

Choosing Wisely in autoimmunologia: le 5 Proposte del Gruppo di Studio in Autoimmunologia della SIPMeL

Choosing Wisely in autoimmunology: the Top Five List of the Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine

Nicola Bizzaro¹ · Marcello Bagnasco² · Renato Tozzoli³ · Ignazio Brusca⁴ · Luigi Cinquanta⁵ · Marilina Tampoia⁶ · Gaia Deleonardi⁷ · Antonio Antico⁸ · Giampaola Pesce² · Maria Grazia Alessio⁹ · Marco Liguori¹⁰ · Danila Bassetti¹¹ · Danilo Villalta¹²

Ricevuto: 26 gennaio 2018 / Accettato: 12 febbraio 2018 / Pubblicato online: 5 marzo 2018
© Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio 2018

Riassunto Nel novembre 2017, il Gruppo di Studio in Autoimmunologia (GdS-AI) della SIPMeL ha organizzato un convegno nazionale a Santa Margherita Ligure per formulare e discutere alcune proposte per una scelta saggia nell'am-

bito della diagnostica autoimmune di laboratorio. Delle 19 proposte presentate da 5 gruppi di lavoro e sottoposte alla valutazione e discussione in aula con i partecipanti al Congresso, ne sono state scelte 5, una per ciascuno dei 5 gruppi di patologia che erano stati inseriti nel programma. In questa rassegna vengono presentate le proposte Choosing Wisely relative alla diagnosi immunologica del morbo di Graves, della gastrite autoimmune, delle miositi infiammatorie autoimmuni, del diabete di tipo 2 e della miastenia gravis.

✉ N. Bizzaro
nic.bizzaro@gmail.com

- ¹ Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Udine, Italia
- ² Di.M.I. Lab. Autoimmunologia e Coordinamento con la Clinica, Ospedale Policlinico San Martino, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia
- ³ Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Presidio Ospedaliero S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italia
- ⁴ UOC di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla FBF, Palermo, Italia
- ⁵ SS Autoimmunologia e Allergologia Diagnostica di Laboratorio, Dipartimento di Patologia Clinica e Medicina TrASFusionale, Azienda Ospedaliera Universitaria “Scuola Medica Salernitana”, OORR San Giovanni di Dio e Ruggi d’Aragona, Salerno, Italia
- ⁶ Laboratorio di Autoimmunologia, UOC di Patologia Clinica Universitaria, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Policlinico, Bari, Italia
- ⁷ Laboratorio Unico Metropolitano, Ospedale Maggiore, Bologna, Italia
- ⁸ Laboratorio Analisi, ULSS 4, Santorso, VI, Italia
- ⁹ Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italia
- ¹⁰ Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari, Italia
- ¹¹ Direzione Sanitaria Avis Regionale Trentino, Trento, Italia
- ¹² SSD di Allergologia e Immunologia Clinica, Presidio Ospedaliero S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italia

Parole chiave Gastrite autoimmune · Miositi infiammatorie idiopatiche · Diabete tipo 1 · Malattia di Graves · Miastenia gravis · Choosing Wisely

Summary In November 2017, the Study Group on Autoimmune Diseases (GdS-AI) of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) organized a national conference in Santa Margherita Ligure to formulate and discuss some proposals for a wise choice in the field of autoimmune laboratory diagnostics. Of the 19 proposals presented by 5 working groups and submitted to the evaluation and discussion in the hall with the participants in the congress, 5 were chosen, one for each of the 5 pathology groups: Graves’ disease for autoimmune thyroid diseases; autoimmune gastritis; autoimmune inflammatory myositis; type 2 diabetes and autoimmune neurological diseases. The Top Five Choosing Wisely proposals of the GdS-AI SIPMeL are the following: Graves’ disease: In case of thyrotoxicosis/hyperthyroidism, the entry test is the search for anti-thyrotropin receptor antibodies (TRAb) and not for anti-thyroperoxidase (TPO) and anti-thyroglobulin (Tg) antibodies. In case of TRAb negativity, it is useful to search for anti-TPO antibodies (pos-

sible diagnosis of non-Graves thyrotoxicosis). The repetition over time of the determination of anti-TPO and anti-Tg antibodies for follow-up, in the case of diagnosed or presumed autoimmune thyroid disease, has no clinical utility. Autoimmune inflammatory myositis: In patients with suspected autoimmune myositis, the detection of antibodies specific to this disease should be performed independently of the ANA positivity. The ANA-immunofluorescence test may be negative or may display a cytoplasmic pattern that is frequently underestimated. Myasthenia gravis: Considering the different frequency of antibodies associated with myasthenia gravis (MG) and the fact that they are usually mutually exclusive, the research of anti-AchR antibodies constitutes the screening test for patients with suspected MG; the determination of anti-MuSK antibodies should be reserved for negative anti-AchR patients, while that of anti-Lrp4 antibodies should be limited to anti-AchR and anti-MuSK negative patients only. Autoimmune gastritis: In the suspicion of autoimmune atrophic gastritis it is useful to search for serological markers of gastric function (pepsinogen I, pepsinogen II, gastrin-17) combined with the detection of gastric parietal cell/ H^+ - K^+ ATPase antibodies (PCA) and anti-intrinsic factor antibodies (IFA). In the presence of altered gastric function compatible with atrophy and positive findings for gastric autoantibodies, it is indicated to continue the diagnostic procedure with gastric endoscopy also in asymptomatic patients. The use of immunometric methods to measure PCA and IFA is preferable to qualitative methods (immunofluorescence and immunoblot).

Type 1 diabetes: Multiple antibody tests (GAD, IA₂, ZnT8) should be performed in the suspected adult autoimmune diabetes (LADA), where the finding of one of the various autoantibodies available will suffice as diagnostic criterion, and in women with gestational diabetes, because the presence of autoantibodies is predictive of the development of diabetes after pregnancy.

