

## **ALLERGOLOGIA IN VITRO: INTRODUZIONE DI NUOVI ALLERGENI NEL PANNELLO DIAGNOSTICO**

B.Cortivo, M.Zanini, F.Poltronieri, B.Caruso

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Verona

### *Scopo del lavoro*

Valutare nella esperienza di laboratorio l'evoluzione della qualità diagnostica in allergometria a seguito dell'ampliamento degli allergeni dosati.

### *Materiali e Metodi*

Sono stati considerati i campioni pervenuti al laboratorio con richiesta di indagine di dosaggio delle IgE specifiche nel periodo novembre 1999 –marzo 2000 e novembre 2000- marzo 2001. I risultati sono stati ottenuti con il software MasterCAP RM 5.1 del sistema di dosaggio per IgE specifiche "AUTOCAP" della ditta PHARMACIA, dal LIS del laboratorio e successivamente elaborati con Microsoft Excel.

### *Risultati*

Nel periodo novembre 1999- marzo 2000 sono stati eseguiti 14665 test in 942 pazienti utilizzando un pannello comprendente 16 allergeni. La positività si è riscontrata in 2874 test

Nel successivo periodo novembre 2000 – marzo 2001 i test eseguiti sono stati 22881 su 990 pazienti con un pannello medio di 23 allergeni. Sono risultati positivi 3515 test.

Dopo l'ampliamento del pannello diagnostico allergologico si sono potuti identificare 641 casi in più di positività, corrispondenti circa al 22% di incremento di IgE specifiche identificate.

L'introduzione nel pannello diagnostico di allergeni di nuovo interesse quali l'*Anisakis*, responsabile di infestazioni intestinali, e la *Blatella germanica*, hanno portato a diagnosticare positività nel 2% dei campioni esaminati che, precedentemente, non avremmo identificato.

L'allergene della *Ambrosia* di grande interesse negli Stati Uniti, ma solo negli ultimi anni studiata in Europa, ha indicato una positività in 95 campioni su 990 pari al 9.6%. Da segnalare che 8 di questi campioni corrispondevano a pazienti pediatriche di età inferiore ai 6 anni sui quali l'esecuzione e l'interpretazione del "Prick Test" risulta estremamente difficile.

### *Discussione e conclusioni*

Nel corso dell'anno si procederà allo studio dell'incidenza di positività per singolo allergene sui pazienti afferenti al laboratorio, per poter meglio configurare i pannelli diagnostici. Questo contribuirà ad un contenimento dei costi aumentando l'efficienza diagnostica del Servizio.

La maggiore incidenza di positività di alcuni allergeni è indice di un maggiore degrado ambientale e delle condizioni igieniche degli alimenti riscontrato nel nostro bacino di utenza come già segnalato dalla letteratura in altre realtà. Prossimamente l'attenzione sarà rivolta all'introduzione di nuovi allergeni legati non solo a problematiche ambientali, ma anche tecnologiche con particolare riguardo agli alimenti geneticamente modificati che potranno indurre reazioni di tipo allergico dovute alla presenza di sostanze non presenti naturalmente nei prodotti alimentari.

**IgE elevate ed ipereosinofilia in un caso clinico particolare: un anno di osservazione**

Tedesco I., Lucchetti A., \*Rocchi V., \*Ambrogi F., \*\*Bazzichi M.L., Innocenti B., Rossi L.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche 1, Azienda Ospedaliera Pisana

\*Immunoallergologia Clinica, \*\*Reumatologia, Dipartimento Medicina Interna, Università di Pisa

**Scopo del lavoro**

Lo scorso anno si è presentato presso il Dipartimento di Medicina Interna un paziente di 54 anni con dati clinici e laboratoristici abbastanza particolari. Affetto da monoartrite di ginocchio e dermatite delle mani è stato sottoposto ad esami clinici e laboratoristici, da cui sono emersi fattore reumatoide positivo ed IgE sieriche molto elevate, risultati sovrapponibili ad altri eseguiti nei due anni precedenti. Il paziente presenta queste alterazioni del quadro ematochimico ma non manifesta nessuna sintomatologia di riguardo. Risultato positivo per HBV ed HCV ma con transaminasi nella norma ed ecografie addominali normali. Risultato negativo o nella norma per tutti gli accertamenti clinici e laboratoristici (test allergici, markers tumorali e tiroidei, esame parassitologico, sangue occulto, ricerca per cisti da echinococco, esami siero/urinari standard, immunofissazioni siero e urine, dosaggio di catene leggere e pesanti anche di tipo IgE, pannello sieroproteico) è stato indicato come caso clinico di un poster presentato allo scorso Congresso Nazionale, con la fiduciosa speranza di un confronto tra laboratoristi alla ricerca della soluzione di un enigma. Dopo un anno di attenta osservazione illustriamo le novità, alla instancabile ricerca di una soluzione ai problemi del nostro paziente.

**Materiali e metodi**

Da gennaio il paziente, fino ad allora in totale benessere, ha iniziato a presentare artralgie e mialgie diffuse, in assenza di elevazione degli indici di flogosi, mentre permanevano eosinofilia periferica in numerosi saggi (biopsia osteomidollare: aumento dello stipite eosinofilo, senza alterazioni della curva maturativa, non dismorfismi; beta 2 microglobulina, timidinocinasasi nella norma) nell'ordine di 450-700 cell/ml (9-10%), incremento marcato delle IgE totali (734-866 UI/ml), positività del fattore reumatoide. E' stato effettuato breve ciclo di terapia con corticosteroide a basse dosi (metilprednisolone 12 mg), tenendo conto della coesistenza di epatite C cronicizzata, senza alcun miglioramento della sintomatologia soggettiva. Dopo congruo periodo di wash out farmacologico, si e' quindi deciso di effettuare una biopsia muscolare con studio della fascia muscolare per evidenziare l'eventuale presenza di cellule infiammatorie, con particolare riferimento alla componente eosinofila (per escludere la presenza di infiltrato eosinofilo, nel sospetto di fascite eosinofila) e il dosaggio delle vit. B12 (elevato, tipicamente, nel caso di sindrome ipereosinofila idiopatica).

**Risultati**

La biopsia ha evidenziato la presenza di infiltrato infiammatorio mononucleato in sede endo-perimisiale (reperto compatibile con miosite) e, a livello cutaneo, infiltrati infiammatori cronici in sede perivascolare dermica; la vitamina B12 era ai limiti alti della norma. L'elettromiografia e la valutazione del metabolismo ossidativo e glicolitico muscolare sono risultati nella norma. Sono stati ripetuti screening paraneoplastico (PSA, CEA, alfafetoproteina, Ca 19.9, NSE, Cyfra, TPA), radiografia del torace, ecografia addominale, ed eseguito ecocardiogramma, risultati rispettivamente negativi e nella norma. Attualmente il paziente e' in terapia con propionilcarnitina e FANS al bisogno, in attesa di completare gli accertamenti epatologici che consentano di impostare una terapia antiflogistica idonea per la miosite.

**Discussione e conclusioni-** Fornire delle conclusioni definitive a questo caso è un compito assai arduo. Il laboratorio e la medicina sono strettamente in contatto alla continua ricerca di nuove indagini, tests clinici o diagnostici per inquadrare questa particolare situazione. L'occasione di incontrarsi presso importanti manifestazioni professionali e culturali può rappresentare una fonte di confronto tra colleghi che potrebbero essere in grado di risolvere questo dilemma.

## VALUTAZIONE DEL SISTEMA STALLERGY E STALLERTEST (BIOMERIEUX)

Ernesto Trabuio, Elena Barzon, Valentino Miconi

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Ospedale "S. Lorenzo" Valdagno (VI)

### Introduzione:

L'allergia è una patologia che colpisce con sempre maggior frequenza la popolazione soprattutto nei Paesi più industrializzati. Tra le sintomatologie allergiche più frequenti, sicuramente quella respiratoria rappresenta una delle più gravi. Nel nostro laboratorio sono state valutate le prestazioni di due metodi analitici per la ricerca delle IgE respiratorie. Il metodo in esame (Stallertest, Biomerieux) prevede un primo screening con risposta qualitativa specifica per i pneumoallergeni ed un secondo step quantitativo (Stallergy) che prevede un pannello allargato di 22 allergeni di varia natura: alimentare, respiratoria e da contatto.

### Materiali e metodi:

Il VIDAS Stallertest è un sistema qualitativo, automatizzato con il sistema VIDAS, che permette la rivelazione della sensibilizzazione ai pneumoallergeni, nel siero o nel plasma, con il metodo ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) che associa il metodo immunoenzimatico ad una rivelazione finale in fluorescenza. Il test, che utilizza 10 allergeni (D1, G3, E1, E2, M6, W6, W21, T9, T3, I6) tra quelli che più frequentemente provocano allergie respiratorie, fornisce una risposta qualitativa che permette di orientare la diagnosi a favore di un'allergia respiratoria di tipo IgE-mediato.

Il VIDAS Stallergy è un test quantitativo, automatizzato con il sistema VIDAS che permette la determinazione delle IgE circolanti specifiche (D1, D2, E1, E2, G3, G6, T3, T9, W6, W21, K82, M6, I6, T23, F1, F2, F3, F4, F14, F85) con il metodo ELFA. Sono stati analizzati i sieri di 48 pazienti ambulatoriali (19 maschi, 29 femmine) con prescrizione di ricerca delle IgE specifiche.

