Originale

Confronto tra Waaler – Rose test e ricerca del fattore reumatoide in immunoturbidimetria

G. De Renzi[A]; C. Bertone[A]; D. Cauchi Inglott[A]; E. Reverso Giovantin[A]; I. Arzano[B]; G. La Torre[B]

[A] *Laboratorio di Patologia Clinica Ospedale di Chieri (ASL 8 Piemonte);*
[B] *Cattedra di Igiene, Università degli Studi di Cassino*

***Premesse*:** La ricerca del Fattore Reumatoide è uno degli esami più comunemente richiesti per la diagnosi di laboratorio di Artrite Reumatoide. Tra le metodiche attualmente più utilizzate a questo scopo vi sono il test di emoagglutinazione indiretta detto test di Waaler - Rose e il dosaggio in immunoturbidimetria, detto anche Reuma-Test. Nel nostro laboratorio le due metodiche vengono richieste insieme nel 20 % circa dei casi. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare il grado di accordo delle due metodiche al fine di ottenere un parametro per valutare la possibilità di escludere uno dei due test dall'uso routinario e di screening per la ricerca del Fattore Reumatoide.
***Metodi*:** Si sono messi a confronto tramite il test K i risultati di pazienti per la ricerca combinata del Fattore Reumatoide ottenuti con metodica equivalente alla Waaler Rose e con quella immunoturbidimetrica attualmente in uso nel laboratorio analisi dell'Ospedale Maggiore di Chieri (ASL 8 Piemonte),
***Risultati*:** Il test K , con i valori di cut-off da noi adottati, ha fornito un accordo tra le due metodiche discreto. Il grado di accordo diverrebbe buono elevando i rispettivi cut-off, ma il risultato rimarrebbe non ottimale, dando in definitiva un esito non soddisfacente.
***Conclusioni*:** Il grado di accordo non ottimale da noi trovato è insufficiente per poter arrivare all'ipotesi di abbandonare una delle due metodiche a favore dell'altra.
Per la diagnosi di laboratorio di Artrite Reumatoide, però, si fa sempre di più avanti l'ipotesi di utilizzare la ricerca del Fattore Reumatoide non da solo ma integrandolo con altri test in maniera combinata ed elastica.

Background: The test for the rheumatic factor is one of the most commonly requested laboratory tests for the diagnosis of rheumatoid arthritis. The indirect hemagglutination test known as the Waaler-Rose test and the immunoturbidity test known as the Reuma-Test are the most widely used methods. In our laboratory these methods are requested together in about 20% of examinations. A study was made to compare these two methods and to see whether one of them could be excluded from routine use and screening purposes for the research of the rheumatic factor.
Methods: Results of the test for the rheumatic factor in patients using an equivalent to the Waaler Rose test and the immunoturbidity test obtained at the "Ospedale Maggiore di Chieri" (ASL8 Piemonte Italy) were compared by using the K-test.
Results: The K-test with the cut-off values adopted by us for the two methods gave discrete results. By incrementing the cut-off values the agreement between the two tests increased but the results were still not optimal, resulting in an unsatisfactory outcome.
Conclusions: The unsatisfactory outcome that we obtained from our study brought us to conclude that neither of these methods could be excluded in favour of the other. For the laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis it is best to use the test for the rheumatic factor together with other laboratory tests in a combined and elastic manner.

Introduzione

Il Fattore Reumatoide (FR) è un autoanticorpo più frequentemente di tipo IgM che lega la frazione Fc delle immunoglobuline di tipo IgG, ed è presente in percentuale variabile in soggetti affetti da Artrite Reumatoide (AR), nel Lupus Eritomatoide Sistemico (LES), nella Sindrome di Sjogren (SS) ed in altri disordini autoimmuni. Nell'AR esso è presente in circa i 2/3 dei pazienti, ma lo si può