Keywords Autoimmune gastritis · Autoimmune inflammatory myositis · Type 1 diabetes · Graves' disease · Myasthenia gravis · Choosing Wisely

Introduzione

La ricerca dell'appropriatezza nella richiesta dei test autoanticorpali e nella scelta dei migliori metodi analitici che rispondano alle necessità diagnostiche e di monitoraggio nelle diverse malattie a patogenesi autoimmune è un percorso lungo e faticoso iniziato già molti anni fa [1–4]. Tuttavia, nonostante in questi anni siano state prodotte numerose raccomandazioni da parte di Società scientifiche e sia stato fatto un grosso sforzo nel tentativo di armonizzare i comportamenti [5], vi sono aree della diagnostica autoimmune di

laboratorio che non sono coperte da linee guida nazionali o internazionali, un po' per il loro carattere di nicchia, un po' perché la maggior parte delle linee guida ha impronta clinica e dedica poco spazio o non dedica spazio agli aspetti diagnostici di laboratorio. Continuano così a essere prescritti ed effettuati molti esami per i quali non esistono evidenze di efficacia o che sono divenuti obsoleti in seguito all'introduzione di nuovi test o di nuovi metodi dotati di maggiore accuratezza diagnostica dei precedenti. I motivi alla base di questo comportamento possono essere molteplici: abitudini consolidate che faticano a essere modificate, pressanti richieste da parte dei pazienti che oggi più di prima traggono informazioni generiche e spesso fuorvianti da siti internet, timore di conseguenze medico-legali, e infine perché nelle organizzazioni sanitarie ancora troppo spesso viene premiata la quantità delle prestazioni più della loro qualità e appropriatezza. Accanto al documentato spreco di risorse [6–8], i test inappropriati costituiscono inoltre un possibile danno nei confronti dei pazienti.

Nel 2010 Howard Brody lanciava la proposta che ogni Società scientifica specialistica creasse “the Top Five List”, una lista di cinque test diagnostici o trattamenti ad alto rischio di inappropriata tra quelli prescritti più comunemente, che possano esporre i pazienti a rischi e che, secondo prove scientifiche di efficacia, non apportino benefici significativi ai pazienti [9]. La Top Five List non si propone quindi di risolvere tutti i problemi legati all'inappropriatezza, ma di incidere concretamente su taluni comportamenti inappropriati partendo dalle situazioni più critiche. Sempre secondo Brody: “per la definizione della Top Five List ogni Società scientifica specialistica avrebbe dovuto costituire un gruppo di studio di alto livello che includesse professionisti con competenze specifiche. Una volta raggiunto l'accordo sulla lista di cinque test diagnostici o trattamenti, ogni Società scientifica o associazione di professionisti dovrebbe predisporre un piano di implementazione e di formazione dei propri membri, per dissuaderli dall'utilizzo di quel test o trattamento per determinate categorie di pazienti”.

Accogliendo le istanze di Brody, l'*American Board of Internal Medicine* ha successivamente promosso l'iniziativa denominata *Choosing Wisely* [10, 11] che ha subito trovato riscontri positivi, prima negli USA e successivamente in altre parti del mondo. In Italia, la sfida è stata raccolta da *Slow Medicine*, un movimento creato nel 2014 all'insegna del “fare di più non significa fare meglio”.

Nel novembre 2017, il Gruppo di Studio in Autoimmunologia (GdS-AI) della SIPMeL ha organizzato un convegno nazionale a Santa Margherita Ligure per formulare e discutere alcune proposte per una scelta saggia nell'ambito della diagnostica autoimmune di laboratorio. Delle 19 proposte presentate da 5 gruppi di lavoro e sottoposte alla valutazione e discussione in aula con i partecipanti al Congresso, ne sono state scelte 5, una per ciascuno dei 5 gruppi di patologia che

erano stati inseriti nel programma: il morbo di Graves per le malattie autoimmuni della tiroide, la gastrite autoimmune, le miositi infiammatorie autoimmuni, il diabete di tipo 2 e le malattie neurologiche autoimmuni.

Questo documento si propone quindi di portare all'attenzione dei professionisti di laboratorio italiani le cinque scelte sagge proposte dal GdS-AI SIPMeL, spiegandone i presupposti e l'evidenza scientifica che le supportano, per un uso ragionato e razionale dei test autoanticorpi.

Morbo di Graves

Gli anticorpi anti-recettore TSH (TRAb) “stimolanti” rappresentano un caso, pressoché unico in patologia umana, di autoanticorpo patogenetico in grado di stimolare in maniera protratta un recettore ormonale e determinare uno stato di iperfunzione della specifica cellula bersaglio. L'occorrenza di tali anticorpi è tutt'altro che rara e la malattia che ne deriva (morbo di Graves) è la più frequente causa di ipertiroidismo, almeno nelle zone iodio-sufficienti; molto più rari risultano i TRAb dotati di attività “bloccante” (causa di ipotiroidismo) o quelli capaci di indurre apoptosi della cellula tiroidea.

Da più di un decennio la misura dei TRAb è possibile con metodi immunometrici di uso corrente, con elevatissima accuratezza analitica e diagnostica [12]. Nella maggioranza dei casi tali metodi non sono in grado di distinguere i TRAb in base alla loro specifica capacità funzionale, ma il contesto clinico (tireotossicosi) e la frequenza prevalente di anticorpi “stimolanti” rendono possibile la corretta interpretazione dei risultati nella maggior parte dei casi. Recentemente, peraltro, è stata resa disponibile una metodica basata sull'uso di recettore chimero, che conserva i soli epitopi riconosciuti prevalentemente dagli anticorpi “stimolanti” [13]. In precedenza, la caratterizzazione dei TRAb in senso funzionale risultava possibile solo tramite metodi biologici, poco adattabili all'uso routinario.

L'elevata qualità analitica di questo marcatore e il suo significato patogenetico dovrebbero condurre a un suo uso generalizzato nella diagnosi di natura delle tireotossicosi, nella diagnosi differenziale tra ipertiroidismo autoimmune e non autoimmune, nella diagnosi differenziale tra ipertiroidismo da anticorpi “stimolanti” (malattia di Graves) e tireotossicosi di tipo distruttivo (fase di tireotossicosi della tiroidite post-partum e della tiroidite silente) e infine tra ipertiroidismo autoimmune e tireotossicosi in corso di tiroidite virale (subacuta).

Ciononostante, solo recentemente il suo uso come indagine di primo livello nella diagnosi differenziale delle tireotossicosi è stato riconosciuto a livello di linee guida, in particolare americane [14], e tale uso è ancora relativamente limitato, anche in Europa, a fronte della richiesta pres-

soché routinaria di anticorpi anti-tireoperossidasi (TPO) e anti-tireoglobulina (Tg) per qualsiasi patologia tiroidea.