### Risultati:

Di 48 pazienti, 15 sono risultati positivi alla determinazione qualitativa di almeno uno dei pneumoallergeni presenti nel pannello (Stallertest). I 15 sieri positivi allo Stallertest sono stati testati con il test "Stallergy" per i seguenti allergeni: D1, D2, E1, E2, G3, M6, T3, T9, W6, W21.

Positivi	D1	D2	E1	E2	G3	M6	T3	T9	W6	W21
Numero	10	9	6	3	6	2	8	1	5	2
Percentuale	66,6	60,5	40	20	40	13,3	53,3	6,6	33,3	13,3

### Discussione e Conclusioni:

Il metodo qualitativo Stallertest è utile per lo screening dei pazienti nei quali la natura allergica della sintomatologia clinica non è ancora stata definita. Il metodo quantitativo Stallergy, per quanto valido, è proponibile per il dosaggio delle IgE specifiche in caso di piccole routine, poiché presenta fattori limitanti quali la mancanza di automazione della fase preanalitica, il cospicuo volume di campione richiesto (200 µL per allergene) e la possibilità di processare un limitato numero di campioni con tempi analitici considerevoli (90').

## DOSAGGIO QUANTITATIVO DELLE IGE SPECIFICHE E GRAVITÀ DELLA SINTOMATOLOGIA NEI PAZIENTI CON ASMA BRONCHIALE-ALLERGICO

P. Clemen\*, G. Zappalà\*\*, A. Xamin\*, M. Pradella\*

\*Laboratorio Analisi; \*\*Medicina Generale, Ospedale di Castelfranco Veneto (TV)

### Scopo del lavoro

Scopo del lavoro è stata la valutazione della eventuale correlazione tra concentrazione di IgE specifiche seriche e gravità della sintomatologia in pazienti con asma bronchiale allergico.

### Materiali e metodi

Sono stati esaminati 129 soggetti, affetti da asma bronchiale allergico lieve persistente o moderato-grave persistente. I pazienti, sulla base dei test funzionali sono stati suddivisi in due gruppi: uno di 67 pazienti affetti da asma lieve persistente con TPBA con metacolina superiore a 400 mcg. e con FEV1 superiore all'80 % del valore teorico, l'altro di 62 pazienti affetti da asma moderato-grave persistente con TPBA con metacolina inferiore a 400 mcg. e con FEV1 inferiore all'80 % del valore teorico. Il dosaggio delle IgE specifiche (CAP System, Pharmacia) ha riguardato: *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, graminacee: *Phleum pratense* e *Dactylis glomerata*.

### Risultati

*Media conc. IgE specifiche antigeni perenni (D. farinae, D. pteronyssinus)*

	n°	asma lieve	n°	asma moderato-grave
monosensibilizzati	34	28.0 ± 20.6 KU/L	33	76.1 ± 27.5 KU/L
polisensibilizzati	4	26.4 ± 31.1 KU/L	15	61.5 ± 26.2 KU/L

*Media conc. IgE specifiche antigeni stagionali (graminacee)*

	n°	asma lieve	n°	asma moderato-grave
monosensibilizzati	18	41.5 ± 33.5 KU/L	10	59.2 ± 21.3 KU/L
polisensibilizzati	10	37.0 ± 32.8 KU/L	18	42.1 ± 26.9 KU/L

*Media conc. IgE specifiche per graminacee in relazione al periodo di determinazione*

Asma lieve	n°	aprile-giugno	n°	luglio-marzo
monosensibilizzati	4	78.9 ± 23 KU/L	14	30.8 ± 27.9 KU/L
polisensibilizzati	5	41.0 ± 25.2 KU/L	9	36.6 ± 34.6 KU/L
Asma mod-grave	n°	aprile-giugno	n°	luglio-marzo
monosensibilizzati	5	66.8 ± 19.4 KU/L	6	51.6 ± 20.4 KU/L
polisensibilizzati	5	47.0 ± 26.4 KU/L	17	43.4 ± 27.7 KU/L

### Discussione e conclusioni

Nei pazienti monosensibili agli acari vi è una differenza molto significativa del livello di concentrazione delle IgE specifiche nella forma di asma lieve rispetto all'asma moderato-grave, al contrario di quanto si riscontra nei due gruppi di pazienti monosensibili ai pollini di graminacee. Nei pazienti polisensibili si conferma l'incremento del livello delle IgE specifiche per gli acari in relazione alla gravità dell'asma, mentre tale correlazione non viene evidenziata per le IgE specifiche per i pollini. La concentrazione serica delle IgE specifiche per i pollini può variare in base alla stagionalità per il diverso stimolo allergenico cui sono esposti i soggetti. I valori medi di IgE specifiche riscontrati per i pollini delle graminacee sono significativamente più elevati nel periodo di pollinazione (aprile-giugno) e sono indipendenti dalla gravità della malattia asmatica. In conclusione è emersa una correlazione solo parziale tra sintomatologia clinica e reattività immunologica, in quanto la gravità dell'asma risente non soltanto della presenza e quantità dell'allergene, ma anche di altri fattori, quali la cascata dei mediatori che inducono flogosi bronchiale-allergica e uno stato di iperreattività bronchiale aspecifica.

## CONFRONTO TRA DUE METODI PER IL DOSAGGIO DELLE SOTTOCLASSI IGG

S. Mangraviti<sup>a</sup>, F. Facco<sup>a</sup>, M. Bisi<sup>a</sup>, M. Filippetti<sup>a</sup>, P. Bonifazio<sup>a</sup>, A. Boschi<sup>a</sup>, C. Gallo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio Centrale di Analisi Chimico – Cliniche e Microbiologia. IRCCS “G. Gaslini”.  
Genova.

Scopo del lavoro.

Scopo del nostro lavoro è stato lo studio delle Sottoclassi IgG ( IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> ) con due diversi reattivi, confrontando i dosaggi ottenuti sugli stessi campioni plasmatici.

Materiali e Metodi.

Sono state eseguite 216 determinazioni nefelometriche di Sottoclassi delle IgG, 108 con i reattivi “Behring” e 108 con i “The Binding Site” su un campione randomizzato di 27 bambini sani ( 14 F e 13 M ), per valutare se i dosaggi mostravano differenze significative nei soggetti arruolati.

Mediante questo metodo la sottoclasse delle IgG reagisce con gli anticorpi specifici formando immunocomplessi che provocano una dispersione della luce incidente. Si è utilizzato il Nefelometro BNA Plus Behring che consente di misurare l’intensità della luce dispersa e di correlarla alla concentrazione dell’analita nel campione. I metodi “Behring” e “The Binding Site” presentano analoghe performance analitiche con imprecisione nella serie pari rispettivamente a CV 2.6 – 5 % e 1.8 – 5.6 % ed imprecisione tra le serie pari rispettivamente a CV 2.8 – 6.3 % e 1.1 – 6.2 %.

Risultati

I valori delle Sottoclassi IgG in mg/dL sono riportati nella tabella 1; in essa “Be” indica i reattivi “Behring” e “Bi” i “Binding”, KS indica il valore per p pari a 0.05 al Test di Kolmogorov-Smirnov.

La correlazione tra IgG<sub>1</sub> Binding (y) e IgG<sub>1</sub> Behring (x) era:  $y = 21.5x + 0.9$  con  $r = 0.92$  (n = 24); tra IgG<sub>2</sub> Binding (y) e IgG<sub>2</sub> Behring (x):  $y = 18.9x + 1.1$  con  $r = 0.88$  (n = 24); tra IgG<sub>3</sub> Binding (y) e IgG<sub>3</sub> Behring (x):  $y = 9.5x + 1.5$  con  $r = 0.95$  (n = 30); tra IgG<sub>4</sub> Binding (y) e IgG<sub>4</sub> Behring (x):  $y = -16x + 1.1$  con  $r = 0.92$  (n = 30). Test T di Student con  $p < 0.001$  per IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>.

Tabella 1. Sono sintetizzati i valori di ogni Sottoclasse IgG in mg/dL ed i dati statistici salienti.

Analita	n	min	max	Media	SD	mediana	Curtosi	KS	a	b	r
IgG <sub>1</sub> Be	24	155.10	1145.00	642.37	207.81	654.25	0.7	0.09	21.5	0.9	0.92
IgG <sub>1</sub> Bi	24	176.00	1127.00	649.11	218.49	660.50	0.4	0.09			
IgG <sub>2</sub> Be	24	81.60	330.00	171.60	63.96	162.60	0.3	0.09	18.9	1.1	0.88
IgG <sub>2</sub> Bi	24	93.50	427.90	214.32	82.20	202.25	0.3	0.09			
IgG <sub>3</sub> Be	30	6.30	77.70	34.77	18.62	27.15	0.3	0.09	9.5	1.5	0.95
IgG <sub>3</sub> Bi	30	19.30	121.00	63.40	30.32	52.70	0.9	0.09			
IgG <sub>4</sub> Be	30	6.30	147.50	51.32	33.00	43.25	1.1	0.09	- 16	1.1	0.92
IgG <sub>4</sub> Bi	30	3.80	179.50	43.11	41.40	23.25	2.7	0.09			

Discussione e Conclusioni

Lo studio di raffronto tra le singole sottoclassi evidenzia una discreta correlazione tra i due metodi. L’analisi globale dei dati (n = 216) mostra differenze statisticamente significative sia per IgG<sub>2</sub> che per IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Peraltro non sono stati riscontrati valori patologici con entrambi i reattivi e ciò indica una buona corrispondenza con la clinica, trattandosi di un campione di soggetti sani.



