

Il referto interpretativo in autoimmunologia e le ricadute sui percorsi diagnostico-assistenziali

Tonutti E., Visentini D.

Laboratorio di Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliera "S. Maria della Misericordia" di Udine

Il Laboratorio di Autoimmunologia è un settore qualificante del Dipartimento di Patologia Clinica in quanto, proprio per la interdisciplinarietà che lo contraddistingue, risulta essere un'essenziale area di riferimento diagnostica e di consulenza per pazienti e colleghi clinici.

I test per la determinazione di autoanticorpi specifici comprendono un gruppo di procedure diagnostiche estremamente diverse tra loro in termini di metodo, sensibilità, specificità e correlazione clinica; i test vengono utilizzati per la diagnosi o il monitoraggio di patologie complesse, in molti casi rare e di pertinenza specialistica; inoltre il significato di questi test assume spesso un rilevante valore diagnostico qualora siano eseguiti in sequenza o in associazione. Il referto interpretativo risulta perciò un momento fondamentale della diagnostica autoanticorpale in quanto fornisce indicazioni estremamente utili per l'interpretazione dei risultati e può avere significative ricadute sul percorso diagnostico. L'atto medico di un referto interpretativo in questa peculiare disciplina richiede una profonda conoscenza dei meccanismi fisiopatologici del sistema immunitario, degli aspetti clinici delle malattie autoimmuni e delle modificazioni dei parametri di laboratorio ad esse connesse nonché delle specifiche dei test anticorpali utilizzati.

Che tipo di referto va consegnato al paziente? Quali sono i test che richiedono un referto esplicativo?

Di seguito vengono presentate alcune situazioni dove, secondo la nostra opinione, il referto interpretativo è imprescindibile.

Il referto interpretativo riferito a singoli test autoanticorpali

In alcune situazioni è estremamente utile che un referto interpretativo sia associato anche ad un singolo test diagnostico il cui risultato presenti degli aspetti di non facile interpretazione da parte del medico richiedente.

Gli anti-nucleo (ANA) in immunofluorescenza indiretta (IFI) su linea cellulare HEp-2 sono senza dubbio gli autoanticorpi più richiesti; è noto che il referto degli ANA deve indicare il metodo utilizzato, il risultato, il pattern di fluorescenza e il titolo¹; infatti un risultato di un test ANA positivo con pattern centromerico a titolo 1:1280 offre al clinico una importante informazione orientativa per la dia-

gnosi di patologie sclerodermiche o di Raynaud, mentre un ANA positivo con pattern speckled a titolo 1:80 ha una bassissima probabilità di correlare con una patologia sistemica del connettivo. In alcuni casi il riscontro di pattern peculiari deve essere corredato da un commento esteso: in presenza del raro pattern PCNA (proliferative cell nuclear antigen: anticorpi anti-ciclina) la cui associazione con il LES è assoluta (100% in tutte le casistiche) è doveroso che il referto sia integrato da un commento che fornisca al medico richiedente l'informazione che anticorpi anti-PCNA anche a basso titolo (è consigliabile la conferma in blot) si riscontrano solo in pazienti con malattie autoimmuni sistemiche (MAIS) e in particolare nel LES; tale nozione infatti, se per il Reumatologo è ovvia, così non lo è per il medico generico e una sottovalutazione di un tale risultato potrebbe avere serie conseguenze per il paziente. D'altro canto spesso si osservano degli ANA anche a titolo significativo la cui associazione con MAIS non è dimostrata come nel caso di anticorpi anti-DFS70 (fine speckled con fluorescenza dei nuclei delle cellule in mitosi) o in presenza di un pattern anti-matrice nucleare (speckled grossolano con esclusione di fluorescenza nucleolare); anche in questo caso è necessario che il medico di laboratorio indichi che tale riscontro non correla generalmente con patologie autoimmuni per evitare ulteriori test di approfondimento o comunque indagini invasive.

Il referto interpretativo del risultato autoanticorpale per la cui determinazione vengono utilizzati più metodi

Il referto interpretativo deve essere riportato in tutti i casi di positività per autoanticorpi per la cui identificazione vengono eseguiti più test con diversi metodi; gli anticorpi anti-dsDNA vengono generalmente identificati con un primo test immunoenzimatico quantitativo (EIA) e i sieri risultati positivi vengono successivamente valutati col metodo IFI su *Crithidia luciliae*¹; tutti i casi che presentano un risultato non concordante tra i due metodi (positivo in EIA e negativo i IFI) devono essere refertati con l'indicazione che questo risultato si riscontra in presenza di anticorpi anti-dsDNA a bassa affinità (di scarsa rilevanza clinica) o comunque per la diversa sensibilità dei due metodi; è noto infatti che la presenza di anticorpi anti-dsDNA ad

alta affinità, evidenziabili sia con metodo EIA che in IFI, correla strettamente con la nefrite lupica.

