Flow charts nella diagnosi delle malattie autoimmuni

N. Bizzaro

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di S.Donà di Piave (VE)

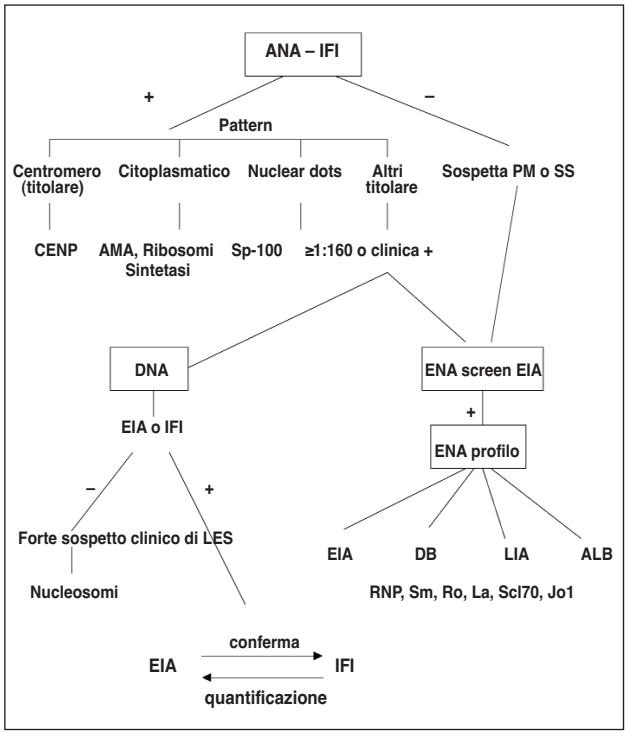
La ricerca di autoanticorpi nel siero è un parametro di fondamentale importanza per la diagnosi e il trattamento di pazienti affetti da malattie autoimmuni. Rispetto ad una decina di anni fa, i test commerciali sono diventati numerosi e le tecnologie si sono diversificate: ai classici metodi di immunofluorescenza indiretta (IFI), di controimmunolettroforesi e immunodiffusione doppia, si sono aggiunti i metodi immunoenzimatici (ELISA) e di blot, fino ai più recenti *addressable laser beads* e *arrays* antigenici. Il notevole aumento della sensibilità analitica dei nuovi test autoanticorpali ha in parte modificato sia i criteri di classificazione di alcune malattie autoimmuni che le strategie diagnostiche; anticorpi che fino a qualche tempo fa si ritenevano essere specifici per alcune malattie, oggi sono stati ritrovati anche in altre malattie autoimmuni[1], rendendo ancora più complessa di quanto già non fosse l'interpretazione dei risultati.
L'eterogeneità delle tecnologie attualmente disponibili non costituisce tuttavia uno svantaggio dal momento che vi è la possibilità di utilizzare metodi diversi in associazione o in sequenza, a seconda delle loro caratteristiche e dello scopo dell'indagine (di screening, diagnostico, prognostico, di monitoraggio).
Nell'elaborazione di una strategia diagnostica, un altro aspetto da considerare è quello relativo ai cambiamenti nell'organizzazione dei laboratori che si è verificata negli ultimi anni in seguito alle pressioni esercitate dagli enti governativi per il contenimento della spesa sanitaria. Benchè la diagnostica di Laboratorio nel suo insieme non incida più del 2-3% sul bilancio di molti stati occidentali[1], il Laboratorio è stato il primo tra le strutture diagnostiche e assistenziali a dover ridurre drasticamente i costi, anche attraverso operazioni di consolidamento che hanno, in generale, portato ad un sovraccarico di lavoro e ad una pressante richiesta di migliorare l'intervallo tra la richiesta dell'esame e la emissione del referto. Queste esigenze hanno imposto necessariamente l'adozione di test rapidi, facili da usare ed economici, in genere molto sensibili ma non sempre dotati di sufficiente specificità. Il peso relativo di un risultato ottenuto con un determinato test deve pertanto essere conosciuto e attentamente valutato nel contesto degli altri dati di laboratorio e clinici[2].
Il bisogno di un approccio pratico, ragionato, basato sull'evidenza, per la scelta dei test diagnostici non è mai stata così sentita come negli ultimi anni. Un'indagine condotta in Scandinavia tra i medici ospedalieri e di famiglia ha evidenziato che i progressi nella medicina di Laboratorio venivano considerati come il più importante passo in avanti della medicina clinica negli ultimi anni[3]. L'indagine evidenziava anche però come la proliferazione dei test diagnostici, creasse grave imbarazzo e difficoltà nella loro corretta scelta e nell'interpretazione dei risultati. Il suggerimento che veniva dato era di fornire indicazioni su quale fosse la migliore sequenza di test per ciascuna patologia (flow-chart). Questo è un compito che il Laboratorio può e anzi dovrebbe svolgere, assumendo un ruolo centrale nel processo di selezione dei test e nella scelta dei metodi analitici, offrendo poi al clinico il miglior algoritmo logico da seguire.
La presente rassegna ha lo scopo di proporre alcune flow-chart per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni, della malattia celiaca e delle epatiti autoimmuni, tenendo tuttavia ben presente che la loro attuale formulazione può non essere applicabile in ogni situazione, ma va adattata alle diverse realtà operative. La scelta dei test e dei metodi può variare in rapporto alle dimensioni del Laboratorio e alle caratteristiche della popolazione che vi afferisce; nei piccoli-medi laboratori è certamente più semplice raggiungere il consenso sulle strategie diagnostiche e sull'adozione di flow-chart di quanto lo sia nelle grandi e complesse strutture ospedaliere e universitarie.