**Presenza di anticorpi anti Golgi in pazienti con epatite cronica attiva HCV correlata in terapia con Interferone**

**I. Brusca\***, R. Sucato\*, P. LiVigni\*, S.M La Chiusa\*, R. Vassallo#, A. D'Angelo#

\*Servizio di Patologia Clinica, # Divisione di Medicina

Ospedale "Buccheri La Ferla" FATEBENEFRAPELLI, Palermo

**Premessa**

Gli anticorpi diretti contro organuli subcellulari possono essere presenti in pazienti con varie malattie reumatiche a carattere sistemico. Gli anticorpi anti Golgi sono stati descritti per la prima volta circa 15 anni fa, ed il loro significato non è ancora completamente chiaro. Oltre che in pazienti affetti da LES ed artrite reumatoide, sono stati descritti transitoriamente in corso di infezioni virali. Alcuni autori ipotizzano che siano un marker precoce di malattia autoimmune. Abbiamo avuto modo di osservare questi autoanticorpi in 4 pazienti affetti da epatopatie croniche HCV correlate. Due di questi pazienti sono seguiti nell'ambulatorio di gastroenterologia del nostro ospedale, e nel nostro studio descriviamo la loro storia clinica.

**Materiali e metodi**

ANA ed anti Golgi sono stati ricercati in Immunofluorescenza indiretta su vetrini di cellule HEP II; ASMA AMA ed anti LKM su vetrini di stomaco, rene e fegato di ratto (INOVA, San Diego California; gli ENA con metodo immunoblot (INNO LIA, Innogenetics Ghent Belgium).

**Storia clinica**

*Caso 1.* Paziente di sesso femminile di anni 47, affetta da epatite cronica attiva HCV correlata. La paziente ANA, AMA ASMA ed anti LKM negativa, intraprende terapia con alpha-2°-Interferon (6 M.U. T.T.W.)+ Ribavirina. Ad inizio terapia il livello delle transaminasi è di 3-4 volte la norma, la viremia oltre il milione di copie. Durante i primi mesi della terapia viene sostituito l'Interferone utilizzato con Interferone leucocitario meglio tollerato. Al decimo mese di terapia, picco di transaminasi che raggiungono livelli di 15-20 volte la norma, contemporaneamente comparsa di ANA 1:320 con pattern granulare, anti ENA negativi, anti Golgi con titolo superiore ad 1:1280. Viene sospesa la terapia, ed effettuati frequenti controlli ematochimici e del quadro anticorpale. Progressivo ritorno alla norma del quadro sierologico in circa due mesi con transaminasi 3-4 volte la norma. Dopo circa tre mesi dalla sospensione della terapia di nuovo ripresa dell'attività citolitica con transaminasi 5-10 volte la norma, ricomparsa dell'anti Golgi fino ad un titolo di 1:320. Negativi ANA ed ENA. Dopo circa due mesi di parallela discesa delle transaminasi e del titolo dell'anti Golgi, enzimi epatici 3-4 volte la norma, anti Golgi negativo. Nessuna significativa variazione della viremia durante il periodo descritto.

*Caso 2.* Paziente maschio di anni 63, affetto da epatite cronica attiva HCV correlata, transaminasi 3-5 volte la norma, ANA 1:80 con pattern "fine speckled", AMA, ASMA, anti LKM ed anti ENA negativi, anti Golgi assenti. Inizio terapia con alpha-2°-Interferon (6 M.U. T.T.W.), mancata risposta, comparsa dopo 6 mesi dell'anti Golgi a titolo 1:320. Livello delle transaminasi sempre 3-5 volte la norma. Viremia non influenzata dalla terapia e sempre oltre il milione di copie. Dopo circa 9 mesi evoluzione in carcinoma epatocellulare primitivo multifocale, sottoposto a terapia embolizzante. Anti Golgi, a distanza di circa un anno, ancora presente.

**Discussione**

I casi clinici presentati, evidenziano la comparsa dell'anti Golgi in seguito alla somministrazione dell'Interferone, in pazienti con mancata risposta al farmaco. Non abbiamo, in altri casi da noi esaminati, riscontrato la comparsa di anti Golgi successivamente alla somministrazione terapeutica di Interferone. Rimane da chiarire il rapporto esistente tra la citolisi epatica e la presenza di questi autoanticorpi, data, soprattutto, la correlazione evidente riscontrata in uno dei due casi, tra entità della citolisi e titolo dell'anti Golgi.

## TECNOLOGIA CON ENZIMA RICOMBINANTE NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLA MALATTIA CELIACA.

Faricelli R., D'Amico V., Rabottini S., Pellicciotta A., Martinotti S.  
Laboratorio Patologia Clinica Ospedale Clinicizzato "SS Annunziata"- Chieti

La malattia celiaca è una intolleranza alimentare permanente al glutine, e in particolare alle gliadine di frumento e alle prolamine di orzo e segale, che si determina in individui geneticamente predisposti. La diagnostica di laboratorio di questa malattia si è avvalsa nel tempo della ricerca degli anticorpi antireticolina (ARA), antigliadina (AGA) di classe IgA e IgG, antiendomisio (EMA) di classe IgA su vari substrati di scimmia o umani. L'identificazione (Dieterich 1997) della transglutaminasi tissutale (tTG) come l'autoantigene riconosciuto dagli EMA ha permesso di fare un notevole passo avanti per chiarire i meccanismi immuno-patogenetici coinvolti nella malattia e per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti celiaci. La tTG, distribuita ubiquitariamente negli organi umani, appartiene alla famiglia di enzimi intracellulari calcio dipendente che catalizzano la formazione di legami isopeptidici fra amminoacidi glutamina (donatore) e lisina (accettore); la gliadina, ricca di glutamina rappresenta uno dei substrati donatori per la tTG. Finora sono stati commercializzati dei kits in immunoenzimatica per il dosaggio degli anticorpi sierici IgA contro la tTG ottenuta da guinea pig. Recentemente varie aziende sono impegnate all'ottimizzazione delle variabili del dosaggio, in particolare l'uso dell'enzima umano ricombinante.

### Scopo del lavoro:

Obiettivo della nostra ricerca è stato quello di valutare le prestazioni analitiche, del nuovo test immunoenzimatico transglutaminasi umana con enzima ricombinante e confrontarle con quelle della trasglutaminasi di guinea pig in uso (DITTA I.P.R.).

### Materiali e Metodi:

Sono stati studiati 320 campioni con entrambi i tests. Per quanto riguarda la tTG sono risultati 51 positivi, 22 dubbi e 247 negativi. Per quanto riguarda la tTG umana sono risultati 20 positivi, 17 dubbi e 283 negativi. Dei 320 pazienti considerati solo a 308 sono stati eseguiti gli EMA, di cui solo 7 sono risultati positivi, 2 dubbi e 298 negativi.

### Risultati:

	tTGguineapig	%	tTGumana	%	EMA	%
Positivi	51	15.9	20	6.2	7	2.3
Dubbi	22	6.9	17	5.3	2	0.7
Negativi	247	77.2	283	88.5	298	97.0
Totale	320	100	320	100	307	100

### Discussione e Conclusione:

Dai risultati ottenuti si conclude che con la nuova metodica tTG umana si ottengono sicuramente meno falsi positivi. Dei 20 campioni tTG umana positivi 7 presentano gli EMA positivi e sono compatibili con una diagnosi di malattia celiaca in atto, 2 sono dubbi ma precedentemente celiaci accertati e da poco a dieta priva di glutine e quindi da monitorare nel tempo. Gli 11 rimasti sono EMA negativi e presentano un'anamnesi positiva per diabete di tipo 1 o per celiachia in trattamento, infatti 9 pazienti sono celiaci in trattamento e 2 appartengono a un gruppo di pazienti sicuramente a rischio che meritano un controllo accurato nel tempo.

L'utilizzo dell'antigene umano dando meno falsi positivi, migliora l'accuratezza del test e può essere usato per una maggiore sorveglianza dei casi a rischio e per il monitoraggio in caso di terapia della malattia celiaca, in quanto gli anti tTG, nella terapia priva di glutine, si negativizzano in seconda istanza rispetto agli EMA favorendo la compliance della terapia.

**IFN- $\gamma$  ed IL-10 NEL FOLLOW-UP DELLE MALATTIE AUTOIMMUNITARIE.**

R. Argento, F. Abenavoli, A. Scuteri, S.A. Longo, M.C. Berlinghieri

Cattedra ed U.O. di Patologia Clinica, DMSC, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi "Magna Græcia" Catanzaro.

