento sia attraverso la RMN encefalica funzionale [47] sia attraverso tecniche di elettroencefalografia [48] permettono di ipotizzare un deficit di funzionamento dei neuroni specchio nell'autismo e di spiegare in questo modo la caratteristica carenza di imitazione e di empatia, offrendo un modello interpretativo della sindrome altamente affascinante che richiede di essere ulteriormente confermato e compreso.

2.2.3 Alterazioni morfostrutturali

Gli studi effettuati di TAC e RMN riportano risultati diversi e contrastanti. E' stata ipotizzata un'alterazione del cervelletto, riscontrabile in un'ipoplasia del verme posteriore a carico dei lobi VI e VII [49]. Altre ricerche hanno messo in evidenza delle anomalie dell'ippocampo e dell'amigdala, attribuendo al sistema limbico un'importante implicazione nei casi di autismo [50]. E' stata messa in evidenza nelle persone affette da autismo la presenza ridotta di cellule di Purkinje [51-52], inibitori della produzione di serotonina, i cui livelli ematici sono spesso aumentati in questi soggetti [53-54].

Altre ipotesi sostengono che l'autismo sia dovuto ad anomalie disembrionogenetiche nello sviluppo del tronco cerebrale, con riduzione volumetriche di quest'ultimo [55-56]. L'interesse per le regioni rostrali del cervello è stato sostenuto da altre evidenze scientifiche, quali l'analisi delle risposte

autonome e vestibolari nelle ricerche di Ornitz [57] e i risultati contraddittori degli studi con i Potenziali Evocati Acustici del Tronco Cerebrale.

Il dato più costante dal punto di vista fenotipico nell'autismo è la macrocefalia, che rientra per lo più in un quadro di macrosomia e a cui non è stato però finora possibile abbinare alcun significato eziopatogenetico certo se non una correlazione statistica con disordini familiari disimmunologici ed allergologici [58].

2.2.4 Alterazioni genetiche

Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una familiarità per l'autismo, con ricorrenza in un familiare di primo grado dal 2 al 8% [59] che, associata all'evidenza di una maggiore incidenza nei soggetti di genere maschile e all'alta percentuale di ricorrenza nei gemelli monozigoti [60], ha permesso di ipotizzare una base genetica. Questa è sostenuta anche dall'evidenza di malattie genetiche la cui presentazione clinica può avvenire attraverso quadri comportamentali che rientrano nella diagnosi di autismo, quali la Fenilchetonuria, la Sclerosi Tuberosa, l'X fragile e la Neurofibromatosi 1.

Gli studi finora condotti hanno evidenziato anomalie varie e localizzate in diversi cromosomi, permettendo di supporre che siano implicati più geni, verosimilmente diffusi nella popolazione normale e che hanno di per se stessi un effetto debole. Il modello proposto è quello di una malattia a determinismo multifattoriale in cui le alterazioni mono/poligeniche, che stabiliscono una predisposizione genetica, interagiscono con i fattori ambientali e danno luogo a diverse espressioni fenotipiche che si situano su un continuum nell'ambito degli ASD. Esiste inoltre una frequenza significativa di antecedenti di disturbi cognitivi o del linguaggio nei fratelli o nelle sorelle di soggetti affetti da autismo [61], a confermare la presenza di una predisposizione genetica familiare sulla quale agiscono successivamente o contemporaneamente fattori esterni ambientali [62].

Negli ultimi anni i filoni della ricerca genetica si sono orientati verso l'analisi delle aberrazioni cromosomiche (5-10% dell'autismo; cromosomi più implicati: braccio lungo del cromosoma 15 e cromosomi X e Y) e verso gli studi sistematici sul genoma (studi di linkage su familiari di I grado: SIB PAIR TESTS, trovate localizzazioni su più della metà dei cromosomi, non sempre confermate dagli studi successivi). I risultati raggiunti sono stati finora deludenti per il riscontro di numerose mutazioni di incerto significato e poco riprodotte, accanto ad un 90% circa di soggetti affetti da autismo per i quali non è stata riscontrata alcuna alterazione genetica conosciuta. Spinti anche dalle nuove conoscenze circa l'importanza dell'epigenetica e dell'interazione con i fattori ambientali più in generale, i ricercatori si sono orientati verso un approccio genomico. Si cerca infatti di

individuare profili genetici che, interagendo con fattori ambientali, danno luogo a determinati fenotipi, ipotizzando meccanismi patogenetici complessi che entrano in gioco nell'embriogenesi, ma non solo, e che si esprimono a livello di molteplici apparati quali il SNC ma anche il sistema immunitario e l'apparato gastrointestinale [63-64].

2.2.5 Alterazioni biochimiche

Si suppone che anomalie quantitative o qualitative a livello recettoriale o nei neurotrasmettitori attivi nel sistema fronto-striatale possano essere coinvolte nel determinismo dell'autismo. In diversi casi è stata infatti documentata un'iperserotoninemia; in altri studi è stata evidenziata una disfunzione a carico del sistema dopaminergico [65-66].

Disfunzioni mitocondriali e stress ossidativo

Particolare attenzione è stata posta al riscontro di anomalie genetiche a carico del trasportatore per l'aspartato-gluttammato situato nei mitocondri [67].

Un'alterata conformazione di questo trasportatore a livello mitocondriale, infatti, potrebbe essere la causa di ipercalcemia e di elevati stress ossidativi che si esprimono a livello di molteplici apparati. Le malattie mitocondriali, infatti, si stanno rivelando sempre più complesse e variegate, sempre meno neuromuscolari ma sistemiche, con meccanismi di trasmissione genetica particolari e a bassa penetranza, potendo fornire un affascinante modello eziopatogenetico per il disturbo autistico.

Stress ossidativi insieme a deficit funzionali di enzimi antiossidanti nel sangue sono stati infatti documentati nei soggetti affetti da autismo [68-70]. E' stato possibile, tra l'altro, evidenziare una maggiore frequenza rispetto alla popolazione normale nei soggetti affetti da autismo e nei loro familiari di polimorfismi a carico della metiltetraidrofoloreduttasi (MHTFR) e di altri geni deputati alla metilazione [70].

La teoria degli oppioidi

Un'altra serie di studi suggerisce la presenza di elevati livelli di oppioidi nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) dei bambini affetti da autismo, che riflettono un'insufficiente digestione delle proteine del glutine, della gliadina e della caseina [71].

L'aumentata permeabilità intestinale riportata nei soggetti affetti da autismo [72] sarebbe alla base di un anomalo assorbimento dei peptidi derivati dalla caseina quali le caseomorfine [73] e dal glutine e dalla gliadina, quali le gluteomorfine [74] che hanno un effetto oppioide. Anomalie dei peptidi urinari sono state infatti confermate da diversi studi [75-79] e peptidi oppioide-simili sono

stati ritrovati nei soggetti affetti da autismo nelle urine, nel siero e nel liquido cefalorachidiano [80-81]. E' stato inoltre dimostrato che tali oppioidi possono interessare il SNC [82-85] inibendone la maturazione [86] e modulando i sistemi dei neurotrasmettitori, specialmente le monoamine [77].

Questo corredo sintomatologico e biochimico starebbe ad identificare nuovamente un gruppo fenotipico caratteristico di alcuni soggetti affetti da Autismo Infantile [58].

2.2.6 Disordini immunologici ed allergie alimentari

Molti bambini affetti da autismo soffrono di ricorrenti infezioni che coinvolgono soprattutto le alte vie aeree e si esprimono con otiti ed ipertrofia adeno-tonsillare. Disordini immunologici sono stati documentati in diversi studi [87-90]. I profili immunologici rivelano un significativo aumento nel numero e nella proporzione di citochine infiammatorie che stimolano la produzione di CD3+linfociti nella mucosa intestinale e nel sangue periferico [91]. E' stata dimostrata inoltre una riduzione significativa di IgA [92]. Disordini autoimmuni sono comuni nei soggetti affetti da autismo [93]. Connolly et al. [94] hanno esaminato il siero dei soggetti affetti da autismo alla ricerca di specifici anticorpi IgG e IgM diretti verso il tessuto cerebrale che sono risultati aumentati nei soggetti affetti da autismo a differenza dei controlli. Ciò è stato confermato da altri autori anche con anticorpi diretti verso il nucleo caudato, la corteccia cerebrale e il cervelletto [95]. Non è chiaro se questi autoanticorpi siano responsabili di disordini neurologici o se siano una conseguenza di un danno al SNC di altra origine.

Vi è un'opinione diffusa infine che vi siano allergie alimentari che giocano un ruolo importante nella patofisiologia dell'autismo. Sono stati dimostrati alti livelli di IgA, IgG e IgM specifici verso proteine alimentari quali la lactoglobulina, la caseina e la β lactoglobulina rispetto a soggetti di controllo [96]. Ciononostante non è stata dimostrata un'ipersensibilità IgE mediata ai test standard cutanei. Un altro studio condotto da Jyonouchi ha mostrato come i soggetti affetti da autismo avessero livelli intestinali aumentati di citochine infiammatorie dirette verso specifiche proteine alimentari rispetto ai controlli [97].

3.0 DISTURBI GASTROENTEROLOGICI NELL'AUTISMO

3.1 Evidenze storiche e più recenti

Per molti anni sono stati descritti disturbi gastrointestinali nell'autismo che colpiscono dal 10% al 50% dei pazienti [98], ma che sono stati generalmente sottovalutati o attribuiti a disfunzioni comportamentali o sensoriali associate al disturbo.

Già Asperger aveva descritto una possibile relazione tra il disturbo celiaco e i disordini psichiatrici nell'infanzia [6] e Dohan scriveva nel 1968 [99] come “Soddy gli avesse scritto di aver notato che ricorrenti disturbi gastrointestinali fossero una costante caratteristica dei bambini affetti da autismo e che, tra gli altri sintomi, il bambino artistico deteriorato presentasse un'acuta diarrea”.

Nel 1971 Goodwin [7] riportava la presenza di feci voluminose, maleodoranti e poco consistenti o di diarrea intermittente in un gruppo di 6 pazienti affetti da autismo.

Nel 1972 Walker-Smith e Andrews [8] hanno riportato basse concentrazioni di alpha-1-antitripsina nei bambini con Autismo Infantile, un indice di perdita proteica intestinale. D'Eufemia [72] ha dimostrato un'alterata permeabilità intestinale anche in soggetti affetti da Autismo Infantile non sintomatici per disturbi gastrointestinali, il che farebbe supporre che buona parte dei disturbi siano sottostimati, anche a causa dell'elevata soglia al dolore e delle difficoltà comunicative tipiche di questi pazienti [100].

L'alterata permeabilità intestinale nei soggetti affetti da Autismo Infantile è stata confermata da altri autori [4].

In una sistematica analisi di 385 pazienti con disturbo dello spettro autistico Melmed e Schneider hanno identificato sintomi gastrointestinali clinicamente rilevanti nel 46% dei casi confrontati con il 10% dei 97 controlli appartenenti alla popolazione pediatrica normale [101].

Il reflusso gastroesofageo (RGE) sembra inoltre rappresentare il disturbo gastroenterico più frequentemente diagnosticato nei soggetti affetti da Autismo Infantile [102]. L'autore ha infatti analizzato il tratto gastrointestinale superiore di 36 bambini affetti da Autismo Infantile che presentavano diarrea cronica, meteorismo e distensione addominale e ha riconosciuto la presenza di esofagite da reflusso di grado I e II in 25 pazienti (69%), gastriti croniche in 15 pazienti (42%) e duodeniti croniche con iperplasia delle cellule di Paneth in 24 pazienti (67%). L'attività enzimatica digestiva era ridotta in 21 pazienti (58%) e la secrezione pancreatica rispondeva all'infusione di secretina in 27 pazienti (75%).

Sono state inoltre descritte anomalie a carico della flora batterica intestinale dei soggetti con diagnosi dello spettro autistico, con un'incidenza maggiore rispetto ai casi controllo di batteri appartenenti al gruppo del *Clostridium Histolyticum* (cluster I e II) [103].

Bolte ha ipotizzato un ruolo neurotossico nell'autismo a carico della disbiosi intestinale causata dal *Clostridium* [104]. Parallelamente, alcuni autori hanno riportato miglioramenti comportamentali in seguito al trattamento con vancomicina di 11 bambini che presentavano autismo regressivo, ipotizzando un'azione neurotossica del *clostridium difficile* insorta dopo terapia antibiotica a largo spettro [105].

Sono state proposte terapie sistematiche con antifungini, quali la nistatina, e probiotici sulla base dell'ipotesi che i bambini con autismo siano soggetti a crescita intestinale eccessiva di funghi o per un'immunodeficienza o per un pregresso eccessivo uso di antibiotici e lo sviluppo di una "leaky gut syndrome" o sindrome dell'intestino permeabile e di una tossicità diretta da parte dei prodotti fungini. La banca dati ARI [106] raccoglie giudizi dei genitori su miglioramento, peggioramento o nessun effetto di varie terapie sul comportamento autistico: per la nistatina si riportano 791 casi con il 5% di casi peggiorati e il 47% dei casi migliorati (rapporto migliorati/peggiore = 9.5); per il fluconazolo 215 casi trattati e rapporto 7,3. Limitazioni dietetiche, precisamente di carboidrati e frutta, avrebbero anch'esse un'azione antimicotica.

3.2 Il movimento DAN!

Sulla base di queste osservazioni, ma soprattutto nell'intento di riempire il vuoto lasciato dalla medicina ufficiale che non riconosce una causa eziologia all'autismo se non nel 10% dei casi non potendo quindi offrire terapie efficaci, hanno preso piede negli ultimi anni terapie alternative basate sull'ipotesi che alla base dell'autismo vi sia un'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali suscettibili di terapia.

Molti promotori di quest'approccio si identificano con un movimento chiamato "DAN!" che significa "*Defeat Autism Now!*" ispirato da Bernard Rimland, psicologo e genitore, fondatore di ARI. I fautori del DAN! rifiutano peraltro l'approccio classico delle sperimentazioni cliniche controllate che considerano non etiche nel caso di un disturbo così pervasivo e accettano come dato positivo la soddisfazione o l'insoddisfazione dei genitori. In nome di questo approccio c'è spazio per una molteplicità di proposte (integratori alimentari, chelanti dei metalli pesanti, diete prive di latte e glutine e per alcuni anche zuccheri, antimicotici, disinfettanti intestinali e probiotici).

In realtà, il rifiuto da parte dei seguaci del DAN! di sottoporre a verifica oggettiva le ipotesi di lavoro che da queste sperimentazioni non controllate potrebbero derivare rischia di bruciare anche

eventuali buone intuizioni impedendo ogni sereno dialogo e lasciando i genitori nella difficilissima posizione di dover decidere il miglior trattamento per il proprio bambino sulla base del passaparola.

3.3 Enterocolite autistica: un'entità clinica in discussione

Nel 1998 Wakefield ha per la prima volta ha dimostrato in un gruppo di pazienti affetti da autismo regressivo la presenza di una malattia infiammatoria cronica intestinale che combina un disturbo della motilità (reflusso gastroesofageo con stipsi alternata a diarrea) ed un'infiammazione con aumento della permeabilità intestinale. Tale patologia è stata denominata "Enterocolite Autistica" ed è caratterizzata da iperplasia nodulare linfoide (LNH) e da ileocolite cronica [2].

Nel 2002 Wakefield [107] ha pubblicato un nuovo studio effettuato su 60 soggetti in età evolutiva affetti da ASD in cui ha dimostrato la presenza statisticamente significativa dell'LNH, rispetto ai risultati di soggetti sani e di soggetti affetti da rettocolite ulcerosa che presentavano LNH in minor misura, in maniera peraltro indipendente dall'età; nello studio inoltre è descritto un "proforma" istopatologico che propone un'interpretazione qualitativa a partire da un'analisi quantitativa, permettendo così di confrontare il profilo istopatologico con quello di altri quadri diagnostici.

Studi immunohistochimici hanno dimostrato la tipicità della malattia a carico dell'intestino con un infiltrato di macrofagi e cellule che esprimono gli antigeni di classe II [108] e un infiltrato di $\gamma\delta$ -linfociti T e CD8+linfociti T in eccesso, con danno a carico dell'epitelio [109] rispetto a controlli sani o appartenenti ad altre patologie.

Studi a carico del piccolo intestino hanno indicato allo stesso modo una risposta immunopatologica cellulo-mediata atipica [110]. Le caratteristiche della patologia, tra cui l'LNH e il deposito di immunocomplessi sulla membrana basolaterale del duodeno, sono stati considerati suggestivi di una patologia autoimmune [111]. E' stato inoltre dimostrato un alto grado di correlazione tra la calprotectina fecale e il grado di infiltrazione neutrofila nella mucosa del colon nei bambini affetti da Autismo Infantile [112].

Successivamente, è stato dimostrato a livello immunohistochimico un interessamento analogo del tratto superiore gastrointestinale [113] come è stato confermato a livello macroscopico mediante l'utilizzo della videocapsula [114].

Per le sue caratteristiche, è stata riconosciuta una somiglianza con le IBD (Inflammatory Bowel Diseases), ipotizzando una possibile evoluzione in Rettocolite Ulcerosa o Morbo di Chron [4 e 115]. Altri autori hanno riconosciuto alcune similitudini su base immunohistochimica con il Morbo Celiaco e le allergie alimentari non IgE-mediate [116].

L'ipotesi inizialmente presentata da Wakefield era che l'Enterocolite autistica fosse un'inflammatione immunomediata e che tra i possibili triggers dell'autoimmunità ci fosse l'antigene del vaccino del morbillo. L'interazione tra intestino e cervello avverrebbe attraverso sostanze neurotossiche provocate da prodotti di degradazione di sostanze alimentari o da prodotti del catabolismo della flora intestinale, che nella cirrosi sono neurotossici a causa del difetto del filtro epatico e nell'autismo lo sarebbero per l'alterata permeabilità intestinale. Questo spiegherebbe la "regressione" comportamentale di quei bambini con autismo regressivo e rientrerebbe pertanto in quella componente ambientale che è chiamata in causa a spiegare l'autismo.