La ricerca degli ANCA viene eseguita invece in prima battuta con il metodo di IFI su granulociti fissati in etanolo e i sieri che risultano positivi vengono successivamente valutati con metodo quantitativo EIA per l'identificazione di anticorpi anti-mieloperossidasi (anti-MPO) o anti-proteinasi³ (anti-PR3)². Le vasculiti ANCA associate presentano dei pattern di fluorescenza caratteristici (C-ANCA o P-ANCA) a cui corrispondono titoli significativi di anticorpi anti-PR3 o anti-MPO. Ci sono però diverse patologie croniche (epatiti, rettocolite ulcerosa, Crohn, linfomi etc.) che in fluorescenza presentano dei pattern ANCA causati da anticorpi che identificano strutture antigeniche diverse da MPO e PR3 e in molti casi ancora non identificate. Il medico di laboratorio deve refertare il test ANCA IFI insieme al test EIA (o blot) per anti-MPO e anti-PR3; in caso di positività per ANCA IFI e anti-MPO o anti-PR3 deve sottolineare la stretta correlazione tra questo riscontro e la diagnosi clinica di vasculite ANCA associate; in caso di positività per ANCA IFI e negatività dei test per anti-MPO o anti-PR3 deve invece suggerire al clinico che tale riscontro non è indicativo di vasculite.

Anche il test per anticorpi anti-cardiolipina (a-CL) in caso di positività deve essere refertato in modo appropriato. Le linee guida internazionali³ prevedono che la determinazione di questi autoanticorpi sia eseguita con metodo ELISA quantitativo per la classe IgG e IgM utilizzando micropiastre il cui coating sia costituito da cardiolipina assieme a β 2-glicoproteina I (a- β 2GPI) (quest'ultima è probabilmente il vero bersaglio antigenico degli autoanticorpi). I sieri che risultano positivi agli a-CL dovrebbero essere testati anche per la ricerca degli a- β 2GPI in quanto sieri di soggetti con la sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi presentano positività per ambedue i test, mentre sieri con positività indotta da processi infettivi acuti o cronici più frequentemente sono reattivi per a-CL e negativi per a- β 2GPI. Questa ultima evenienza deve quindi essere segnalata nel referto nel quale deve essere indicata inoltre la necessità di ripetere il test dopo 6 settimane.

Un ulteriore esempio in cui più test vengono utilizzati per la ricerca di un marcatore è la celiachia di cui affronteremo la problematica più avanti.

Il referto interpretativo in assetti autoanticorpali atipici o contraddittori

In autoimmunologia è frequente riscontrare pattern autoanticorpale poco chiari e discordanti qualora vengano eseguiti test con diverse metodiche. Nel campo delle connettiviti può accadere che un test di screening ENA in EIA (tutti i sei antigeni ENA in un pozzetto) risulti positivo e che la conseguente ricerca delle singole specificità con metodo EIA risulti negativa mentre la ricerca in blot positiva; è evidente che una situazione di questo tipo non deve essere né sottovalutata né sottolineata in modo troppo deciso in quanto il paziente potrebbe presentare una falsa positività ai test come potrebbe essere in una fase clinica e sierologica di non completa definizione della MAIS (connettiviti indifferenziate). Un referto interpretativo che spieghi la presenza di una reattività non confermata da altri metodi trova in queste situazioni una pertinenza estremamente ri-

levante ed in questo caso vanno valutati dal medico di laboratorio tutti i parametri autoanticorpali (ANA, dsDNA, fattore reumatoide, anti-citrullina etc.) nonché i parametri emato-chimici in generale (indici di flogosi, complementemia, emocromo etc.).

La valutazione da parte del medico di laboratorio di tutti i parametri eseguiti al paziente è un aspetto prioritario; un ulteriore esempio di ciò è la diagnosi sierologica delle patologie del tratto gastro-enterico dove capita frequentemente che ad un paziente con disturbi dell'alvo vengano richiesti anticorpi anti-transglutaminasi (a-tTG) e anticorpi anti-Saccharomyces Cerevisiae (ASCA) in associazione ai normali esami routinari. I soggetti affetti da celiachia nel 30%-50% dei casi risultano anche positivi (ad alto titolo!) per ASCA IgA e/o IgG oltre che per a-tTG IgA; in questa situazione il medico di laboratorio, visti anche i parametri di flogosi (in genere normali in corso di celiachia), deve indicare nel referto che la positività degli ASCA è quasi certamente indotta da alterata permeabilità intestinale (celiachia indotta) e non deve quindi essere presa in considerazione una eventuale diagnosi di morbo di Crohn.