*Scopo del Lavoro*

Nell'uomo è stata ampiamente accertata la presenza di sottopopolazioni linfocitarie, definite Th1 e Th2 in base alle citochine da esse prodotte, capaci di svolgere funzioni biologiche diverse. Th1, modulata da IL-2 e da IFN- $\gamma$ , è responsabile dei meccanismi di citotossicità; Th2, la cui attività biologica è modulata da IL-4 e da IL-10 è correlata con la risposta immunitaria umorale. Nel nostro laboratorio ci siamo proposti di valutare il significato biologico, patogenetico e prognostico della variazione dei livelli sierici di alcune citochine nei pazienti affetti da malattie autoimmunitarie.

*Materiali e Metodi*

In questa fase dello studio sono stati arruolati 80 pazienti adulti, con titoli elevati di autoanticorpi dosati con metodiche standard (IFI, Poiesys, Padova), rispettivamente 40 positivi per anti-ANA, anti-dsDNA, anti-ENA, 40 positivi per anti-LKM, anti-ASMA, anti-TPO, anti-TG, tali da suffragare la diagnosi di malattie autoimmunitarie sistemiche o d'organo. In tutti i soggetti sono stati misurati i livelli sierici di IL-10, e di IFN- $\gamma$  con metodiche immunoenzimatiche (Nuclear Laser, Milano) ed utilizzando quali valori di riferimento, ottenuti dalla popolazione di controllo, rispettivamente: 5 pg/ml e 5 pg/ml.

*Risultati*

Nel gruppo dei pazienti con malattie sistemiche 33 avevano valori elevati ad una od entrambe le citochine, nell'altro gruppo di pazienti 39 presentavano la medesima situazione. Dei 26 pazienti con malattie sistemiche, già sottoposti a terapia immunomodulante, 23 avevano valori elevati di IFN- $\gamma$ . Dei 29 pazienti dell'altro gruppo sottoposti a terapia, 23 avevano valori elevati di IFN- $\gamma$ . Nei pazienti non ancora sottoposti a terapia, i livelli di IFN- $\gamma$  erano elevati solo in 3 su 14 nel primo gruppo ed in nessuno su 11 nel secondo gruppo.

*Discussione e Conclusioni*

I dati sperimentali, precedentemente da noi ottenuti, suggeriscono che nelle malattie autoimmunitarie l'alterazione della regolazione citochinica coinvolga inizialmente l'attività biologica della popolazione linfocitaria Th1 e successivamente quella della Th2. Ma mentre in quelle "d'organo" ambedue le popolazioni sono egualmente funzionalmente alterate per tutta la durata della malattia, in quelle "sistemiche" o che tendono a diventarlo, il meccanismo patogenetico è caratterizzato da una più ampia disregolazione della popolazione Th2. I risultati più significativi di questo studio sono:

- la dimostrazione dell'efficacia della terapia immunomodulante nell'indurre e mantenere livelli elevati di IFN- $\gamma$ ;
- la necessità di instaurare terapia immunomodulante adeguata, tale da controllare l'evoluzione "sfavorevole" della malattia autoimmunitaria.

L'algoritmo laboratoristico dei pazienti con malattie autoimmunitarie può, dunque, a nostro avviso comprendere il dosaggio sierico di IL-10 e IFN- $\gamma$  per una migliore definizione della diagnosi e dell'evoluitività della malattia.

## VALUTAZIONE DEL TEST APhL-ELISA PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI

N. Bizzaro <sup>1</sup>, D. Villalta <sup>2</sup>, E. Tonutti <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di San Donà di Piave (VE), <sup>2</sup> Servizio di Immunologia e Microbiologia, Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli, Pordenone, <sup>3</sup> Istituto di Chimica-Clinica, Azienda Ospedaliera S.Maria della Misericordia, Udine.

### *Introduzione*

La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS), primaria e secondaria, è un'entità clinica ben caratterizzata, con notevoli implicazioni di ordine clinico e terapeutico. La presenza di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) è uno dei criteri per la diagnosi di APS e la accurata determinazione del titolo aPL è fondamentale per la scelta della strategia terapeutica più appropriata. Nonostante siano stati fatti molti sforzi per la sua standardizzazione, il test aPL ELISA resta ancora un metodo scarsamente riproducibile soprattutto a causa dei frequenti legami aspecifici che ne riducono la specificità dei risultati. In questo studio abbiamo valutato le performances di un nuovo kit (APhL-ELISA,  $\alpha$ -Wassermann, Milano) che utilizza come substrato antigenico una miscela di cardioplipina e altri 4 fosfolipidi a carica negativa, per la determinazione degli aPL di classe IgG e IgM.

### *Materiali e metodi*

Sono stati studiati 229 sieri ben caratterizzati sia dal punto di vista sierologico che clinico: 26 erano di pazienti con APS, 82 con lupus eritematoso sistemico, 9 con malattia indifferenziata del connettivo, 38 con trombosi venose o arteriose (la maggior parte ricorrenti e in soggetti di età inferiore a 45 anni), 8 con piastrinopenie autoimmuni, 6 con aborto ricorrente e 60 di soggetti sani. I livelli soglia adottati sono stati quelli proposti dal produttore (15 GPL e 15 MPL) e, in assenza di un metodo di riferimento, i valori attesi sono stati stabiliti sulla base dei risultati ottenuti da studi preliminari, nei quali ognuno dei 229 sieri è stato esaminato con altri 3 metodi ELISA e per i quali vi era assoluta concordanza dei risultati.

### *Risultati*

La sensibilità del kit APhL-ELISA per gli aPL IgG, calcolata nei 64 sieri positivi, è stata del 90.0% (intervallo di confidenza al 95%, 82.6-97.3%) e la specificità sui 165 sieri negativi, del 97.6% (95.2-99.9%). Per gli aPL IgM, la sensibilità sui 51 sieri positivi è risultata del 92.2% (84.8-99.5%) e la specificità sui 178 sieri negativi, del 96.6% (93.9-99.2%). Tutti i falsi positivi e i falsi negativi, sia per gli aPL IgG che per gli aPL IgM, erano relativi a sieri con bassa concentrazione anticorpale il cui significato clinico è incerto e comunque non rilevante ai fini del trattamento terapeutico.

### *Conclusioni*

I risultati di questo studio, in cui abbiamo valutato l'accuratezza diagnostica del nuovo kit APhL-ELISA, hanno evidenziato l'ottimo comportamento del test in esame, su una popolazione eterogenea per caratteristiche cliniche e sierologiche. In particolare, questo metodo ha fornito risultati molto buoni per quanto riguarda la specificità, che costituisce il punto di maggior criticità per questo tipo di test diagnostico.

## **CORRELAZIONE TRA SINGOLE SPECIFICITA' AUTOANTICORPALI Ro52 E Ro60 E MANIFESTAZIONI CLINICHE IN UN GRUPPO DI PAZIENTI CON LES SSA/SSB POSITIVO**

G. Paolazzi <sup>b</sup>, D. Bassetti <sup>a</sup>, M. Govoni <sup>c</sup>, P. Caciagli <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Patologia Clinica II: Microbiologia-Immunologia, Ospedale S.Chiera, Trento

<sup>b</sup>Medicina: servizio Reumatologia, Ospedale S.Chiera, Trento

<sup>c</sup>Istituto di Reumatologia, Università degli Studi di Ferrara

### *Scopo del lavoro*

Scopo del presente lavoro è stata la valutazione in un gruppo di pazienti con LES Ro/SSA positivi della possibile suddivisione in diversi subsets clinici in rapporto alle singole specificità autoanticorpali anti-Ro/SSA60kD e/o 52 kD associate o meno alla positività anti-La/SSB.

### *Materiali e metodi*

Sono stati studiati 45 pazienti (41 F e 4 M) con LES, tutti ANA positivi e Ro/SSA e/o La/SSB positivi, rientranti nei criteri ARA 1982 rivisti per la classificazione. L'età media dei pazienti era di anni 48,7 con durata media di malattia di anni 8,3. Le manifestazioni cliniche prese in esame sono state l'impegno cutaneo (fotosensibilità, rash, dermatite orticariode, vasculite, lupus discoide), renale (diagnosticato con biopsia nei pazienti con proteinuria e/o ematuria, cilindruria ed aumento della creatinina), polmonare (diagnosticato con Rx, HRCT, prove spirometriche e DLCO), neurologico periferico e centrale (conferma EMG, EEG, RM, SPECT cerebrale), ematologico ed articolare. In tutti i pazienti è stata effettuata la ricerca delle specificità autoanticorpali Ro52kD, Ro60kD e La48kD mediante metodica Immunoblot con il kit INNO-LIA ANA della ditta Innogenetics. I risultati ottenuti sono stati quindi confrontati con le caratteristiche cliniche sopra elencate, mediante analisi statistica tra i sottogruppi con diverse specificità autoanticorpali, allo scopo di verificare l'eventuale associazione di particolari subsets clinici con le specificità riscontrate.

### *Risultati*

Dei 45 pazienti 10 (22%) reagivano solo con RO/SSA, 35 (78%) sia con Ro/SSA che con La/SSA; anti-Ro52 erano presenti in 7 sieri (16%), anti-Ro52-60 in 3 (7%), anti-Ro60 isolato in 0 pazienti, Ro52 associato La/SSB in 14 (31%), anti-Ro60 con La/SSB in 1, anti-Ro52-60 associati a La/SSB in 20 (44%). Dei sieri positivi per Ro/SSA ben 44 (98%) reagivano quindi con Ro52, da solo (16%) o associato a Ro60 (7%), per la maggior parte solo o con 60kD. La/SSB era associato a Ro52-60 in 34 pazienti (75%).

