



PRINCIPIO METODOLOGICO DEL DOSAGGIO ALLERGIA ALIMENTARE IgG MEDIATA

Il test Allergia alimentare IgG mediata è un test immunoenzimatico basato sulla metodica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Questo test consente l'identificazione ed il dosaggio di anticorpi di classe IgG (in tutte le sue sottoclassi) diretti contro 93 diversi antigeni alimentari ed eventualmente presenti nel siero del paziente. Sono disponibili test in cui vengono saggiate IgG specifiche per 40 alimenti e per 5 alimenti.

La metodica utilizzata prevede una procedura a più step e l'utilizzo, quale substrato tecnologico, di una piastra appositamente studiata e realizzata, che funge da supporto solido per lo svolgimento delle necessarie reazioni immunoenzimatiche, e di un calibratore che consente l'espressione di risultati anche quantitativi. Nella fase di realizzazione della piastra in ogni pozzetto viene fissata una quantità standard di un solo antigene alimentare, diverso da pozzetto a pozzetto.

Il siero del paziente opportunamente centrifugato e diluito, viene ripartito nei pozzetti della piastra. In ciascun pozzetto, qualora il siero contenga IgG specifiche per l'antigene alimentare fissato nel pozzetto stesso, si realizza un legame tra l'anticorpo e l'antigene; nei pozzetti in cui vi sono antigeni alimentari verso i quali non vi sono anticorpi non si realizza, invece, alcun legame. Dopo incubazione della piastra per 30 min. a temperatura ambiente si effettua un lavaggio dei pozzetti, che ha sostanzialmente lo scopo di rimuovere gli anticorpi che non si sono fissati alla piastra perché non hanno trovato il corrispondente antigene.

Dopo il lavaggio, in tutti i pozzetti viene aggiunta una quantità standard di un anticorpo monoclonale diretto contro la porzione costante delle IgG; l'anticorpo, coniugato con un enzima (perossidasi di rafano), si lega a tutte le IgG del paziente eventualmente presenti sulla piastra, indipendentemente dalla loro specificità per i diversi antigeni. Nei pozzetti contenenti antigeni verso cui il paziente presenta allergia si formano, quindi, complessi anticorpo monoclonale - anticorpo IgG - antigene pozzetto, mentre nei restanti pozzetti, non essendovi complessi anticorpo IgG antigene pozzetto l'anticorpo monoclonale non si lega.



Anche in questo fase, al fine di consentire l'eventuale formazione del legame, la piastra viene posta in incubazione per 30 min. a temperatura ambiente. Al termine della fase di incubazione si esegue un secondo lavaggio finalizzato a rimuovere l'anticorpo monoclonale dai pozzetti in cui esso non si è fissato. Infine in tutti i pozzetti viene aggiunto il substrato (TMB) della reazione catalizzata dall'enzima fissato all'anticorpo monoclonale; tale sostanza viene scissa dall'enzima assumendo una colorazione proporzionale alla quantità di enzima presente, che dipende a sua volta dalla quantità di anticorpi IgG del paziente diretti verso quel dato antigene con una valutazione quantitativa delle IgG specifiche presenti. L'aggiunta di una soluzione bloccante dopo 10 min. consente il raggiungimento del pH ottimale per l'arresto dello sviluppo del cromogeno e favorisce la standardizzazione della procedura. La lettura delle densità ottiche può essere condotta a 450 nm (singola lunghezza d'onda) o a 450/620 nm (doppia lunghezza d'onda) dei singoli pozzetti e necessita di un fotometro per micropiastre.



STUDIO CLINICO SPERIMENTALE RANDOMIZZATO CONTROLLATO IN DOPPIO CIECO SUL RUOLO EZIOPATOGENETICO DELLE ALLERGIE ALIMENTARI IgG MEDIATE NELL'INSORGENZA DELLA DISPEPSIA CRONICA.