Il referto interpretativo in autoimmunologia come atto conclusivo in un percorso diagnostico autonomo del laboratorio: il caso della malattia celiaca

La malattia celiaca è una patologia su base autoimmune per la quale il Laboratorio può utilizzare dei marcatori altamente sensibili e specifici in grado di identificare la quasi totalità dei casi; il laboratorio clinico esegue come test d'ingresso la ricerca degli anti-tTG IgA assieme alla determinazione delle IgA totali (per la identificazione dei deficit di IgA); i sieri risultati positivi vengono confermati con la ricerca degli anti-endomisio (EMA) IgA in IFI (a-tTG ed EMA identificano lo stesso antigene su substrati e con metodiche diverse)⁴. Nella maggior parte dei casi positivi per a-tTG IgA risultano positivi anche gli EMA IgA ma non sono pochi i casi in cui una positività per a-tTG IgA non viene confermata da EMA IgA⁵. Inoltre sotto i 5 anni di età si consiglia la determinazione anche degli anti-gliadina AGA in relazione ai modelli di sieroconversione. L'insieme di queste procedure, che si svolgono autonomamente in laboratorio, porta alla produzione di dati che necessitano nel modo più assoluto di un referto in particolare in tutti quei casi in cui i risultati non sono univoci. Il medico di Laboratorio deve assumersi la responsabilità di fornire indicazioni precise sui test ulteriori da eseguire (molto spesso nei casi dubbi si deve proporre la determinazione dell'aplotipo HLA DQ2/DQ8), sulla eventuale ripetizione dei test di laboratorio e, ove necessario, deve consigliare di eseguire la biopsia duodenale come approccio diagnostico definitivo. Un interessante lavoro di Sinclair e collaboratori ha recentemente dimostrato come la mancanza di un referto interpretativo ai test di laboratorio per intolleranza al glutine porta una percentuale molto elevata di casi ad una non-diagnosi⁶.

Il referto interpretativo del dato autoanticorpale inatteso

Durante l'esecuzione di procedure diagnostiche per la ricerca di autoanticorpi specifici non è infrequente il riscon-

tro di marker autoanticorpale non richiesti, ma che in molti casi devono essere segnalati per l'impatto che tale indicazione può avere sulla storia clinica del paziente ma anche per un problema etico. Gli esempi più eclatanti sono: riscontro di anti-mitocondri (AMA) eseguendo gli ANA su HEp-2, riscontro di anticorpi anti-reticolina (associati a celiachia!) sui tessuti, evidenziazione sui tessuti di anticorpi non richiesti (anti-muscolo liscio, mucosa gastrica, anti-mitocondri, anti-LKM). L'introduzione poi di nuove tecnologie (multiplex assay etc.) in grado di determinare simultaneamente un numero estremamente ampio di marcatori anticorpali potrà estendere la possibilità di riscontri autoanticorpali non strettamente richiesti. Il riscontro di pattern anticorpali non richiesti deve essere confermato con i metodi di riferimento (ad un riscontro di anti-reticolina deve essere eseguito a-tTG IgA e EMA IgA; ad un riscontro di AMA su HEp-2 deve essere eseguita la ricerca di AMA su tessuti e la conferma in blot per la specificità M2 etc.) Il medico di laboratorio deve essere a conoscenza del significato e dell'eventuale valore predittivo di ciascun marcatore in modo da poter eseguire un referto non allarmistico ma comunque in grado di dare una corretta peso al dato riscontrato consigliando quindi un corretto percorso diagnostico e di follow-up.

Conclusioni

Il referto interpretativo è una procedura essenziale nei percorsi diagnostici delle malattie autoimmuni; per produrre un corretto ed efficace referto il medico di laboratorio deve conoscere la clinica e la fisiopatologia delle malattie autoimmuni oltre che le caratteristiche dei test diagnostici; deve inoltre valutare tutti gli esami richiesti, deve indicare perché sono stati eseguiti eventuali esami aggiuntivi e deve fornire indicazioni utili al percorso diagnostico e al moni-

toraggio; in molti casi è opportuno che il medico di laboratorio contatti direttamente il collega prescrittore ricordando inoltre che ogni referto deve essere firmato per esteso fornendo eventualmente anche il numero telefonico del laboratorio.

Bibliografia

1. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, 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.
2. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111:507-13.
3. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1309-11.
4. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Villalta D, Bagnasco M, Tozzoli R, et al. Linee guida per la diagnosi di laboratorio e istologica della malattia celiaca. *RIMeL-IJLM* 2005; 2:110-22.
5. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al. The role of antitissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of celiac disease: a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56:389-93.
6. Sinclair D, Duncan H. What happens to patients with positive tissue transglutaminase and endomysium antibody results in general practice? *J Clin Pathol* 2004; 57:943-5.