### *Discussione e Conclusioni*

I diversi patterns autoanticorpali sono stati valutati in comparazione alle singole manifestazioni cliniche: non sono state riscontrate differenze statisticamente significative fra la presenza di Ro52 e/o Ro60 ed i diversi subsets clinici tra le varie classi di età, con ampia sovrapposizione di impegno renale e neurologico. Risultava viceversa importante la presenza o meno di La/SSB nel manifestare impegno cutaneo, sd.Sjogren, interessamento neurologico e renale.

Alla luce di quanto rilevato sembra di poter concludere che nella ricerca di autoanticorpi Ro/SSA è fondamentale l'utilizzo di una metodica in grado di identificare sia la frazione Ro52 che Ro60, viceversa la loro singola identificazione non rivela particolari vantaggi diagnostici o terapeutici, ad eccezione delle pazienti per un'eventuale gravidanza, dove effettivamente l'associazione Ro52 e La/SSB comporta un maggior rischio di blocco atrio-ventricolare fetale.

## ELEVATI LIVELLI DI RECETTORE SOLUBILE Fc $\gamma$ RIIIb COME INDICE DI ACCELERATA APOPTOSI IN SOGGETTI CON NEUTROPENIA CRONICA AUTOIMMUNE

N. Bizzaro e F. Fiorin

Laboratorio di Patologia Clinica e Servizio Immunotrasfusionale, Ospedale Civile di S. Donà di Piave (VE)

### *Introduzione*

I neutrofili umani esprimono nella membrana citoplasmatica, due diversi recettori a bassa affinità per le IgG, l'Fc $\gamma$ RII e l'Fc $\gamma$ RIII; quest'ultimo nella sua forma isofenotipica b (Fc $\gamma$ RIIIb) è presente esclusivamente nei neutrofili e corrisponde al sistema antigenico neutrofilo-specifico HNA-1 (NA<sub>1</sub>/NA<sub>2</sub>). Esiste anche una forma solubile di Fc $\gamma$ RIIIb, la cui concentrazione plasmatica è un indice accurato della massa totale di neutrofili. I livelli plasmatici di Fc $\gamma$ RIIIb riflettono il turn over dei neutrofili nei tessuti, mentre la produzione midollare o la loro mobilizzazione dal compartimento marginato periferico, non ne influenzano la quantità plasmatica. Inoltre, ad una diminuzione dei neutrofili circolanti non fa seguito un contestuale aumento dei livelli plasmatici di Fc $\gamma$ RIIIb, mentre tali livelli aumentano significativamente in presenza di apoptosi.

### *Materiali e metodi*

Sono stati studiati due pazienti, entrambi di sesso maschile (8 e 2 anni), cugini di primo grado, che presentavano dalla nascita una neutropenia assoluta con un numero di neutrofili variabile tra 200 e 500 x10<sup>9</sup>/L. L'esame citologico del midollo emopoietico effettuato in più occasioni, ha sempre evidenziato in entrambi i casi un marcata iperplasia con normale maturazione di tutti gli elementi della linea granulocitaria. Il fenotipo antigenico HNA-1 e la ricerca di anticorpi anti-neutrofili sono stati determinati con metodo immunocitofluorimetrico, utilizzando anticorpi monoclonali con specificità anti-NA<sub>1</sub> (CLBgran11) e anti-NA<sub>2</sub> (GRM1). La tipizzazione delle popolazioni linfocitarie è stata eseguita con metodo citofluorimetrico standard. Il dosaggio del Fc $\gamma$ RIIIb solubile è stato effettuato con metodo ELISA-sandwich, impiegando anticorpi monoclonali anti-pan-Fc $\gamma$ RIII (CLBcFRgran1, per gentile concessione di M. de Haas, CLB, Amsterdam, Olanda) e sistema di rilevazione avidina-biotina.

### *Risultati*

Ambedue i pazienti sono risultati positivi per la presenza di autoanticorpi anti-NA<sub>2</sub>. In entrambi la tipizzazione degli antigeni-neutrofilo specifici ha evidenziato un fenotipo omozigote NA<sub>2</sub>/NA<sub>2</sub>, confermando la natura autoimmune della neutropenia. La concentrazione plasmatica di Fc $\gamma$ RIIIb solubile è risultata molto elevata, pari a 430 unità nel primo paziente e a 235 nel secondo (int.rif. 30-120). La tipizzazione linfocitaria ha dimostrato in entrambi i casi una ridottissimo numero di cellule B (1%, 12-13 cellule x10<sup>9</sup>/L), assenza di cellule B CD5+, e una netta prevalenza di cellule T CD8+ con inversione del rapporto CD4/CD8.

### *Conclusioni*

Questo studio ha messo in evidenza che elevati livelli di Fc $\gamma$ RIIIb solubile sono presenti in soggetti con neutropenia cronica autoimmune. Poiché normali o bassi livelli di Fc $\gamma$ RIIIb solubile si riscontrano sia in soggetti con neutropenia cronica idiopatica a midollo povero, sia in soggetti con iperplasia granuloblastica midollare e, viceversa, elevate concentrazioni vengono prodotte da cellule apoptotiche in vitro, è verosimile che nelle neutropenie croniche di natura autoimmune vi sia un'aumentata attività apoptotica anticorpo-mediata. A sostegno di questa ipotesi vi è un'unica segnalazione di 2 pazienti affetti da LES con neutropenia periferica (anticorpi anti-neutrofili non sono stati ricercati), che presentavano elevati livelli di Fc $\gamma$ RIIIb solubile. La determinazione del recettore solubile del Fc $\gamma$ RIIIb potrebbe pertanto essere utilizzata per la diagnosi delle neutropenie autoimmuni e nella diagnosi differenziale delle neutropenie croniche.

**STUDIO MULTICENTRICO ABRUZZESE SULLA DIAGNOSTICA DEL MORBO CELIACO**

F Balucanti<sup>1</sup>, M Golato<sup>2</sup>, N Colanero<sup>2</sup>, L Talone<sup>2</sup>, R De Marinis<sup>2</sup>, D Marino<sup>2</sup>, P Frascaria<sup>3</sup>, S Colangeli<sup>3</sup>, E Tucci<sup>4</sup>, A Spanò<sup>5</sup>

1) Dipartimento Servizi Diagnostici, P. O. Sulmona (L'Aquila); 2) Patologia Clinica, P. O. "Renzetti", Lanciano (Chieti); 3) Patologia Clinica, P. O. Coppito, L'Aquila; 4) Patologia Clinica, P. O. "G. Bernabeo" Ortona (Chieti); 5) P. O., "S. Salvatore", Atri (Teramo).

**OBIETTIVO** Studio dell'incidenza del morbo celiaco nella popolazione afferente in diversi Laboratori abruzzesi in pazienti con disturbi gastrointestinali e con sintomi suggestivi di MC e predittività dei tests utilizzati rispetto alla biopsia.

**OSPEDALI PARTECIPANTI:** Atri, Lanciano, L'Aquila, Ortona, Sulmona

**MATERIALI E METODI** Sono stati oggetto di studio n. 4882 pazienti, adulti e pediatrici, nel periodo compreso tra Gennaio 1999 a tutt'oggi. La casistica di celiaci proveniente dall'Ospedale di Sulmona comprende pazienti già clinicamente selezionati che vi affluiscono da tutta la Regione per la presenza in detto ospedale di un Centro per lo studio della Celiachia:

- Nei Laboratori di Sulmona, L'Aquila, Atri, Ortona è stato applicato il seguente protocollo diagnostico:

**AGA IgA e IgG** (Anticorpi anti-gliadina)

**EMA IgA** (Anticorpi anti-endomisio)

**tTG IgA** (Anticorpi anti-transglutaminasi)

**IgA totali sieriche** (per valutare eventuale deficit)

- Nell'Ospedale di Lanciano il seguente protocollo

(fino alla fine del 1999)

**AGA IgA e IgG**

**EMA IgA**

**IgA totali sieriche**

Dal 2000, dopo aver affiancato per 3 mesi le due metodiche, stato applicato 2° protocollo

**IgA totali sieriche**

**tTG IgA**

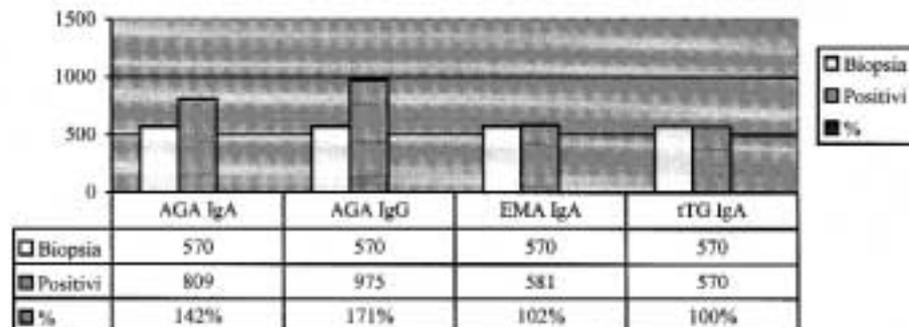
→ se positivo → **EMA PER CONFERMA**

→ se negativo → **NON ULTERIORE INDAGINE**

**I METODI UTILIZZATI** sono stati: **AGA IgA e IgG:** ELISA test quantitativo; **EMA IgA:** IFA su 3° inferiore di esofago di scimmia; **tTG IgA:** ELISA test quantitativo

**RISULTATI** I risultati ottenuti sono esposti nella tabella A. Da questi si evince che su 4882 casi testati, è stata formulata la diagnosi di MC, secondo le raccomandazioni dell'ESPGAN, in 572 pazienti.