Le situazioni di diagnostica differenziale indicate si pongono assai frequentemente e un inquadramento diagnostico non corretto ha come possibile conseguenza un'impostazione terapeutica non appropriata, dal momento che, in particolare, l'ipertiroidismo basedowiano e la tireotossicosi da distruzione tissutale richiedono provvedimenti differenti. I principali esempi di situazioni in cui la diagnosi di natura della tireotossicosi può non essere ovvia sono: (1) la presenza di un gozzo nodulare preesistente (tuttora a prevalenza elevata nel nostro Paese), su cui si innesta una situazione di morbo di Graves (gozzo “basedowificato”); (2) la possibile positività per anticorpi anti-TPO in corso di gozzo multinodulare con noduli autonomi iperfunzionanti; (3) la possibile insorgenza post-partum di ipertiroidismo da malattia di Graves da differenziare da una tireotossicosi da tiroidite post-partum.

L'uso in prima istanza degli anticorpi anti-TPO (come marcatore generale di autoimmunità) non contribuisce sostanzialmente al corretto inquadramento del problema, quando il dato clinico di partenza è la presenza di tireotossicosi e la ripetizione nel tempo di tale indagine non apporta alcun ulteriore vantaggio diagnostico. L'aggiunta degli anticorpi anti-Tg non fornisce elementi aggiuntivi di rilievo, anzi la presenza transitoria di anti-Tg può conseguire anche a danno distruttivo di natura non autoimmune (per es., virale).

È quindi raccomandabile l'implementazione dell'uso degli anticorpi anti-recettore TSH come marcatore di prima istanza nella diagnostica di tireotossicosi/ipertiroidismo, in luogo dell'uso generalizzato di anti-TPO (e anti-Tg) come primo esame; in caso di positività, la diagnosi di malattia di Graves ha altissima probabilità, visto il valore patogenetico di tali anticorpi e l'alta sensibilità e specificità delle metodiche disponibili; in caso di negatività, la valutazione degli anti-TPO (e a seguire, eventualmente degli anti-Tg) può essere utile nell'individuare forme di tireotossicosi non Graves di natura autoimmune (in caso di tiroiditi silenti e post-partum).

Sulla base delle attuali evidenze, la nostra proposta Choosing Wisely nella diagnostica autoimmune delle malattie della tiroide è la seguente:

In caso di tireotossicosi/ipertiroidismo il test di ingresso è la ricerca dei TRAb e non degli anti-TPO e anti-Tg. In caso di negatività dei TRAb, è utile la ricerca degli anticorpi anti-TPO (possibile diagnosi di tireotossicosi non-Graves). La ripetizione nel tempo della determinazione di anticorpi anti-TPO e anti-Tg a scopo di follow-up, in caso di tireopatia autoimmune diagnosticata o presunta, non ha utilità clinica.

Le miopatie infiammatorie autoimmuni

Le miopatie infiammatorie costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie acquisite, subacute o croniche a carico dei muscoli scheletrici. Queste affezioni coinvolgono non solo la muscolatura scheletrica ma anche molti altri organi, quali i polmoni, il cuore, le articolazioni e la cute. Le miositi acquisite immuno-mediate rappresentano le più comuni miositi infiammatorie nei bambini e negli adulti e sono patologie potenzialmente curabili. Le miopatie infiammatorie sulla base di specifiche caratteristiche cliniche e istologiche sono classificate in quattro sottotipi: dermatomiosite, polimiosite, miosite necrotizzante autoimmune e miosite da corpi inclusi. L'identificazione del corretto sottotipo e la distinzione di queste malattie da altre che hanno caratteristiche cliniche simili sono fondamentali, perché ciascun sottotipo ha una prognosi peculiare e una risposta diversa alla terapia [15]. Autoanticorpi diretti contro antigeni ribonucleoproteici nucleari o verso antigeni citoplasmatici (ANA) sono rilevati fino nel 60% nei pazienti con miopatie infiammatorie [16–19] in relazione alle casistiche studiate e al metodo di rilevamento utilizzato. Negli ultimi 15 anni, vari autoanticorpi specifici sono stati identificati come espressione fenotipica di miopatie infiammatorie idiopatiche (MII) e come marcatori specifici di sottogruppi clinici; questi marcatori, in alcuni casi, si sono dimostrati validi anche come indicatori prognostici, capaci di predire la risposta al trattamento [20–24]. Nell'ambito delle miositi autoimmuni, i principali autoanticorpi sono stati raggruppati sulla base della loro specificità diagnostica in: (1) anticorpi miosite specifici (MSA) comprendenti gli anticorpi anti-aminoacil tRNA sintetasi (anti-ARS), gli anticorpi anti-Mi-2 e gli anticorpi anti-proteine che riconoscono il segnale (anti-SRP); (2) anticorpi miosite associati (MAA) che includono gli anticorpi anti-Ro52, anti-U₁RNP, anti-PM/Scl e anti-Ku tra i più importanti. Sul possibile ruolo patogenetico di questi autoanticorpi nelle varie forme di miosite infiammatoria le opinioni in materia non sono convergenti [25]. Nelle MII più che in altre connettiviti i test sierologici sono analiticamente complessi perché gli autoantigeni bersaglio principali sono prevalentemente localizzati nel citoplasma e/o scarsamente rappresentati negli estratti cellulari o nei pannelli di antigeni ricombinanti adesi alle fasi solide dei saggi immunometrici presenti in commercio [26, 27]. Ne deriva che i tradizionali test ANA in immunofluorescenza indiretta (IFI) ed ENA screen, nonché il più recente test CDT Screen in fase solida, possono non rilevare la presenza di numerose specificità autoanticorpali potenzialmente coinvolte nelle miositi autoimmuni. A questo proposito i risultati riportati di recente dal *Panlar Myositis Study Group* evidenziano che su 155 pazienti con MII la positività del test ANA in IFI veniva evidenziata solo nel 51% dei casi [28]. Nella sostanza questi dati confermano quelli precedentemente ottenuti dal gruppo di Vancsa che, in una casistica di

169 pazienti affetti da vari sottotipi di miositi (130 primarie e 39 overlap con altre connettiviti), hanno evidenziato che gli ANA risultavano positivi nel 25,4% delle forme primarie e nel 61,5% dei casi di miosite overlap [29]. La ricerca degli anticorpi anti-Ro52 può essere considerata di supporto nella diagnostica delle miositi infiammatorie. Questi autoanticorpi, infatti, pur mancando di specificità sono notevolmente frequenti in questo gruppo di patologie e i dati a oggi disponibili gli attribuiscono un ruolo prognostico negativo [30–32]. Pertanto, l'algoritmo diagnostico di laboratorio, da applicare in caso di sospetta miosite infiammatoria idiopatica, deve partire dalla richiesta di un pannello di autoanticorpi specifici delle miositi immuno-mediate e prescindere dalla prescrizione o dalla negatività del test ANA eseguito in prima battuta, a differenza di quanto è consuetudine nella quasi totalità delle malattie reumatiche autoimmuni sistemiche.