Introduzione: Il termine “dispepsia” viene utilizzato per indicare una serie di disturbi, anche differenti tra loro, accomunati dal fatto di essere percepiti dal paziente come malessere a livello dei quadranti addominali superiori o, talvolta, inferiori, spesso in relazione cronologica con l’assunzione di cibo. I disturbi che più comunemente rientrano in tale definizione sono:

- dolore addominale franco;
- sensazione di pienezza epigastrica;
- pirosi;
- tensione addominale;
- sensazione di digestione lenta e laboriosa;
- eruttazioni e/o meteorismo.

Considerazioni di carattere fisiopatologico, nonché risultati di studi clinici, fanno ritenere che i sintomi comunemente definiti come dispepsia possano essere in realtà attribuibili all’interessamento di organi diversi per cause differenti. Inoltre, l’attuale inquadramento eziopatogenetico della dispepsia prevede una distinzione tra forme “organiche” e forme “funzionali”, utilizzando quale elemento discriminante la presenza o l’assenza di lesioni organiche. Le cause più frequenti di dispepsia organica sono rappresentate da:

Patologie dello stomaco:

- gastriti;
- reflusso gastro-esofageo;
- ulcera peptica;
- neoplasie.



BETA DIAGNOSTICI

Patologie del duodeno:

- duodenite;
- ulcera duodenale

Patologie del digiuno e dell'ileo:

- enteriti;
- sindromi da malassorbimento;
- neoplasie.

Patologie delle vie biliari:

- colecistite;
- colelitiasi;
- litiasi coledocica.

Patologie del fegato:

- epatiti;
- cirrosi;
- fegato da stasi.

Patologie del pancreas:

- pancreatite;
- neoplasie.

Patologie metaboliche:

- diabete mellito;
- alterazione della funzione tiroidea;
- iperparatiroidismo.

Alterazioni indotte da farmaci:

- FANS;
- antibiotici;
- digitale;
- teofillina;
- altri.



Per quanto riguarda le forme funzionali, invece, l'eziopatogenesi è a tutt'oggi sconosciuta, anche se sono state formulate delle ipotesi, non sufficientemente suffragate da evidenze cliniche. Particolare attenzione è stata posta sul rapporto disturbo-cibo, ed in passato è stato considerato il ruolo svolto dall'assunzione di grassi, capaci di rallentare lo svuotamento gastrico e, potenzialmente, di provocare l'insorgenza del disturbo in una percentuale di soggetti. Attualmente l'interesse maggiore è verso l'esistenza di meccanismi immuno-mediati innescati da antigeni alimentari in individui predisposti.

Disegno dello studio

Obiettivo: L'obiettivo dello studio è quello di definire l'eventuale ruolo svolto da anticorpi di classe IgG rivolti verso antigeni alimentari nella patogenesi della dispepsia.

Metodo: Lo studio viene condotto in forma di trial clinico randomizzato controllato in doppio cieco, studiando l'andamento del disturbo in due campioni di pazienti, tutti positivi a test ELISA per la determinazione dei titoli di IgG contro antigeni alimentari, uno dei quali segue una dieta di eliminazione, mentre l'altro segue una dieta varia. Il miglioramento o la risoluzione del disturbo nei pazienti a dieta ristretta viene considerato indicativo dell'esistenza di un rapporto di causa- effetto tra allergia alimentare con presenza di IgG e dispepsia, ossia dell'esistenza di un ruolo patogenetico svolto dalle IgG. Il disegno dello studio è il seguente:

- La "popolazione di studio", costituita da pazienti affetti da dispepsia afferenti agli ambulatori dei Medici di Base, viene distinta nei due gruppi dei "potenziali partecipanti" e dei "non partecipanti" sulla base dei seguenti criteri di ammissione;
- Essere affetti da dispepsia da almeno un anno;
- Aver eseguito una esofagogastroduodenoscopia con eventuale biopsia e ricerca di H. Pylori per escludere la presenza di patologia da reflusso, neoplasie dello stomaco e del duodeno, ulcera peptica e ulcera duodenale;



- Aver eseguito un'ecografia dell'addome per escludere la presenza di colelitiasi, litiasi coledocica, neoplasie epato-biliari, epatopatie, neoplasie pancreatiche e pancreatiti;
- Aver eseguito dosaggi della glicemia per escludere l'esistenza di diabete mellito e dosaggi degli ormoni tiroidei e del PTH per escludere endocrinopatie;

Sono pertanto ammessi al trial i pazienti che:

- Non presentano evidenza di alterazioni organiche ricercate con le indagini strumentali e laboratoristiche citate e sono quindi affetti da dispepsia immuno-mediata da IgG contro antigeni alimentari;
- Presentano gastrite (in assenza di infezione da H. Pylori) o duodenite o enterite, la cui patogenesi potrebbe essere riferita a meccanismo immuno- mediato da IgG verso antigeni alimentari.