**CONCLUSIONI** La predittività diagnostica, nei casi positivi per MC, dei tests utilizzati rispetto alla biopsia è esposta nella seguente tabella ed ha confermato l'eccellente correlazione di EMA IgA e tTG IgA rispetto ad AGA IgA ed AGA IgG.



## ANTICORPI ANTI-TRANSGLUTAMINASI: IL TEST CON ANTIGENE RICOMBINANTE UMANO E' SUPERIORE A QUELLO CHE UTILIZZA ANTIGENE ESTRATTIVO DI GUINEA PIG

E. Tonutti<sup>a</sup>, D. Visentini<sup>a</sup>, N. Bizzaro<sup>b</sup>, D. Villalta<sup>c</sup>, M. Caradonna<sup>d</sup>, L. Cerni<sup>d</sup> e il Gruppo di Studio Italo-Francese per lo Studio della Malattia Celiaca.

<sup>a</sup>Laboratorio Analisi Cliniche, Ospedale di Udine, <sup>b</sup>Laboratorio Analisi Cliniche Ospedale di S. Donà (VE), <sup>c</sup>Servizio di Immunologia e Microbiologia Ospedale di Pordenone, <sup>d</sup>Eurospital Trieste.

### *Scopo del lavoro*

L'introduzione dei test ELISA per la ricerca di anticorpi anti-transglutaminasi (a-tTG) IgA ha affinato le potenzialità diagnostiche per il morbo celiaco. Obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare le performance diagnostiche dei test EIA con antigene ricombinante umano e quelli con antigene estrattivo di guinea pig su un gruppo selezionato di sieri. I risultati dei test EIA sono stati comparati con la determinazione degli anticorpi anti-endomisio (EMA) IgA e con i dati clinici.

### *Pazienti e metodi*

73 Laboratori Italiani e Francesi hanno eseguito la determinazione di a-tTG IgA con antigene estrattivo da guinea pig (a-tTGgp) (Eu-tTG IgA, Eurospital, Trieste) e la ricerca degli EMA IgA con la metodica dell'immunofluorescenza indiretta (IFI) su 7.948 sieri; di questi, 598 sieri sono stati inviati in un laboratorio di riferimento per la determinazione degli a-tTG con il test che utilizza antigene ricombinante umano (a-tTG<sub>r</sub>) (Eu-tTG humana IgA, Eurospital) e la rideterminazione di EMA IgA in IFI su terzo inferiore di esofago di scimmia (Antiendomysium, Eurospital). I 598 sieri avevano le seguenti caratteristiche sierologiche:

- 300 erano EMA e a-tTGgp concordanti negativi
- 100 erano EMA e a-tTGgp concordanti positivi
- 162 erano EMA negativi e a-tTGgp positivi
- 36 erano EMA positivi e a-tTGgp negativi

### *Risultati*

Nessuno dei 300 sieri concordanti negativi è risultato positivo per EMA IgA e a-tTG<sub>r</sub> IgA. Tutti i 100 sieri concordanti positivi sono stati confermati positivi per EMA IgA e a-tTG<sub>r</sub>.

Dei 162 sieri a-tTGgp positivi ed EMA negativi solo 49 sono risultati positivi con a-tTG<sub>r</sub> e di questi 49 ben 39 erano positivi per EMA; 21 dei 113 sieri negativi per a-tTG<sub>r</sub> erano di soggetti biopsiati e nessuno di questi era risultato celiaco; dei 39 soggetti positivi per EMA e a-tTG<sub>r</sub> 28 erano di soggetti celiaci mentre 11 non erano stati biopsiati, dei 10 sieri IgA a-tTG<sub>r</sub> positivi ed EMA negativi 7 erano di soggetti celiaci mentre 3 non erano stati biopsiati.

Dei 36 sieri EMA positivi e a-tTGgp negativi, 34 sono risultati in realtà EMA negativi mentre solo 2 sono stati confermati EMA positivi; 35 sieri su 36 sono risultati a-tTG<sub>r</sub> negativi mentre 1 siero (confermato positivo anche agli EMA) era positivo ad alto titolo per a-tTG<sub>r</sub>; i 36 sieri di questo gruppo appartenevano a: 3 soggetti con diagnosi di celiachia non trattata, 4 celiaci in dieta, 8 biopsiati non celiaci, 21 non biopsiati.

### *Discussione e Conclusioni*

Il test per la ricerca di a-tTG<sub>r</sub> è più specifico di a-tTGgp in quanto correla in maniera ottimale sia con gli EMA che con i dati clinico-biopsici. Il laboratorio che utilizza un test per a-tTG con antigene estrattivo deve sospettare una falsa positività in presenza di una positività per a-tTG e negatività per EMA. D'altra parte il test la ricerca degli EMA si è confermato di non facile interpretazione in quanto alcuni laboratori non identificano la presenza di questi anticorpi e viceversa in alcuni casi forniscono risultati positivi in assenza di EMA. L'utilizzo dei test ELISA con antigene ricombinante permetterà ai laboratori clinici di affinare le potenzialità diagnostiche per la malattia celiaca.

## **ASSOCIAZIONE DEI DOSAGGI ASCA E p-ANCA NELLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE DELL'INTESTINO.**

**Masier M.G., Arona P., Goggi F., Cacciabue A., Ponzetta C., Tropiano A.**  
**Laboratorio analisi chimico-cliniche e microbiologiche ASL 20 TORTONA.**

### SCOPO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'applicabilità e l'utilità della determinazione combinata dei p-ANCA (dosaggio MPO) e degli ASCA ai fini della diagnosi delle malattie infiammatorie intestinali (IBD).

### MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 30 pazienti (20 uomini e 10 donne) di età compresa tra i 15 e i 50 anni, afferenti al laboratorio analisi della ASL 20 di Tortona nel periodo compreso tra novembre 2000 e gennaio 2001, con indicato nella richiesta il sospetto di IBD. Su tutti i sieri è stata eseguita la ricerca dei p-ANCA (dosaggio MPO con tecnica ELISA) e la ricerca degli ASCA (IgA e IgG con tecnica ELISA della Ditta INOVA-MENARINI). Dei 30 pazienti esaminati : 2 soggetti sono affetti da Morbo di Crohn (già diagnosticato in altra sede), 2 soggetti (femmine) da Morbo Celiaco (sintomatologia tipica e biopsia positiva), 8 soggetti affetti da RCU, 18 soggetti sono stati considerati non affetti da IBD (sintomatologia atipica).

### RISULTATI

I p-ANCA sono risultati positivi in 4 pazienti affetti da RCU e in due pazienti con morbo di Crohn. Gli ASCA (solo le IgG) sono risultati positivi in 2 pazienti con Crohn e non in quelli affetti da Rettocolite ulcerosa. Nei 2 pazienti con Celiachia gli ASCA (IgA e IgG) erano negativi, mentre i p-ANCA erano positivi in un solo paziente. Negli 8 pazienti affetti da RCU: 4 avevano p-ANCA negativi ed ASCA negativi, 4 avevano p-ANCA positivi ed ASCA negativi. I rimanenti 18 soggetti presentavano p-ANCA negativi ed ASCA negativi, quindi sono stati giudicati sani.

### CONCLUSIONI

La determinazione degli ASCA (IgA e IgG) affiancata a quella dei p-ANCA anche nel nostro laboratorio, nonostante la ridotta casistica, si è dimostrata utile nello screening diagnostico del morbo di Crohn e della colite ulcerosa. I risultati ottenuti confermano i dati della letteratura, poiché solo nei pazienti con morbo di Crohn gli ASCA sono risultati positivi; inoltre il test ASCA non ha dato falsi positivi nei soggetti giudicati sani. Pertanto tale test è stato inserito nella routine diagnostica delle IBD e viene sempre eseguito insieme al dosaggio dei p-ANCA.

### BIBLIOGRAFIA

Eziopatogenesi e terapia medica delle malattie infiammatorie intestinali (morbo di Crohn, colite ulcerosa) : presente e futuro.

Di Gianpaolo Cresci, U.O. di gastroenterologia di Pisa.

Diagnostic Accuracy of Anti-Saccharomyces Cerevisiae Mannon Antibodies in Inflammatory Bowel Disease.

F. Costa, M.G. Mugolo, M. Bellini, M.R. Romano, L. Lambresa, A. Roamno, M. Vanghetti, F. Cristiani, G. Maltini, S. Marchi.

Gastrointestinal Unit-Depert. Internal Medicine, Pisa University, Pisa Italy.

## SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ASCA) NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI.

C.Bonaguri, A. Russo, M.Ferrari, R.Perini, E.Roncari, L. Del Bono, C.Monica

Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio- Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma

### *Scopo del lavoro*

Una diagnosi corretta delle malattie croniche intestinali in grado di differenziare chiaramente e precocemente la malattia di Crohn (CD) dalla colite ulcerosa (UC) risulta di estrema utilità per ottimizzare le scelte terapeutiche e la prognosi. Scopo del lavoro è valutare l'accuratezza diagnostica degli Anticorpi anti-Saccharomyces Cerevisiae (ASCA) nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD).

### *Materiali e metodi*

Sono stati al momento valutati per ASCA 60 pazienti affetti da IBD; per 38 di essi è stato possibile reperire informazioni diagnostiche complete sulla base delle quali i pazienti sono stati suddivisi nei seguenti gruppi: Malattia di Crohn (18), Colite ulcerosa (13), Colite Indeterminata IC (7). Il dosaggio degli ASCA è stato realizzato utilizzando un Kit MEDIPAN distribuito dalla Ditta Alifax; gli ASCA IgA sono stati valutati quantitativamente (UI/mL) mentre gli ASCA IgG come valori positivi/negativi. Su un sub-set di pazienti con diagnosi certa (17) sono stati valutati anche i p-ANCA in immunofluorescenza.

### *Risultati*

	ASCA IgA Valori medi ( $\pm$ D.S.)	% POSITIVITA' ASCA IgA e/o ASCA IgG
CD (18)	39.9 ( $\pm$ 4.1)	73
UC (13)	10.3 ( $\pm$ 1.2)	9
IC (7)	10.7 ( $\pm$ 2.1)	14

### *Discussione e conclusioni*

In tabella è riportata un'analisi preliminare dei dati dalla quale è possibile evidenziare come i livelli medi di ASCA IgA appaiono nettamente più elevati nei pazienti affetti da MC ( $39.9 \pm 4.1$ ) rispetto a quelli affetti da CU ( $10.3 \pm 1.2$ ) e a quelli con diagnosi di IC ( $10.7 \pm 2.1$ ). Lo stesso andamento seguono le percentuali di positività ASCA IgG e/o IgA. Ci riserviamo di valutare il livello di significatività delle differenze osservate sull'intera casistica. Inoltre, dati preliminari relativi al test p-ANCA sembrano mostrare un'associazione più stretta di questi autoanticorpi con la CU (3 positivi su 7 = 42%) rispetto alla IC (1 positivo su 5 = 20%) e rispetto al MC (0 positivi su 5 = %) confermando i dati di letteratura circa un loro utilizzo per una diagnosi differenziale MC/CU o per un'identificazione di sub-set di pazienti (Rutgers P., Vermeire S., Lancet 2000 vol.356).

### Valore diagnostico degli anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae ed anti citoplasma dei neutrofili nelle malattie infiammatorie croniche intestinali

I. Brusca\*, P. LiVigni\*, R. Sucato\*, S.M. La Chiusa\*, L. Montalbano#, R. Vassallo#, F. Cartabellotta#, A. D'Angelo#

\*Servizio di Patologia Clinica, # Divisione di Medicina  
Ospedale "Buccheri La Ferla" FATEBENEFRAELLI, Palermo

#### Scopo del lavoro

La ricerca degli anticorpi *anti citoplasma dei Neutrofili (pANCA)* ed *anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA)*, ha recentemente assunto importanza nella valutazione diagnostica rispettivamente della Rettocolite Ulcerosa (UC) e del Morbo di Crohn (CD). Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare l'accuratezza diagnostica di un metodo ELISA per la ricerca degli ASCA, di verificare il valore predittivo di ASCA ed ANCA nei riguardi della UC e del CD; di valutare la presenza degli ASCA nei componenti di nuclei familiari in cui era stato evidenziato più di un caso di CD.

#### Materiali e metodi

Sono stati valutati 151 sieri provenienti da: 75 pazienti consecutivi affetti rispettivamente da, CD (n.= 31), UC (n.=17), Colon irritabile (CI) (n.=12), Celiachia (MC) (n.=15); 41 sieri da donatori sani la cui età media e distribuzione per sesso era omogenea con la popolazione ammalata; in 28 conviventi apparentemente sani consanguinei di primo grado, ed in 7 conviventi apparentemente sani non consanguinei provenienti da 7 famiglie in cui si era verificato più di un caso di CD. Su questi pazienti, oltre ai dati clinici, sono stati ricercati gli ASCA di classe IgG, e di classe IgA con metodo ELISA (INOVA, San Diego California), e gli ANCA in Immunofluorescenza indiretta su vetrini fissati con etanolo e formalina (INOVA, San Diego California). Sui pazienti affetti da patologie intestinali è stato effettuato esame endoscopico e biopsia. L'analisi statistica, con le curve ROC, è stata eseguita tramite il programma Analyse-it

#### Risultati

Il valore di cut-off calcolato è stato pari a 19 UI, con una sensibilità di 87,1% (95% CI 71.34-100) ed una specificità di 80.65% (95% CI 66.06-95.24). Infatti sono risultati ASCA+ 27/31 pazienti con CD, 3/17 con UC, 1/12 con CI, 2/15 con MC, 0/41 nella popolazione sana. Il valore predittivo positivo (VPP) e il valore predittivo negativo (VPN) degli ASCA+, sono risultati rispettivamente di 81.82% e 95.29%. L'indice di Youden è stato pari a 0.68. Sono inoltre risultati ASCA positivi 8/28 familiari apparentemente sani non consanguinei pari al 28.57% (95% CI 18.18-38.96), e nessuno dei conviventi non consanguinei. Per quanto riguarda i pANCA essi sono stati riscontrati in 3 dei pazienti con CD, in 9 dei pazienti con UC ed in nessuno dei sieri provenienti da pazienti con CI, MC e nella popolazione sana. La sensibilità dei pANCA nei riguardi delle UC è stata quindi pari al 52.94% (95% CI 43.4-62.48), i VPP e VPN degli ANCA+ sono risultati rispettivamente 75% e 91.30%. Non è stata valutata la specificità dei pANCA in quanto notoriamente presenti in altre patologie non incluse nello studio.

#### Conclusioni

L'analisi dei dati ci ha confermato l'importanza della ricerca degli ASCA e degli ANCA nella diagnostica delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino. I dati ottenuti sui familiari con CD suggeriscono che fattori genetici e non ambientali siano coinvolti nella induzione di questi anticorpi.

### EIA IgG e Fissazione del Complemento: due metodiche a confronto per la ricerca di anticorpi anti-*Helicobacter pylori*

- \* Salvemini G., D'Alonzo A., Di Carlo M., Ricci F.
- \*\* Faricelli R., D'Amico V., Rabottini S., Martinotti S.
- \* Clinica delle Malattie Infettive Università "G. D'Annunzio" - Chieti
- \*\* Laboratorio Patologia Clinica Ospedale Clinicizzato "SS Annunziata" - Chieti

#### Scopo del lavoro:

Scopo del nostro lavoro è stato lo studio comparativo di due metodiche per la ricerca di anticorpi anti *Helicobacter pylori* (HP).

#### Materiali e Metodi:

Sono stati studiati 104 pazienti afferenti per diverse patologie alla Clinica delle Malattie Infettive dell'Università "G.D'Annunzio" di Chieti. 62 pazienti presentavano una sintomatologia caratterizzata da dispepsia e/o epigastralgia.

Per lo studio degli anticorpi anti -HP sono state usate due metodiche: metodo EIA Immunoenzimatico IgG (EUROGENETICS) e metodo di Fissazione del Complemento (SERAMAT DIESSE).

#### Risultati:

##### Pazienti Asintomatici

	F.C.	E.I.A.
24	NEG	NEG
18	NEG	POS

##### Pazienti con Sintomatologia

	F.C.	E.I.A.
12	1/8	NEG
9	1/8	POS
5	1/16	POS
22	1/32	POS
6	1/64	POS
3	1/128	POS
3	1/256	POS
2	1/512	POS

	SENS	SPEC
F.C.	100%	100%
E.I.A.	80%	57%

#### Discussione e conclusione:

L'analisi dei risultati ha mostrato un alto indice di sensibilità ( 100% ) e di specificità (100%) di F.C. rispetto al metodo E.I.A.( 80% e 57% rispettivamente). La negatività con il metodo F.C. è stata accertata da altri test diagnostici non invasivi.

Per titoli di F.C. > 1/16 vi è corrispondenza anche degli E.I.A.. Questi valori sono stati confermati con test invasivi e non.

In 12 pazienti con titoli 1/8 la positività del test è stata convalidata da altri test non invasivi.

I risultati mostrano una attendibilità della metodica F.C. e una grande affidabilità dovuta al fatto che questo metodo rileva anche un pool di IgM e, quindi, risulterebbe utile nel monitoraggio dell'eradicazione dell'H.P..

## REFLUSSO VESCICO-URETERALE E INDICI DI FLOGOSI

S. Mangraviti<sup>a</sup>, A. Di Stefano<sup>b</sup>, M. Filippetti<sup>a</sup>, C. Gallo<sup>a</sup>, E. Bonioli<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio Centrale di Analisi Chimico – Cliniche e Microbiologia. IRCCS “G. Gaslini”.