Corrispondenza a: Dott. De Renzi Giuseppe, Via Genova 43/1 Torino CAP 10126. Tel. 011 6961980 Fax. 011 94293324 Cell. 338 5882519 - E-mail: pderenzi@tiscalinet.it or derenzi.giuseppe@tiscalinet.it

ritrovare senza alcun significato clinico in circa il 5 % della popolazione sana, percentuale che cresce fino al 10-20 % nei soggetti con età superiore ai 65 anni[1].
Il FR fu scoperto nel 1937 da Waaler, e da allora il test di emoagglutinazione indiretta detto test di Waaler – Rose (WR) è divenuto uno standard per la sua ricerca in laboratorio.
Come alternativa al metodo classico, sono stati sviluppati in seguito altri tipi di test, principalmente basati sull'agglutinazione al latex, su metodi ELISA e nefelometrici, che però rivelano spesso una ampia variabilità per quanto concerne la loro sensibilità. Negli Stati Uniti, per esempio, si utilizza un altro metodo standard rispetto alla WR classica, il cosiddetto test di Plotz-Singer latex test, che mostra una sensibilità tra il 50 e il 95%[2].
Spesso, però, questi metodi alternativi vengono affiancati al test di WR senza sostituirlo, e di fatto in molti laboratori, come il nostro, essi vengono spesso richiesti ed eseguiti contemporaneamente. Inoltre, in molti casi, assieme alla ricerca del fattore reumatoide, i medici richiedono anche test autoanticorpali quali ad esempio gli ANA, gli anti-DNA e gli anti-ENA per la diagnosi delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS), all'interno delle quali l'AR occupa il primo posto con una prevalenza di 1/116[3], forse con l'intento da parte dei medici richiedenti di poter escludere tali patologie dal loro sospetto di diagnosi e di ottenere dal cumulo dei risultati di test diversi un maggior dettaglio diagnostico.
In genere si ritiene sufficiente la sola determinazione degli ANA quale prima indagine nella diagnostica delle MAIS[4], mentre per quanto riguarda in particolare la ricerca del FR nella diagnosi di AR esso risulta praticamente inutile nello screening di tale malattia, se usato da solo, a causa della sua bassa predittività[1].
A questo proposito, per la diagnosi soprattutto in fase precoce dell'AR, recentemente è stato suggerito l'utilizzo multiplo del fattore reumatoide con test al lattice e/o ELISA in aggiunta ai test per la ricerca del fattore antiperinucleare (APF), agli anticorpi anticheratina (AKA) e agli anti-peptide citrullinato ciclico (anti-CCP)[5].
Nel laboratorio analisi dell'Ospedale Maggiore di Chieri (TO) si eseguono routinariamente il RAHA test (agglutinazione al lattice) e la ricerca immunoturbidimetrica del FR, ed in circa il 20% dei casi i due esami vengono richiesti assieme.
Lo scopo del lavoro è stato quello di mettere a confronto i due test dal punto di vista della concordanza dei risultati se eseguiti assieme nello stesso momento e sullo stesso paziente per poterne valutare, per quanto possibile, la loro rispondenza al processo decisionale clinico che sostiene la loro richiesta. Un test diagnostico, infatti, dovrebbe essere richiesto solo quando esista la prova che il risultato del test darà una risposta ad un dato quesito clinico[6].
In pratica, si è voluto verificare quale grado di accordo statistico vi sia tra le due metodiche; a quale cut-off i due test offrano la migliore concordanza tra loro, e se questo dato sia sufficiente per poter decidere di eseguire in laboratorio solo uno dei due test per la ricerca del FR e non entrambi, al fine di semplificare il processo organizzativo in un'ottica di efficienza e efficacia dei test di laboratorio.