Flow-chart nella diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni

I test di maggior significato per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni includono il dosaggio degli anticorpi anti-nucleo (ANA), degli anticor-

Corrispondenza a: Dott. Nicola Bizzaro, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, 30027 San Donà di Piave (VE). Tel. 0421.227570, fax 0421.227571, email:n.bizzaro@dacos.it

Figura 1. Flow-chart per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni (DB, dot blot; LIA, line immunoassay; ALB, addressable laser beads assay). Nel presente schema non è inclusa la diagnosi di artrite reumatoide che ha un proprio algoritmo specifico.



pi anti-antigeni nucleari specifici (ENA) e degli anticorpi anti-dsDNA.

La richiesta di ANA è notevolmente aumentata rispetto a qualche anno fa, diventando quasi ovunque un vero e proprio esame di routine. Sia che venga eseguito in IFI su cellule HEp-2 o con metodo ELISA, il test ANA è tra tutti i test autoanticorpali quello di minor costo e di maggior sensibilità. Poiché l'esame ha tuttavia una bassa specificità (attorno al 70% alla diluizione di 1:40)[4], la accurata selezione dei soggetti da sottoporre al test è fondamentale. Se viceversa viene utilizzato in modo indiscriminato, il test presenta dei limiti notevolissimi per l'elevato numero di falsi positivi, con un valore predittivo positivo non superiore al 16%[5,6]. Per gli anti-dsDNA e per la maggior parte degli anti-ENA e degli altri anticorpi nucleari o citoplasmatici, la situazione è capovolta: la sensibilità è in genere inferiore a quella degli ANA e la specificità maggiore. Questi dati indicano che il test ANA presenta tutte le caratteristiche per essere utilizzato come test di primo livello nella diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni e che gli altri test hanno maggior significato ed efficacia se impiegati come test di secondo livello[7].

Stabilito che gli ANA sono il primo test da eseguire, in caso di loro positività, due sono i parametri da considerare per il prosieguo dell'indagine: il quadro di fluorescenza e il titolo anticorpale.

Poiché il quadro di fluorescenza degli ANA è, almeno a grandi linee, correlato con la specificità anticorpale, una sua corretta definizione può essere utile nella scelta dei metodi più appropriati da utilizzare per i test di secondo livello. Per esempio, in presenza di una fluorescenza citoplasmatica o di tipo nuclear dots è perfettamente inutile eseguire un classico test anti-ENA a 6-8 antigeni, ma è invece ovviamente indicato utilizzare rispettivamente dei test che contengano antigeni citoplasmatici (sintetasi, ribosomi, mitocondri, ecc) o l'antigene Sp100, così come in presenza di un quadro omogeneo, può essere indicato effettuare la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA anche se il sospetto di LES non è presente nella richiesta. Viceversa, quando è presente un pattern anti-centromero, l'esecuzione di un test anti-ENA non è essenziale poiché la specificità anticorpale è facilmente desumibile dal tipico aspetto morfologico in IFI.