L'ipotesi di una correlazione con la vaccinazione antimorbillo è stata smentita da numerose pubblicazioni condotte anche dagli autori stessi che hanno ritrattato quanto inizialmente pubblicato [12, 16, 117-120]. Molti autori hanno smentito inoltre la possibilità di riconoscere un'entità infiammatoria cronica intestinale specifica per l'autismo, riportando inoltre che l'Iperplasia Nodulare Linfoide (NHL) sostenuta da Wakefield come marchio macroscopico specifico non sia in realtà di per sé patologica, quanto molto frequente soprattutto in soggetti giovani [121-126].

E' altresì vero che non è mai stato effettuato a tal fine un controllo su soggetti sani ed è stato invece dimostrato che l'NHL è caratteristica di bambini con sanguinamento gastroenterico [127]), allergie alimentari [128]) e più in generale di pazienti con difetti immunitari e infezioni microbiche persistenti [129-132].

Nell'articolo del 2002 Wakefield [107] riportava come grazie alla terapia antinfiammatoria basata sui 5aminosalicilati e/o alla dieta priva di glutine e caseina vi fosse una risoluzione della stitichezza. A livello italiano negli ultimi anni ci sono stati alcuni riconoscimenti. In una recente delibera, infatti, la Regione Marche ha riconosciuto "l'erogazione dei prodotti dietetici destinati ad una alimentazione particolare e posta a carico del Servizio Sanitario Nazionale in base al D.M. 8/6/2001 ("Assistenza sanitaria integrativa relativa ai prodotti destinati ad una alimentazione particolare") per le persone affette da malattie metaboliche congenite, fibrosi cistica e morbo celiaco. Di fatto la condizione di enterocolite autistica è del tutto assimilabile a tali condizioni morbose".

3.3.1 Descrizione clinica

Tra gli autori che accettano l'ipotesi dell'Enterocolite Autistica, vi è ormai una certa condivisione di osservazioni, in primo luogo cliniche.

In un sottogruppo di bambini con Autismo Infantile è stata riconosciuta infatti la presenza di un corredo sintomatologico gastroenterologico che include: disturbi dell'alvo, in particolare stipsi cronica, dolore addominale, flatulenza e RGE associato a frequenti risvegli notturni. Altre volte è

riferita diarrea o da alvo alterno. Le feci sono spesso molto voluminose e possono avere caratteristiche di malassorbimento (feci chiare, spugnose, con presenza di cibi indigeriti), anche con la presenza di muco.

Dal punto di vista generale, si osserva magrezza, ipotrofia della masse muscolari.

Agli esami si rileva un'anemia sideropenica e sangue occulto nelle feci oltre ad anomalie delle caratteristiche chimico-fisiche delle feci quali la presenza di amidi indigeriti.

I bambini spesso manifestano particolarità del comportamento quali autoaggressività, crisi di rabbia improvvise e posizioni ricorrenti “antalgiche” che esercitano una pressione sull'addome [4, 111] oppure posizioni evacuative particolari che sono state ricondotte alla sintomatologia gastroenterica (“torchio addominale”, defecazione in piedi; vedi *Figura 1*). Le difficoltà evacuative possono spiegarsi per la presenza di una mega-ampolla rettale che è stata peraltro documentata [133] e spesso si associano ad un'acquisizione tardiva del controllo sfinterico. Si possono ritrovare inoltre disturbo del sonno caratterizzato da risvegli frequenti in associazione o meno a RGE e, quasi sistematicamente, disturbo dell'alimentazione con estrema selettività alimentare a favore generalmente di carboidrati (pane, pasta, patate), spesso con comportamenti di abbuffata e rifiuto di altri cibi, tra cui i latticini/formaggi. Reazioni comportamentali abnormi all'ingestione di alcuni cibi, specie latticini, sono state infatti riportate da diversi genitori.

I bambini con questo quadro sintomatologico spesso intraprendono già a casa una dieta senza glutine e caseina che, da quanto riferito dai genitori, riesce a migliorare la sintomatologia gastroenterica (spesso si risolve la diarrea e subentra la stipsi o viceversa) e il disturbo del sonno e a mitigare la selettività alimentare permettendo l'introduzione di altri cibi, quali verdure e frutta.

Figura 1. “Torchio addominale” e “Distensione addominale”



3.4 La dieta senza glutine e caseina

Sono sempre più numerose le segnalazioni da parte dei genitori di soggetti con autismo circa i miglioramenti clinici in seguito all'introduzione della dieta priva di glutine e caseina.

Diversi studi hanno confermato i miglioramenti riferiti [134-144].

Come già detto in precedenza, alla base dei miglioramenti potrebbe esistere, da una parte, un'allergia alimentare a questi prodotti e, dall'altra, un ruolo tossico degli oppioidi derivati dal metabolismo del glutine e della caseina (gliadomorfina e β caseomorfina) che sarebbero anormalmente permeabili alla mucosa intestinale [11].

Uno studio controllato in cieco ha dimostrato un miglioramento significativamente migliore nel gruppo di soggetti affetti da autismo in dieta senza glutine e caseina per 1 anno, confrontato con un gruppo di controllo di soggetti affetti da autismo, appaiati, non in dieta. In particolare si sono osservati significativi miglioramenti nelle aree dell'attenzione, dei fattori sociali ed emozionali, dei fattori comunicativi, cognitivi e senso-motori; inoltre si è osservato una significativa riduzione del comportamento autistico che non si è osservato nel gruppo controllo e un aumento significativamente migliore dei punteggi cognitivi non verbali alla Scala Leiter che potrebbero essere conseguenti ad una migliore prestazionalità attentiva [135].

La Cochrane Collaboration [145] ha condotto recentemente un'analisi delle pubblicazioni sull'argomento concludendo che non ci sono attualmente evidenze sufficienti per consigliare una terapia dietetica nell'autismo; tuttavia, tenendo conto di una sperimentazione controllata su piccolo gruppo di bambini con risultati positivi su uno dei quattro outcome testati (i tratti autistici) e della popolarità dell'ipotesi dietetica tra i genitori (in alcune nazioni fino al 30% dei bambini autistici sono stati messi a dieta), consiglia di iniziare sperimentazioni serie su questo tema [146].

Anche il National Institute of Health degli USA sta conducendo ricerche in questo senso.

3.5 Integratori alimentari ed uso di enzimi

Diversi studi hanno considerato l'introduzione di integratori alimentari ed enzimi al fine di ottenere un miglioramento clinico dei pazienti affetti da ASD.

Gli studi sull'efficacia della terapia con Secretina nei pazienti affetti da Autismo nel modificare il comportamento hanno mostrato risultati contraddittori, nonostante gli iniziali successi [147]. L'ormone era stato infatti introdotto al fine di agire come neuromediatore sul SNC in quanto capace di superare la BEE e al contempo di ridurre la sintomatologia del RGE. Dopo diverse pubblicazioni che hanno negato l'effetto positivo della secretina [148], alcuni autori hanno proposto in un articolo

del 2005 che l'ormone possa effettivamente risultare efficace nel migliorare il comportamento di un sottogruppo di pazienti con autismo ad alto funzionamento ed RGE, ipotizzano trattamenti mirati a pazienti clinicamente riconducibili a quello presentato [149].

Sulla base della teoria degli oppioidi e delle evidenze circa i disturbi digestivi con alterazione della flora intestinale nei soggetti affetti da ASD, sono stati inoltre proposti e sperimentati protocolli di integrazione di enzimi alimentari, in particolare enzimi proteolitici.

Uno studio condotto da Brudnak [150] ha visto l'utilizzo sperimentale di un complesso enzimatico costituito da enzimi proteolitici insieme al Galattoso, impiegato, quest'ultimo, nella speranza di una doppia azione, quella di indurre l'espressione genica per la Dipeptidil-peptidasi IV e quella di favorire la proliferazione della flora intestinale. Trattati per 12 settimane, i soggetti con ASD hanno mostrato un miglioramento clinico che si è espresso su diversi fronti ma che è stato maggiore per la socializzazione e l'iperattività con un miglioramento rispettivo del 90% e dell'80%. Non era stato però tenuto conto della dieta senza glutine e caseina che alcuni pazienti già sostenevano ed inoltre gli autori stessi riconoscono che vi è stato un alto tasso di abbandono anche causato da un'iniziale reazione avversa all'introduzione di enzimi, con insorgenza di aggressività, iperattività, alterazioni dell'alvo, aumento dell'appetito o inappetenza.

E' peraltro stato riportato a livello aneddótico da molti genitori come anche con l'introduzione della dieta senza glutine e caseina spesso si osservano inizialmente reazioni di questo tipo che in seguito scompaiono con il proseguire della dieta.

4.0 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il presente progetto origina dalla riflessione sulla recente letteratura riguardante sia l'aumentata incidenza dell'autismo che il riconoscimento di un'interazione tra intestino e sistema nervoso centrale nei pazienti autistici.

Dai dati in nostro possesso, anche se spesso discordanti tra loro, deduciamo come vi possano essere importanti implicazioni clinico-terapeutiche in presenza di una maggiore conoscenza della patologia gastrointestinale e del suo coinvolgimento immunopatologico cerebrale nei sintomi comportamentali dei pazienti affetti da autismo.

Avendo a che fare nella pratica clinica con molti bambini affetti da tale patologia, di entità estremamente variabile e che tende a presentarsi ad età sempre inferiori, è nostro interesse approfondire al meglio ogni ipotesi che possa avere una ricaduta clinico-terapeutica, oltre che scientifica, importante.

In effetti, molti dei pazienti giunti alla nostra osservazione nel corso degli anni, presentavano sintomi generici ascrivibili alla sfera gastrointestinale, soprattutto nei termini di difficoltà allo svezzamento e di selettività alimentare, ma non ci è mai stato possibile classificarli in maniera sistematica.

Riteniamo prioritario, al fine di impostare un progetto di verifica e di approfondimento dell'associazione esistente tra autismo e disturbi gastrointestinali, una collaborazione interdisciplinare che ci porti a confrontarci dal punto di vista diagnostico e successivamente terapeutico, con colleghi pediatri (i primi, spesso, a visitare bambini a rischio non ancora diagnosticati e a raccogliere le preoccupazioni dei genitori, anche relative alla sfera somatica), gastroenterologi (con i quali condividere i dubbi specifici ed impostare gli approfondimenti più idonei) e nutrizionisti (specialisti in grado di impostare al meglio eventuali interventi dietetici, tenendo conto anche della selettività alimentare che spesso già condiziona l'apporto alimentare di molti piccoli pazienti).

Ci siamo posti i seguenti obiettivi:

- 1) giungere all'individuazione e alla classificazione sistematica della presenza dei disturbi gastrointestinali dei bambini che vengono diagnosticati nel nostro ambulatorio dei "Disturbi pervasivi dello Sviluppo" e di quelli già seguiti dal punto di vista riabilitativo-terapeutico presso il Centro per la Diagnosi e la Cura dell'Autismo e dei Disturbi Generalizzati dello Sviluppo della Clinica di Neuropsichiatria Infantile dell'Ospedale San Paolo di Milano.

- 2) Valutare l'esistenza di una correlazione tra i dati clinici (presenza di sintomatologia gastroenterologica) e grado di alterazione ai test di laboratorio (Calprest, Test di Permeabilità Intestinale).
- 3) Individuare, sulla base dei dati emersi, possibili modelli di trattamento specifici e precoci.

5.0 MATERIALI E METODI

5.1 Fasi del progetto

Il progetto impostato preliminarmente prevedeva l'articolazione in cinque fasi suscettibili di modifiche qualora la ricerca ci avesse portato a cambiamenti nella realizzazione del progetto iniziale.

Si sono in effetti rese necessarie delle modifiche, alcune individuate sulla base del confronto in equipe, altre determinate da problematiche ed esigenze cliniche evidenziatesi in itinere.

5.1.1 Prima fase: ricerca e validazione del protocollo diagnostico

Questa prima fase ha previsto il confronto con i colleghi gastroenterologi pediatri in merito alla definizione e validazione di un protocollo diagnostico definitivo che consentisse la valutazione dei disturbi gastroenterici secondo un elenco di items per i quali è stata precisata una corrispondenza terminologica e clinica.

5.1.2 Seconda fase: somministrazione del protocollo (stima dell'incidenza e arruolamento di due gruppi di pazienti)

In seguito alla validazione teorica del protocollo, come primo step è stata effettuata una stima dell'incidenza statistica dei diversi disturbi gastrointestinali nei bambini del nostro campione.

Ci eravamo posti l'obiettivo iniziale di verificare l'incidenza statistica di tali disturbi in un campione di almeno 30 pazienti di età compresa tra i 2 e i 18 anni.

Abbiamo successivamente deciso di raccogliere i dati di un campione più ampio: ci è sembrato un obiettivo perseguibile in un anno di tempo quello di ottenere i dati relativi ad almeno 100 pazienti.

Il secondo step di questa fase prevede di proseguire con l'arruolamento dei pazienti da sottoporre all'intero protocollo.

Ci siamo proposti di raccogliere i dati di almeno 25 pazienti con disturbi gastrointestinali (casi) e di confrontarli con almeno 25 pazienti senza alcun disturbo inerente la sfera gastrointestinale (controlli).

5.1.3 Terza fase: esecuzione dei test di permeabilità e di flogosi intestinale

La terza fase del progetto originario prevedeva che i pazienti entrati nella sperimentazione venissero sottoposti a due test: il test di permeabilità intestinale lattulosio-mannitolo e il dosaggio della calprotectina fecale (indice di flogosi intestinale).

Test della permeabilità intestinale lattulosio-mannitolo

Si tratta di un test non invasivo, di semplice esecuzione e basso costo e serve per valutare eventuali alterazioni della permeabilità e della capacità funzionale di assorbimento della parete intestinale.

Rappresenta il metodo più affidabile per valutare l'integrità della mucosa gastrointestinale.

E' un test molto sensibile (sensibilità 90%, valore predittivo positivo 90%, valore predittivo negativo 97%), ma poco specifico, in quanto un gran numero di condizioni possono influenzarne il risultato (*Tabella 1*).

L'integrità della mucosa intestinale viene valutata mediante la misurazione del rapporto di escrezione urinaria di due sostanze-test somministrate per via orale che presentano un diverso indice di permeabilità: una molecola più grande, un disaccaride (lattulosio o cellobiosio) ed una più piccola, un monosaccaride (mannitolo o L-ramnoso). Si tratta di due zuccheri inerti, non metabolizzati dall'intestino e quindi la loro quota assorbita si ritrova completamente escreta nelle urine entro 6 ore. Il mannitolo viene assorbito agevolmente attraverso la mucosa intestinale; nell'intestino sano la percentuale media del suo assorbimento è del 14%, mentre valori inferiori sono indice di alterato assorbimento intestinale. Al contrario il lattulosio, in condizioni fisiologiche viene assorbito assai scarsamente, meno dell'1%; valori più elevati si presentano in condizioni di alterato assorbimento intestinale.

Al mattino a digiuno il paziente assume una miscela composta da 2 grammi di mannitolo e 5 grammi di cellobiosio sciolti in 100 ml di acqua per ottenere un'osmolarità di 270 mOsm.

Al termine di un periodo di digiuno di 5 ore, in cui viene effettuata la raccolta delle urine, si misura in HPLC (High Performance Liquid Chromatography) la loro concentrazione.

Il valore normale del rapporto disaccaride/monosaccaride è $< 0,023$.

Nei disordini del piccolo intestino la permeabilità transcellulare tende a diminuire in risposta ad una riduzione delle cellule mature del villo intestinale, mentre la permeabilità paracellulare tende ad aumentare in conseguenza del danno delle giunzioni serrate tra gli enterociti.

Tabella 1. Principali condizioni potenzialmente associate ad aumento della permeabilità intestinale

Patologie digestive	Patologie extra-digestive	Uso di farmaci o altre sostanze
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Infezioni intestinali ✓ Allergie alimentari ✓ Malattia celiaca ✓ Fibrosi cistica ✓ Malattie infiamm croniche intestinali ✓ Epatopatia acuta e cronica ✓ Irradiazione dell'addome ✓ Ischemia intestinale ✓ Chirurgia addominale ✓ Nutrizione parenterale totale ✓ Disordini funzionali 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Insufficienza renale ✓ Diabete ✓ Infezione da HIV ✓ Sclerosi multipla ✓ Sclerodermia ✓ Sarcoidosi ✓ Artrite reattiva ✓ Spondilite anchilosante ✓ Anemia ferropriva ✓ Ipogammaglobulinemia ✓ Endotossinemia 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ FANS ✓ Terapia con farmaci citotossici ✓ Assunzione di alcol

Dosaggio della calprotectina fecale

Nell'approccio diagnostico alle patologie caratterizzate da un significativo aumento dello stato di flogosi fisiologica a livello gastrointestinale, accanto ai comuni indici di infiammazione, poco specifici per le patologie gastrointestinali (velocità di eritrosedimentazione, proteina C reattiva, conta piastrinica etc...), sono stati recentemente proposti nuovi esami di laboratorio il cui utilizzo sta divenendo sempre più diffuso. Diverse proteine prodotte dai leucociti sono state proposte come marcatori di flogosi intestinale. Tra queste la calprotectina fecale (CF) è sicuramente una delle più studiate.

Si tratta di una proteina di 36 KD, legante il calcio e lo zinco, che costituisce oltre il 60% delle proteine citosoliche dei neutrofilo e che resiste bene alla degradazione termica ed enzimatica. Si mantiene stabile a temperatura ambiente fino a 7 giorni ed è facilmente dosabile nelle feci tramite test ELISA commerciali.

Nei soggetti sani di età compresa tra i 2 e i 17 anni i valori normali di CF sono sempre inferiori a 100 microgrammi/grammo di feci, senza differenze significative a seconda di età, sesso e tipo di alimentazione.

Gli intervalli di riferimento suggeriti dal Laboratorio Analisi per i minori sono i seguenti (unità di misura mg/L): positività per valori superiori a 50.

Il dosaggio dei livelli di CF è ormai considerato il marcatore non invasivo più affidabile per lo studio di un processo flogistico a carico di ogni segmento del tratto gastrointestinale dall'esofago al retto.