I pazienti appartenenti al gruppo dei “potenziali partecipanti” vengono invitati a partecipare allo studio dagli stessi Medici di Base, che li informano dello scopo, delle caratteristiche e della durata del trial. Sulla base delle adesioni, il gruppo dei “potenziali partecipanti” viene suddiviso nel gruppo dei "partecipanti" ed in quello dei “non partecipanti”.

- Il gruppo dei pazienti “partecipanti” viene sottoposto al test ELISA per la determinazione dei titoli di IgG alimenti, in modo da identificare gli alimenti verso cui sono presenti titoli significativi di IgG, individuando così il gruppo dei pazienti “positivi al test” e quello dei pazienti "negativi al test". I pazienti "negativi al test" compilano comunque un diario sull'andamento del disturbo.
- Il gruppo dei pazienti “positivi al test” viene suddiviso in modo random in due gruppi, inserendone metà nel gruppo dei “trattati” e metà nel gruppo dei “controlli”. I pazienti “trattati” ricevono una dieta che prevede l'eliminazione degli antigeni alimentari verso i quali il test ELISA ha rilevato significativi titoli di IgG. I pazienti inseriti nel gruppo dei "controlli" ricevono invece una dieta equilibrata, normocalorica e varia, comprendente quindi anche alimenti contenenti gli antigeni alimentari in questione. Per garantire il controllo dell'effetto placebo, i pazienti non vengono informati dei risultati del test e non

sanno quindi se la dieta comprende o esclude gli alimenti potenzialmente nocivi. Inoltre, al fine di eseguire lo studio in doppio cieco, il Medico Specialista che segue i pazienti non è a conoscenza di quale dieta essi seguano.

- I pazienti "positivi al test" vengono invitati a compilare, per un mese, un diario nel quale registrano ogni episodio di dispepsia assegnandovi un punteggio di 1 se lo considerano "lieve", di due se lo considerano "medio", di 3 se lo considerano "intenso". I pazienti iniziano poi la dieta e, per sei mesi, compilano e consegnano diari mensili. Per i pazienti con diagnosi iniziale di gastrite o duodenite viene ripetuta, a un anno dall'inizio della dieta, l'endoscopia per documentare il quadro anatomopatologico. Alla fine dello studio viene ripetuto il test ELISA per evidenziare modificazioni nei titoli anticorpali.

Analisi: Lo studio della eventuale correlazione tra somministrazione della dieta e modificazione del quadro clinico viene condotto prendendo in esame tre parametri: *Frequenza del disturbo*: Ogni mese, a partire da quello iniziale in assenza di dieta, i pazienti annotano quotidianamente se e quante volte il disturbo si è presentato. Al termine del mese assegnano valore 1 ad ogni giorno di scarica diarroica. Viene così calcolato uno score mensile determinato dalla somma dei punteggi giornalieri. Dopo il completamento del periodo di osservazione i pazienti di entrambi i gruppi vengono stratificati, quanto a frequenza del disturbo, nelle seguenti sottoclassi:

- **Miglioramento:** Si considerano migliorati i pazienti per i quali vi è una riduzione dello score mensile superiore al 50% rispetto al valore calcolato alla fine del primo mese di osservazione;
- **Peggioramento:** Si considerano peggiorati i pazienti per i quali vi è un aumento dello score mensile superiore al 25% rispetto al valore calcolato alla fine del primo mese di osservazione;
- **Stabilità:** Si considerano stabili i pazienti per i quali lo score mensile è compreso tra il valore iniziale meno il 50% e il valore iniziale più il 25%.