Uno degli aspetti in assoluto più importanti nella impostazione della flow chart è dato dalla correlazione tra il titolo degli ANA e la positività dei test di secondo livello. Infatti, la probabilità di ottenere un risultato positivo nella ricerca di anticorpi anti-dsDNA o anti-ENA aumenta direttamente con l'aumentare del titolo ANA[7]. Al di sotto di un titolo di 1:160 solo il 5% dei campioni ANA positivi è anti-ENA o anti-dsDNA positivo. La percentuale di positività supera il 50% solo per concentrazioni uguali o superiori a 1:1280[8]. Pertanto, in presenza di un titolo ANA inferiore a 1:160 la ricerca sistematica degli anti-ENA e degli anti-dsDNA non dovrebbe essere effettuata[9]. In generale, in presenza di ANA negativi o positivi a basso titolo, la decisione di eseguire un test di 2° livello deve essere basata su un consistente sospetto clinico. Il caso tipico è quello che si verifica qualora siano presenti dati clinici fortemente suggestivi per polimiosite o per sindrome di Sjögren; in questi casi è consigliabile eseguire la ricerca degli anti-ENA anche se il test ANA è negativo perché i corrispettivi antigeni, Jo-1 e Ro, sono espressi molto debolmente nelle cellule HEp-2 e l'esame può risultare falsamente negativo in IFI.

Per la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA possono essere utilizzati in prima battuta o il metodo IFI su Crithidia *luciliae* o l'ELISA. Se si utilizza il metodo ELISA è opportuno che le positività vengano poi confermate con il più specifico metodo IFI; se invece si utilizza per primo il metodo IFI è necessario che i risultati positivi vengano poi espressi in termini quantitativi ritestando i campioni con un metodo immunoenzimatico calibrato sullo standard internazionale WHO/Wo80.

Per quanto riguarda gli anti-ENA, il test può essere eseguito con uno dei vari metodi disponibili, scelto in base alle esigenze del proprio laboratorio. Poiché tuttavia nessuno dei metodi che vengono oggi impiegati ha una sensibilità del 100%, in presenza di un quadro clinico caratteristico e dopo il riscontro di una positività ad alto titolo degli ANA, un'eventuale negatività degli anti-ENA deve essere confermata con almeno due metodi diversi[10,11].

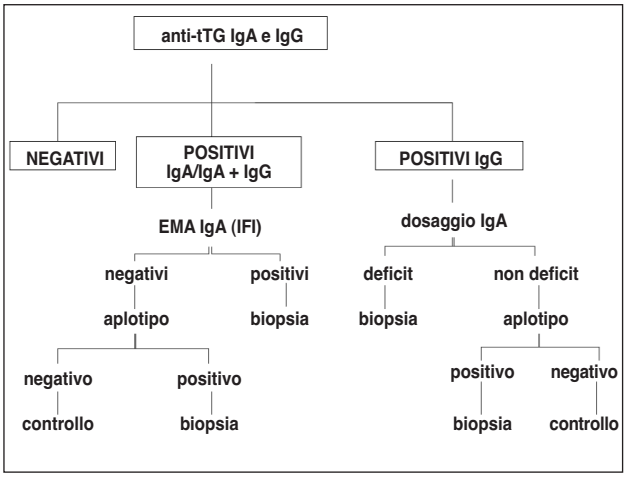
Infine bisogna tener presente che nei pazienti con artrite reumatoide, gli ANA possono risultare positivi, anche ad alto titolo, con pattern nucleare omoge-

neo o granulare. In questi casi gli anticorpi anti-dsDNA e anti-ENA risulterebbero inevitabilmente assenti e sarà più utile ricercare la presenza del fattore reumatoide e degli anticorpi anti-citrullina[12,13].