La nostra proposta *Choosing Wisely* nella diagnostica autoimmune delle miopatie infiammatorie è la seguente:

Nei pazienti con sospetta miosite autoimmune la ricerca di anticorpi specifici per questa patologia va effettuata indipendentemente dalla positività per gli ANA. Gli ANA possono risultare negativi all'IFI o evidenziare un pattern citoplasmatico che a volte viene sottovalutato.

Miastenia gravis

La miastenia gravis (MG) è una patologia autoimmune caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi diretti principalmente verso il recettore dell'acetilcolina (AChR) della membrana post-sinaptica nella giunzione neuromuscolare. Gli autoanticorpi, patogenetici, sono in grado di determinare una disfunzione nella trasmissione neuromuscolare, dalla quale deriva debolezza a carico dei muscoli scheletrici e facile affaticabilità, spesso uniche manifestazioni cliniche di malattia. La debolezza muscolare, generalizzata o localizzata, generalmente coinvolge i muscoli prossimali in maniera asimmetrica ed è quasi sempre associata a un coinvolgimento oculare, asimmetrico, con ptosi e diplopia [33]. La debolezza tipicamente aumenta con l'esercizio e con i movimenti ripetitivi, varia durante il corso della giornata e nei diversi giorni, mentre nelle prime ore della giornata la forza è generalmente normale.

La MG è una patologia rara, con un'incidenza annuale di 8–10 casi per milione di abitanti e una prevalenza di 150–250 casi per milione [34] ed è la più importante tra le patologie della giunzione neuromuscolare. Entra in diagnosi differenziale con le patologie pre-sinaptiche (sindrome di Lambert-Eaton), con le sindromi congenite miasteniche e con le condizioni indotte da farmaci e tossine (per es., botulino).

Gli autoanticorpi anti-AChR si riscontrano nella maggior parte dei casi di MG generalizzata (80–85%), sono di classe

IgG1 o IgG3, sono in grado di attivare il complemento e di bloccare il legame con il recettore e di modularlo [35]. Sono responsabili di una severa perdita di numero e di funzione dei recettori a livello post-sinaptico. Sono relativamente più rari nelle forme oculari (50%) [36] e nelle forme a esordio precoce (50–70%) [37].

La MG associata alla presenza di autoanticorpi anti-AchR è suddivisa in tre principali forme: a esordio precoce (età < 50 anni), a esordio tardivo (età > 50 anni) e la forma associata a timoma. Le forme di MG anti-AchR positive associate a timoma sono il 10% dei casi con esordio di solito in età avanzata; le forme a esordio precoce si associano invece a iperplasia timica e le forme a esordio tardivo sono caratterizzate da atrofia timica.

La ricerca degli autoanticorpi anti-AchR riveste un ruolo importante nell'ambito della diagnosi di malattia, nella diagnosi differenziale e nell'ambito del monitoraggio clinico del paziente. Gli autoanticorpi reagiscono verso differenti subunità del recettore, sebbene la maggior parte dei pazienti presenti anticorpi diretti verso uno specifico dominio immunodominante nella regione extracellulare della subunità alfa [38].

La presenza degli autoanticorpi si traduce in un'alterazione funzionale e morfologica della membrana post-sinaptica il cui principale effetto è la riduzione dei cluster recettoriali, cruciale per l'efficienza delle sinapsi e la corretta interazione con altre proteine di membrana come l'agrina, la chinasi muscolo specifica (MuSK) e la lipoproteina correlata al recettore proteina 4 (Lrp4) [39]. Autoanticorpi diretti verso queste proteine sono stati descritti in pazienti affetti da MG e definiscono differenti sottotipi di malattia e diversi meccanismi patogenetici [40].

Sebbene la determinazione degli autoanticorpi anti-AchR venga principalmente eseguita mediante il metodo radioimmunometrico (RIA), che utilizza come antigene recettori estratti da muscoli umani, identificati e marcati con I^{125} alfa-bungarotossina, fin dal 2006 è stato sviluppato un metodo immunoenzimatico (EIA) basato sull'utilizzo di recettore umano purificato che ha mostrato elevata accuratezza analitica e diagnostica [41]. Da una recente disamina della distribuzione dei metodi di dosaggio degli autoanticorpi anti-AchR utilizzati nel corso di un noto esercizio di VEQ, si evince come il metodo EIA abbia avuto un'ampia diffusione nei Laboratori di routine.

Nel 30–40% dei pazienti con MG anti-AchR negativi si riscontrano autoanticorpi anti-MuSK, che sono generalmente associati a forme di miastenia generalizzata con prevalente debolezza bulbare. L'antigene MuSK è una proteina recettoriale tirosin chinasi transmembrana localizzata a livello della giunzione neuromuscolare sulla membrana post-sinaptica che media l'aggregazione dei recettori nicotinici dell'acetilcolina. Gli autoanticorpi anti-MuSK sono generalmente di classe IgG4 e non sono in grado di attivare il com-

plemento; svolgono un ruolo patogenetico mediante l'interazione diretta con le proteine recettoriali di membrana [42]. I pazienti anti-MuSK positivi sono prevalentemente di sesso femminile, con età di insorgenza più precoce (30–40 anni), con coinvolgimento craniale e bulbare e con una percentuale più alta di crisi rispetto agli altri pazienti.

Anticorpi anti-Lrp4 sono presenti in una percentuale ridotta di pazienti con MG negativi per anti-MuSK e per anti-AchR, variabile dal 4% in un recente studio cinese [43] al 19% in uno studio multicentrico europeo [44]. È stato riconosciuto un ruolo patogenetico di questi anticorpi che inducono malattia nell'animale da esperimento mediante la distruzione del legame agrina-Lrp4 e l'attivazione del complemento [45]. Tali anticorpi sembrano essere correlati a forme meno severe di MG [43, 44].

Altri anticorpi sono stati descritti in corso di MG (anti-titina, anti-rapsina e anti-recettore per la rianodina), ma il loro ruolo come marcatori diagnostici e come fattori patogenetici deve ancora essere chiarito [39].

Il riscontro degli anticorpi anti-AchR, anti-MuSK e anti-Lrp4 nei pazienti con sintomatologia suggestiva conferma la diagnosi di MG e indirizza le decisioni terapeutiche. Questi anticorpi definiscono sottotipi differenti di MG e sono nella maggior parte dei casi mutuamente esclusivi.