Metodi

Sono stati raccolti i dati riguardanti tutti i prelievi affluiti al nostro laboratorio dal 01/01/2002 al 31/03/2003 con richiesta di ricerca del FR. Di questi si sono analizzati statisticamente i risultati di 386 pazienti che hanno eseguito sul medesimo prelievo la ricerca del FR contemporaneamente sia con test di agglutinazione che con metodo strumentale. Si è scelto questo intervallo lungo di tempo per poter ottenere almeno 50 risultati positivi per ciascun metodo, come raccomandato dall'NCCLS per il confronto tra metodi quali-quantitativi[7].
L'estrazione dei dati riguardanti i pazienti e i risultati dei test è stata eseguita con il sistema informatico in dotazione del laboratorio.
Il test RAHA utilizzato nel nostro laboratorio è eseguito con kit SERODIA-RA (FUJIREBIO INC., Tokyo, Giappone) ed è basato sull'agglutinazione passiva di particelle artificiali di gelatina sensibilizzate con IgG di coniglio denaturate. Il principio del test è, come dichiarato dalla ditta, conforme al test classico di WR e alla sua modifica da parte di Heller, per cui i termini WR e RAHA in questo articolo verranno usati in modo intercambiabile. Il test è manuale, e prevede una titolazione in microtiter. Il cut-off consigliato dalla ditta produttrice è di 1:40, mentre la sua sensibilità e specificità non è dichiarata.
Il test RT (Roche, Mannheim, Germania) è eseguito su strumentazione COBAS INTEGRA 800 con metodo immunoturbidimetrico, che prevede l'agglutinazione di particelle di lattice ricoperte di IgG umane, il cui precipitato viene letto in turbidimetria a 583 nm. In questo caso il cut-off consigliato è di 14 UI/ml.
Entrambi i test vengono eseguiti su siero ricavato da prelievo sanguigno in provetta Vacutainer tipo SST II da 3.5 ml della ditta Becton Dickinson senza additivi e con la presenza di gel separatore.
Entrambi i test vengono eseguiti routinariamente in giornata da provetta madre.
Sui dati è stata eseguita un'elaborazione statistica mirata a mettere in rilievo la loro concordanza tramite il test Kappa (Jekel et al, 1996)[8], e non una valutazione del cut-off appropriato (curve ROC), né quella su sensibilità e specificità in quanto non è stato possibile in molti casi risalire a ritroso all'esatta diagnosi clinica.

Le differenze fra i gruppi per le variabili qualitative sono state analizzate utilizzando il test del X^2. Sono state considerate statisticamente significative le differenze con un $p < 0.05$. Relativamente al test K sull' accordo tra i metodi di diagnosi, sono stati considerati i seguenti riferimenti: K < 20% accordo trascurabile, 20% < K < 40% accordo minimo, 40% < k < 60% accordo discreto, 60% < K < 80% accordo buono, K > 80% accordo eccellente[8].
L'analisi statistica è stata effettuata con il pacchetto EpiInfo 2002.

Risultati

Il campione, presso il nostro laboratorio, è risultato composto da 2210 pazienti, di cui 1669 (75.5%) con sola richiesta di RT; 155 (7%) con sola richiesta di WR e 386 (17.5%) con la richiesta dei due esami insieme.
Dei 386 pazienti sottoposti contemporaneamente agli esami di screening RAHA e RT, 282 (73.1%) erano femmine e 104 maschi (26.9%). L'81,9% dei pazienti ha un'età superiore ai 51 anni con frequenze del 24.1% e 25.1% rispettivamente per le fasce di età 51-60 e 61-70. Non si osservano al riguardo differenze statisticamente significative relativamente al rapporto fra sesso e fascia d'età ($X^2 = 6.00$; $p = 0.306$).
Sono risultati positivi al RT 58 soggetti (15.0%), mentre 65 (pari al 16.8%) sono risultati positivi al test RAHA (Tabella I).
Comparando le due metodiche diagnostiche, 34 pazienti (8.8%) sono risultati positivi in modo concorde ad entrambi i test, mentre 297 soggetti, pari al 76.9%, sono risultati concordi negativi. Inoltre, 31 pazienti positivi al RAHA (8%) sono risultati negativi al RT, mentre 24 soggetti (6.2%) sono viceversa risultati positivi al RT ma negativi alla RAHA.
Il sesso non sembra essere discriminante in riferimento alla positività ($X^2 = 0.60$; $p = 0.43778$) e alla negatività concorde dei due test ($X^2 = 1.18$; $p = 0.2764$) .
Per calcolare l'accordo fra la metodica della RAHA e quella del RT, è stato utilizzato il test del Kappa . Si è proceduto a costruire una tabella standard 2x2 che paragona i risultati dei due metodi.