Flow-chart nella diagnosi della malattia celiaca

La ricerca con metodo ELISA degli anticorpi anti-transglutaminasi (tTG) sia di classe IgA che IgG è il test più sensibile di cui oggi disponiamo e rappresenta perciò il test di primo livello per la diagnosi di malattia celiaca[14]. L'utilizzo di un marcatore anticorpale di classe IgG da affiancare alla determinazione degli anti-tTG IgA, ancorchè tuttora in fase di completa validazione per la sua recente introduzione, è opportuno perchè consente di identificare soggetti celiaci con deficit di IgA e soggetti celiaci con sola positività per IgG, siano essi o no portatori di deficit di IgA. In caso di negatività per entrambe le classi anticorpali vi è un'elevata probabilità che il paziente non sia affetto da MC.
In caso di positività per anti-tTG IgA (associata o meno a positività per anti-tTG IgG) il dato va confermato con il test per gli anticorpi anti-endomisio (EMA) di classe IgA, più specifico degli anti-tTG, con metodo IFI su sezione di terzo inferiore di esofago di scimmia o sezione di cordone ombelicale umano.
Se anche gli EMA risultano positivi, la diagnosi di celiachia è molto probabile e al paziente deve essere proposta la biopsia duodeno-digiunale. Se invece gli EMA risultano negativi, data la loro inferiore sensibilità rispetto agli anti-tTG, prima di procedere all'effettuazione della biopsia duodenale è opportuno eseguire la ricerca degli alleli HLA DQ2 e DQ8 la cui presenza si associa praticamente alla totalità dei celiaci. Tale indagine è raccomandata anche nei pazienti anti-tTG IgA negativi ma IgG positivi. Nei soggetti che risultano DQ2 o DQ8 positivi, è a questo punto consigliata l'esecuzione della biopsia duodeno-digiunale. In assenza di DQ2 o DQ8 il giudizio se eseguire o meno la biopsia va demandato al quadro clinico, ovvero alla presenza e persistenza di manifestazioni cliniche fortemente suggestive per malattia celiaca.
A causa della relativa immaturità del sistema immunitario nei bambini di età inferiore ai 2 anni, considerata la maggiore sensibilità in quella fascia di età degli anticorpi di classe IgG rispetto a quelli di classe IgA[15], può essere utile l'esecuzione del test AGA IgG in associazione ai test anti-tTG IgA e IgG. L'opportunità di testare il paziente anche per gli AGA IgG deriva dal fatto che AGA e anti-tTG non possono essere considerati sovrapponibili. Infatti, mentre gli anti-tTG sono autoanticorpi diretti contro un enzima proprio dell'organismo, gli AGA sono anticorpi (e non autoanticorpi) rivolti contro una proteina esogena, il glutine, che è la causa diretta dello scatenamento del fenomeno autoimmune. Inoltre, almeno secondo alcune ipotesi[16], gli AGA IgG comparirebbero più precocemente delle IgG anti-tTG. La scelta di mantenere o abbandonare il test AGA IgG dovrà perciò attendere i risultati di studi attualmente in corso per valutare la sensibilità degli anti-tTG di classe IgG nei bambini di età inferiore ai due anni.

Figura 2. Flow-chart per la diagnosi di Malattia Celiaca (da Tonutti et al, RML 2001).



Flow-chart nella diagnosi delle epatiti autoimmuni

Le epatiti autoimmuni (EAI) sono affezioni relativamente rare, con una prevalenza di circa 1 caso ogni 6000 individui[17]. La diagnosi si basa sull'esclusione di altre cause di danno epatico (epatiti virali, alcoliche, da farmaci, malattia di Wilson)[18] e sulla presenza di anticorpi nel siero. In base proprio al tipo di anticorpo presente, le EAI vengono distinte in due gruppi: le EAI di tipo 1, caratterizzate dalla presenza di ANA, anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA) con specificità verso l'actina, e anticorpi anti-*soluble liver antigen* (SLA), e le EAI di tipo 2, caratterizzate dalla positività per anticorpi anti-*liver kidney microsomal* (LKM). Fino a qualche anno fa veniva riconosciuta anche l'epatite di tipo 3, che si differenziava dalle altre per la presenza di anticorpi anti-*liver pancreas* (LP). Tuttavia, la dimostrazione che l'antigene LP è identico allo SLA, ha di fatto eliminato questo terzo gruppo di epatiti.
Considerato che tutti gli anticorpi sopracitati concorrono alla definizione del tipo di EAI, un corretto approccio diagnostico prevede che tutti i test disponibili (ANA, ASMA, SLA e LKM) vengano eseguiti contemporaneamente. Nelle EAI di tipo 1, che costituiscono l'85% circa di tutte le EAI, gli ANA si ritrovano nel 65% dei casi (50% associati agli ASMA e 15% da soli), gli ASMA sono evidenziabili nel 85% dei pazienti (35% dei casi da soli)[19] e gli anti-SLA nel 30%[20]. All'incirca nel 15-20% dei pazienti, ANA e ASMA possono essere inizialmente assenti e comparire più tardivamente, cosicchè praticamente quasi il 100% dei pazienti con EAI di tipo 1 ha alla fine almeno un anticorpo positivo[21]. Tali test hanno tuttavia un peso diagnostico molto diverso: gli ANA non pos-