Esofagiti, gastriti, enterocoliti infettive o allergiche, celiachia, malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) sono tutte le condizioni in cui è possibile riscontrare valori di CF patologici (>100 microgrammi/gr di feci). Al contrario, in tutti i disordini di natura funzionale i livelli di CF sono sempre nel range di normalità (comunque ben al di sotto dei 100 microgrammi/gr di feci).

E' importante ricordare che anche in presenza di processi emorragici a carico di qualsiasi segmento intestinale si possono avere aumentati livelli di CF: polipi/poliposi, diverticolo di Meckel, sanguinamento in corso di ragadi o di patologia emorroidaria, angiomatosi dell'intestino.

Nella *Tabella 2* sono elencati i principali fattori in grado di determinare falsi positivi al test.

Nei bambini affetti da celiachia o enterocolite allergica e sottoposti a dieta di esclusione i valori di CF ritornano nel range di normalità entro 2-6 settimane. Ciò rende possibile l'utilizzo della CF nel follow-up di queste patologie, allo scopo di monitorare la risposta alla dieta di esclusione.

Uno dei campi di maggior utilizzo della CF è sicuramente rappresentato dalle MICI.

La forza della CF è quella di riuscire a misurare direttamente l'attività infiammatoria mucosale, anche quando questa non è in grado di determinare alterazioni dei valori di VES e PCR. Pertanto, il dosaggio della CF può essere utile nell'approccio iniziale al bambino con sospetta MICI e sintomatologia sfumata per svelare la presenza di flogosi a livello intestinale.

I valori di CF correlano meglio di ogni altro marcatore non invasivo o score clinico con il grado di infiammazione mucosale determinato dal punto di vista endoscopico ed istologico.

Ciò rende il test molto utile nel follow-up di questi pazienti: con la misurazione periodica dei livelli di CF è possibile evidenziare stati sub-clinici di flogosi intestinale e valutare meglio, in modo assolutamente non invasivo, l'andamento della malattia e la risposta al trattamento, nonché predire eventuali riacutizzazioni.

Tabella 2. Principali variabili in grado di determinare falsi positivi dei livelli di CF

- ✓ Età < 12 mesi
- ✓ Sanguinamento intestinale
- ✓ Epistassi, mestruazioni in atto
- ✓ Assunzione di farmaci (inibitori pompa protonica, antiinfiammatori non steroidei)
- ✓ Modalità di raccolta e conservazione delle feci

Figura 2. Scheda di approfondimento Calprest

Calprest

Descrizione

Calprest è un test immunoenzimatico in colorimetria per la determinazione diretta della calprotectina nelle feci.

Configurazione

Calprest _____ codice 9031

Il kit contiene tutti i reagenti necessari per eseguire 96 determinazioni.

Dispositivo per raccolta feci _____ codice 9120

50 pezzi.

Calprest: importanza del problema

La malattia di Crohn (**MC**) e la colite ulcerosa (**CU**) sono malattie infiammatorie croniche intestinali la cui eziologia è ancora ignota; il tasso di incidenza annuo oscilla intorno a 4/100.000 abitanti per la MC e 8/100.000 per la CU. Il cancro colon-rettale i cui principali fattori di rischio riconosciuti sono la predisposizione genetica, la dieta, la presenza di MICI e l'età, ha un tasso di incidenza annuo pari a 25/100.000 nella popolazione europea occidentale ed americana.

Calprotectina: struttura, funzione, localizzazione

La calprotectina è una proteina antimicrobica appartenente al gruppo delle proteine Ca-leganti della famiglia S100. È costituita da una catena polipeptidica leggera e da due catene polipeptidiche pesanti, ed ha un peso molecolare totale di 36,5 Kda. È presente nei granulociti neutrofilii dove rappresenta il 5% delle proteine totali e il 60% di quelle della porzione citoplasmatica; in minore quantità si riscontra nei macrofagi attivati e nei monociti. La calprotectina è stabile nei campioni di feci per parecchi giorni a temperatura ambiente e per periodi molto più lunghi a -20°C.

L'aumento di calprotectina fecale è dovuto all'escrezione fecale dei neutroili e dei macrofagi migrati dal circolo sanguigno nel lume intestinale attraverso la mucosa infiammata. Questa ipotesi è confermata da molti lavori scientifici che hanno dimostrato la stretta associazione tra la concentrazione fecale di calprotectina e il quadro istologico ed endoscopico dell'infiammazione intestinale nei pazienti affetti da MICI.

Indicazioni al test

Test di screening non invasivo che, in associazione alla sintomatologia clinica, è in grado di rivelare in modo affidabile la presenza di flogosi nella mucosa intestinale. Questo dato è utile nella diagnosi e nel monitoraggio delle **Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI)**, nello screening dei soggetti ad alto rischio di malattia.

Caratteristiche del kit

- 6 calibratori
- 2 controlli
- incubazioni a temperatura ambiente
- risultati quantitativi espressi in mg/kg
- prodotto secondo standard di qualità UNI EN ISO 9001

Calprest nella pratica clinica

Il ruolo della calprotectina fecale quale marker non invasivo delle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI) è ormai noto. I risultati ottenuti in un recente studio (Tabella 1 e 2)⁽¹⁾ hanno confermato l'utilità di questo test per definire il grado di infiammazione intestinale in quanto la calprotectina correla in maniera significativa con l'attività clinica della malattia. La calprotectina fecale può essere pertanto usata come test di screening, una specie di VES dell'intestino, in quanto permette di selezionare i pazienti con infiammazione da avviare ad ulteriori esami con una migliore accuratezza rispetto ai normali test biochimici (VES, PCR)⁽²⁾. La calprotectina fecale aumenta in oltre il 95% dei pazienti con MICI, e, grazie all'elevato valore predittivo negativo⁽²⁾, permette di differenziare in modo affidabile i pazienti con MICI da quelli con IBS. La determinazione della Calprotectina fecale trova applicazione anche in campo pediatrico e neonatale. Nei pazienti pediatrici affetti da MICI la concentrazione di calprotectina è un dato più affidabile rispetto ad altri criteri soggettivi correntemente in uso ed ha sensibilità e specificità decisamente migliori rispetto ad altri indici di laboratorio^(2,3). Inoltre, pazienti con MICI in remissione clinica ed istologica hanno livelli normali di calprotectina⁽⁴⁾. Questo dato indica che la determinazione calprotectina potrebbe assumere una maggiore rilevanza nella pratica clinica in quanto potrebbe essere impiegata nel monitoraggio della remissione clinica al posto degli attuali esami endoscopici, costosi e non gradevoli per il paziente.

Tabella 2

Efficienza diagnostica di calprotectina fecale, VES e proteina C Reattiva⁽²⁾

Esame	Casi di MICI con valore patologico	Casi di MICI con valore normale	Totale
Calprotectina	30 (93.7%)	2 (6.3%)	32
VES	8 (25.0%)	24 (75.0%)	32
Prot. C-reattiva	18 (56.1%)	14 (43.9%)	32

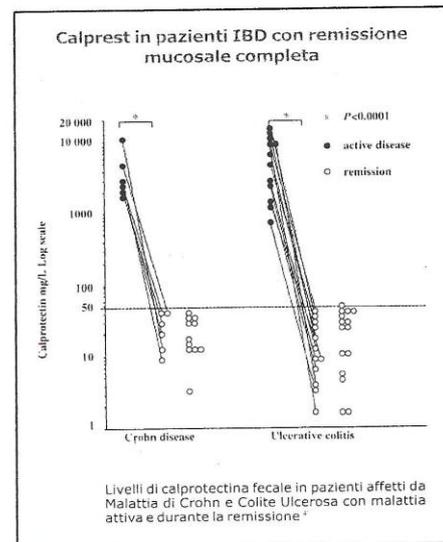
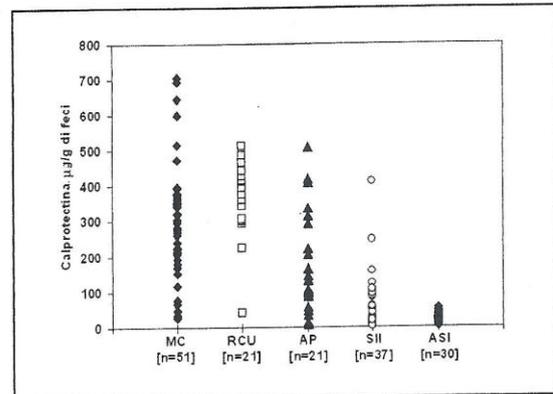
Perché Calprest?

La determinazione della calprotectina fecale è pertanto utile nelle seguenti condizioni:

- Diagnosi differenziale (MICI ed IBS)
- Previsione delle ricadute cliniche
- Follow-up delle MICI e adozione di una corretta strategia farmacologica.
- Screening dei casi di diarrea cronica

Tabella 1

Valori di calprotectina nei differenti gruppi di pazienti (MC: Crohn; RCU: Retto-Colite Ulcerosa; AP: altre Patologie intestinali; SII: Sindrome dell'Intestino Irritabile; ASI: Individui Asintomatici) (1)



Bibliografia

- (1) Ciarrocchi G., et al.: Calprotectina fecale: un prezioso esame non invasivo nella Malattia Infiammatoria Cronica Intestinale (MICI), *biochimica clinica*, 2006, vol. 30, n. 1.
- (2) Berni Canani R et al.: Fecal calprotectin is a useful diagnostic tool in pediatric gastroenterology, *Ital J Pediatr* 2005;31:89-94.
- (3) Berni Canani R et al.: Combined Use of Non-invasive Tests is Useful in the Initial Diagnostic Approach to a Child with Suspected Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, Vol. 42, No. 1, January 2006.
- (4) Roseth AG, Aadland E., Grzyb K: Normalization of Faecal Calprotectin: a Predictor of Mucosal Healing in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Scan. J Gastroenterol*. 2004; 39: 1017- 1020.

Questa fase ha subito le maggiori modificazioni.

Mentre per il Calprest si è riusciti ad incontrare la collaborazione delle famiglie dei pazienti – pur con alcuni disagi e la necessità di flessibilità nella raccolta dei campioni in giorni ed orari differenti da quelli inizialmente preventivati, il Test di Permeabilità Intestinale Lattulosio-Mannitolo si è mostrato da subito di più difficile esecuzione.

Per la corretta esecuzione di tale tipo di test, infatti, si rende necessario il digiuno prolungato dei pazienti: devono giungere a digiuno in ospedale e mantenere il digiuno per 5 ore successivamente all'ingestione della bevanda zuccherata. Tale necessità, pur spiegata idoneamente e recepita dalle famiglie, ha precluso per diversi pazienti l'arruolamento o la corretta esecuzione del test.

Un ulteriore ostacolo, trattandosi di pazienti piccoli e spesso caratterizzati da estrema selettività alimentare e difficoltà o bizzarrie inerenti le sfere sensoriali (gusto e olfatto), è stato rappresentato dalla palatabilità della miscela composta dai due zuccheri con l'acqua.

Anche l'aspetto della raccolta seriata delle urine ha rappresentato un ulteriore ostacolo che ha in alcuni casi pregiudicato la buona riuscita dell'indagine.

Tali difficoltà, in parte preventivate, ci hanno indotto a modificare gli obiettivi previsti per la terza fase: in itinere, si è dunque presa la decisione di sottoporre tutti i pazienti arruolati al Calprest e di riservare il più difficoltoso Test di Permeabilità solo a quei pazienti con indici di alterata flogosi intestinale (ovvero valori di calprotectina fecale alterati).

5.1.4 Quarta fase: confronto dei dati clinici con quelli di laboratorio

La quarta fase prevedeva il confronto dei dati acquisiti attraverso la valutazione clinico-anamnestica con quelli risultanti dal Test Lattulosio-Mannitolo e dal Calprest con l'obiettivo di verificare l'esistenza di una correlazione tra la rilevanza dei sintomi ed il livello di alterazione dei test.

Ovviamente anche questa fase ha risentito delle modifiche effettuate a monte, per cui si è proceduto a mettere a confronto i due gruppi di pazienti (casi e controlli) rispetto ai risultati ottenuti al Calprest.

I dati relativi al Test di Permeabilità verranno correlati con quelli del Calprest e la clinica.

5.1.5 Quinta fase: impostazione di interventi terapeutici e monitoraggio clinico-sintomatologico

L'ultima fase del progetto prevedeva che ai pazienti che avessero presentato indici di alterato assorbimento al test di permeabilità intestinale, a quello di flogosi intestinale e/o anomalie clinico-anamnestiche venisse proposto l'avvio di un adeguato intervento dietetico (esclusione del glutine e della caseina) e, qualora indicato, anche farmacologico.

Questi pazienti sarebbero stati rivalutati trimestralmente.

Il follow-up gastroenterologico avrebbe previsto la valutazione della persistenza dei sintomi, delle loro caratteristiche ed intensità e il retest calprotectina fecale e lattulosio-mannitolo.

Il follow-up neuropsichiatrico sarebbe stato effettuato attraverso la valutazione dei sintomi autistici mediante l'utilizzo della scala di valutazione standardizzata Behavioral Summarized Evaluation (BSE [151]) basata sia sul colloquio con i genitori che sull'osservazione diretta del paziente (*Figura 3*).

Le difficoltà riscontrate a livello dell'esecuzione degli specifici test, la scarsa compliance delle famiglie rispetto ad interventi specifici e di monitoraggio, insieme alla dubbia interpretazione di alcuni risultati (correlazione dati clinici e di laboratorio) hanno modificato la tempistica di quest'ultima fase del progetto.

Tale fase è da poco iniziata e, in considerazione della latenza tra inizio delle terapie ed eventuale modificazione dei sintomi, la valutazione della sua efficacia, avverrà in un tempo successivo.

Figura 3. BSE di Barthelemy, versione italiana

SCALA ERC-A-III (BSE) TRADUZIONE ITALIANA

Nome

Cognome

data

Segnare una crocetta nella colonna corrispondente
al livello di frequenza che si ritiene più esatto

0 1 2 3 4

1	Cerca di isolarsi					
2	Ignora gli altri					
3	Interazione sociale insufficiente					
4	Modo di guardare non appropriato					
5	Non si sforza di comunicare con la voce o con le parole					
6	Difficoltà di comunicare con i gesti e con la mimica					
7	Emissioni vocali o verbali stereotipate, ecolalia					
8	Mancanza di iniziativa, attività spontanea ridotta					
9	Problemi nel rapporto con gli oggetti (bambola od altro)					
10	Intolleranza al cambiamento, alla frustrazione					
11	Attività senso-motoria stereotipata					
12	Agitazione, turbolenza					
13	Mimica, andature e postura bizzarre					
14	Aggressività verso se stesso					
15	Aggressività verso gli altri					
16	Piccole manifestazioni d'angoscia					
17	Disturbi dell'umore					
18	Disturbi del modo di mangiare e di bere					
19	Fatica a stare attento, si distrae					
20	Disturbi dell'udito					

Ad ogni sintomo corrisponde un numero da 0 a 4 che contrassegna la frequenza di comparsa e precisamente:

0 = MAI 1= TALVOLTA 2= SPESSO 3= MOLTO SPESSO 4= SEMPRE
CONTINUATIVO

5.2 Il protocollo diagnostico

Il protocollo diagnostico ipotizzato per l'avvio del progetto ha costituito materia di discussione e di confronto con l'equipe multidisciplinare per la sua definizione e validazione.

Il protocollo prevede in sintesi:

- 1) Valutazione diagnostica neuropsichiatrica: allo scopo di tipizzare il fenotipo clinico, identificare le aree cognitive integre e deficitarie, indirizzare il trattamento riabilitativo, porre diagnosi differenziale con altri disordini o ritardi di sviluppo (*Figura 4*);
- 2) Raccolta anamnestica: approfondimento della storia clinica gastroenterologica, familiare e farmacologia (*Figura 5*);
- 3) Esame fisico: generale, addominale, eventualmente rettale (*Figura 5*);
- 4) Esami di laboratorio: biochimici, microbiologici e parassitologici su sangue, urine e feci (*Figura 6*);
- 5) Esami strumentali di secondo livello: ecografia addominale, endoscopia tratto gastrointestinale superiore, colonscopia tratto gastrointestinale inferiore (*Figura 6*).

Le *Figure 4 - 6* evidenziano in maggior dettaglio i dati e gli esami di cui proporremo la raccolta sistematica nel campione di pazienti arruolati.