<sup>b</sup>I Clinica Pediatrica. Dipartimento di Pediatria. Università degli Studi di Genova. IRCCS “G. Gaslini”.

### Scopo del lavoro.

Lo scopo del lavoro è stato quello di analizzare il comportamento di alcuni indici di flogosi nei bambini con reflusso vescico-ureterale ( RVU ) per valutarne l’eventuale significato predittivo di nefropatia.

### Materiali e Metodi.

Si è effettuata un’analisi retrospettiva su 138 determinazioni plasmatiche di Procalcitonina ( PCT ), Proteina C reattiva ( PCR ) e Fibronectina ( Fn ) effettuate all’ingresso su un campione di 64 bambini ( 21 F e 43 M di età compresa tra 1 mese e 9 anni ) affetti da RVU. All’esordio 9 pazienti avevano presentato un quadro di pielonefrite con RVU, infezione delle vie urinarie ed aumento della PCR.

Riportiamo i valori di riferimento e i metodi utilizzati. PCT: < 0.2 ng/mL ( Immunoluminometria con Lumat LB 9507 Berthold ), PCR: < 0.46 mg/dL ( Immunoturbidimetria con Integra Roche ), Fn: 17 – 31 mg/dL ( Nefelometria con BNA Plus Behring ).

### Risultati

Lo studio è stato realizzato mediante un’analisi globale ( n = 138 ) e specifica dei singoli analiti, cioè PCT ( n = 64 ), PCR ( n = 64 ) e Fn ( n = 10 ) mediante statistiche elementari, test t di Student, test di Wilcoxon, regressione lineare non parametrica e regressione lineare di Passing-Bablok, senza evidenziare alcuna significatività.

Invece, valutando i dosaggi di PCT secondo i valori strumentali del segnale luminescente o “relative light unit” ( RLU ), sono emerse evidenze estremamente interessanti sui 9 soggetti con pregressa pielonefrite. Infatti, con range utile di lettura tra 111 e 521 RLU e cut-off di 293 RLU pari a 0.2 ng/mL di PCT, le frequenze percentuali di positività, analizzate mediante il test del  $\chi^2$  hanno evidenziato  $p < 0,05$ . Con lo stesso test PCR forniva  $p < 0,01$ .

Fn, dosata soltanto in alcuni pielonefritici, era francamente patologica con valori fino a 45 mg/dL.

### Discussione e Conclusioni

I valori di PCT sono risultati significativamente a favore di una possibile utilità come indice flogistico precoce nei bambini con reflusso vescico-ureterale con potenziale significato predittivo rispetto alla coesistenza di pielonefrite (  $p < 0,05$  ).

E’ comunque evidente che, ad oggi, la PCR rimane il parametro più significativo, non solo per l’evidenza statistica (  $p < 0,01$  ) ma, soprattutto, perchè associa al precoce aumento un evidente significato prognostico.

Questi dati preliminari, suggestivi per un utile impiego anche di PCT e Fn, impongono ulteriori studi e suggeriscono l’impostazione di una rigorosa indagine prospettica che permetta di meglio evidenziare il marker cui ascrivere significato predittivo e prognostico nel RVU.

## INFEZIONI RESPIRATORIE DA CHLAMYDIA PNEUMONIAE: ANALISI SIEROLOGICA

*Silvana ORRO      Elisabetta RAMO*

Laboratorio analisi – Ospedale “BINAGHI” – CAGLIARI.

### *Scopo del lavoro*

Quest'indagine valuta la sieroprevalenza di CHLAMYDIA PNEUMONIAE in pazienti ricoverati presso le divisioni di pneumologia del nostro ospedale nel periodo compreso fra 01 gennaio 1999 e 31 dicembre 1999.

### *Materiali e metodi*

I pazienti esaminati sono stati 153. Tutti presentavano affezioni a carico delle alte e basse vie respiratorie, talvolta associate ad altre patologie di tipo cronico (cardiopatie, artrite reumatoide etc.). I pazienti sono stati suddivisi per tipo di patologia respiratoria ed è stata valutata la reattività per anticorpi IgG e IgM diretti contro la chlamydia pneumoniae. È stato utilizzato il test “ELISA” Cp – test (Eurospital – Trieste). Tale test si basa su un antigene naturale estrattivo proveniente da corpi elementari del ceppo TW – 183 e ci assicura un'ottima specificità antigenica necessaria vista l'elevata cross-reattività antigenica tra le singole specie di chlamydia pneumoniae.

### *Risultati*

La ricerca ha evidenziato quanto segue:

- a) dieci casi con sierologia IgG- IgM+ (infezione primaria in atto);
- b) undici casi con IgG+ IgM+ (infezione primaria in atto ma in uno stadio più avanzato rispetto al punto a);
- c) cinquanta casi con IgG+ IgM- (infezione pregressa oppure reinfezione in atto).

La seguente tabella riporta la percentuale delle varie affezioni riferite alle diverse positività anticorpali

<b>PATOLOGIE</b>	<b>IgM+ IgG-</b>	<b>IgM+ IgG+</b>	<b>IgM- IgG+</b>
POLMONITI	60	63.6	56
Bronchiti acute e/o croniche	10	18.2	22
Tumori Apparato Respiratorio	10	9.1	8
Tbc Polmonare	10	9.1	4
Patologie respiratorie associate ad altre patologie	10	0	10

### *Conclusioni*

Questo studio conferma l'elevata importanza della chlamydia pneumoniae quale agente etiologico di affezioni dell'apparato respiratorio. Infatti la percentuale di positività per IgM, quale indicatore di affezione primaria in atto, è del 13.07. Tale dato conferma le più recenti acquisizioni a livello internazionale.

Inoltre l'elevata percentuale di pazienti IgG+ IgM- nelle varie patologie respiratorie dimostra che chlamydia pneumoniae può essere diretta responsabile di reinfezioni o può esserne concausa.

## GLI ANTICORPI ASCA E ANCA NELLE PATOLOGIE INFIAMMATORIE INTESTINALI: LA NOSTRA ESPERIENZA

L.Giargia, M.M.Ciriello, T.Callegari, C.Arfini

Laboratorio di analisi chimico-cliniche ed ematologiche, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "ss. Antonio e Biagio e C. Arrigo" di Alessandria

### SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato di determinare se, nella nostra realtà, il dosaggio degli anticorpi ANCA e ASCA può essere utile per la diagnosi delle malattie infiammatorie dell'intestino (IBD).

### MATERIALE E METODI

Lo studio è stato eseguito su 245 sieri di persone afferenti nel nostro laboratorio nel periodo luglio 2000- giugno 2001. Questo gruppo comprende 177 soggetti affetti da patologia e 68 soggetti sani (SS). I soggetti malati sono così suddivisi per patologia: 78 con morbo di Crohn (MC), 52 con colite ulcerosa (CU), 37 con altre malattie infiammatorie intestinali (ALTRE), 10 soggetti sospetti celiaci (GLU).

Su entrambi i gruppi sono stati eseguiti il dosaggio degli ASCA e dei p-ANCA atipici o x-ANCA. Gli ASCA sono stati cercati con un metodo immunoenzimatico (Menarini) dosando entrambe le classi IgA e IgG. I p-ANCA sono stati cercati con metodo di immunofluorescenza indiretta (Menarini).

### RISULTATI

Noi abbiamo trovato gli anticorpi anti-ASCA nel 74,4% dei MC (58/78), nell'9,6% delle CU (5/52), nel 8,1% di ALTRE (3/37) e nel 10% di GLU (1/10). Abbiamo trovato positivi i p-ANCA nel 10,2% di MC (8/78), nel 55,8% (29/52) di CU, nel 5,4 (2/37)% di ALTRE e nessun caso tra i celiaci (GLU). Nessun positivo è stato trovato nel gruppo dei soggetti sani. Nella tabella seguente presentiamo i nostri dati di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo.

test	Sensibilità	Specificità	PPV	NPV
ASCA +	74,4%	94,6%	86,8 %	88,8 %
p-ANCA +	55,8 %	94,8 %	74,4 %	88,8 %
ASCA+ / p-ANCA-	69,2 %	92,2 %	80,6 %	86,5 %
ASCA- /p-ANCA +	51,9 %	93,8 %	69,2 %	87,9 %

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli alti valori di specificità trovati per entrambi questi markers ci fa credere che siano molto utili per la diagnosi differenziale tra MC e CU, per quanto non utilizzabili come test di screening su una popolazione con sintomi generici di IBD. Noi abbiamo riscontrato che pazienti affetti da MC in fase attiva e decorso complicato (fibrosi, stenosi, fistolizzazione e localizzazione ileale) presentavano i titoli ASCA più elevati (sia IgA che IgG). Ci proponiamo di studiare in maniera prospettica i casi positivi per ASCA nella popolazione con "coliti indeterminate".

### BIBLIOGRAFIA

Vermeire S., et al. "Comparative study of ASCA assays in IBD", Gastroenterology 2001 Mar; 120(4):827-33

Peeters M., et al. "Diagnostic value of ASCA and ANCA in IBD", Am J Gastroenterol 2001 Mar; 96(3):730-4