

BACKGROUND: la ricerca degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) è di fondamentale importanza per la diagnosi delle VAA. Negli ultimi anni le richieste di ANCA sono notevolmente aumentate e si sono rese disponibili nuove tecnologie e metodi analitici in grado di supportare strategie diagnostiche più efficaci.

SCOPO DEL LAVORO: questa indagine è parte di un progetto approvato dall' "European Autoimmunity Standardisation Initiative" (E.A.S.I., www.easi-network.com), con il supporto finanziario di Phadia-ThermoFisher Italia, finalizzato a "fotografare" e confrontare la pratica quotidiana nei diversi Paesi Europei.

METODI:

- ❖ questionario con 59 domande a risposta multipla inviato a 300 laboratori italiani, successivamente ad una *mail* di presentazione del progetto contenente il *link* per la compilazione *online del* sondaggio
- ❖ 145 questionari restituiti (48.3%) di cui 112 validati e valutati statisticamente mediante software Survey Monkey (www.surveymonkey.com).

RISULTATI PRELIMINARI: la percentuale di partecipazione al sondaggio è probabilmente sottostimata poiché, a causa dei processi di consolidamento dei laboratori, e in particolare dei settori specialistici quale quello per la diagnostica dell'autoimmunità, è stato particolarmente difficile costruire un elenco aggiornato dei Centri che attualmente effettuano queste indagini.

La maggior parte dei laboratori partecipanti alla *survey* appartiene al settore pubblico, strutture certificate di dimensioni medio/grandi (58% > 1.000.000 test/anno).

L'Autoimmunità è solo raramente indipendente o parte dell'Immunologia Clinica (9%), più spesso è un settore di Patologia Clinica (53%), Biochimica (24%) o Microbiologia (7%).

Biologi (54%) e Medici (46%) condividono la responsabilità della diagnostica di laboratorio delle vasculiti.



Fig. 1: test autoimmunità/anno

Tab. 1: richieste ANCA/settimana

Richieste ANCA/settimana	%
< 5	13,8%
5 – 15	39,4%
15 – 30	22,0%
30 – 50	15,6%
> 50	9,2%

Test ANCA: gli ANCA sono ricercati in IFI su granulociti/leucociti fissati in Et-OH in $\approx 75\%$ dei centri, generalmente seguiti dalla conferma della specificità antigenica mediante *test* immunometrici per anti-MPO e anti-PR3. Anticorpi diretti verso altre specificità antigeniche sono raramente cercati (5%), soprattutto a scopo di ricerca.

La determinazione degli ANCA viene eseguita in tutti i laboratori mediante l'utilizzo di *kit* commerciali.