Pertanto la nostra proposta di *Choosing Wisely* nella diagnosi di MG è la seguente:

Considerata la diversa frequenza dei diversi anticorpi (AChR > MuSK > Lrp4) e il fatto che in genere sono tra loro mutuamente esclusivi, la ricerca degli anticorpi anti-AchR costituisce il test di screening per i pazienti con sospetta miastenia gravis; la determinazione degli anticorpi anti-MuSK deve essere riservata ai pazienti anti-AchR negativi, mentre quella degli anticorpi anti-Lrp4 deve essere limitata ai soli pazienti anti-AchR e anti-MuSK negativi.

La gastrite autoimmune

La gastrite autoimmune (GAI) è una malattia organo-specifica caratterizzata da un'aggressione infiammatoria cronica progressiva che interessa le regioni del fondo e del corpo della mucosa dello stomaco con conseguente distruzione delle cellule parietali e quindi delle ghiandole ossintiche ed evoluzione verso la gastrite atrofica, condizione che predispone allo sviluppo del cancro gastrico.

La diagnosi è istologica, eseguita su campioni biotici prelevati in corso di esofago-gastro-duodenoscopia (EGDS) e la stadiazione effettuata secondo il sistema OLGA (*Operative Link for Gastritis Assessment*).

La GAI, di regola asintomatica, precede l'insorgenza dell'atrofia di 10–20 anni e origina dall'attivazione di cellule T CD4⁺25⁻ autoreattive verso l'autoantigene bersaglio, l'enzima H⁺/K⁺ ATPasi (pompa protonica) presente sulla superficie delle cellule parietali deputate alla secrezione

di acido cloridrico (HCl) e fattore intrinseco. Le cellule T CD4⁺25⁻ esercitano la loro azione citolitica attraverso la produzione di citochine (in particolare IFN- γ e IFN- α), perforine e mediante l'attivazione dei meccanismi Fas e Fas-ligando e ledono anche le cellule principali, produttrici di pepsinogeno I (PGI) e II (PGII), per la contiguità anatomica con le cellule parietali [46, 47].

L'attività delle cellule T stimola contestualmente anche la produzione, da parte dei linfociti B, di anticorpi rivolti verso le cellule parietali (PCA) e verso il fattore intrinseco (IFA). Questi autoanticorpi sono in grado di attivare il complemento ma, al di là del loro possibile ruolo patogenetico, la loro presenza nel siero rappresenta un'indagine fondamentale per la diagnosi della malattia. I PCA circolanti, prevalentemente di classe IgG, sono rilevabili nel 90% dei pazienti con GAI e possono essere determinati con metodi analitici quantitativi discreti (immunofluorescenza indiretta) o quantitativi immunoenzimatici (ELISA) e fluoroenzimatici (FEIA) dotati di elevata sensibilità (82%) e specificità (90%). Gli IFA si trovano nel siero di circa il 30–50% dei pazienti con GAI e si possono ricercare con metodi qualitativi (immunoblotting) o quantitativi (ELISA e FEIA) [48–50].

L'aggressione autoimmune determina il danno istologico, che porta alla sostituzione della mucosa con tessuto fibroso o di tipo intestinale, e l'alterazione della funzionalità gastrica regolata dalle cellule delle ghiandole del corpo e del fondo. In particolare la perdita delle cellule parietali implica il calo della produzione di HCl e del fattore intrinseco, che provocano rispettivamente diminuzione dell'acidità dello stomaco e mancato assorbimento di vitamina B₁₂. Il danneggiamento delle cellule principali causa riduzione della secrezione di PGI, ma non del PGII che viene prodotto anche dalle cellule principali della mucosa antrale e del cardias risparmiata dall'aggressione T e B linfocitaria.

Gli effetti fisiopatologici possono causare:

- anemia da carenza di ferro, in quanto la ridotta acidità gastrica provoca una diminuzione dell'assorbimento del ferro a livello intestinale;
- anemia macrocitica e/o anemia perniciose per carenza di vitamina B₁₂;
- ipergastrinemia per perdita del feedback negativo garantito dalla secrezione di HCl;
- riduzione del PGI sierico che determina una riduzione della capacità digestiva gastrica e, conseguentemente, anche della ratio PGI/PGII.

Tutti questi indicatori di GAI e/o di gastrite atrofica possono essere presenti e rilevati quando ancora il paziente è asintomatico. Il sospetto clinico di GAI va quindi posto nei pazienti con familiarità per la malattia, nei soggetti affetti da patologie autoimmuni associate a GAI (tiroidite, diabete, vitiligine, celiachia ecc.), in tutti i soggetti che presentano un'anemia macro- o microcitica da cause non chiare e nei

pazienti con sintomi non specifici (reflusso, maldigestione, dolore epigastrico ecc.).

Nel sospetto di GAI, prima di eseguire l'indagine endoscopica invasiva dovrebbero essere dosati i parametri bioumorali che esplorano la funzionalità gastrica ed eseguita la ricerca di PCA e di IFA; una loro eventuale alterazione consentirà di selezionare con maggiore appropriatezza il paziente da sottoporre a EGDS e di definirne l'eziologia autoimmune.

Inoltre, studi prospettici hanno dimostrato che PCA e IFA aumentano progressivamente durante il progredire dell'aggressione, raggiungono un picco e poi scendono fino a scomparire, in seguito alla progressiva distruzione della mucosa gastrica e quindi alla scomparsa dell'autoantigene bersaglio. Questa caratteristica, che stigmatizza l'andamento della patologia, suggerisce che il dosaggio anticorpale dovrebbe essere eseguito con metodi quantitativi, gli unici in grado di discriminare in modo significativo le concentrazioni delle immunoglobuline, soprattutto in fase iniziale e avanzata [51].

Sulla base di quanto su esposto e dell'evidenza degli studi pubblicati in letteratura proponiamo come *Choosing Wisely*:

Nel sospetto di gastrite atrofica autoimmune, come esami di primo livello vanno misurati i marcatori sierologici di funzionalità gastrica (pepsinogeni I e II, gastrina-17) e ricerca di autoanticorpi anti-cellule parietali gastriche (PCA) e anti-fattore intrinseco (IFA). In presenza di alterata funzionalità gastrica compatibile con atrofia e di positività autoanticorpale è sostanzialmente il sospetto di gastrite atrofica autoimmune anche in pazienti asintomatici ed è necessario procedere a biopsia gastrica. Per la determinazione di PCA e IFA è preferibile l'utilizzo di metodiche immunometriche quantitative.