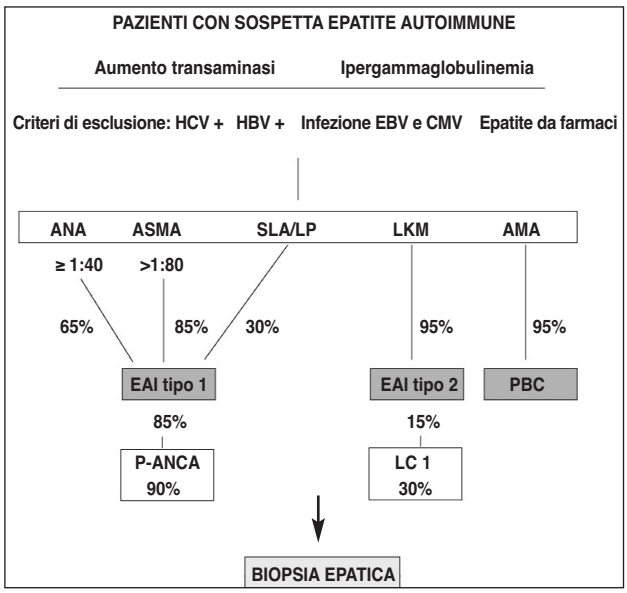
sono ovviamente essere considerati specifici per l'EAI dal momento che si possono ritrovare in molti altre malattie autoimmuni e in altre affezioni epatiche, compresa la cirrosi biliare primitiva (20-30% dei casi[20]). Lo stesso discorso vale per gli ASMA che hanno significato solo se sono positivi ad alto titolo (> 1:80). ASMA a basso titolo sono infatti rinvenibili nel siero di molti soggetti sani o con altre patologie epatiche[22]. Comunque, anche se presenti ad alto titolo, gli ASMA non hanno sicuramente significato patogenetico, dal momento che il titolo anticorpale non correla con la severità della malattia e non è un parametro utile nel follow-up clinico[23] e che la presenza nel siero di anticorpi diretti verso la muscolatura liscia non è neanche lontanamente correlata alla distruzione degli epatociti che si osserva in questi pazienti nè tantomeno sono riscontrabili danni alle cellule della muscolatura liscia del fegato o di altri distretti dell'organismo[24]. E' stato proposto che la diluizione di base per la loro determinazione sia almeno di 1:100 in modo da eliminare la maggior parte delle positività aspecifiche. Tuttavia, su questo punto non c'è ancora accordo e saranno necessari studi su casistiche molto ampie per definire quale possa essere livello soglia più idoneo a garantire il massimo di specificità senza perdere eccessivamente in sensibilità. Gli anti-SLA, pur essendo meno frequenti degli ANA e degli ASMA, sono invece anticorpi molto specifici[25] e la loro presenza è chiaramente indicativa di EAI tipo 1. E' interessante notare che nel 90% delle EAI tipo 1 si possono ritrovare anticorpi ANCA con pattern perinucleare, senza apparente significato clinico.

Nelle EAI di tipo 2, che costituiscono il 15% delle EAI, gli anticorpi anti-LKM sono presenti nel 95% dei casi. Anti-LKM possono tuttavia essere presenti anche nel 6% dei pazienti con epatite virale da HCV e, più raramente, anche in pazienti con epatite indotta da farmaci (alotano, anticonvulsivanti, diidralazina); in questi casi, si ritiene che la loro presenza rappresenti un epifenomeno e non sia indicativa di EAI tipo 2[20]. Nel 30% dei pazienti con EAI di tipo 2, sono rilevabili anche anticorpi anti-*liver cytosol type 1* (LC1); nonostante non siano specifici, dal momento che anch'essi possono risultare positivi in soggetti con epatite da HCV, sembrano essere ben correlati con l'attività di malattia[26].

Infine, nello studio dei pazienti con sospetta EAI è sempre opportuna anche la ricerca degli anticorpi anti-mitocondri (AMA), allo scopo di escludere la cirrosi biliare primitiva.