Titoli anticorpali: Confrontando i titoli anticorpali misurati con test ELISA all'inizio e alla fine dell'osservazione si stratificano i pazienti nel modo seguente:

- **Miglioramento** : Si considerano migliorati i pazienti per i quali vi è una riduzione della media dei titoli inizialmente elevati superiore al 50% rispetto alla media dei valori iniziali;
- **Peggioramento** : Si considerano peggiorati i pazienti per i quali vi è un aumento della media dei titoli inizialmente elevati superiore al 25% rispetto alla media dei valore iniziale;
- **Stabilità** : Si considerano stabili i pazienti per i quali la media dei titoli inizialmente elevati è compresa tra la media dei valori iniziali meno il 50% e la media dei valori iniziali più il 25%.

Evoluzione del quadro anatomopatologico: Limitatamente ai pazienti per i quali all'atto dell'ammissione allo studio è stata formulata diagnosi di gastroenterite, colite, o malattie croniche intestinali, a fine studio viene nuovamente eseguita la valutazione strumentale e i pazienti vengono stratificati come segue:

- **Miglioramento:** Si considerano migliorati i pazienti per i quali, a giudizio del Coordinatore dello studio, vi è un significativo miglioramento del quadro anatomo-patologico;
- **Peggioramento** : Si considerano peggiorati i pazienti per i quali a giudizio del Coordinatore dello studio, vi sono chiari elementi di peggioramento del quadro anatomo-patologico;
- **Stabilità** : Si considerano stabili i pazienti per i quali il quadro rimane approssimativamente immutato.

Per ciascuno dei tre parametri vengono poi poste a confronto le seguenti ipotesi:

- *Ipotesi nulla:* L'esito del parametro in questione è indipendente dalla dieta somministrata
- *Ipotesi alternativa:* L'esito del parametro in questione dipende dalla dieta, ed in particolare gli esiti positivi sono maggiori nel gruppo dei trattati" rispetto a quello dei "controlli".

Per ciascun parametro le ipotesi vengono sottoposte a verifica tramite test χ^2 , con un livello di significatività del 90% ($\alpha=0,05$).



Differenze tra il test ALLERGIA ALIMENTARE IgG MEDIATA ed il test CITOTOSSICO

Il test Allergia alimentare IgG mediata presenta numerose differenze rispetto ai diffusi test citotossici, nelle loro diverse versioni.

Le differenze più importanti riguardano da un lato l'aspetto del metodo di laboratorio e dall'altro delle sue indicazioni.

Da un punto di vista del metodo il test Allergia alimentare IgG mediata è un test immunoenzimatico basati sulla metodica ELISA (Enzime-Linked Immunosorbent Assay). Questo test consente l'identificazione ed il dosaggio di anticorpi di classe IgG (in tutte le sue sottoclassi) diretti contro 93 diversi antigeni alimentari ed eventualmente presenti nel siero del paziente. La metodica utilizzata prevede una procedura a più step e l'utilizzo, quale substrato tecnologico, di una piastra appositamente studiata e realizzata, che funge da supporto solido per lo svolgimento delle necessarie reazioni immunoenzimatiche e di un calibratore che consente l'espressione di un risultato anche quantitativo.

I test citotossici, invece, utilizzano una metodica diversa e sono finalizzati ad osservare le variazioni morfologiche che si producono a carico dei leucociti quando il sangue del paziente, opportunamente preparato, viene posto a contatto con allergeni alimentari adesi ai vetrini. La positività per un dato antigene viene assegnata sulla base dell'osservazione soggettiva, in microscopia ottica, di modificazioni a carico dei leucociti.

Da un punto di vista delle indicazioni esistono differenze ancor più profonde tra il test Allergia alimentare IgG mediata e i test citotossici. In linea generale, un test è adeguato alla diagnosi di una data patologia quando misura la presenza, la quantità o l'assenza di un fenomeno o di un fattore implicato nel meccanismo patogenetico o che è riferibile agli effetti della patologia. Occorre cioè che l'impianto concettuale del test sia coerente con l'evidenza biologica.