Figura 4. Protocollo clinico-strumentale neuropsichiatrico

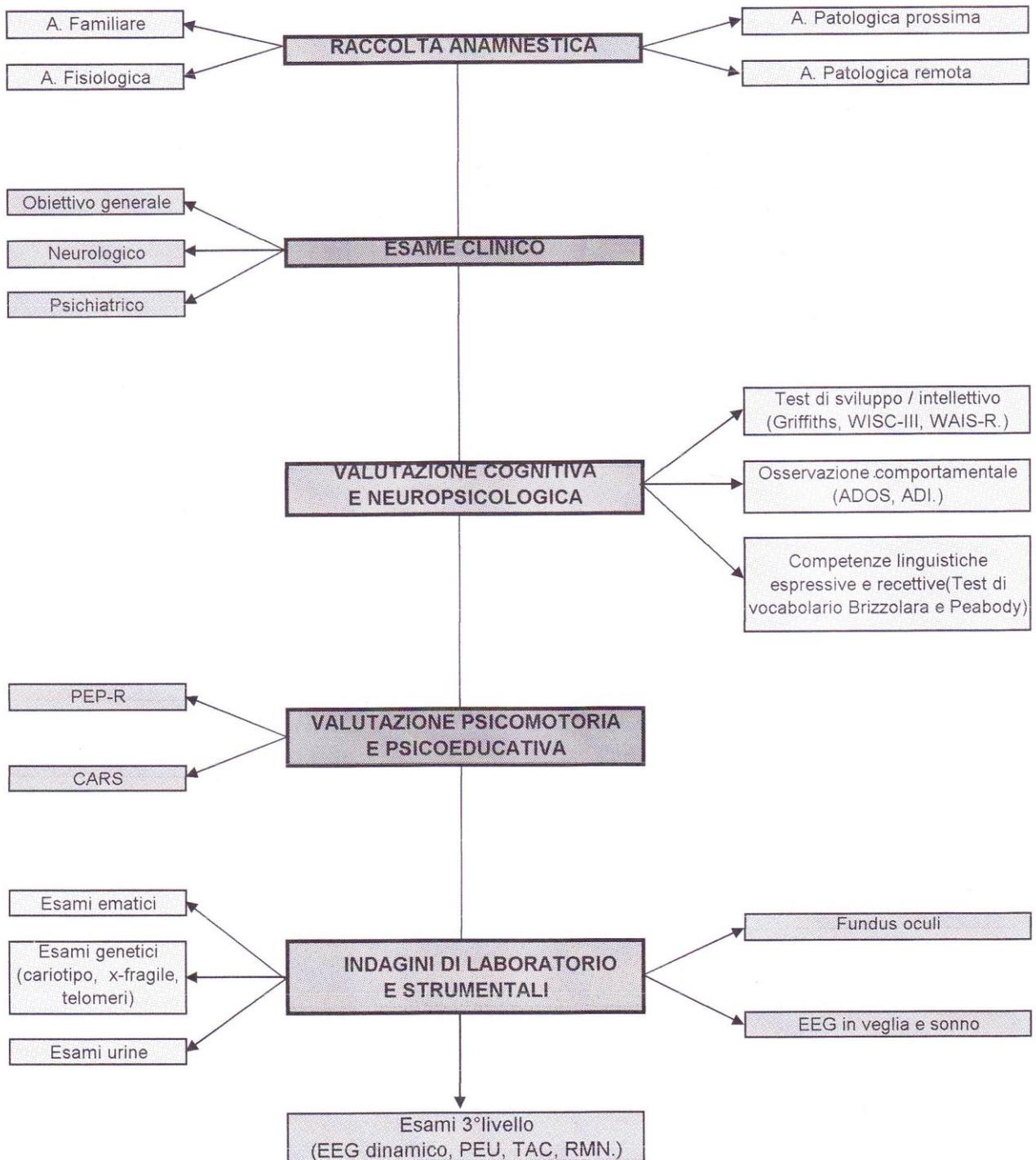


Figura 5. Protocollo gastroenterologico (clinico)

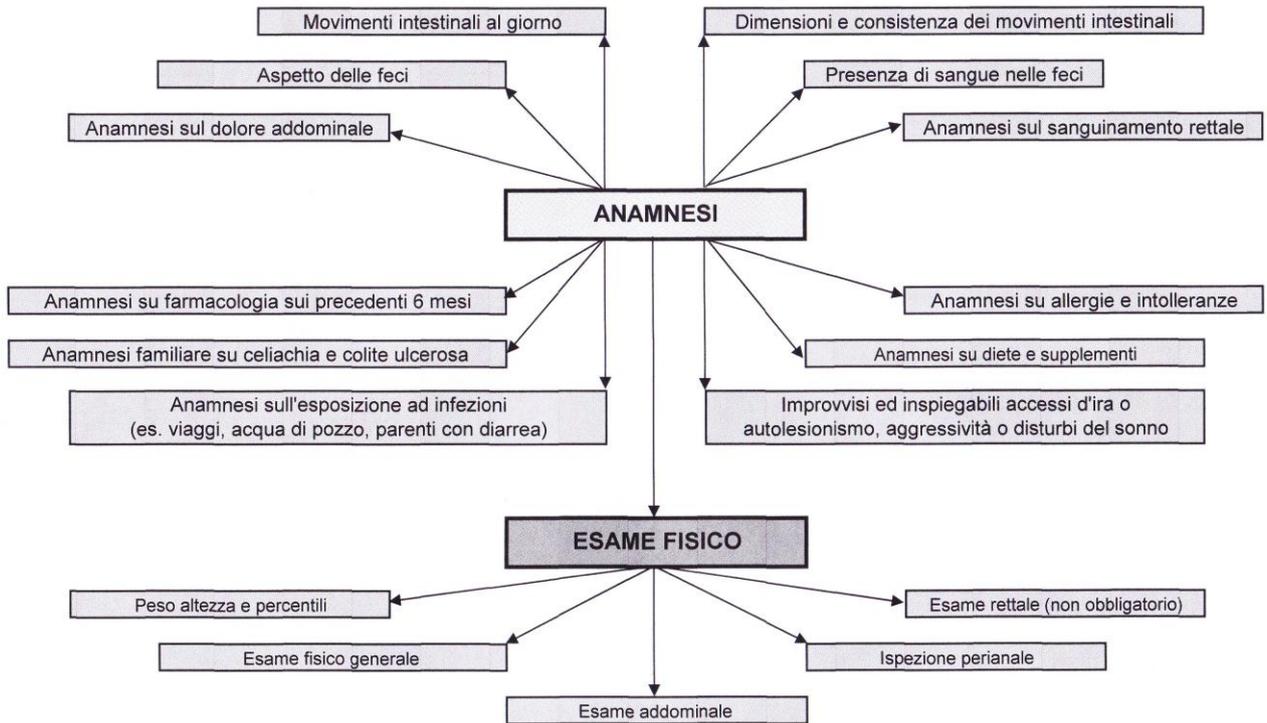
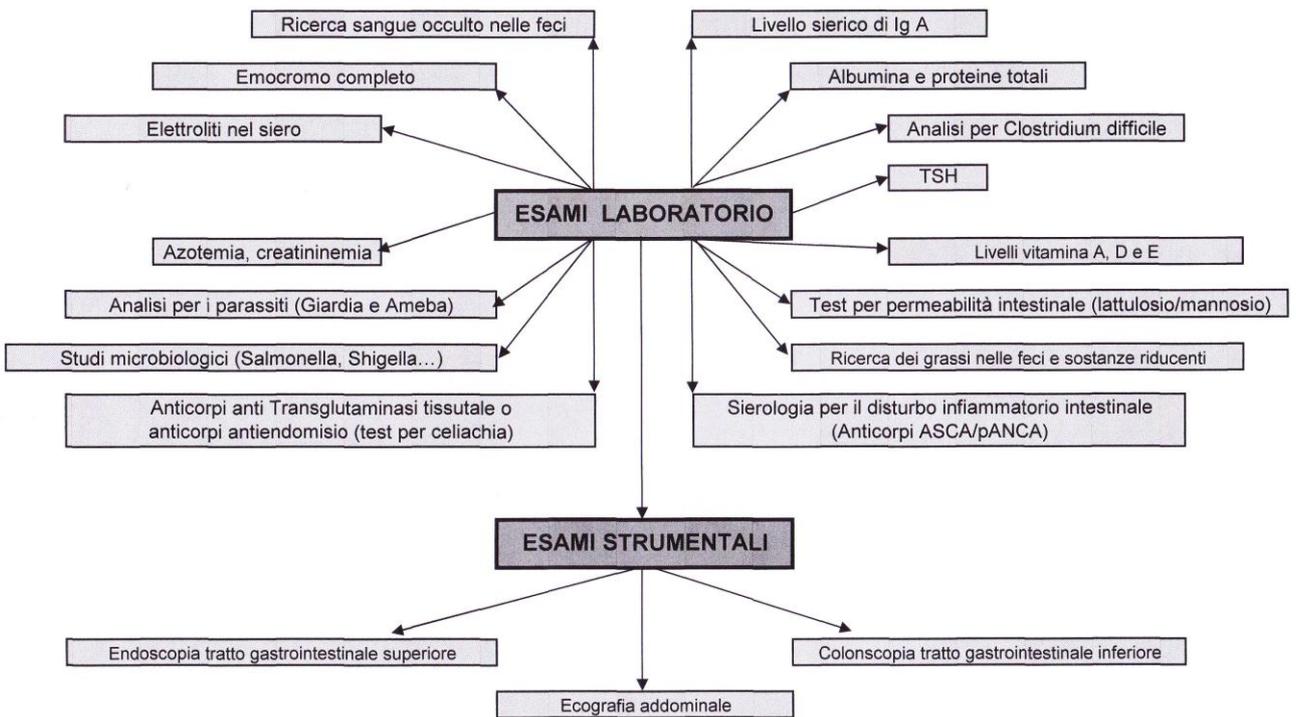


Figura 6. Protocollo gastroenterologico (strumentale)



6.0 RISULTATI

6.1 Risultati della Fase I: definizione del protocollo diagnostico

A partire dal dicembre 2009 è iniziata la collaborazione tra il reparto di Neuropsichiatria Infantile e quello di Gastroenterologia Pediatrica al fine di confrontarci sulle argomentazioni illustrate nel protocollo di ricerca e di avviare un progetto condiviso che prevedesse l'arruolamento di un maggior numero di pazienti, rispetto a quello inizialmente previsto, in tempi il più possibile ristretti.

E' stato da subito necessario confrontarsi sugli obiettivi del progetto, partendo da una condivisione del know-out professionale rispetto ad un argomento ancora così poco conosciuto.

Abbiamo discusso in equipe multidisciplinare i dati provenienti dalla letteratura italiana ed internazionale, soffermandoci con particolare attenzione sulle recentissime linee guida pubblicate su *Pediatrics*, rivista ufficiale dell'American Academy of Pediatrics dal titolo "Evaluation, diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report" [153] e "Recommendations for evaluation and treatment of common gastrointestinal problems in children with ASDs" [154].

Gli Autori americani dei due report, partendo dalla considerazione che i disturbi gastrointestinali sono sempre più riportati essere associati ai disturbi dello spettro autistico, ma che questioni chiave come la prevalenza di tali disturbi ed indicazioni per il loro trattamento sono ancora sconosciute, hanno analizzato sistematicamente la letteratura medica a disposizione con il fine di identificare raccomandazioni evidence-based per la diagnosi e la gestione clinica di tali disturbi.

La task force ha ultimato il lavoro di revisione della letteratura concludendo che raccomandazioni evidence-based non sono ancora disponibili in questo campo.

E' opinione consensuale degli esperti che gli individui affetti da disturbi dello spettro autistico vadano trattati, dal punto di vista diagnostico e terapeutico, secondi gli stessi criteri e standard di assistenza dei pazienti non affetti da autismo.

Segnalano altresì di prestare attenzione alla possibilità che, in tale coorte di pazienti, le problematiche comportamentali siano il sintomo principale, se non addirittura l'unico, di una condizione medica sottostante (tra cui i disturbi gastrointestinali).

In questo caso, l'integrazione di cure mediche oltre che di tecniche riabilitative comportamentali porterà ad un maggiore beneficio per i piccoli pazienti.

Dopo aver condiviso le conoscenze e gli aggiornamenti su tale argomento, abbiamo discusso in dettaglio le proposte di protocollo gastrointestinale.

Si è concordato di procedere utilizzando i protocolli proposti (*Figure 5 e 6*).

Nello specifico, si è stabilito che il protocollo clinico (che comprende un'anamnesi approfondita ed un esame fisico) venisse espletato dal neuropsichiatra nel corso della prima visita del paziente, mentre quello strumentale (con l'esecuzione di esami di laboratorio e strumentali) venisse valutato dal gastroenterologo, previo visita accurata del paziente, e "personalizzato" per ogni paziente a seconda delle problematiche e della sintomatologia riportata.

Si è reso necessario costruire uno strumento che permettesse ai neuropsichiatri di poter effettuare una raccolta anamnestica accurata e precisa, che trovasse riscontro e consenso, anche dal punto di vista terminologico, da parte degli altri specialisti.

Abbiamo così messo a punto un breve questionario di screening sui disturbi gastrointestinali da utilizzare nel corso di tutte le prime visite neuropsichiatriche, a completamento della usale raccolta anamnestica (*Figura 7*).

Tale questionario costituisce la valutazione "filtro" per consentire l'arruolamento dei pazienti nello studio.

Abbiamo stabilito, come criterio di invio all'ambulatorio di gastroenterologia, che fosse necessaria la presenza di almeno un chiaro sintomo attribuibile alla sfera gastrointestinale (tra quelli elencati nel questionario) o di un disturbo persistente della sfera alimentare (condizioni cliniche e/o abitudine alimentari peculiari).

Figura 7. Questionario di screening (prima pagina)

QUESTIONARIO SCREENING DISTURBI GASTRO-INTESTINALI

Nome Cognome:

Data compilazione: .../.../...

Data di nascita: .../.../...

Dott.:/.....

Diagnosi:

AUTISMO	DGS NAS
---------	---------

Attuale presenza di	Da quanto tempo (mm)	Specifiche: frequenza, durata, intensità, accertamenti eseguiti...
Stitichezza evacuazione ogni 3 gg; feci dure 1 v/die o meno		
Diarrea feci morbide abbondanti 2-5 v/die		
Meteorismo/distensione addom. gonfiore addominale da eccesso gas intestinali		
Vomito emissione cibo con sforzo (± nausea, conati)		
Rigurgito emissione di cibo dalla bocca senza sforzo		
Reflusso succo acido da stomaco a esofago ± pirosi		
Ruminazione portare volontariamente in bocca cibo ingoiato; masticare in bocca per autoprovocarsi vomito		
Steatorrea perdita grassi con le feci		
Sangue nelle feci		
Dolore addominale ricorrente		
RIFIUTO CIBI SOLIDI		
IPERFAGIA/VORACITA'		
INAPPETENZA		
ECCESSO PONDERALE		
SCARSO ACCRESCIMENTO (peso)		

Movimenti intestinali /die:

Quantità (n / aspetto feci)	Qualità (dimensioni / consistenza)

Diete e supplementi (anamnesi: cosa, da quanto, cambiamenti, benefici...)

Specifiche gastroenterologiche

Assunzione farmaci nei 6 mesi precedenti (anamnesi: quali, da quanto, benefici, collaterali...)

Specifiche gastroenterologiche

Figura 7. Questionario di screening (seconda pagina)

- Allergie e/o intolleranze (anamnesi: cosa, da quanto, quando, farmaci; chiedere anche dermatite atopica)

Specifiche gastroenterologiche
A. Personale

Specifiche gastroenterologiche
A. Familiare

- Familiarità per celiachia, colite ulcerosa e/o M. Crohn (quanti, grado parentela)

Specifiche gastroenterologiche

- Esposizione ad infezioni (parenti con diarrea, viaggi, acqua di pozzo...)

Specifiche gastroenterologiche

- Coliche gassose lattante (a che età, per quanto tempo, farmaci?)

Specifiche gastroenterologiche

- Esami strumentali effettuati (endoscopia, gastroscopia, colonscopia etc...; quando, referto...)

Specifiche gastroenterologiche

- Presenza di condizioni cliniche e/o abitudini alimentari peculiari
ANORESSIA/SELEZIONE CIBI PER CONSISTENZA, ELEVATA INTRODUZIONE LIQUIDI, AUTORIDUZIONE LATTICINI E/O CARBOIDRATI).

COMPORAMENTO

- Indagare per es. comportamento post-prandiale (irritabilità; segni indiretti: tosse, pirosi...)

- Chiedere se presenti atipie in posture, posizioni antalgiche addominali, posizione evacuativa (atipica con aumentato torchio addominale), autolesionismo, eccessi improvvisi di aggressività

ABITUDINI ALIMENTARI

- Indagare se anoressia/selezione cibi per consistenza, elevata introduzione liquidi, riduzione latticini e/o carboidrati

CIBI (elenco cibi, se selettivi, per verificare eccesso carboidrati, assenza fibre/proteine animali etc...)

6.2 Risultati della Fase II

6.2.1 Stima dell'incidenza dei disturbi gastrointestinali

Da un punto di vista più strettamente neuropsichiatrico, si è stabilito, contrariamente a quanto ipotizzato in precedenza, di includere nel campione tutti i bambini con una diagnosi di Disturbo Pervasivo dello Sviluppo (DPS o Disturbi dello Spettro Autistico), ovvero, oltre ai bambini affetti da Disturbo Autistico (DA), anche quelli con Disturbo generalizzato dello sviluppo non altrimenti specificato (DGS nas), Sindrome di Asperger (SA), Disturbo di Rett e Disturbo disintegrativo della fanciullezza (classificazione secondo i criteri del DSM-IV [27]).

Questa decisione è stata condotta nell'ipotesi che un arruolamento secondo criteri diagnostici più ampi ci potrebbe permettere, in una seconda fase dello studio ed in presenza di un maggior numero di pazienti, di effettuare confronti intergruppo e di stabilire l'esistenza di differenze rilevanti e variabili statisticamente significative; tale confronto potrebbe essere interessante in termini di specificità della correlazione tra disturbi gastrointestinali e sottotipi di DPS.

La fase di somministrazione del questionario di screening è iniziata nel mese di febbraio 2010 e si è conclusa nel febbraio 2011 con l'arruolamento di tutti i pazienti in carico presso il Centro Autismo (CTR) e di quelli che giungevano, consecutivamente, al Servizio ambulatoriale per un inquadramento diagnostico.

Abbiamo reclutato un totale di 106 pazienti: 53 pazienti in carico al CTR e 53 giunti all'ambulatorio. La *Tabella 3* riporta in modo schematico le caratteristiche del campione.

L'età del campione risulta compresa tra 2,1 e 17,9 anni con un'età media di $8,2 \pm 4,6$ deviazioni standard (DS).

Il range di età dei pazienti del CTR è compreso tra i 4 e i 17,9 anni (media $10,7 \pm 3,8$ DS), mentre quello dei pazienti ambulatoriali è tra 2,1 e 17,1 anni (media $5,7 \pm 3,8$ DS).

La distribuzione per sesso è di 93 maschi (87,7 %) a fronte di 13 femmine (12,3 %).

I pazienti in carico al CTR sono 42 maschi (79,2 %) e 11 femmine (20,8 %); quelli ambulatoriali 51 maschi (96,2 %) e 2 femmine (3,8 %).

Si tratta, dal punto di vista diagnostico, di 76 bambini con diagnosi di DA (71,7 %), 24 affetti da DGS nas (22,6 %) ed infine 6 con SA (5,7 %).

Nel gruppo CTR sono presenti: 46 DA (86,8 %), 6 DGS nas (11,3 %) e 1 SA (1,9 %).

Il gruppo ambulatoriale risulta invece così suddiviso: 30 DA (56,6 %), 18 DGS nas (33,9 %) e 5 SA (9,5 %).