Tabella I – Confronto tra metodi per la ricerca del Fattore Reumatoide nel laboratorio analisi dell'Ospedale Maggiore di Chieri (TO): RAHA test (agglutinazione al lattice) e Reuma test (metodo immunoturbidimetrico) con **Cut-off WR 1:40 e RT 14:**

	RAHA	RAHA	TOTALE
	Positivi	Negativi	
Reuma test positivi	34 (8.8%)	24 (6.2%)	58 (15%)
Reuma test negativi	31 (8.1%)	297 (76.9%)	328 (85%)
Totale	65 (16.9%)	321 (83.1%)	386 (100%)
Test k = 0.47 (47%)			

Tabella II – Confronto tra metodi per la ricerca del Fattore Reumatoide nel laboratorio analisi dell'Ospedale Maggiore di Chieri (TO): RAHA test (agglutinazione al lattice) e Reuma test (metodo immunoturbidimetrico) con **Cut-off WR 1:80 e RT 19:**

	RAHA	RAHA	TOTALE
	Positivi	Negativi	
Reuma test positivi	22 (5.7%)	19 (4.9%)	41 (10.6%)
Reuma test negativi	23 (6%)	322 (83.4%)	328 (85%)
Totale	45 (11.7%)	341 (88.3%)	386 (100%)
Test k = 0.45 (45%)			

Tabella III – Confronto tra metodi per la ricerca del Fattore Reumatoide nel laboratorio analisi dell'Ospedale Maggiore di Chieri (TO): RAHA test (agglutinazione al lattice) e Reuma test (metodo immunoturbidimetrico) con **Cut-off WR 1:128 e RT 19:**

	RAHA	RAHA	TOTALE
	Positivi	Negativi	
Reuma test positivi	14 (3.6%)	5 (1.3%)	19 (4.9%)
Reuma test negativi	31 (8.1%)	336 (87%)	328 (85%)
Totale	45 (11.7%)	341 (88.3%)	386 (100%)
Test k = 0.617 (61.7%)			

Successivamente è stato calcolato sia l'accordo osservato pari a 331 che l'accordo dovuto al caso (283,26). È emerso un K = 0.47 per cui è possibile affermare che si è in presenza di un accordo discreto.
La zona grigia, nel campione da noi utilizzato, è rappresentata dal 14.3% (6.2% + 8.1%, Tabella I) dei soggetti in cui uno dei due test fornisce un risultato positivo e l'altro negativo, e corrisponde al 61.8% delle positività, configurando pertanto un dato non trascurabile.
Elevando arbitrariamente i cut-off della RAHA e del RT rispettivamente a 1:80 e 19 il grado di accordo (K = 0.45) rimaneva sostanzialmente invariato, mentre si innalzava decisamente fino a raggiungere un accordo buono (K = 61,7 %) se i cut-off venivano elevati a 1:128 per la RAHA e a 19 per quello del RT, (Tabelle II e III). Se tuttavia il cut-off della RAHA veniva ancora innalzato fino a 1:320 mantenendo il RT a 19, il grado di accordo scendeva drasticamente al 26.9 % (Tabella IV).

Tabella IV – Confronto tra metodi per la ricerca del Fattore Reumatoide nel laboratorio analisi dell'Ospedale Maggiore di Chieri (TO): RAHA test (agglutinazione al lattice) e Reuma test (metodo immunoturbidimetrico) con **Cut-off WR 1:320 e RT 19:**

	RAHA	RAHA	TOTALE
	Positivi	Negativi	
Reuma test positivi	8 (2.1%)	1 (0.3%)	9 (2.4%)
Reuma test negativi	37 (9.6%)	340 (88%)	377 (97.6%)
Totale	45 (11.7%)	341 (88.3%)	386 (100%)
Test k = 0.269 (26.9%)			