Il diabete tipo 1

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) è una malattia autoimmune determinata dalla distruzione delle beta-cellule pancreatiche a opera di specifici autoanticorpi, cui segue un deficit assoluto nella produzione di insulina. Gli autoanticorpi noti a oggi e utilizzati nella pratica clinica sono rivolti verso la beta-cellula (ICA), la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD), l'insulina (IAA), la tirosina fosfatasi (IA-2A) e il trasportatore dello zinco 8 (ZnT8), determinabili nella maggior parte dei Laboratori con un'ampia gamma di metodiche [52, 53]. Al momento della diagnosi di T1DM, nel siero dei pazienti è presente almeno un autoanticorpo nel 95–98% dei casi [52, 53]. Nel T1DM la perdita di beta-cellule pancreatiche condiziona l'esordio clinico e la sintomatologia, caratterizzata da poliuria, polidipsia, dimagrimento e chetoacidosi [52, 53]. Nei bambini, negli adolescenti e negli adulti con T1DM, la presenza di iperglicemia e di segni clinici

di insulino-deficienza consente nella maggior parte dei casi di porre una diagnosi di certezza; in queste situazioni la ricerca degli autoanticorpi appare superflua, in quanto nulla aggiunge alla diagnosi e non è in grado di modificare la terapia. Solo in una minoranza di casi, più frequenti nella fascia di età tra 15 e 30 anni, l'esordio clinico può avvenire in assenza del caratteristico quadro sintomatologico; in tali casi, solo la presenza degli autoanticorpi consente di differenziare il T1DM dal diabete mellito di tipo 2 (T2DM). Esistono però due condizioni cliniche in cui il riscontro della presenza di autoanticorpi riveste un ruolo fondamentale: il LADA (*Latent Autoimmune Diabetes of Adult*) e il diabete mellito gestazionale.

Il termine LADA fu coniato da Zimmet et al per indicare pazienti con caratteristiche fenotipiche di diabete di tipo 2 (età maggiore di 32 anni e iniziale buon controllo glicemico) ma positivi per autoanticorpi, principalmente GAD e/o ICA, inizialmente trattati con ipoglicemizzanti orali ma che divenivano insulino-dipendenti più rapidamente dei diabetici di tipo 2 sieronegativi; per questa condizione sono stati successivamente proposti termini alternativi quali diabete autoimmune non insulino-dipendente e diabete di tipo 1 insulino-dipendente lentamente progressivo. Si tratta di pazienti con caratteristiche diverse dal paziente con T2DM: sono generalmente più giovani; non sono in sovrappeso e hanno un *body mass index* (BMI) più basso; non hanno, o hanno in misura limitata, alterazioni del metabolismo lipidico e sindrome metabolica; presentano livelli di C-peptide più bassi [54, 55]. È stato inoltre evidenziato che in questi pazienti (specialmente quelli con alti titoli di GAD) coesistono con elevata frequenza altre malattie autoimmuni organo-specifiche, in particolare tiroidite di Hashimoto, morbo di Addison, celiachia, gastrite autoimmune e anemia pernicio-sa. Dal punto di vista genetico, il LADA condivide sia le caratteristiche di T1DM che di T2DM, facendo supporre che si tratti o di una sindrome a sé stante, derivante da un mix delle due condizioni, oppure lo step intermedio di un *continuum* evolutivo nell'ambito di una patologia autoimmune delle isole pancreatiche. La genesi autoimmune è altresì evidenziata dall'infiltrazione dei linfociti T nel pancreas, ma sul ruolo patogenetico degli autoanticorpi non esistono ancora dati conclusivi. In Italia, il LADA rappresenta circa il 5–10% dei casi inizialmente diagnosticati come T2DM (10–20% nel mondo); dati recenti indicherebbero come esso possa rappresentare in realtà la forma più comune di diabete dell'adulto e probabilmente la forma di diabete autoimmune più frequente in assoluto. A causa della natura latente della malattia e dei segni e sintomi non facilmente distinguibili, questi pazienti spesso sono diagnosticati come diabetici di tipo 2 e iniziano il trattamento con ipoglicemizzanti orali. Tuttavia il controllo glicemico si deteriora dopo pochi mesi o addirittura per anni con ricadute negative, che si

possono evitare instaurando una tempestiva terapia insulinica [54, 55]. Nel 2005 l'IDS (*Immunology Diabetes Society*) ha proposto 3 criteri diagnostici per il LADA: (1) età di esordio maggiore di 35 anni, (2) presenza di almeno un autoanticorpo, (3) assenza di terapia insulinica per almeno 6 mesi [56].

L'ADA (*American Diabetes Association*) e la WHO, tuttavia, non riconoscono il LADA come un'entità clinica a sé stante, facendolo quindi rientrare nella più generale classificazione di diabete di tipo 1 autoimmune. I tre criteri proposti dall'ADA generano un'ampia variabilità clinica e metabolica, poiché non vengono presi in considerazione il tipo di anticorpo, il titolo, il loro numero, gli epitopi e i genotipi associati. L'autoanticorpo di più frequente riscontro è il GAD, che è anche quello che compare più precocemente e che possiede il più elevato valore predittivo circa la successiva necessità di terapia insulinica: il riscontro di alti livelli di GAD, infatti, costituisce indicazione all'inizio precoce della terapia insulinica stessa, in virtù del suo ruolo di marker altamente predittivo di distruzione delle cellule beta. Considerate l'elevata prevalenza dell'anticorpo e la relativa facilità di dosaggio, è suggerita la determinazione dei GADA in pazienti con nuova diagnosi di diabete di tipo 2. Per un contenimento dei costi è opportuno circoscrivere le richieste a pazienti a maggiore rischio ovvero: età di esordio < 50 anni; sintomi acuti quali poliuria, polidipsia e calo ponderale; BMI < 25 kg/m²; storia personale di altre malattie autoimmuni e/o storia familiare di malattie autoimmuni. La presenza di almeno 2 di queste caratteristiche ha una sensibilità e specificità rispettivamente del 90% e 71%, mentre l'assenza di questi criteri o la presenza di un solo criterio ha un valore predittivo negativo del 99%; nel caso di negatività per GADA ma con uno score maggiore di 2 è giustificato anche il dosaggio degli IA-2 e/o ZnT8.