Sulla base di questi primi conteggi, abbiamo formulato due considerazioni relative alla composizione del campione: i pazienti già in carico al servizio sono di età maggiore rispetto a quelli inviati in consultazione e, da un punto di vista diagnostico sono rappresentati da forme eziopatologiche più severe (stanno in effetti già seguendo un percorso riabilitativo).

Tale assetto non sembra poter costituire un bias di selezione essendo rispettati sia il criterio di inclusione relativo all'età (range 2 - 18 anni) sia quello relativo alla diagnosi (arruolamento di tutti i DPS).

Tabella 3. Caratteristiche del campione di 106 pazienti

	CTR (n = 53)	Ambulatoriali (n = 53)	Totale (n = 106)
Età (anni)			
Media (DS)	10,7 (3,8)	5,7 (3,8)	8,2 (4,6)
Range	4 – 17,9	2,1 – 17,1	2,1 – 17,9
Genere (%)			
Maschio	42 (79,2)	51 (96,2)	93 (87,7)
Femmina	11 (20,8)	2 (3,8)	13 (12,3)
Diagnosi (%)			
DA	46 (86,8)	30 (56,6)	76 (71,7)
DGS nas	6 (11,3)	18 (33,9)	24 (22,6)
SA	1 (1,9)	5 (9,5)	6 (5,7)

Per quanto riguarda lo screening relativo alla presenza dei disturbi gastrointestinali (DGI) o attribuibili alla sfera alimentare, i risultati indicano un'incidenza, nel nostro campione, del 38,7 %: 41 dei 106 pazienti presentano infatti un'importante selettività alimentare e/o disturbi gastrointestinali. Nella *Tabella 4* e nel *Grafico 1* sono sintetizzati, schematicamente, i risultati ottenuti.

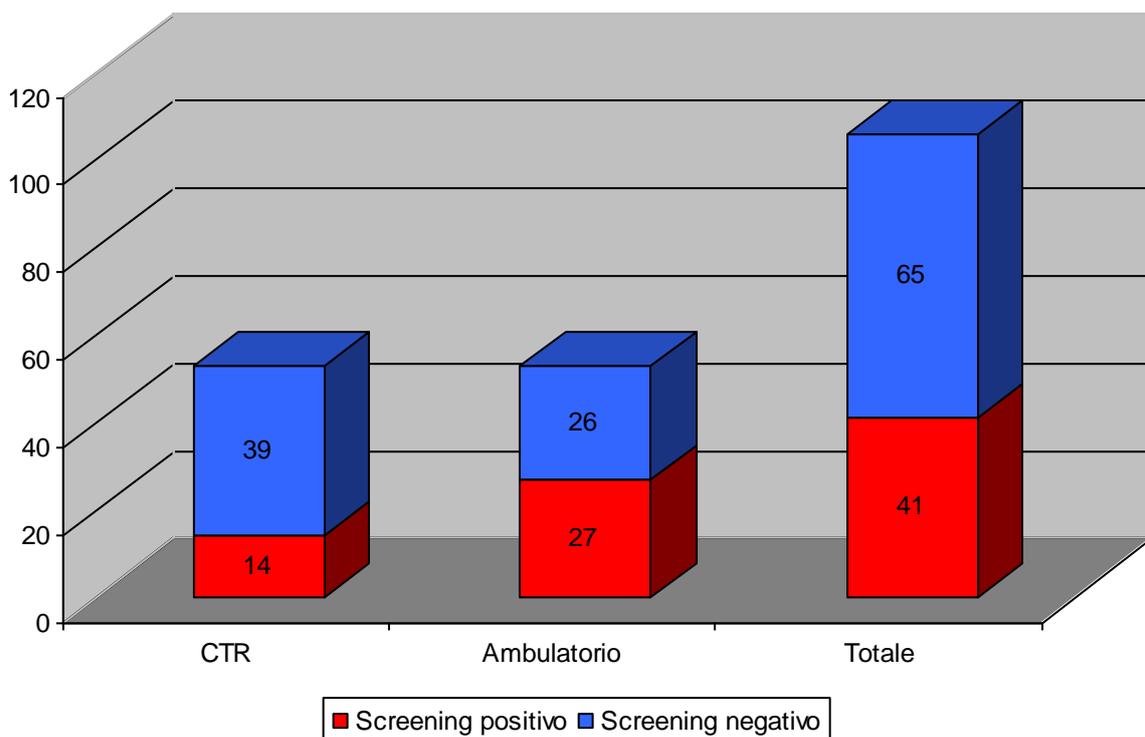
Rispetto a tale percentuale però, il 15,1 % (16 su 106 pazienti) mostra solo un marcata selettività alimentare, nel 18,9 % (20 su 106 pazienti) è presente selettività alimentare associata a specifici DGI ed, infine, solo nel 4,7 % (5 su 106 pazienti) sono presenti esclusivamente DGI.

Considerando dunque esclusivamente i pazienti che presentano DGI o associazione tra DGI e selettività alimentare (escludendo quindi i soli “selettivi”), l’incidenza dei disturbi della sfera gastrointestinale nel nostro campione risulta del 23,6 % (25 su 106 pazienti).

Tabella 4. Risultati del campione di 106 pazienti

	CTR (n = 53)	Ambulatoriali (n = 53)	Totale (n = 106)
N° positivi allo screening (%) (invio all’ambulatorio di gastroenterologia)	14 (26,4 %)	27 (50,9 %)	41 (38,7 %)
N° selettivi (%)	10 (19,0)	6 (11,3)	16 (15,1)
N° selettivi + DGI (%)	2 (3,7)	18 (33,9)	20 (18,9)
N° DGI (%)	2 (3,7)	3 (5,7)	5 (4,7)

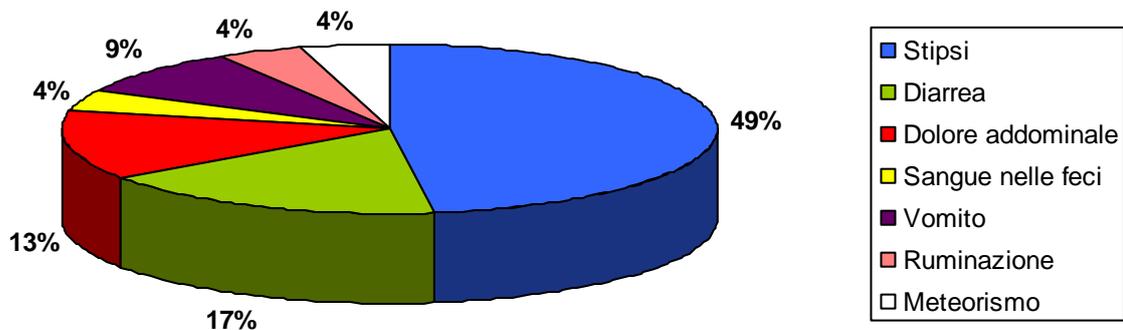
Grafico 1. Positività e negatività al questionario di screening



In particolare, dei dieci disturbi gastrointestinali indagati con il questionario di screening (stitichezza, diarrea, meteorismo/distensione addominale, vomito, rigurgito, reflusso, ruminazione, steatorrea, sangue nelle feci, dolore addominale ricorrente) e tenendo in considerazione che 5 dei 25 pazienti presentano l'associazione di due DGI, i disturbi riscontrati nei nostri pazienti sono (vedi *Grafico 2*):

- stipsi nel 49 % ,
- diarrea nel 17 % ,
- dolore addominale ricorrente nel 13 % ,
- vomito nel 9% ,
- meteorismo nel 4% ,
- ruminazione nel 4% ,
- presenza di sangue nelle feci nel 4 % .

Grafico 2. Disturbi gastrointestinali riscontrati nel campione



6.2.2 Arruolamento dei casi e dei controlli

Dopo avere effettuato la stima dell'incidenza dei DGI nel campione, abbiamo quindi proceduto, dal febbraio 2011, con l'arruolamento dei pazienti da sottoporre all'intero protocollo concordato con l'equipe multidisciplinare per costituire i due gruppi di pazienti per il confronto clinico, strumentale e statistico (pazienti affetti da DPS con e senza sintomi gastrointestinali).

Abbiamo ritenuto opportuno escludere tutti i pazienti che al momento della compilazione del questionario di screening avevano già intrapreso trattamenti farmacologici o dietetici volti alla riduzione di sintomi gastrointestinali.

Sono stati inoltre esclusi i pochi pazienti con autismo a base organica.

Purtroppo, come già motivato, abbiamo registrato un'alta percentuale di rifiuti o di drop out sia tra i pazienti non sintomatici sia tra quelli che presentavano sintomi gastrointestinali o attribuibili alla sfera alimentare.

Dei 71 pazienti a cui è stato proposto l'arruolamento nel progetto, 15 hanno rifiutato (21,4%) e di questi 8 presentavano specifici DGI (11,4%) .

Abbiamo reclutato 51 pazienti: il gruppo dei "casi" (DGI) è costituito da 25 pazienti, mentre quello dei "controlli" da 26.

Nella *Tabella 5* sono riassunte le caratteristiche dell'attuale campione.

L'età del campione risulta compresa tra 2,4 e 17,9 anni con un'età media di $6,1 \pm 3,3$ DS.

Il range di età dei "casi" è compreso tra i 2,5 e i 17,9 anni (media $7 \pm 3,6$ DS), mentre quello dei "controlli" è tra 2,4 e 11,7 anni (media $5,3 \pm 2,9$ DS).

La distribuzione per sesso è di 48 maschi (94,1 %) a fronte di 3 femmine (5,9 %).

I casi sono 24 maschi (96 %) e 2 femmine (4 %), i controlli 24 maschi (92,3 %) e 2 femmine (7,7 %),

Si tratta, dal punto di vista diagnostico, di 30 bambini con diagnosi di DA (58,8 %), 20 con DGS nas (39,2 %) e 1 Sindrome di Asperger (SA, 1,9 %).

I casi sono 17 DA (68 %) e 8 DGS nas (32 %) mentre i controlli 13 DA (50 %), 12 DGS (46,2%) e 1 SA (3,8%).

Tabella 5. Caratteristiche del campione

	CASI (n = 25)	CONTROLLI (n = 26)	TOTALE (n = 51)
Età (anni)			
Media (DS)	7 (3,6)	5,3 (2,9)	6,1 (3,3)
Range	2,5 – 17,9	2,4 – 11,7	2,4 – 17,9
Genere (%)			
Maschio	96	92,3	94,1
Femmina	4	7,7	5,9
Diagnosi (%)			
DA	68	50	58,8
DGS nas	32	46,2	39,2
SA	-	3,8	1,9

Il gruppo dei casi si caratterizza per la presenza della seguente sintomatologia (vedi *Tabella 6*):

- specifici DGI associati a selettività alimentare nel 64% (16 su 25 casi),
- specifici DGI nel 36 % (9 su 25 casi).

Undici dei 24 pazienti presentano inoltre l'associazione di più sintomi.

Tabella 6. Sintomatologia presente nei "casi"

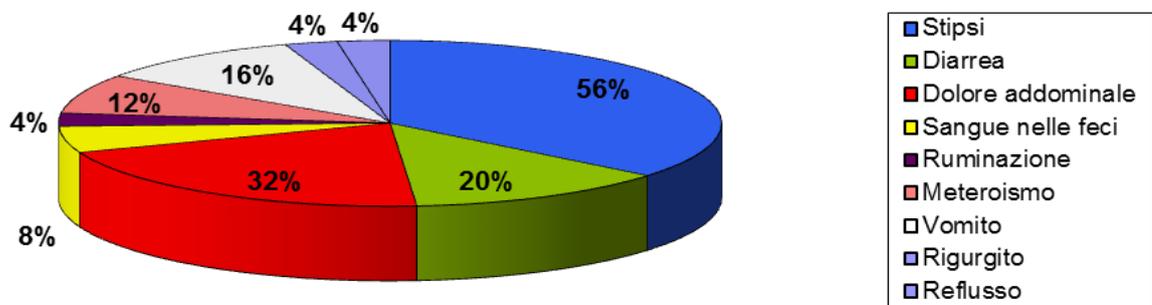
	Casi (n 25)
N° selettivi + DGI (%)	16 (64)
N° DGI (%)	9 (36)

In particolare, dei dieci disturbi indagati con il questionario di screening (stitichezza, diarrea, dolore addominale ricorrente, vomito, sangue nelle feci, meteorismo/distensione addominale, ruminazione,

reflusso, rigurgito, steatorrea) e tenendo in considerazione che 11 pazienti presentano l'associazione di due DGI, i disturbi riscontrati sono (vedi *Grafico 3*):

- stipsi nel 56 % (14 pazienti)
- diarrea nel 20 % (5 pazienti)
- dolore addominale ricorrente nel 32 % (8 pazienti)
- vomito nel 16% (4 pazienti)
- presenza di sangue nelle feci nel 8 % (2 pazienti)
- meteorismo nel 12% (2 pazienti)
- ruminazione nel 4% (1 paziente)
- reflusso nel 4% (1 paziente)
- rigurgito nel 4% (1 paziente).

Grafico 3. Disturbi gastrointestinali nei casi



6.3 Risultati della Fase III

6.3.1 Esecuzione del Calprest

Tutti i pazienti arruolati hanno effettuato il Calprest.

I valori di CF del campione risultano compresi tra 0,2 e 217,5 mg/L con un valore medio di 19,8 mg/L \pm 34,8 DS.

Il range nei casi è compreso tra 0,5 e 217,5 mg/L con una media 31,1 mg/L \pm 45,4 DS; quello dei controlli è tra 0,2 e 34,3 mg/L con una media 8,6 mg/L \pm 10,1 DS.

Si è assunto come cut-off per la positività il valore di 50 mg/L.

Tabella 7. Confronto tra i valori di CF

	CASI (n = 25)	CONTROLLI (n = 26)	TOTALE (n = 51)
CF (mg/L)			
Media (DS)	31,1 (45,4)	8,6 (10,1)	19,8 (34,8)
Range	0,5 – 217,5	0,2 – 34,3	0,2 – 217,5

Ad un'analisi qualitativa, si nota che i valori medio e massimo siano più alti nei casi rispetto ai controlli, ma che anche la DS è più elevata nei casi (dato che suggerisce la presenza di una forte dispersione dei valori).

Si è pertanto stabilito di escludere dal gruppo dei casi, prima di proceder all'analisi statistica, il valore più alto in quanto causa della dispersione dei valori (si tratta dell'unico risultato superiore al valore di 100 mg/l, nella fattispecie 217,5; i dati definitivi utilizzati per l'analisi statistica sono quindi quelli riportati successivamente nella *Tabella 8*).

6.3.2 Esecuzione del Test di Permeabilità Lattulosio-Mannitolo

Il Test di Permeabilità è stato riservato solo a quei pazienti con indici di alterata flogosi intestinale (valori di CF alterati); allo stato attuale è stato quindi eseguito nei 5 pazienti risultati positivi al Calprest.

I valori del piccolo campione risultano compresi tra 0.014 e 0.226 con un valore medio di 0.074 mg/L \pm 0.1 DS.

Assunto un valore normale del rapporto disaccaride/monosaccaride $<$ 0,023, allo stato attuale tre sono risultati nei limiti di norma e due sono valori patologici.

6.4 Risultati della Fase IV

6.4.1 Analisi statistica

Si è proceduto al confronto dei valori CF tra i due gruppi sottoponendo i dati a disposizione ad analisi statistica.

I risultati descrittivi sono espressi come media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo per le variabili continue, o come numero di osservazione e percentuale per le variabili discrete.

Si è utilizzato nello specifico il test non parametrico di Mann-Whitney (in quanto la distribuzione dei valori nei campioni non è risultata normale; test Kolmogorov-Smirnov: $Z = 2,044$ e $p = 0,00$).

Quale livello di significatività statistica è stato assunto il valore $p < 0,05$ (test a due code).

Le analisi statistiche sono state condotte tramite il Programma SPSS versione 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

I valori ottenuti ($U = 193,5$ e $p = 0,021$) indicano come la differenza rilevata all'analisi qualitativa risulti anche statisticamente significativa.

Considerando come dato anche la “positività” del valore CF (> 50 mg/L) nei casi (5 positivi su 25) e nei controlli (0 positivi su 26) ed utilizzando il test di Person (Chi-Square, della distribuzione del campione per variabili categoriali) si ottengono ugualmente valori significativi (Chi-Square = 4,710 e $p = 0,046$).

Il *Grafico 4* e la *Tabella 8* mostrano rispettivamente la distribuzione dei valori nei due campioni e i dati descrittivi utilizzati per effettuare l'analisi statistica.

Grafico 4. Distribuzione dei valori nei campioni

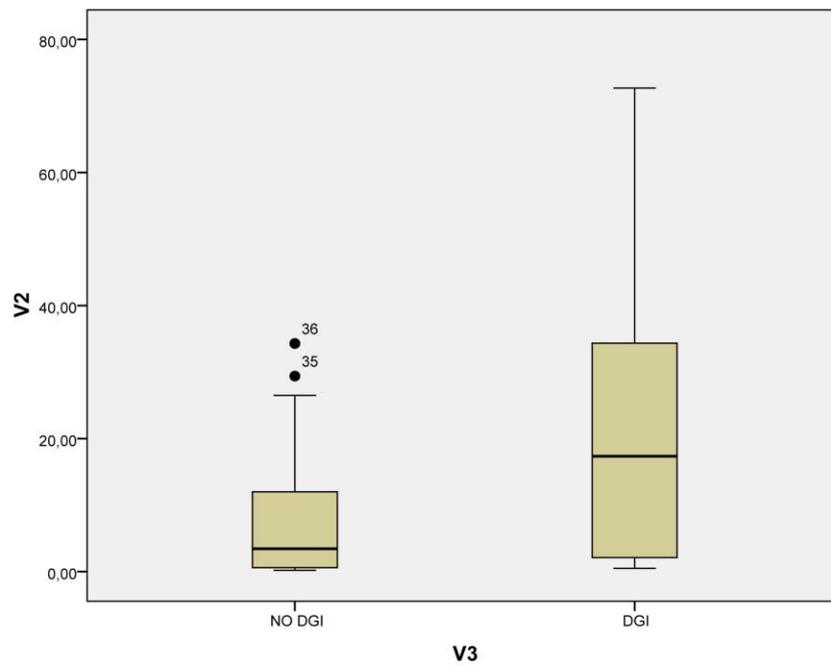


Tabella 8. Valori descrittivi

		Descriptives			
V3			Statistic	Std. Error	
V2	NO DGI	Mean	8,3396	1,95623	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4,3107	
			Upper Bound	12,3685	
		5% Trimmed Mean	7,4118		
		Median	3,4400		
		Variance	99,498		
		Std. Deviation	9,97485		
		Minimum	,20		
		Maximum	34,30		
		Range	34,10		
		Interquartile Range	11,88		
		Skewness	1,344	,456	
		Kurtosis	,904	,887	
		DGI	DGI	Mean	23,3767
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			13,2249	
	Upper Bound			33,5285	
5% Trimmed Mean	21,9148				
Median	17,3500				
Variance	577,990				
Std. Deviation	24,04141				
Minimum	,50				
Maximum	72,70				
Range	72,20				
Interquartile Range	33,88				
Skewness	,897			,472	
Kurtosis	-,368			,918	

6.4.2 Correlazione tra CF e IPT

Si è provato a verificare la sussistenza di qualche correlazione, seppur consapevoli dell'eventuale relatività data dall'esiguità numerica, ma non è stato possibile inferire alcuna correlazione né rispetto ai valori di FC né alla tipologia o gravità sintomatologica.