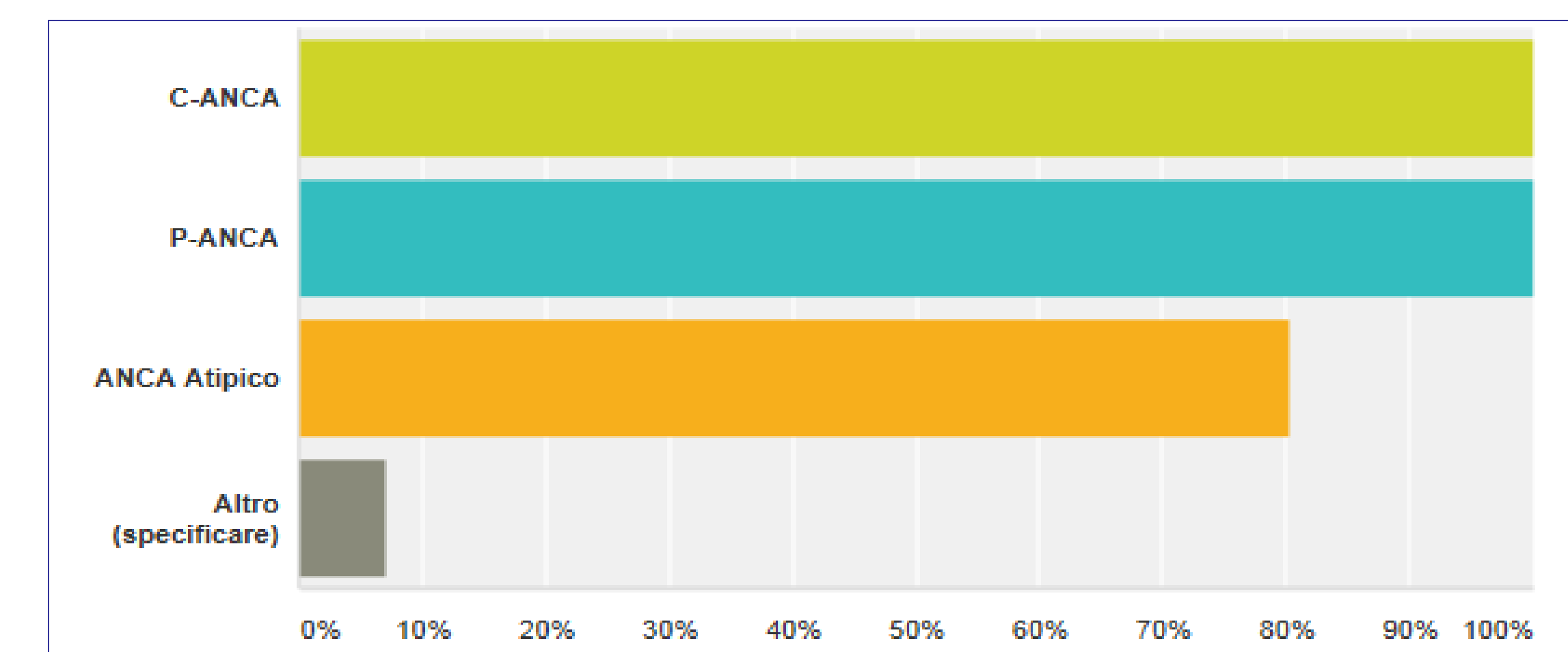


Fig. 2: quadri fluoroscopici refertati

Il *test* IFI viene effettuato utilizzando substrati cellulari fissati con etanolo, ad una diluizione di *screening* di 1:10 (38%) o 1:20 (60%), seguita dalla titolazione dei campioni positivi nel 36%.

I vetrini sono valutati da due osservatori indipendenti nella metà dei casi. Sebbene il substrato cellulare sia costituito soprattutto da neutrofili, in alcuni laboratori sono utilizzati mosaici di granulociti e cellule HEP-2. Titolo/intensità e *pattern* sono riportati nel 75% e 95% dei casi, rispettivamente.

IFT su cellule fissate con HCHO è eseguito mai (24%), sempre (35%) o soltanto in casi selezionati (31%).

La proporzione relativamente alta di *test* IFI su cellule fissate con formalina è dovuta soprattutto all'impiego di substrati commerciali che contengono cellule fissate con Et-OH e HCHO nello stesso pozzetto.

La definizione di *pattern atipico* è assai controversa, identificando talvolta tutti i quadri fluoroscopici granulocita-specifici diversi dai "classici" C-ANCA/P-ANCA (29%) o quadri fluoroscopici misti (9%), ma anche P-ANCA non confermati con metodiche diverse (IFT su cellule fissate con formalina, MPO-ANCA, PR3-ANCA) (27%).

Il 70% degli intervistati utilizza una *strategia per identificare eventuali interferenze* (ricerca ANA su cellule HEP-2/2000, HCHO-IFT, altro).