Con il termine di *diabete mellito gestazionale* si intende il diabete diagnosticato per la prima volta in gravidanza; comprende sia forme di nuova insorgenza, sia forme preesistenti ma non diagnosticate. È una condizione piuttosto frequente, che complica circa il 7–8% delle gravidanze. Il corretto inquadramento e gestione di questa condizione è di estrema importanza, sia per l'aumentata frequenza di complicanze materno-fetali, sia per la possibile evoluzione verso un diabete conclamato (T1DM o LADA) nel periodo post-gravidico. Esistono fattori di rischio specifici per questa patologia: familiarità per diabete mellito di tipo 2; presenza di sindrome dell'ovaio policistico; età materna superiore ai 35 anni; sovrappeso/obesità prima della gravidanza; aver sviluppato un diabete gestazionale in una gravidanza precedente; macrosomia fetale in una gravidanza precedente [57, 58]. Le più recenti classificazioni internazionali non inquadrano il diabete mellito gestazionale autoimmune come entità clinica a sé stante; numerosi studi sulla frequenza dei vari autoanticorpi nel corso della malattia (seppure non omogenei

per numerosità, selezione dei casi, metodologie di indagine ecc.) hanno evidenziato un'ampia variabilità della loro prevalenza. Analogamente alle altre forme di diabete autoimmune, gli autoanticorpi hanno evidenziato il loro ruolo predittivo per un successivo sviluppo di diabete autoimmune dopo il parto, soprattutto per ICA e GAD; il valore predittivo è ancora maggiore in caso di positività per più autoanticorpi. Sebbene alcuni autori raccomandino lo screening autoanticorpale sin dalla diagnosi di diabete mellito gestazionale, tale procedura comporterebbe costi molto elevati; è pertanto auspicabile limitare la ricerca a casi con forte sospetto clinico e con presenza di fattori di rischio; vanno presi in considerazione anche i fattori caratteristici precedentemente citati nel sospetto di LADA. La positività attesa è intorno al 6% per almeno un autoanticorpo [58].

Per quanto riguarda gli autoanticorpi da ricercare, vari studi hanno esaminato il potenziale ruolo predittivo degli autoanticorpi nei confronti dell'insorgenza del diabete di tipo 1 dopo il parto nelle pazienti affette da diabete gestazionale e la maggior parte di loro ha confermato il ruolo predittivo della positività per gli autoanticorpi, soprattutto anti-ICA, GAD e presenza di due o più autoanticorpi [57, 58]. Titoli anticorpali elevati sono rari e questo è in linea con la lenta progressione della malattia diabetica autoimmune nelle donne con diabete gestazionale. In un follow-up di 8 anni, il 50% delle donne autoanticorpo-positivo ha sviluppato un diabete di tipo 1 e il 21% un'alterata glicemia a digiuno o una ridotta tolleranza glucidica, con un tasso significativamente più alto rispetto alle pazienti senza autoanticorpi; tra le donne che hanno sviluppato un diabete di tipo 1, questo è accaduto entro 6 mesi dal parto nel 41% dei casi ed entro 1 anno nel 50%, sottolineando così l'importanza dello screening autoanticorpale durante e dopo la gravidanza [58].

La nostra proposta di *Choosing Wisely* nella diagnosi di LADA e di diabete gestazionale è la seguente:

La ricerca contestuale degli anticorpi anti-GAD, anti-IA₂ e anti-ZnT8 dovrebbe essere effettuata nel sospetto di LADA, perché il riscontro anche di una sola positività autoanticorpale costituisce criterio diagnostico, e nel diabete mellito gestazionale, perché la presenza di autoanticorpi è predittiva dello sviluppo di diabete dopo la gravidanza.

Conclusioni

Le norme dettate dal movimento *Choosing Wisely* dicono che una volta raggiunto l'accordo sulla lista di cinque test diagnostici, ogni Società scientifica mette a punto un piano di implementazione e di formazione dei propri membri, per dissuaderli dall'utilizzo di quel test o trattamento per determinate categorie di pazienti. Noi pertanto invitiamo tutti coloro che operano nei Laboratori di Autoimmunologia in Italia ad adottare le nostre 5 proposte *Choosing Wisely* e a

renderle operative nel proprio contesto professionale. Poiché però è sicuramente necessario un confronto molto più ampio di quello avvenuto in occasione della presentazione a Santa Margherita Ligure, invitiamo tutti i colleghi interessati all'argomento a inviarci commenti e suggerimenti utilizzando l'indirizzo di corrispondenza dell'autore di questo articolo.

Conflitti di interessi Nessuno.

Studi condotti su esseri umani e animali L'articolo non contiene alcuno studio eseguito su esseri umani e su animali da parte degli autori.

Bibliografia

1. Brook RH (1994) Appropriateness: the next frontier. *BMJ* 308:218–219
2. Bizzaro N (2001) L'appropriatezza nella richiesta dei test autoanticorpali per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni. *Riv Med Lab-JLM* 2:11–16
3. Wiik AS (2003) Appropriateness of autoantibody testing in clinical medicine. *Clin Chim Acta* 333:177–180
4. Bizzaro N, Wiik A (2004) Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol* 22:349–355
5. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N (2017) Challenges in the standardization of autoantibody testing: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 53:68–77
6. Fisher ES, Bynum JP, Skinner JS (2009) Slowing the growth of health care costs—lessons from regional variation. *N Engl J Med* 360:849–852
7. Berwick DM, Hackbarth AD (2012) Eliminating waste in US health care. *JAMA* 307:1513–1516
8. Brody H (2012) From an ethics of rationing to an ethics of waste avoidance. *N Engl J Med* 366:1949–1951
9. Brody H (2010) Medicine's ethical responsibility for health care reform: the Top Five list. *N Engl J Med* 362:283–285
10. Good Stewardship Working Group (2011) The “top 5” lists in primary care: meeting the responsibility of professionalism. *Arch Intern Med* 171:1385–1390
11. Cassel CK, Guest JA (2012) Choosing wisely: helping physicians and patients make smart decisions about their care. *JAMA* 307:1801–1802
12. Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D et al (2012) TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. Systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 12:107–113
13. Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D et al (2017) Evaluation of the first fully automated immunoassay method for the measurement of stimulating TSH receptor autoantibodies in Graves' disease. *Clin Chem Lab Med* 55:58–64
14. Ross DS, Burch HB, Cooper DS et al (2016) 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and other Causes of Thyrotoxicosis. *Thyroid* 26:1343–1421
15. Dalakas MC (2015) Inflammatory muscle diseases. *N Engl J Med* 372:1734–1747
16. Rider LG, Miller FW (2011) Deciphering the clinical presentations, pathogenesis, and treatment of the idiopathic inflammatory myopathies. *JAMA* 305:183–190