6.5 Risultati della fase V

Come già anticipato, le difficoltà riscontrate a livello dell'esecuzione degli specifici test, la scarsa compliance delle famiglie rispetto ad interventi specifici e di monitoraggio, insieme alla dubbia interpretazione di alcuni risultati (correlazione dati clinici e di laboratorio) hanno modificato la tempistica di quest'ultima fase del progetto.

Tale fase è da poco iniziata ed, in considerazione della latenza tra inizio delle terapie ed eventuale modificazione dei sintomi, la valutazione della sua efficacia avverrà in un tempo successivo.

E' altresì importante sottolineare che non si sono riscontrate nel campione sottoposto a visita gastroenterologica pediatrica significative alterazioni nell'assetto nutrizionale - metabolico.

I numerosi parametri pediatrici considerati (profilo marziale, valori nutrizionali, indici di malassorbimento, screening allergico e per celiachia; vedi Figura 6 - Protocollo Gastroenterologico – esami di laboratorio) sono risultati nei limiti di norma e non si è quindi ritenuto opportuno procedere ad una loro specifica analisi e ad un confronto casi/controlli.

Anche a livello di obiettività fisica (parametri auxologici, esame fisico generale ed addominale – vedi Figura 5 – Protocollo Gastroenterologico Clinico) si sono riscontrati dati di normalità, paragonabili alla popolazione generale pediatrica.

Allo stato attuale, è comunque possibile fornire una descrizione dei singoli interventi effettuati e dei primi risultati, ma non siamo in grado di effettuare correlazioni tra i vari pazienti rispetto all'efficacia degli interventi proposto.

Tali interventi sono di tipo farmacologico e dietetico in senso più lato; sono state fornite indicazioni dietetiche e consegnati regimi alimentari ad hoc per i pazienti, ma non si è ritenuto opportuno in

alcun caso avviare interventi dietetici specifici, come quelli di esclusione totale del glutine e della caseina.

Nella fattispecie, è possibile riassumere le prescrizioni effettuate nel campione come segue:

- interventi dietetici di variazione/correzione del regime alimentare (aumento del consumo di frutta, verdura e legumi; aumento dell'assunzione di acqua bicarbonato-alcantino terrosa (Uliveto); riduzione dell'assunzione di bevande gassate e zuccherate) nel 52 % dei casi (13/25 pazienti);
- interventi dietetici di supplementazione (fermenti lattici e probiotici: Dicoflo, Flortec, Reuflor) nel 20 % dei casi (5/25);
- toilette trainign (intervento di rieducazione all'uso della toilette che prevede di incoraggiare ed abituare il bambino all'utilizzo di tazza/vasino ad orari fissi – preferibilmente dopo i pasti – per almeno cinque minuti) nel 20 % dei casi (5/25);
- interventi farmacologici lassativi (prescrizione di Movicol, Paxabel e Regolint) nel 44 % (11/25);
- interventi farmacologici antireflusso (prescrizione di Gaviscon) nell' 8 % (2/25).

Si è ritenuto opportuno procedere all'approfondimento con indagini strumentali (ecografia addominale) in soli tre casi (con obiettività addominale nella norma, ma che presentavano sintomi importanti per persistenza e recidivanza).

Tutti i pazienti che hanno mostrato un'alterazione dei valori di CF e IPT, stanno ripetendo entrambi gli esami a distanza di tre/quattro mesi dal test, a prescindere che abbiano o meno intrapreso terapia farmacologica o dietetica.

7.0 DISCUSSIONE

7.1 Rilevanza dei disturbi gastrointestinali nel campione

Il dato di sicura importanza che va discusso, al di là delle difficoltà incontrate nell'esecuzione del progetto e degli esiti delle specifiche variabili studiate, riguarda il riscontro, nel nostro campione allargato (106 pazienti) utilizzato per stimare l'incidenza dei DGI, di una cospicua percentuale di tali disturbi.

E' infatti risultato positivo allo screening per la presenza di specifici DGI quasi un quarto del campione (nello specifico, come descritto nei risultati, il 23,6 % del campione, ovvero 25 pazienti su 106).

Come descritto nell'introduzione del progetto, in accordo con numerose - anche se spesso discordanti - segnalazioni in letteratura, ritenevano che un certo numero di pazienti giunti negli anni alla nostra osservazione presentasse sintomi generici ascrivibili alla sfera gastrointestinale, ma non ci era mai stato possibile classificarli e stimarli in maniera sistematica.

E' stato dunque importante impostare un protocollo che chiarisse quali sintomi cercare e che precisasse una definita corrispondenza terminologica e clinica.

E' infatti possibile che negli anni l'ambulatorio abbia registrato un numero sommerso di patologie gastrointestinali, per lo più probabilmente di modesta entità (e pertanto verosimilmente risolvibili con semplici accorgimenti dietetici) che non sono state identificate ed indagate per le problematiche già illustrate relative alla diagnosi neuropsichiatrica (difficoltà interpretative o di comunicazione da parte di molti pazienti autistici che rendono difficoltosa l'individuazione di sintomi specifici; mancanza di ricerca ed approfondimento sistematico dei DGI in quanto non previsti tra i criteri diagnostici e talvolta loro "facile" correlazione con stereotipie o comportamenti propri dell'autismo).

Ritornando al dato numerico (incidenza nel 23,6 % del campione di DGI specifici), lo abbiamo posto a confronto con i due dati in nostro possesso relativi a studi effettuati a livello nazionale e già menzionati nell'introduzione del progetto [20-24].

Gli studi condotti dal gruppo di ricerca torinese (dottor Balzala e colleghi) evidenziano un'incidenza molto più alta di DGI (circa il 50 % del campione osservato); le due considerazioni che possiamo effettuare sono che il campione è più ampio del nostro (250 pazienti) e che è

maggiormente disomogeneo per età, includendo sia l'età evolutiva che pazienti giovani/adulti (verosimilmente più collaboranti e sicuramente più in grado di fornire elementi utili per evidenziare possibili disturbi e dettagliare la sintomatologia).

Anche lo studio condotto nella realtà napoletana (dottoressa De Magistris e colleghi) riporta un'incidenza di DGI doppia rispetto a quella da noi riscontrata (46,7 % de campione, costituito in questo caso da 90 pazienti in età evolutiva).

Proseguendo con il confronto dei sintomi maggiormente rappresentati nei tre campioni, al di là delle singole percentuali di incidenza, si evidenzia come siano la stitichezza, la diarrea ed il dolore addominale ricorrente i tre disturbi riscontrati con maggior frequenza in tutti e tre i campioni (con percentuali per la maggior parte rilevanti; vedi *Tabella 9*).

Tabella 9. Confronto tra le incidenze dei DGI in tre campioni italiani

	Nostro studio	Studio Napoli	Studio Torino
Stitichezza (%)	56	46	39
Diarrea (%)	20	34	28
Dolore addominale (%)	32	16	73

7.2 Possibile interferenza della selettività alimentare e degli aspetti metabolici e nutrizionali

Il secondo dato importante da discutere, per lo meno a livello qualitativo, è relativo alla preventivata interferenza degli aspetti di carattere nutrizionale e dismetabolico, conseguenti al problema della selettività alimentare, che caratterizza di frequente, e spesso in maniera marcata, i pazienti affetti da disturbi dello spettro autistico.

Agli inizi del progetto, a livello di questionario di screening nel nostro campione allargato, abbiamo considerato anche i “sintomi attribuibili alla sfera alimentare” (condizioni cliniche e/o abitudini alimentari peculiari: ad esempio selezione dei cibi per consistenza, elevata introduzione o viceversa esclusione di liquidi/latticini/carboidrati/proteine...), ipotizzando che i comportamenti scorretti, tanto frequenti in questi pazienti, potessero sottendere vaghi disturbi gastrointestinali ed interferire con le analisi a vari livelli.

Si è visto, in effetti, che una percentuale del campione allargato (il 15,1 %, ovvero 16/106 pazienti) presentava tali caratteristiche. Tale percentuale - che di certo ci attendevamo, forse anche in misura più cospicua - è risultata però inferiore a quella che presenta DGI specifici, in esclusiva o in associazione a selettività (23,6 %, ovvero 25/106 pazienti).

Nel proseguo dello studio, includendo inizialmente nell'approfondimento con CF anche tale gruppo di pazienti, tenendolo separato dai casi e dai controlli, ci siamo resi conto di come non mostrasse alcuna alterazione nei valori di CF; si è infine deciso, data anche l'eseguità del campione numerico, di non considerare tale gruppo di pazienti a parte, ma di includerlo nei controlli, in quanto pazienti che a tutti gli effetti non presentavano specifici DGI.

Non abbiamo dunque ritenuto che la "selettività" fosse costituisce un fattore confondente rispetto all'analisi effettuata: si tratta di un tratto che caratterizza questi pazienti, nel nostro studio peraltro, non in modo così importante, e presente quindi tanto nei casi quanto nei controlli.

Inoltre, come anticipato dai risultati preliminari della V Fase (ancora in corso), è importante sottolineare che non si sono riscontrate nel campione sottoposto a visita gastroenterologica pediatrica significative alterazioni nell'assetto nutrizionale - metabolico.

I numerosi parametri pediatrici considerati (profilo marziale, valori nutrizionali, indici di malassorbimento, screening allergico e per celiachia) sono risultati nei limiti di norma e non si è quindi ritenuto opportuno procedere ad una loro specifica analisi e ad un confronto casi/controlli.

Anche a livello di obiettività fisica (parametri auxologici, esame fisico generale ed addominale) si sono riscontrati dati di normalità, paragonabili alla popolazione generale pediatrica.

7.3 Calprest e Test di Permeabilità Intestinale

Nel nostro studio il Calprest si è dimostrato essere di semplice esecuzione ed ha portato a risultati che riteniamo rilevanti.

Non avevamo mai utilizzato tale indagine prima dell'avvio del presente studio.

Per incontrare una completa collaborazione delle famiglie all'esecuzione di tale test si sono resi necessari alcuni accorgimenti, in particolare preventivare una certa flessibilità nella raccolta dei campioni fecali (in giorni ed orari magari differenti da quelli preventivati in cui erano state programmate le altre analisi e valutazioni).

Già all'analisi quantitativa dei risultati del Calprest, si era evidenziato come i valori medio e massimo di CF fossero più alti nel gruppo dei casi; si era altresì ritenuto opportuno effettuare una correzione escludendo il valore di gran lunga maggiore rispetto agli altri in quanto ritenuto causa di dispersione dei valori (DS molto elevata nei casi rispetto a quella dei controlli).

Quando si è proceduto al confronto dei valori di CF mediante analisi statistica, si è ulteriormente evidenziato come la differenza rilevata all'analisi qualitativa dei dati risultasse anche statisticamente significativa ($p = 0,021$).

Risultano infatti positivi il 20 % dei casi (rispetto a nessuna positività nel gruppo dei controlli).

Abbiamo posto anche questo secondo dato numerico a confronto con quello disponibile relativo allo studio dei colleghi di Napoli (De Magistris et al.): la percentuale di positività della FC riscontrata in tale studio è infatti del 24,6 % nei casi.

I colleghi sono inoltre riusciti ad avere a disposizione i valori di FC anche per i parenti di primo grado dei pazienti affetti da autismo; riscontrano in questo secondo gruppo una percentuale di positività per FC del 11,7 %, più alta rispetto agli altri gruppi analizzati nello studio (costituiti da bambini "sani – che non presentano un disturbo dello spettro autistico – e loro parenti di primo grado).

Come già anticipato, al contrario che per il Calprest, per l'esecuzione del Test di Permeabilità Intestinale (dosaggio dell'escrezione urinaria di lattulosio/mannitolo) abbiamo incontrato molte difficoltà (vedi paragrafo successivo "Limitazioni dello studio").

Si è dovuto pertanto decidere in itinere, cambiando gli obiettivi prefissati, di eseguirlo solo su quei pazienti che mostravano alterazioni al Calprest (in totale, quindi, è stato eseguito solo su cinque pazienti).

Si è tentata un'analisi qualitativa dei risultati emersi, provando a verificare la sussistenza di qualche correlazione. Non è stato possibile inferire alcuna correlazione né rispetto ai valori di FC né alla tipologia o gravità sintomatologica.

Continuando nel parallelismo con il lavoro impostato dai colleghi napoletani, si evince peraltro come anche in tale studio - pur in presenza di idonei dati numerici sia rispetto agli indici di flogosi che a quelli di permeabilità intestinale – non sia emersa una chiara correlazione nell'alterazione ai due test laboratoristici.

7.4 Limitazioni dello studio

Le due maggiori limitazioni dello studio sono sicuramente rappresentate dall'esiguità del campione numerico e dalla difficoltà, non preventivata e che abbiamo dovuto affrontare in itinere, relativa all'esecuzione di uno dei due test che ritenevamo prioritari per la sperimentazione.

Rispetto alla numerosità del campione, come già discusso, abbiamo registrato un'alta percentuale di rifiuti o di drop out sia tra i pazienti non sintomatici sia tra quelli che presentavano sintomi gastrointestinali (rispetto all'arruolamento nel progetto, dopo la fase iniziale di somministrazione del protocollo di screening).

Ci siamo confrontati in equipe sulle possibili spiegazioni di tale difficoltà di arruolamento: molte delle famiglie dei pazienti affetti da autismo, come già accennato nell'introduzione del progetto, provano svariati percorsi terapeutici e sperimentano, negli anni, diversi insuccessi (rispetto alle attese...) divenendo progressivamente meno disponibili al coinvolgimento in programmi di ricerca o anche solo proposte che appaiono di ricaduta marginale rispetto ai grossi problemi di gestione quotidiana dei loro figli.

Questa difficoltà, con la quale abbiamo dovuto fare i conti rispetto alla proposta dell'attuale sperimentazione, si è manifestata sia nell'arruolamento iniziale (drop out di molti dei pazienti "non sintomatici"/controlli), sia nella successiva disponibilità e tenuta/collaborazione rispetto allo svolgimento dei test specifici (in particolare il test di permeabilità intestinale) o alla proposta di interventi terapeutici da monitorare nel tempo.

Rispetto invece alle difficoltà concrete di esecuzione dei test laboratoristici, come già discusso, ci eravamo prefissati di analizzare i pazienti arruolati nello studio rispetto a due variabili: la permeabilità intestinale (mediante l'esecuzione del test lattulosio-mannitolo) e la flogosi intestinale (mediante il dosaggio della calprotectina fecale).

Il primo dei due test si è mostrato da subito di più difficile esecuzione nel nostro campione.

La corretta esecuzione del test richiede un digiuno prolungato dei pazienti (sostanzialmente dalla cena del giorno precedente l'accertamento e per cinque ore successivamente all'ingestione della bevanda zuccherata).

Tale necessità, pur spiegata idoneamente e recepita dalle famiglie, ha precluso per diversi pazienti l'arruolamento oppure la corretta esecuzione del test.

Come già accennato, trattandosi di pazienti piccoli e spesso caratterizzati da estrema selettività alimentare e difficoltà o bizzarrie inerenti le sfere sensoriali (gusto e olfatto), un ulteriore ostacolo è stato rappresentato dalla palatabilità della miscela composta dai due zuccheri con l'acqua.

Anche l'aspetto della raccolta seriata delle urine ha rappresentato una difficoltà aggiuntiva che ha in alcuni casi pregiudicato la buona riuscita dell'indagine.

Tali difficoltà ci hanno indotto a modificare gli obiettivi previsti per la terza fase del progetto e a decidere, in itinere, di sottoporre tutti i pazienti arruolati al Calprest e di riservare il più difficoltoso Test di Permeabilità solo a quei pazienti con indici di alterata flogosi intestinale (ovvero valori di calprotectina fecale alterati).

Questo ci ha ovviamente precluso di raggiungere nei tempi preventivati un idoneo numero di pazienti "analizzati" rispetto ad entrambe le variabili individuate (permeabilità e flogosi intestinale) e ha limitato la nostra possibilità di correlare i dati clinici con quelli laboratoristici.

7.5 Conclusioni generali e prospettive future

L'argomento affrontato in questo progetto permane altamente complesso e meritevole di ulteriori studi di approfondimento nell'ottica di chiarire la relazione tra i DGI – e gli aspetti istopatologici sottostanti e connessi – e Disturbi dello Spettro Autistico, fornendo indicazioni precise per la loro individuazione ed il loro trattamento.

Il lavoro presentato, per i limiti analizzati e le difficoltà riscontrate, non ha portato a risultati definiti che ci consentano, come auspicavamo, di delineare linee guida in questo intricato argomento.