La patologia oggetto di studio è, in questo caso, l'allergia alimentare IgG mediata, condizione caratterizzata dalla anomala presenza di IgG dirette verso antigeni alimentari, responsabili di una serie eterogenea di disturbi con un meccanismo legato alla presenza di complessi antigene-anticorpo a livello tissutale e relativa attivazione di meccanismi di danno. In questo contesto, la



proposta più razionale per porre diagnosi di malattia è quella di misurare la concentrazione delle IgG, che sono alla base del meccanismo patogenetico stesso della malattia. Il test immunoenzimatico proposto pone diagnosi di malattia dosando le IgG nel siero.

L'impianto concettuale dei test citotossici è, invece, discutibile. Oltre ad ovvie considerazioni metodologiche, quali il fatto che la lettura del test sia piuttosto empirica e comunque operatore dipendente, un'attenta riflessione consente di far emergere un problema inquietante ed irrisolto.

Risulta infatti inspiegabile il motivo per cui l'alterazione leucocitaria indotta dal contatto con un alimento dovrebbe essere indicativa di allergia all'alimento stesso quando tale contatto, di fatto, non si verifica mai nell'organismo umano. Inoltre, nessuna correlazione vi è tra eventuale citotossicità diretta di un alimento verso i leucociti e presenza di IgG verso l'alimento stesso. Il fatto, poi, che spesso tali test di citotossicità vengano propugnati come strumenti diagnostici per le "intolleranze alimentari" rappresenta una vera e propria contraddizione, in quanto, per definizione le intolleranze alimentari sono patologie non immunomediate nella cui patogenesi i leucociti non sono coinvolti.

Inoltre, l'utilizzo di alterazioni morfologiche leucocitarie come segno indiretto di citotossicità dell'alimento su altre popolazioni cellulari (cellule tissutali bersaglio) non ha fondamento in evidenze sperimentali.

Rassegna dei principali studi clinici condotti sulle Allergie IgG-mediate

Uno studio clinico sul ruolo eziopatogenetico delle Allergie Alimentari Ig-G mediate nell'insorgenza della sindrome del colon irritabile è stato condotto a *Manchester, presso il South Manchester Hospital*, dal settembre 2000 su 140 pazienti. I risultati sono stati pubblicati su GUT.

Attualmente, gli studi internazionali in cui vengono utilizzati test per la determinazione delle IgG specifiche nei confronti degli alimenti sono i seguenti:

- Studio clinico sul ruolo eziopatogenetico delle Allergie Alimentari Ig-G mediate nell'insorgenza dell'eczema, in corso a Monaco, presso il Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie Universität München, dal gennaio 2002 (50 pazienti);



- Studio clinico sul ruolo eziopatogenetico delle Allergie Alimentari Ig-G mediate nell'insorgenza della cefalea, in corso a York, presso la York Regional Migraine Clinic, dal febbraio 2002 (140 pazienti).

In Italia, sono in fase di avvio i seguenti studi clinici, dei quali si riportano i protocolli.

Studio clinico sperimentale randomizzato controllato in doppio cieco sul ruolo eziopatogenetico delle allergie alimentari Ig-G mediate nell'insorgenza della diarrea cronica.

Introduzione

Per diarrea cronica si intende un aumento del peso medio fecale quotidiano oltre i 200 g, spesso associato ad anomalo aumento della frequenza delle defecazioni e a diminuzione della loro consistenza, che si mantenga, in forma continua o intermittente, oltre le 2- 3 settimane. Da un punto di vista fisiopatologico, la diarrea cronica può essere sostenuta da meccanismi differenti, ed è pertanto possibile classificarla nelle seguenti forme:

- Diarrea infiammatoria, in affezioni quali colite ulcerosa, morbo di Crohn, enterite attinica, gastroenterite eosinofila, infezioni AIDS-linked;
- Diarrea osmotica, da insufficienza pancreatica, contaminazione batterica, morbo celiaco, deficit di lattamasi, abeta-lipoproteinemia, sindrome dell'intestino corto;
- Diarrea secretoria, associata a patologie quali sindrome da carcinoide, sindrome di Zollinger-Ellison, adenoma pancreatico VIP secernente, carcinoma midollare della tiroide, adenoma villosa del retto, colite microscopica;
- Diarrea da dismotilità intestinale, in seguito a sindrome dell'intestino irritabile, fecalomi, neoplasie intestinali, patologie neurologiche;
- Diarrea autoindotta, in seguito ad abuso di lassativi.