Discussione e Conclusioni

In generale, per quanto riguarda la prevalenza dell'AR in letteratura vi sono dati abbastanza concordi.
L' AR, infatti, ha nelle diverse parti del mondo una prevalenza che si aggira intorno all'1% circa (range 0.3 – 2.1), e non sembra vi siano variazioni significative riguardanti le razze e le diverse aree del mondo, fatta eccezione per le popolazioni africane sub-sahariane, che denotano un'incidenza e una gravità minori[1].
In Italia, l'AR colpisce fra lo 0,3% e l'1% della popolazione, con una stima riferita al 2001 di circa 400.000 casi. Tali pazienti generano tra costi diretti (ricoveri, spese ambulatoriali, indagini diagnostiche e terapie) e indiretti (oneri previdenziali e spese sostenute dal malato) una spesa valutabile tra 1600 e 1800 euro circa pro-capite (3100 - 3600 miliardi di lire)[9].
In un studio scandinavo del 1988 che ha esaminato una popolazione di 8807 persone con età compresa tra i 20 e i 50 anni, si è trovata una sieropositività al FR dell'1,36%, usando per la WR un cut-off con titolo di 1:40, Tuttavia solo l'11% di questi soffriva di AR[10].
A proposito della correlazione con la clinica, uno studio del 1998 eseguito nell'Arthritis Research Center, degli USA, evidenziava come il metodo nefelometrico e quello al latex correlassero bene tra loro (r = 0.872), avendo entrambi un buon potere discriminante tra AR e condizioni non infiammatorie. Si faceva notare però che seppure il FR correlava con i cambiamenti dell'attività della malattia, la sua ricerca era meno efficiente in questo senso rispetto all'andamento nel tempo della VES o della PCR[11].
Per quanto riguarda il confronto tra metodi, secondo uno studio tedesco risalente al 1996, la WR comparata ad altri 4 test diversi (nefelometro, latex, IgM –EIA ed IgA EIA) risultava come il test con la migliore specificità (90.8 %), mentre il test al latex e la ricerca delle IgM EIA risultavano i migliori in quanto a sensibilità (76.7%), suggerendo di usare per lo screening i test quali il latex o le IgM EIA e successivamente di passare ai metodi più specifici (tra cui il nefelometro – specificità: 89.9, comparabile quindi con la WR)[12].
In un ampio studio norvegese del 2001, infine, in cui la prevalenza clinica della AR era del 1%, si mostrava come elevando il cut-off della WR da 1:64 a 1:128 la sensibilità scendeva dal 67.5% al 60.3% rispettivamente, mentre il PPV aumentava da 8.8 a 12.9, valori, quest'ultimi, decisamente insoddisfacenti.
Lo studio peraltro segnalava sensibilità decisamente inferiori, nell'ordine del 38% e del 34% rispettivamente per il nefelometro e la WR nel caso in cui i due test venivano eseguiti per la diagnosi non di RA ma di SS.
Sempre nello stesso studio, eseguendo il test del K ed il calcolo della curva ROC, si rilevava un buon accordo tra i due test ad entrambi i livelli di specificità trovata a seconda dei due cut-off suggeriti (K = 0.697 con specificità di 91 % e K = 0.7111 con specificità di 95.9%) concludendo infine che il risultato ottimale del test si otteneva considerando valori di cut-off di 19 UI/mL per il sistema nefelometrico e di 1:128 per la WR. In definitiva, gli Autori di questo studio concludevano che la ricerca del FR in nefelometria aveva una maggior capacità discriminante rispetto alla WR tra pazienti con disordini infiammatori di tipo reumatico (soprattutto RA e SS) rispetto ai pazienti con malattie non autoimmuni, ma sottolineavano al contempo come l'esecuzione di entrambi i test per la rilevazione del FR non fosse raccomandabile[13].
Per quanto riguarda il solo test K, quanto trovato da noi è in linea proprio con quest'ultimo studio: l'accordo tra i due test, infatti, è risultato buono con cut-off più elevati di quelli utilizzati routinariamente, ma resta in ogni caso non ottimale. Peraltro, l'ipotesi di alzare il cut-off dei due metodi, o di uno solo di essi, per aumentare la concordanza dei due test si tramuterebbe in perdita della sensibilità del test, già di per sé non elevatissima.
Dai dati relativamente scarsi ricavati in letteratura e dai risultati ottenuti solo con il test K, sembra si possa affermare che la ricerca del FR con metodica strumentale o con test classici (WR) e affini (RA-HA) sia destinata per il momento a suscitare giudizi ancora contrastanti sia per quanto riguarda la sensibilità e specificità, sia per quanto riguarda il cut-off utilizzabile.
Vi è allo stato attuale, infatti, un'insufficienza di dati per poter valutare la possibilità di abbandonare uno dei due test in favore dell'altro nello screening e nell'ausilio diagnostico di laboratorio dell'AR. Dal punto di vista del processo diagnostico, infatti, non appare ipotizzabile né giustificabile l'esclusione di uno dei due test dalla pratica di un laboratorio, poiché un simile atteggiamento inficerebbe in maniera rilevate l'esito diagnostico ricercato.
In alternativa, però, dato che il FR mostra un'utilità diagnostica maggiore se ricercato assieme agli anti-CCP[14] e che sempre di più il suo utilizzo diagnostico sembra andare nella direzione della sua associazione con più test in maniera tra loro combinata a vari livelli, indipendentemente dalla metodica con cui lo si ricerca, si potrebbe ipotizzare di richiedere un singolo test per la ricerca del FR (lasciando libero il laboratorio che la esegue di scegliere quale metodica usare, se in agglutinazione o con test strumentale automatico) in associazione con la ricerca degli anticorpi anti (anti-CCP), soprattutto se in fase di screening, come recentemente proposto.
Pur tuttavia, è utile sottolineare che la diagnosi di artrite va comunque confermata sia clinicamente che radiologicamente.