Siamo confortati, ma solo in parte, dal riscontro derivante dalla letteratura italiana e straniera che in questo triennio abbiamo particolarmente tenuto in considerazione rispetto a nuovi aggiornamenti: colpisce infatti come, dalle prime ricerche, effettuate per impostare correttamente il nostro progetto dal punto di vista teorico e bibliografico, si sia progressivamente registrata una riduzione del numero di articoli pubblicati, insieme ad un riconoscimento condiviso della difficoltà di affrontare tale argomento in maniera "parcellizzata" e alla segnalazione di difficoltà concrete nell'esecuzione di studi sperimentali in questo ambito (tra le altre: alte percentuali di drop-out di pazienti dopo iniziale entusiasta adesione, difficoltà etiche e mediche relative alla proposta randomizzata di diete e/p terapie farmacologiche per poterne osservare separatamente gli effetti...).

Siamo tuttavia soddisfatti di aver intrapreso tale percorso che, a livello clinico, ci ha fornito spunti di discussione importanti, aprendo possibili altre vie da percorrere.

Di sicuro, al di là degli specifici risultati ottenuti, abbiamo potuto stabilire alcuni punti di non ritorno e direttive che il nostro ambulatorio seguirà da ora in poi.

Ci sembra innanzitutto doveroso abbandonare la resistenza scientifica che era stata negli anni posta rispetto alle problematiche gastrointestinali nell'autismo (in riferimento soprattutto alle datate ipotesi patogenetiche relative alla vaccinazione antimorbillo), riconoscendo che si tratta di una realtà che, maggiormente indagata, potrà offrire importanti spunti anche dal punto di vista terapeutico.

I dati riguardanti la “normalità nutrizionale e metabolica” del nostro campione di pazienti, al di là degli aspetti che possono essere più o meno presenti ed importanti relativamente alla selettività alimentare, ci confortano rispetto alla situazione di iniziale confusione in cui ipotizzavamo che non ci fossero reali DGI da investigare, ma che generici sintomi celassero soltanto cattive abitudini alimentari. Sappiamo ora che i DGI vanno indagati nello specifico e separatamente.

Rispetto ai bambini che giungono in nuova diagnosi (sempre più frequentemente in età prescolare, spesso in fascia 0-3 anni), abbiamo stabilito che questi piccoli pazienti devono senz'altro venir studiati per la possibile compresenza di una malattia intestinale, indagando in modo accurato l'esistenza di possibili sintomi gastrointestinali sia con lo screening eziologico standard alla diagnosi sia, successivamente, in presenza di sintomi emergenti.

Correlato a questo aspetto, è importante promuovere una campagna di sensibilizzazione per il riconoscimento precoce dei sintomi gastrointestinali da parte dei pediatri di base (i primi, spesso, a visitare bambini a rischio non ancora diagnosticati e a raccogliere le preoccupazioni genitoriali, anche relativamente alla sfera somatica) e dei neuropsichiatri territoriali (che generalmente non si occupano nello specifico del management dei disturbi dello spettro autistico, ma che possono indirizzare più precocemente e correttamente i pazienti a rischio).

Tenendo in considerazione gli interessanti risultati relativi all'ipotesi dell'esistenza di una predisposizione genetica per le alterazioni della permeabilità intestinale (evinti per esempio dal già citato studio napoletano, in cui sono stati studiati anche i parenti di primo grado dei pazienti autistici e sono state riscontrate significative alterazioni al test di permeabilità intestinale anche in

questi ultimi), lo studio della “familiarità” potrebbe costituire anche per noi un filone di ricerca interessante, proponendo l’esecuzione dei test prescelti anche ai genitori e ai fratelli dei nostri pazienti.

8.0 BIBLIOGRAFIA

1. Horvath K, Perman JA. Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Curr Opin Pediatr.* 2002; 14(5):583–587
2. Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, Berelowitz M, Dhillon AP, Thomson MA, Harvey P, Valentine A, Davies SE, Walker-Smith JA. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis and pervasive developmental disorder in children [published partial retraction appears in *Lancet* 2004;363(9411):750]. *Lancet.* 1998;351(9103):637– 641
3. Wakefield AJ, Anthony A, Murch SH, Wakefield AJ, Anthony A, Murch SH, Thomson M, Montgomery SM, Davies S, O'Leary JJ, Berelowitz M, Walker-Smith JA. Enterocolitis in children with developmental disorders. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(9):2285–2295
4. Horvath K, Medieros L, Rabsztyń A. High prevalence of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorder (ASD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31(2):S174
5. Ibrahim SH, Voigt RG, Katusic AK, Weaver AL, Barbaresi WJ. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism in Olmsted County, Minnesota, 1976 –1997: a population-based study. *Pediatrics.* 2009;124(2):680–686
6. Asperger H. Psychopathology of children with celiac disease [in German]. *Ann Paediatr.* 1961;197:346 –351
7. Goodwin MS, Cowen MA, Goodwin TC. Malabsorption and cerebral dysfunction: a multivariate and comparative study of autistic children. *J Autism Child Schizophr.* 1971;1(1):48–62
8. Walker-Smith J, Andrews J. Alpha-1-antitrypsin, autism, and coeliac disease. *Lancet.* 1972;2(7782):883– 884
9. Panksepp J. A neurochemical theory of autism. *Trends Neurosci.* 1979;2(1):174 –177
10. Reichelt KL, Holt K, Hamberger A, Saelid G, Edminson PD, Braestrup CB, Lingjaerde O, Ledaal P, Orbeck H. Biologically active peptide-containing fractions in schizophrenia and childhood autism. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1993;28:627– 643

11. Shattock P, Kennedy A, Rowell F, Berney TP. Role of neuropeptides in autism and their relationships with classical neurotransmitters. *Brain Dysfunct.* 1991;3(2):328–345
12. Murch SH, MacDonald TT, Walker-Smith JA, Levin M, Lionetti P, Klein NJ. Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation. *Lancet.* 1993;341(8847):711–741
13. Wakefield AJ, Murch SJ, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, Berelowitz M, Dhillon AP, Thomson MA, Harvey P, Valentine A, Davies SE, Walker-Smith JA. Ileal-lymphoid nodular hyperplasia, non-specific colitis and pervasive developmental disorder in children [published partial retraction appears in *Lancet* 2004; 63(9411):750]. *Lancet* 1998; 351 (9103):673-641
14. Peltola H, Patja A, Leinikki P, Valle M, Davidkin I, Paunio M. No evidence for measles, mumps, and rubella vaccine-associated inflammatory bowel disease or autism in a 14-year prospective study. *Lancet.* 1998;351(9112):1327–1328
15. Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt J, Thorsen P, Olsen J, Melbye M. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *N Engl J Med.* 2002;347(19):1477–1482
16. Taylor B, Lingam R, Simmons A, Stowe J, Miller E, Andrews N. Autism and MMR vaccination in north London: no causal relationship. *Mol Psychiatry.* 2002;7(suppl 2):S7–S8
17. Honda H, Shimizu Y, Rutter M. No effect of MMR withdrawal on the incidence of autism: a total population study. *J Child Psychol Psychiatry.* 2005;46(6):572–579
18. Hornig M, Briese T, Buie T, Bauman ML, Lauwers G, Siemietzki U, Hummel K, Rota PA, Bellini WJ, O'Leary JJ, Sheils O, Alden E, Pickering L, Lipkin WI. Lack of association between measles virus vaccine and autism with enteropathy: a case-control study. *PLoS ONE.* 2008;3(9):e3140
19. Campbell DB, Buie TM, Winter H, Bauman M, Sutcliffe JS, Perrin JM, Levitt P. Distinct genetic risk based on association of MET in families with co-occurring autism and gastrointestinal conditions [published correction appears in *Pediatrics* 2009;123(4):1255]. *Pediatrics.* 2009;123(3):1018–1024

20. Balzola F, Clauser D, Repici A, Barbon V, Sapino A, Barbera C, Calvo PL, Gandione M, Rigardetto R, Rizzetto M. Autistic enterocolitis: confirmation of a new inflammatory bowel disease in an Italian cohort of patients. *Digestive and Liver Disease* PO2.87, S137. Vol 37. Supplement N.1 March 2005
21. Balzola F, Clauser D, Repici A, Barbon V, Sapino A, Barbera C, Calvo PL, Gandione M, Rigardetto R, Rizzetto M. Autistic enterocolitis: confirmation of a new inflammatory bowel disease in an Italian cohort of patients. *Gastroenterology* 2005 Vol 128(4), supplement 2. M1074 A-303
22. Balzola F, Barbon V, Repici A, Rizzetto M, Clauser D, Gandione M, Sapino A. Panenteric IBD-Like Disease in a Patient with Regressive Autism Shown for the First Time by the Wireless Capsule Enteroscopy: Another Piece in the Jigsaw of this Gut-Brain Syndrome? *Am J Gastroenterol.* 2005; 100(4): 979-81
23. Balzola F, Clauser D, Repici A, Caldognetto M, Barletti C, Sapino A, Barbera C, Calvo PG, Reggio D, Gennai F, Nonnato A, Forni M, Morra I, Gandione M, Rigardetto R, Pizzetto M. Beneficial behavioural effects of IBD therapy and gluten/casein-free diet in an Italian cohort of patients with autistic enterocolitis followed over one year. *Gastroenterology* 2006 Vol 130(4), supplement 2. S1364 A-211
24. De Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Frolli A, Iardino P, Carteni M, De Rosa M, Francavilla R, Riegler G, Militerni R, Bravaccio C. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Oct;51(4):418-24
25. Rice CE, Baio J, Van Naarden BK, Doernberg N, Meaney FJ, Kirby RS. A public health collaboration for the surveillance of autism spectrum disorders. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007; 21(2):179-190
26. Società Italiana di Neuropsichiatria dell'Infanzia e dell'Adolescenza SINPIA. Linee Guida per l'Autismo. Raccomandazioni tecniche-operative per i servizi di neuropsichiatria dell'età evolutiva. 2005; Sito ufficiale SINPIA: www.sinpia.org

27. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, Revised Fourth Edition 1994. Washington, DC: American Psychiatric Association. (Trad. it Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali, DSMIV-TR, Masson, Milano, 2001)
28. World Health Organization (1992). The ICD-10 classification of mental and behavioral disorder: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: World Health Organization
29. Fombonne E. The Prevalence of Autism. *JAMA* 2003 Jan 1; 289 (1):87-89.
30. Baird G., Simonoff E., Pickles A., Chandler S., Loucas T., Meldrum D., Charman T. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP) *Lancet* 2006; 368:210-5
31. Besana D. Osservatorio Regionale sulla Disabilità – Autismo. 2000 www.alihandicap.org/introau.htm
32. Fombonne E, Heavey L, Smeeth L, Rodrigues LC, Cook C, Smith PG, Meng L and Hall AJ. Validation of the diagnosis of autism in general practitioner records. 2004 *BMC Public Health* 4:5
33. Fombonne E. Pervasive Developmental Disorders in Preschool Children: Confirmation of High prevalence, *Am J Psychiatry* 2005;162: 1133-1141.
34. Williams J, Brayne CEG, Higgins JPT. Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders, *Arch.Dis.Child.* 2005 doi:10.1136/adc.2004.062083
35. Filipeck PA, Accardo PJ, Ashwal S, Baranek GT, Cook EH, Dwason G, Gordon B et al. 2000 Practice parameter: screening and diagnosing of autism, Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Child Neurolog Society American Academy of Neurology
36. Asperger H. « Die Autistischen Psychopathen im Kindesalter », *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1944; 117, 76-136

37. Bettelheim B. *The Empty Fortress*, Macmillan Company, New York 1967 (trad it. *La Fortezza Vuota*, Feltrinelli, Milano 1976).
38. Rimland B. *Infantile Autism : the Syndrome and its Implications for a Neural Theory of Behaviour*. New York : Appleton Century Crofts 1964.
39. Lelord G, Muh JP, Sauvage D, Hérault J. Neurobiologie des syndromes autistiques de l'enfant. *Médecine/Sciences* 1996 ;12:715-22
40. Gillberg C, Coleman M. Autism and medical disorders: a review of the literature *Developmental Medicine and Child Neurology* 1996;8: 191-202
41. Conroy J., Meally E., Kearney G., Fitzgerald M., Gill M., Gallagher L. (2004) Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population. *Mol Psychiatry*, 9: 587-93.
42. Reichelt K.L., Hole K., Hamberger A., Sælid G., Edminsson P.D., Braestrup C.B., Lingjærde O., Ørbek H. (1981) Biologically active peptide containing fractions in schizophrenia and childhood autism. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 28, 627-643.
43. Garreau B., Barthélémy C., Martineau J., Bruneau N., Lelord G. (1985) Aspects électrophysiologiques de l'autisme de l'enfant. *L'encéphale*, XI, 145-55
44. Lelord G., Sauvage D. (1990) *L'autisme de l'enfant*. Masson, Paris (trad. it. *L'autismo infantile*. Milano, Masson Ed. 1994)
45. Belmonte M-K., Allen G., Beckel-Mitchener A., Boulanger L.M., Carper R.A., Webb S.J. (2004) Autism and Abnormal development of brain connectivity. *J Neuroscience*, 24(42):9228-9231.
46. Rizzolatti G., Fadiga L., Gallese V., Fogassi L. (1996) Premotor cortex and the recognition of motor actions *Brain Res Cogn Brain Res* 3(2)131-41
47. Dapretto M., Davies M.S., Pfeifer J.H., Scott A.A., Sigman M., Bookheimer S.Y., Iacoboni

M. (2006) Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience* 9(1)28-30

48. Oberman L.M., Hubbard E.M., McCleery J.P., Altschuler E.L., Ramachandran V.S., Pineda J.A. (2005) EEG evidence for mirror neurons dysfunction in autism spectrum disorders *Brain Res Cogn Brain Res* 24(2)190-8

49. Kaufmann W.E., Cooper K.L., Mostofsky S.H., Capone G.T. Kates W.R., Newschaffer C.J., Bukelis I., Stump M.H., Jann A.E., Lanham D.C. (2003) Specificity of cerebellar vermian abnormalities in autism: a quantitative magnetic resonance imaging study. *J Child Neurol.* 18(7): 463-70

50. Baron-Cohen S., Ring H.A., Bullmore E.T., Wheelwright S., Ashwin C., Williams S.C. (2000): The amygdala theory of autism. *Neurosc Biobehav Reviews* 24:355-364

51. Ritvo E., Freeman B., Scheibe A. et al. (1986) Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLA-NSAC autopsy research reports. *Am J Psychiatry*; 143: 862-866

52. Kern J.K. (2003) Purkinje cell vulnerability and autism: a possible etiological connection. *Brain Dev.* 25(6): 377-82

53. Goussé V., Plumet M.H., Chabane N., Mouren-Siméoni M.C., Ferradian N., Leboyer M. (2002) Fringe phenotypes in autism: a review of clinical, biochemical and cognitive studies. *Eur Psychiatry*, 17,120-8

54. Tuchman R. (2003) Autism. *Neurol Clin.* 21(4): 915-32

55. Hashimoto T., Masanobu T., Kazuyosi M., Tsutomu Y., Masahito M., Midori H., Yasuhiro K. (1995) Development of Brainstem and Cerebellum in Autistic Patients. *J Autism Dev Disord* 25,1.1-18

56. Rodier P.M. (2002) Converging evidence for brainstem injury in autism. *Dev Psychopathol* 14(3):537-57

57. Ornitz E.M., Atwell C.W., Kaplan A.R., Westlake J.R. (1985) Brain-stem Dysfunction in Autism. Results of Vestibular Stimulation. *Arch Gen Psychiatry*, 42,1018-1025
58. Sacco R., Militerni R., Frolli A., Bravaccio C., Gritti A., Elia M., Curatolo P., Manzi B., Trillo S., Lenti C., Saccani M., Schneider C., Melmed R., Reichelt K.L., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Persico A.M. (2007) Clinical, morphological, and biochemical correlates of head circumference in autism. *Biol Psychiatry*. 1;62(9):1038-47
59. Gillberg C., Coleman M. (2000) *The Biology of the Autistic Syndromes*, 3d ed London, UK: Mac Keith Press, Distributed by Cambridge University Press
60. Bailey A., Le Couter A. (1997) Autism as Strongly Genetic Disorders: Evidence from a British Twin Study, *Psychological Bulletin*, 25,63-78
61. Belmonte M. (2008) Autistic neural information processing is “All in the family?”
Comunicazione Personale II Congresso Nazionale SIRFA 28/11/2008 Milano, in press.
62. Volkmar F.R. Lord C., Bailey A., Schultz R.T., Klin A. (2004) Autism and pervasive developmental disorders. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 45:1,135-170
63. Lintas C, Persico AM (2008) Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist *J Med Genet*. Aug 26. [Epub ahead of print]
64. Garbett K., Ebert P.J., Mitchell A., Lintas C., Manzi B., Mirnics K., Persico A.M. (2008) Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis*. 30(3):303-11
65. Damasio A.R., Maurer R.G. (1978) A neurological model for childhood autism. *Arch Neurol*; 35 :778-86.
66. Garreau B., Barthélémy C., Domenech J., Sauvage D., Muh J.P., Lelord G., Callaway E. (1980) Troubles du métabolisme de la dopamine chez des enfants ayant un comportement autistique. *Acta Psychiatr Belg*; 80:249-65

67. Palmieri L., Papaleo V., Porcelli V., Scarcia P., Gaita L., Sacco R., Hager J., Rousseau F., Curatolo P., Manzi B., Militerni R., Bravaccio C., Trillo S., Schneider C., Melmed R., Elia M., Lenti C., Saccani M., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Reichelt K.L., Persico A.M. (2008) Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Mol Psychiatry*. Jul 8. doi:10.1038/mp.2008.63
68. James S.J., Cutler P., Melnyk S. et al. (2004) Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation disorder. *Ann N Y Acad Sci*;1107:92-103
69. Yorbik O., Sayal A., Akay C. et al (202) Invesigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins Leukot Essen Fatty Acids*; 67(5)341-363 McGinnins W.R. (2004) Oxidative stress in autism. *Altern Ther Health Med* 10(6):22-36
70. James S.J., Cutler P., Melnyk S., Jernigan S., Janak L., Gaylor D.W., Neubrandner J.A. (2006) Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141(8):947-56
71. Reichelt K.L., Hole K., Hamberger A., Sælid G., Edminsson P.D., Braestrup C.B., Lingjærde O., Ørbek H. (1981) Biologically active peptide containing fractions in schizophrenia and childhood autism. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 28, 627-643.
72. D'Eufemia P., Celli M., Finocchiaro R., Pacifico L., Viozzi L., Zaccagnini M., Cardi E., Giardini O.(1996) Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr*; 85:1076-9
73. Brantl W., Teschemacher H. (1979) A maternal opioid activity in bovine milk and milk product *Naunyn Schmiedebergs Archiv der Pharmacology* 306, 301-304
74. Graf L. Horvath K., Walcz E., Berzetei I, Burnier J. (1987) Effect of two synthetic alphasagliadin peptides on lymphocytes in celiac disease: identification of a novel class of opioid receptors,. *Neuropeptides* 9, 113-122