Disegno dello studio

Obiettivo: L'obiettivo dello studio è quello di definire l'eventuale ruolo svolto da anticorpi di classe IgG rivolti verso antigeni alimentari nella patogenesi della diarrea cronica.

Metodo: Lo studio viene condotto in forma di trial clinico randomizzato controllato in doppio cieco, studiando l'andamento del disturbo in due campioni di pazienti, tutti positivi a test ELISA per la determinazione dei titoli di IgG contro antigeni alimentari, uno dei quali segue una dieta di eliminazione, mentre l'altro segue una dieta varia. Il miglioramento o la risoluzione del disturbo nei pazienti a dieta ristretta viene considerato indicativo dell'esistenza di un rapporto di causa- effetto tra allergia alimentare con presenza di IgG e diarrea cronica, ossia dell'esistenza di un ruolo patogenetico svolto dalle IgG. Il disegno dello studio è il seguente:

La "popolazione di studio", costituita da pazienti affetti da diarrea cronica afferenti agli ambulatori dei Medici di Base, viene distinta nei due gruppi dei "potenziali partecipanti" e dei "non partecipanti" sulla base dei seguenti criteri di ammissione:

- Essere affetti da diarrea cronica;
- Non essere stati sottoposti a terapia radiante con irradiazione dell'intestino;
- Non essere affetti da AIDS;
- Non essere stati sottoposti a resezioni intestinali, singole o ripetute;
- Non fare utilizzo di lassativi;
- Non essere affetti da diabete o da altre condizioni che possono associarsi a neuropatia. Non essere affetti da morbo celiaco (utile dosaggio AGA);
- Avere eseguito una ecografia epatica pancreatico e tiroidea per escludere patologie concomitanti o neoplasie;
- Avere eseguito il breath test all'H₂ (test al lattosio) per escludere un deficit di lattamasi;
- Avere eseguito esami biochimici (VES, PCR, elettroforesi, TSH, T4, elettroliti, calcio, fosforo).

Vengono in tal modo ammessi al trial soggetti con disturbo cronico esenti dalle patologie esposte in precedenza e riferibili a meccanismo immunomediato potenzialmente ascrivibile alla presenza di



IgG contro antigeni alimentari. Sono pertanto ammessi al trial i pazienti che:

- non presentano evidenza di alterazioni organiche ricercate con le indagini strumentali e laboratoristiche citate;
- presentano quadri infiammatori quali colite, gastroenterite, malattie croniche intestinali, la cui patogenesi potrebbe essere riferita a meccanismo immuno-mediato da IgG verso antigeni alimentari.

I soggetti appartenenti al gruppo dei “potenziali partecipanti” vengono invitati a partecipare allo studio dagli stessi Medici di Base, che li informano dello scopo, delle caratteristiche e della durata del trial. Sulla base delle adesioni, il gruppo dei “potenziali partecipanti” viene suddiviso nel gruppo dei “partecipanti” ed in quello dei “non partecipanti”.

- Il gruppo dei pazienti “partecipanti” viene sottoposto al test ELISA per la determinazione dei titoli di IgG alimenti, in modo da identificare gli alimenti verso cui ciascuno di essi risulta presentare titoli significativi di IgG, individuando così il gruppo dei pazienti “positivi al test” e quello dei pazienti “negativi al test”. I pazienti “negativi al test” compilano comunque un diario sull’andamento del disturbo;
- Il gruppo dei pazienti “positivi al test” viene sottoposto a randomizzazione. Metà dei pazienti vengono inseriti nel gruppo dei “trattati”, metà nel gruppo dei “controlli”. I pazienti “trattati” ricevono una dieta che prevede l’eliminazione degli antigeni alimentari verso i quali il test ELISA ha rilevato significativi titoli di IgG. I pazienti inseriti nel gruppo dei “controlli” ricevono invece una dieta equilibrata, normocalorica e varia, comprendente quindi anche alimenti contenenti gli antigeni alimentari in questione. Per garantire il controllo dell’effetto placebo, i pazienti non vengono informati dei risultati del test e non sanno quindi se la dieta comprende o esclude gli alimenti lo Specialista che segue i pazienti non è ha conoscenza di quale dieta essi seguano.
- I pazienti “positivi al test” vengono invitati a compilare, per un mese, un diario nel quale registrano ogni episodio di diarrea . I pazienti iniziano poi la dieta e, per un sei mesi, compilano e consegnano diari mensili. Per i pazienti con diagnosi iniziale di gastroenterite, colite, malattie croniche intestinali, vengono ripetuti, a un anno dall’inizio della dieta, accertamenti strumentali per documentare il quadro anatomo-patologico. Alla fine dello