In conclusione, anche se i test autoanticorpali hanno raggiunto livelli di grande affidabilità, è opportuno sottolineare come la migliore flow chart diagnostica non possa prescindere da un'appropriata selezione dei pazienti, che rimane il requisito essenziale per migliorare il valore predittivo positivo dei test. La ricerca di autoanticorpi dovrebbe sempre essere effettuata in forma selettiva e solo quando vi sia un consistente sospetto di malattia autoimmune. Successivamente, è responsabilità del Laboratorio adottare i test più idonei in rapporto al quadro clinico e agli scopi dell'indagine, ed educare i clinici sul significato dei risultati ottenuti con diversi tipi di dosaggio disponibili.

Figura 3. Flow-chart per la diagnosi di epatite autoimmune (EAI). I dati in percentuale indicano la prevalenza dei diversi anticorpi e dei due tipi di epatite autoimmune.



Bibliografia

1. Fritzler MJ, Wiik A, Fritzler ML, Barr SG: The use and abuse of commercial kits used to detect autoantibodies. Arthritis Res Ther 2003; 5:192-201.
2. Wiik A. Testing for ANA and ANCA. Diagnostic value and pitfalls. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, (eds). Rheumatology. 3rd edition. London: Mosby 2003. pp 215-26.
3. Wiik AS, Gordon TP, Kavanaugh AF, Lahita RG, Reeves W, van Venrooij WJ, et al, and the IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic and Related Diseases: Cutting edge diagnostics in rheumatology: The role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. Arthritis Care Res (in press).
4. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. Arthritis Rheum 1997; 40:1601-11.
5. Keren DF, Nakamura R. Progress and controversies in autoimmune disease testing. Clin Lab Med 1997; 17:483-97.
6. Bizzaro N. L'appropriatezza nella richiesta dei test autoanticorpali per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni. Riv Med Lab 2001;2:11-6.
7. Dawkins RL, Martinez OP, Freitas EM, Hollingsworth PN. Diagnosis of autoimmune disease. In: Rose NR, Mackay IR, eds. The autoimmune diseases. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 1998. p. 821-31.
8. Bizzaro N, Pasini P. Correlazione tra titolo e pattern

degli anticorpi anti-nucleo in immunofluorescenza indiretta e positività degli anticorpi anti-ENA. Med Lab 1999; 7:419.
9. Homburger HA. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue diseases. Mayo Clin Proc 1995; 70:183-4.
10. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshop for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. J Immunol Methods 1991; 140:181-9.
11. Tozzoli R, Bizzaro N, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, et al: Guidelines for the Laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. Am J Clin Pathol 2002;117:316-24.
12. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 2000; 43:155-63
13. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. Clin Chem 2001; 47:1089-93
14. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli R, Bagnasco M, et al. Proposta di linee guida per la diagnosi di laboratorio della malattia celiaca. Riv Med Lab 2001; 4: 44-51.
15. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al, for the French-Italian Laboratory Study Group on Coeliac Disaese. The role of anti-tissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: A French-Italian multicentre study. J Clin Pathol 2003; 56:389-93.
16. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Gut 1998; 42:362-5.
17. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. Scand J Gastroenterol 1998; 33:99-103.
18. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. J Hepatol 2000; 32(Suppl.1):181-97.
19. Czaja AJ, Cassani F, Catala M, Valentini P, Bianchi FB. Antinuclear antibodies and patterns of immunofluorescence type 1 autoimmune hepatitis. Dig Dis Sci 1997; 8:1688-96.
20. International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol 1999; 31:929-33.
21. MacFarlane JG. Autoimmune liver diseases. Scand J Clin Lab Invest 2001; 61(Suppl. 235):53-60.
22. Bylund DJ, McHutchinson J. Autoimmune liver diseases. In: Keren DF, Nakamura R (eds). Progress and controversies in autoimmune disease testing. Clin Lab Med 1997; 17:483-97.
23. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. J Hepatol 1999; 30:394-401.
24. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20 year experience. Hepatology 1997; 25:541-7.
25. Lohse AW, Gerkem G, Mohr H, Löhr HF, Treichel U, Dienes HP, et al. Relation between autoimmune hepatitis and viral hepatitis: clinical and serological characterisation in 859 patients. Z Gastroenterol 1995; 33:527-33.
26. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2