75. Israngkun P., Newman H., Patel S. (1986) Potential biochemical markers for infantile autism. *Neurochemical Pathology* 5, 51-70
76. Reichelt K.L., Sælid G., Lindback T., Bøler J.B. (1986) Childhood autism. A complex disorder *Biological Psychiatry* 21, 1279-1290
77. Shattock P., Kennedy A., Rowell F., Berney T. (1990) Role of neuropeptides in autism and their relationships with classical neurotransmitters *Brain Dysfunction* 3, 315-327
78. Cade R., Privette M., Fregly M., Rowland N., Sun Z., Zele V., Wagemaker H., Edelstein C. (1999) Autism and Schizophrenia: intestinal disorders *Nutritional Neuroscience* 2, 57-72
79. Shanahan M.R., Venturini A.J., Daiss J.L., Friedman A.E. (2000) Peptide diagnostic markers for human disorders *European Patent Application EP O 969 015 A2*, 1-44
80. Gillberg C., Terenius L., Lønnerholm G. (1985) Endorphin activity in childhood psychosis *Archives of General Psychiatry* 42, 780-783
81. LeBoyer M., Boulard M.P., Recasens C., Philippe A., Guilloud-Bataille M., Bondoux D., Tabuteau F., Dugas M., Panksepp J., Launay J.M. (1994) Difference between plasma N- and Cterminally directed beta-endorphin immunoreactivity in infantile autism. *American Journal of Psychiatry* 151, 1797-1801
82. Lindstrøm L.H., Nyberg F., Terenius L., Bauer K., Besev G., Gunne L.M., Lyrenås S., Willdeck-Lund G., Lundberg B. (1984) CFS and plasma beta-caseomorphin like opioid peptides in postpartum psychosis. *American Journal of Psychiatry* 141, 1059-1066
83. Sun Z., Cade J.R., Fregly M.J., Privette R.M. (1999) β -casomorphin induces Fos-like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia and autism. *Autism* 3(1),67-83
84. Banks W.A., Kastin A.J. (1990) Peptide transport systems for opiate across the bloodbrain barrier *American Journal of Physiology* 259,E1-E10
85. Ermisch A., Brust P., Kretschmar R., Buhle H.J. (1993) Peptides and blood-brain barrier

transport *Psychological Review* 73,489-527

86. Zagon S., McLaughlin P.J. (1987) Endogenous opioid systems regulate cell proliferation in the developing rat brain *Brain Research* 412, 68-72

87. Stubbs E.G., Crawford M.L., Burger D. et al (1977) Lymphocyte responsiveness in autistic children. *J Autism Child Schizophr*; 7;49-55

88. Warren R.P., Yonk L.J., Burger R.A., Cole P., Odell J.D., Warren W.L., White E., Singh V.K. (1990) Deficiency of suppressor-inducer (CD4+CD45RA+) T cells in autism. *Immunol Invest* 19:245-51

89. Warren R.P., Foster A., Margaretten N. (1987) Reduced natural killer cell activity in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*;26:333-5

90. Ferrari P., Marescot M.R., Moulias R., Bursztein C., Deville Chabrolle A., Thiollet M., Lesourd B., Braconnier A., Dreux C., Zarifian E. et al (1988) Immune status in infantile autism. *L'Encéphale*; 14:339-44

91. Ashwood P. Anthony A., Torrente F., Wakefield A.J. (2004) Spontaneous mucosal lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms: mucosal immune activation and reduced counter regulatory interleukin-10. *J Clin Immunol* 24(6):664-73

92. Cohly H.A., Panja A. (2005) Immunological findings in autism. *Int Rev Neurobiol* 71:317-41

93. Weber W., Newmark S. (2007) Complementary and Alternative Medical Therapies for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism. *Pediatr Clin N Am* 54:983-1006

94. Connolly A.M., Chez M.G., Pestronk A., Arnold S.T., Mehta S., Deuel R.K. (1999) Serum autoantibodies to brain in Landau-Kleffner variant, autism and other neurologic disorder. *J Pediatr*; 134(5):607-13

95. Singh V.K., Warren R., Averett R., Ghaziuddin M. (1997) Circulating autoantibodies to

- neuronal and glial filament proteins in autism. *Pediatr Neurol*; 17(1):88-90
96. Lucarelli S., Frediani T., Zingoni A.M., Ferruzzi F, Giardini O, Quintieri F, Barbato M, D'Eufemia P, Cardi E. (1995) Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med*; 37(3):137-41
97. Jyonouchi H., Sun S., Itokazu N. (2002) Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. *Neuropsychobiology*; 46(2):76-84
98. Horvath K., Perman J.A. (2002) Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Curr Opin Pediat* , 14(5):583-7
99. Dohan F.C. (1968) Schizophrenia: possible relationship to cereal grains and celiac disease. In: S. Sankar, ed. *Schizophrenia: Current Concepts and Research*. Hicksville, NY: PJD Publications
100. Gillberg C. (1988) The role of endogenous opioids in autism and possible relationships to clinical features. In: Wing L, ed. *Aspects of Autism: Biological Research*. London: Gaskell/NAS;31-7
101. Melmed R., Schneider C.K., Fabes R.A. et al. (2000) Metabolic markers and gastrointestinal symptoms in children with autism and related disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutrit* : 31 S2:A116
102. Horwath K., Papadimitriou J.C., Rabsztyn A., Drachenberg C., Tildon J.T. (1999) Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder *Journal of Pediatrics* 135:559-563
103. Parracho H.M., Bingham M.O., Gibson G.R., McCartney A.L. (2005) Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol* 54(Pt 10):987-91
104. Bolte E.R. (1998) Autism and *Clostridium tetani*. *Med Hypotheses*; 51:133-44.
105. Sandler R.H., Finegold S.M., Bolte E.R., Buchanan C.P., Maxwell A.P., Väisänen M.L.,

- Nelson M.N., Wexler H.M. (2000) Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressiveonset autism. *J Child Neurol*; 15:429-35
106. <http://www.autismwebsite.com/ari/dan/pangborn.htm>
107. Wakefield A.J. (2002) The gut-brain axis in childhood developmental disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34:S14-S17
108. Anthony A., Sim R., Murch S.M. et al. (1998) Lymphonodular hyperplasia of the ileum with increased MVH class II antigen expression and macrophage infiltration of the colon in children with regressive developmental disorder. *Gut* 42(S1):A24
109. Furlano R.I., Anthony A., Day R., Brown A., McGarvey L., Thomson M.A., Davies S.E., Berelowitz M., Forbes A., Wakefield A.J., Walker-Smith J.A., Murch S.H. (2001) Colonic CD8 and gamma delta T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J Pediatr* 138(3):366-72
110. Torrente F., Machado N., Perez-Machado M. et al (2002) Enteroopathy with T cell infiltration and epithelial IgG deposition in autism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 31(S2):A546
111. Wakefield A.J., Ashwood P., Limb K., Anthony A. (2005) Significance of ileocolonic lymphoid nodular hyperplasia in children with autistic spectrum disorder. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17(8):827-36
112. Anthony A., Bjnarson I., Sigthorsson G. et al. (2000) Fecal calprotectin levels correlate with acute inflammation in autistic enterocolitis. *Gut*; 46(S2):A3
113. Torrente F., Anthony A., Heuschkel R.B., Thomson M.A., Ashwood P., Murch S.H. (2004) Focal-enhanced gastritis in regressive autism with features distinct from Crohn's and Helicobacter pylori gastritis. *Am J Gastroenterol*;99(4):598-605
114. Balzola F., Barbon V., Repici A., Rizzetto M., Clauser D., Gandione M., Sapino A. (2005) Panenteric IBD-like disease in a patient with regressive autism shown for the first time by the wireless capsule enteroscopy: another piece in the jigsaw of this gut-brain syndrome? *Am J Gastroenterol* 100(4):979-81.

115. Balzola F., Clauser D., Curri F., Caldognetto M., Repici A., Barletti C., Musso A., Bruno M., Sracco G., Sapino A., Castellano I., Reggio D., Camamrota P., Lerro P., Calvo P.L., Forni M., Morra I., Gandione M., Rigardetto R., Rizzetto M. (2007) Autistic Enterocolitis in childhood: the early evidence of the later Crohn's disease in Autistic adulthood? *Gastroenterology*;132,4,S2:W1100A660
116. Bellanti J.A., Zeligs B.J., Malka-Rais J., Sabra A. (2003) Abnormalities of Th1 function in non-IgE food allergy, celiac disease and ileal lymphonodular hyperplasia : a new relationship ? *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 90,6,S1,84-89.
117. Murch S.H., Anthony A., Casson D.H., Malik M., Berelowitz M., Dhillon A.P. et al. (2004) Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children (Retraction of vol 351, p 637, 1998). *Lancet* 363(9411),750-750
118. Chen W., Landau S., Sham P., Fombonne E. (2004) No evidence for links between autism, MMR and measles virus. *Psychological Medicine* 34(3), 543-553
119. Wilson K., Mills E., Ross C., McGowan J., Jadad A. (2003) Association of autistic spectrum disorder and the measles, mumps and rubella vaccine – A systematic review of current epidemiological evidence. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 157(7), 628-634
120. Baird G., Pickles A., Simonoff E., Charman T., Sullivan P., Chandler S., Loucas T., Meldrum D., Afzal M., Thomas B., Jin L., Brown D. (2008) Measles vaccination and antibody response in autism spectrum disorders *Arch. Dis. Child* 93(10):832-7
121. Richmond P. Goldblatt D. (1998) Autism, inflammatory bowel disease and MMR vaccine. *Lancet*; 351:1355
122. Theander G., Trägårdh (1976) Lymphoid hyperplasia of the colon in childhood. *Acta Radiologica Diagnosis* 17:631.40
123. Bejaoui M., Guezmir M., Hamdi M., Mezni F., Gorbil A., Lakhoua R. (1992) Hyperplasie lymphoide de l'intestin chez l'enfant. *Ann Pediatr (Paris)*: 39:359-64

124. Colòn A.R., DiPalma J.S., Leftridge C.A., (1991) Intestinal lymphoidnodular of childhood: patterns of presentation. *J Clin Gastroenterol*; 13:163-166
125. Fieber S.S., Schaeffer H.J. (1966) Lymphoid hyperplasia of the terminal ileum – a clinical entity? *Gastroenterology* 50:83-98
126. Riddlesberger M.M., Lebenthal E. (1980) Nodular colonic mucosa of childhood: normal or pathologic. *Gastroenterology* 79:265-270
127. Kaplan B., Benson J. Rothstein F., Dahms B., Haplin T. (1984) Lymphoidnodular hyperplasia of the colon as a pathological finding in children with lower gastrointestinal bleeding *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 29:257-62
128. Kokkonen J. Karttunen T.J. (2002) Lymphoidnodular hyperplasia in the mucosa of the lower gastrointestinal tract in children: an indication of enhanced immune response? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 34:42-46
129. Hermans P.E., Huizenga K.A., Hoffmann H.N., Brown A.L., Markowitz H. (1966) Dysgammaglobulinaemia associated with nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine. *Am J Med*, 40:78-89
130. Webster A.D.B., Kenwright S., Ballard J., Shiner M., Slavin G., Levi A.J., et al (1977) Nodular lymphoid hyperplasia of the bowel in primary hypogammaglobulinaemia: study of in vitro lymphocyte function. *Gut* 18:364-372
131. Levendoglu H., Rosen Y. (1992) Nodular lymphoidnodular hyperplasia of gut in HIV infection. *Am J Gastroenterol* 87:1200-1202
132. Sbeih F., Abdullar A., Sullivan S., Merenkov Z. (1996) Antral nodularity, gastric lymphoid hyperplasia and *Helicobacter Pylori* in adults. *J Clin Gastroenterol* 22:227-230
133. Afzal N., Murch S., Thirrupathy K., Berger L., Fagbemi A., Heuschkel R. (2003) Constipation with acquired megarectum in children with autism. *Pediatrics* 112(4):939-42
134. Reichelt K.L., Ekrem J., Scott H. (1990) Gluten., milk proteins and autism: dietary

intervention effects on behaviour and peptide secretion *Journal of Applied Nutrition* 42,1-11

135. Knivsberg A.M., Wiig K., Lind G., Nødland M., Reichelt K.L. (1990) Dietary intervention in autistic syndromes *Brain Dysfunction* 3, 315-327

136. Knivsberg A.M., Reichelt K.L., Nødland M., Høyen T. (1995) Autistic syndromes and diet: a follow-up study. *Scandinavian Journal of Educational Research*. 39,223-236

137. Knivsberg A.M., Reichelt K.L., Nødland M., Høyen T.(1998) Parents' observation after one year of dietary intervention for children with autistic syndromes. *Conference proceedings: Psychobiology of Autism: Current Research and Practice (Autism Research Unit, University of Sunderland and Autism North Ltd, Sunderland)*13-24

138. Knivsberg A.M., Reichelt K.L., Nødland M. (1999) Dietary intervention for a seven year old girl with autistic behaviour. *Nutritional Neuroscience* 2,435-439

139. Rimland B. (1988) Comparative effect of treatment on child's behaviour. *Autism Research Review International* 2(4), Publication 34B(Revised)

140. Rimland B. (2000) Parent rating of behavioural effects of drugs, nutrients and diets. *Autism Research Review International* 14(4), ARI Publication 34

141. Lucarelli S., Frediani T., Zingoni A., Ferruzzi F., Giardini O., Quintieri F., Barbato M., D'Eufemia P., Cardi E. (1995) Food allergy and infantile autism. *Panminerva medica* 37(3),137-141

142. Shattock R. (1995) Can dietary intervention be used successfully as a therapy in autism. Conference proceedings, *Psychological Perspectives in Autism (University of Sunderland, Autism Research Unit, Sunderland)* 203-208

143. Adams L., Conn S. (1997) Nutrition and its relationship to autism. *Focus on autism and other developmental disabilities* Spring, 3-58

144. Whiteley P., Rodgers J., Savery D., Shattock P. (1999) A gluten-free diet as an

- intervention for autism and associated spectrum disorders; preliminary findings. *Autism* 3(1),45-65
145. Millward C., Ferriter M., Calver S., Connell-Jones G. (2005) Gluten and casein free diets for autistic spectrum disorder. The Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 1
146. Mariani Cerati D., Hanau C. (2005) Autismo e medicine alternative *Medico e bambino* 7; 465-468
147. Horwath K., Stefanotos G., Sokolski K.N., Wachtel R., Nabors L., Tildon J.T. (1998) Improved social and language skills after secretin administration in patients with autistic spectrum disorders. *Journal of the Association for Academic Minority Physicians*, 9:9-15
148. Patel N.C., Yeh J.Y., Shepherd M.D., Crismon M.L. (1998) Secretin treatment for autistic disorder: a critical analysis. *Pharmacotherapy* 22:905-914
149. Pallanti S., Lassi S., La Malfa G., Campigli M., Di Rubbo R., Paolini G., Cesarali V. (2005) Short report: autistic gastrointestinal and eating symptoms treated with secretin: a subtype of autism. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health*: I. 2,doi:10.1186/1745-0179-1-24
150. Brudnak M.A., Rimland B., Kerry R.E., Dailey M., Taylor R., Stayton B., Waickman F., Waickman M., Pangborn J., Buchholz I. (2002) Enzyme-based therapy for autism spectrum disorder – Is it worth another look? *Medical Hypotheses* 58(5),422-428
151. Barthelemy C, Adrien JL, Tanguay P, Garreau B, Fermanian J, Roux S, Sauvage D, Lelord G. The Behavioral Summarized Evaluation: validity and reliability of a scale for the assessment of autistic behaviors. *J Autism Dev Disord*. 1990; 20(2):189-204
- 152 Barthélémy C., Lelord G. (1997) Manuel ECA-R Echelle d'évaluation des comportements autistiques (version révisée). *Editions et applications psychologiques, Paris*.
- 153 Schopler E., Reichler R.J., Renner B.R. (1988) The Childhood Autism Rating Scale (CARS). *Western Psychological Services, L.A.*
- 154 Service d'Explorations Fonctionnelles, Pédiopsychiatrie, Hôpital Bretonneau, Tours,

France. Prof. C. Barthélémy

153. Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ 3rd, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, Whitaker AH, Atkins D, Bauman ML, Beaudet AL, Carr EG, Gershon MD, Hyman SL, Jirapinyo P, Jyonouchi H, Kooros K, Kushak R, Levitt P, Levy SE, Lewis JD, Murray KF, Natowicz MR, Sabra A, Wershil BK, Weston SC, Zeltzer L, Winter H. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics* 2010;125 Suppl 1:S1-18

154. Buie T, Fuchs GJ 3rd, Furuta GT, Kooros K, Levy J, Lewis JD, Wershil BK, Winter H. Recommendations for evaluation and treatment of common gastrointestinal problems in children with ASDs. *Pediatrics* 2010;125 Suppl 1:S19-29

Desidero ringraziare

il prof. Lenti per le proposte ed il sostegno

la dott.ssa Diana Ghisleni per la collaborazione e la consulenza pediatrica

il dottor Marco Siviero per il prezioso aiuto nella statistica

le dott.sse Alessandra Barassi e Francesca Ghilardi per la parte laboratoristica

*le dott.sse Monica Saccani e Federica Aggio, insieme alle specializzande del DH NPI,
per la parte esecutiva*