studio viene ripetuto il test ELISA per evidenziare modificazioni nei titoli anticorpali.

Analisi: Lo studio della eventuale correlazione tra somministrazione della dieta e modificazione del quadro clinico viene condotto prendendo in esame tre parametri: Frequenza del disturbo: Ogni mese, a partire da quello iniziale in assenza di dieta, i pazienti annotano quotidianamente se e quante volte il disturbo si è presentato. Al termine del mese assegnano valore 1 ad ogni giorno di scarica diarroica. Viene così calcolato uno score mensile determinato dalla somma dei punteggi giornalieri. Dopo il completamento del periodo di osservazione i pazienti di entrambi i gruppi vengono stratificati, quanto a frequenza del disturbo, nelle seguenti sottoclassi:

- **Miglioramento:** Si considerano migliorati i pazienti per i quali vi è una riduzione dello score mensile superiore al 50% rispetto al valore calcolato alla fine del primo mese di osservazione;
- **Peggioramento:** Si considerano peggiorati i pazienti per i quali vi è un aumento dello score mensile superiore al 25% rispetto al valore calcolato alla fine del primo mese di osservazione;
- **Stabilità:** Si considerano stabili i pazienti per i quali lo score mensile è compreso tra il valore iniziale meno il 50% e il valore iniziale più il 25%.

Titoli anticorpali: Confrontando i titoli anticorpali misurati con test ELISA all'inizio e alla fine dell'osservazione si stratificano i pazienti nel modo seguente:

- **Miglioramento:** Si considerano migliorati i pazienti per i quali vi è una riduzione della media dei titoli inizialmente elevati superiore al 50% rispetto alla media dei valori iniziali;
- **Peggioramento:** Si considerano peggiorati i pazienti per i quali vi è un aumento della media dei titoli inizialmente elevati superiore al 25% rispetto alla media dei valore iniziale;
- **Stabilità:** Si considerano stabili i pazienti per i quali la media dei titoli inizialmente elevati è compresa tra la media dei valori iniziali meno il 50% e la media dei valori iniziali più il 25%.



Evoluzione del quadro anatomopatologico: Limitatamente ai pazienti per i quali all'atto dell'ammissione allo studio è stata formulata diagnosi di gastroenterite, colite, o malattie croniche intestinali, a fine studio viene nuovamente eseguita la valutazione strumentale e i pazienti vengono stratificati come segue:

- **Miglioramento:** Si considerano migliorati i pazienti per i quali, a giudizio del Coordinatore dello studio, vi è un significativo miglioramento del quadro anatomo-patologico;
- **Peggioramento:** Si considerano peggiorati i pazienti per i quali a giudizio del Coordinatore dello studio, vi sono chiari elementi di peggioramento del quadro anatomo-patologico;
- **Stabilità:** Si considerano stabili i pazienti per i quali il quadro rimane approssimativamente immutato.

Per ciascuno dei tre parametri vengono poi poste a confronto le seguenti ipotesi:

Ipotesi nulla: L'esito del parametro in questione è indipendente dalla dieta somministrata

Ipotesi alternativa: L'esito del parametro in questione dipende dalla dieta, ed in particolare gli esiti positivi sono maggiori nel gruppo dei trattati" rispetto a quello dei "controlli".

Per ciascun parametro le ipotesi vengono sottoposte a verifica tramite test χ^2 , con un livello di significatività del 90% ($\alpha=0,05$).