17. Ernste FC, Reed AM (2013) Idiopathic inflammatory myopathies: current trends in pathogenesis, clinical features, and up-to-date treatment recommendations. *Mayo Clin Proc* 88:83–105
18. Casciola-Rosen L, Mammen AL (2012) Myositis autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 24:602–608
19. Fiorentino DF, Chung LS, Christopher-Stine L et al (2013) Most patients with cancer associated dermatomyositis have antibodies to nuclear matrix protein NXP-2 or transcription intermediary factor 1 γ . *Arthritis Rheum* 65:2954–2962
20. Love LA, Leff RL, Fraser DD et al (1991) A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 70:360–374
21. Brouwer R, Hengstmam GJ, Vree Egberts W et al (2001) Autoantibodies profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 60:116–123
22. Ghirardello A, Zampieri S, Tarricone E et al (2006) Clinical implications of autoantibody screening in patients with autoimmune myositis. *Autoimmunity* 39:217–221
23. Chinoy H, Fertig N, Oddis CV et al (2007) The diagnostic utility of myositis autoantibody testing for predicting the risk of cancer-associated myositis. *Ann Rheum Dis* 66:1345–1349
24. Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay JL et al (2005) Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)* 84:231–249
25. Simon JP, Marie I, Jouen F et al (2016) Autoimmune myopathies: where do we stand? *Front Immunol* 7:234
26. Sordet C, Goetz J, Sibilia J (2006) Contribution of autoantibodies to the diagnosis and nosology of inflammatory muscle disease. *Joint Bone Spine* 73:646–654
27. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S et al (2008) Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multicentre case-control study. *Ann Rheum Dis* 67:1282–1286
28. Gonzalez-Bello Y, Garcia-Cerda D, Medrano-Ramírez G et al (2015) Frequency of Antinuclear (ANA), Myositis-Specific (MSA) and Myositis-Associated Antibodies (MAA) in Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies (IIM) from Mexico, Central and South America Centers: Data from the Panlar Myositis Study Group. *Arthritis Rheum* 67(Suppl 10)
29. Vánca A, Gergely L, Ponyi A et al (2010) Myositis-specific and myositis-associated antibodies in overlap myositis in comparison to primary dermatopolymyositis: relevance for clinical classification: retrospective study of 169 patients. *Joint Bone Spine* 77:125–130
30. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M (2009) Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev* 8:632–637
31. Marie I, Hatron PY, Dominique S et al (2012) Short-term and long-term outcome of anti-Jo1-positive patients with anti-Ro52 antibody. *Semin Arthritis Rheum* 41:890–899
32. Infantino M, Manfredi M, Grossi V et al (2017) An effective algorithm for the serological diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies: the key role of anti-Ro52 antibodies. *Clin Chim Acta* 475:15–19
33. Gilhus NE, Verschuuren JJ (2015) Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 14:1023–1036
34. Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO et al (2010) A systematic review of population based epidemiological studies in myasthenia gravis. *BMC Neurol* 10:46
35. Philips WD, Vincent A (2016) Pathogenesis of myasthenia gravis: update on disease types, models and mechanism. *F1000Res F1000 Faculty Rev* 1513
36. Wong SH, Huda S, Vincent A et al (2014) Ocular myasthenia gravis: controversies and updates. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14:421
37. Finnis MF, Jayawant S (2011) Juvenile myasthenia gravis: a paediatric perspective. *Autoimmune Dis* 2011:404101
38. Leite MI, Waters P, Vincent A (2010) Diagnostic use of autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmunity* 43:371–379
39. Evoli A (2017) Myasthenia gravis: new developments in research and treatment. *Curr Opin Neurol* 30:464–470
40. Gilhus NE (2016) Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 375:2570–2581
41. Hewer R, Matthews I, Chen S et al (2006) A sensitive non isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies. *Clin Chim Acta* 364:159–166
42. Konecny I, Stevens JA, De Rosa A et al (2017) IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients. *J Autoimmun* 77:104–115
43. Li Y, Zhang Y, Cai G et al (2017) Anti-LRP4 autoantibodies in Chinese patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 56:938–942
44. Zisimopoulou P, Evangelakou P, Tzartos J et al (2014) A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J Autoimmun* 52:139–145
45. Shen C, Lu Y, Zhang B et al (2013) Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J Clin Invest* 123:5190–5202
46. Toh BH (2014) Diagnosis and classification of autoimmune gastritis. *Autoimmun Rev* 13:459–462
47. Toh BH (2017) Pathophysiology and laboratory diagnosis of pernicious anemia. *Immunol Res* 65:326–330
48. Antico A (2009) L'autoimmunità gastrica. In: Tozzoli R, Bizzaro N, Villalta D et al (eds) *Il laboratorio nelle malattie autoimmuni d'organo*. Esculapio, Bologna
49. Bizzaro N, Antico A (2014) Diagnosis and classification of pernicious anemia. *Autoimmun Rev* 13:565–568
50. Rusak E, Chobot A, Krzywicka A et al (2016) Anti-parietal cell antibodies—diagnostic significance. *Adv Med Sci* 61:175–179
51. Huang YK, Yu JC, Kang WM et al (2015) Significance of serum pepsinogens as a biomarker for gastric cancer and atrophic gastritis screening: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 10:e0142080
52. American Diabetes Association (2009) Diagnosis and classification of diabetes mellitus (Position statement). *Diabetes Care* 32(Suppl 1):S62–S67
53. http://www.standarditaliani.it/skin/www.standarditaliani.it/pdf/STANDARD_2016_June20.pdf (Accesso 26 gennaio 2018)
54. Nambam B, Aggarwal S, Jain A (2010) Latent autoimmune diabetes in adults: a distinct but heterogeneous clinical entity. *World J Diabetes* 1:111–115
55. Buzzetti R, Zampetti S, Maddaloni E (2017) Adult-onset autoimmune diabetes: current knowledge and implications for management. *Nat Rev Endocrinol* 13:674–686
56. Fourlanos S, Dotta F, Greenbaum CJ et al (2005) Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia* 48:2206–2212
57. de Leiva A, Mauricio D, Corcoy R (2007) Diabetes-related autoantibodies and gestational diabetes. *Diabetes Care* 30(Suppl 2):S127–S133
58. Dalfrà MG, Burlina S, Lapolla AG (2016) Il diabete gestazionale autoimmune. *G It Diabetol Metab* 36:203–209