Bibliografia

1. Lipsky PE. Artrite Reumatoide. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. Principi di Medicina Interna. Milano: Mc Graw-Hill Libri Italia srl; 1995. P 1868-1877.
2. Ravel R. Bone, Joint, and Collagen-Vascular Disorders. In: Ravel R. Clinical Laboratory Medicine. St.Louis: Mosby-Year book, Inc.; 1995. P 369-392.
3. Bassetti D, Bizzarro N, Manoni F, Piazza A, Pradella M, Rizzotti P, *et al*. Il ruolo del laboratorio nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie reumatiche sistemiche. Med Lab, Vol. 6, N. 3. 1998: 285-287
4. Bizzaro N. L'appropriatezza nella richiesta dei test autoanticorpali per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni. Riv Med Lab – JLM, Vol 2, N. 2. 2001; 11-16
5. Saraux A, Berthelot JM, Devauchelle V, Bendaoud B, Chales G, Le Henaff C, *et al*. Value of antibody to citrulline-containing peptides for diagnosis early rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2003; 30 (12):2535-9.
6. Price C. P. Evidence-based Laboratory Medicine: Supporting Decision-Making. Clinical Chemistry. 2000; 46: 1041-1050
7. Poltronieri F. La valutazione dei metodi di analisi qualitativi utilizzando le linee guida contenute nel documento NCCLS EP12-P "User protocol for evaluation of qualitative test performance; Proposed guideline" Riv Med Lab – JLM, Vol.2, S1, 2001 113-117
8. Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Capire e ridurre gli errori in medicina. In: Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Epidemiologia, Biostatistica e Medicina Preventiva. Napoli: Edises; 1996
9. Ciocci A, Buratti L, Coari G, Di Franco M, Iagnocco A.M, Mauceri M.T, *et al*. Artrite reumatoide: stima della frequenza dei ricoveri e valutazione dei costi della malattia. Reumatismo. 2001; 53(3): 215-222
10. Husby G, Grant JT, Johannessen A. Epidemiological and genetic aspects of IgM rheumatoid factors. Scand J Rheumatol Suppl. 1988; 75:213-8
11. Wolfe F. A comparison of IgM factor by nephelometry and latex methods: clinical and laboratory significance. Arthritis Care Res. 1998 Apr; 11(2):89-93.
12. Aupperle KR, Alsalameh S, Stock KP, Burmester GR, Kalden JR. Comparison of rheumatoid factor assay systems – value and critical interpretation of sensitivity and specificity and their effect on pre-test and post-test probability. Z Rheumatol. 1996 May-Jun; 55 (3): 158-67.
13. Ulvestad E, Kanestrom A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ. Clinical utility of diagnostic tests for rheumatoid factor. Scand J Rheumatol 2001; 30(2):87-91
14. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. Clin Chem. 2001 Jun; 47(6): 1089-93 Erratum in Clin Chem 2001 Sep; 47(9): 1748.