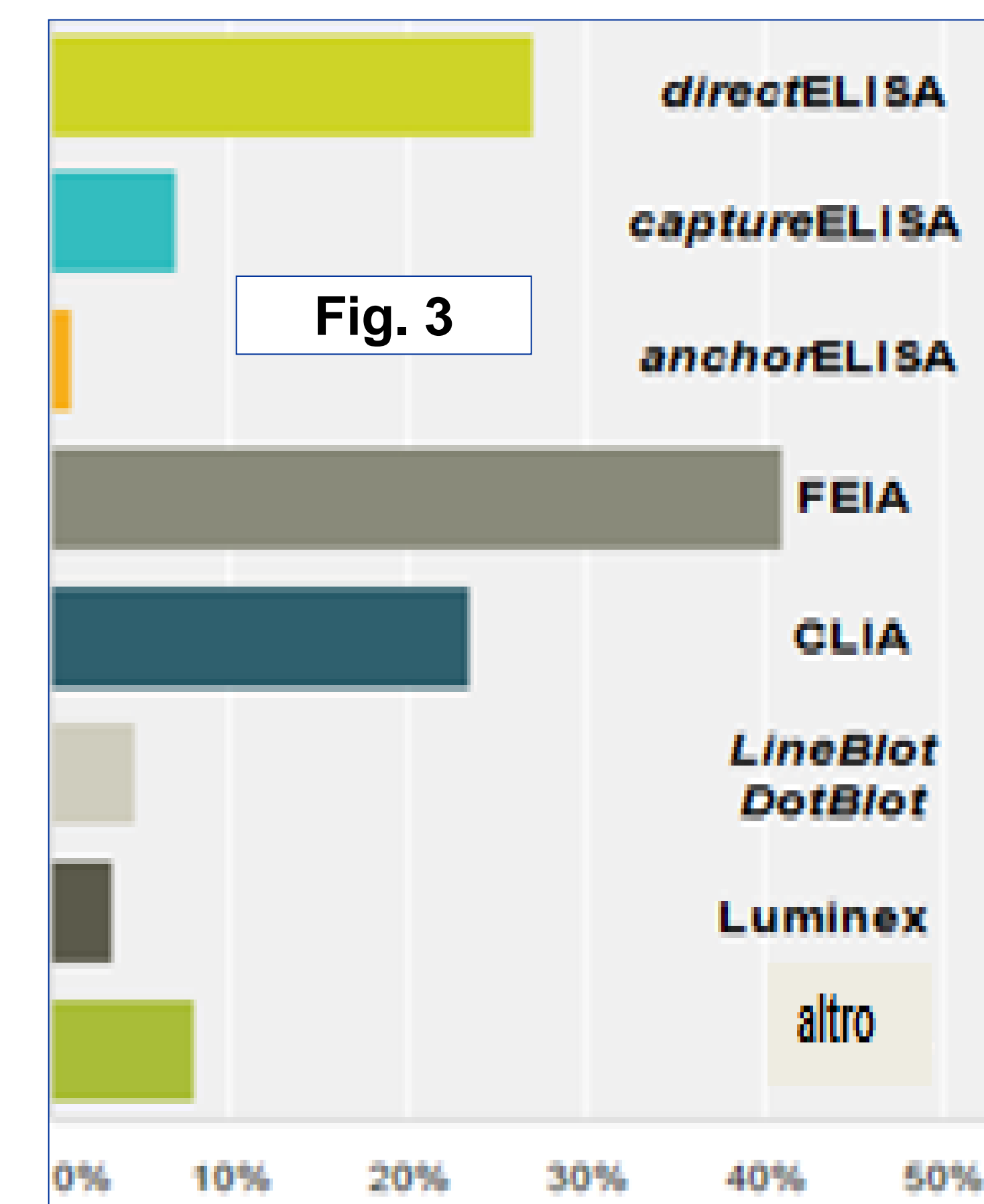


Fig. 3

MPO e PR3-ANCA sono identificati con diverse metodiche (Fig. 3) generalmente utilizzando il *cut-off* suggerito dal produttore (85%); i risultati sono riportati quantitativamente nell' 80% dei casi. **Solo pochissimi specialisti hanno risposto alla domanda relativa alla definizione di "incremento significativo" del livello degli ANCA.**

Strategie di richiesta test ANCA (nuovi pazienti)	%
IFT + PR3 + MPO	37,3%
IFT, confermato da PR3 o MPO	6,0%
IFT, confermato da PR3 e MPO	28,9%
PR3 + MPO (no IFT)	16,9%
PR3 + MPO, confermato da IFT	1,2%
altro	9,6%

Tab. 2

Non sono generalmente applicate regole che stabiliscono un intervallo di tempo minimo tra *test* ANCA successivi. Le informazioni cliniche sono considerate estremamente utili ma solo raramente disponibili. ANCA urgenti sono raramente codificati, comunque i risultati sono forniti entro le 24h tutti i giorni (7%), da lunedì a venerdì (26%) o in situazioni cliniche critiche (coinvolgimento renale severo e/o polmonare, 11%).

Inaspettatamente l'algorithmo alternativo, basato sullo *screening* MPO e PR3-ANCA con metodi ad elevata sensibilità seguito da IFT per conferma dei campioni positivi, è raramente applicato. Quando appropriato, nella maggioranza dei laboratori il referto è integrato da un commento per favorire la corretta interpretazione del risultato. L'automazione è largamente presente nei laboratori italiani, il 90% dei *test* IFI e il 99% dei *test* immunometrici sono effettuati con preparatori di vetrini e/o sistemi completamente automatizzati.

CONCLUSIONI: la maggior parte dei laboratori italiani effettua la determinazione degli ANCA in accordo con le raccomandazioni internazionali e gli specialisti di laboratorio dimostrano una forte consapevolezza del ruolo del laboratorio nella diagnosi delle vasculiti ANCA-associate.

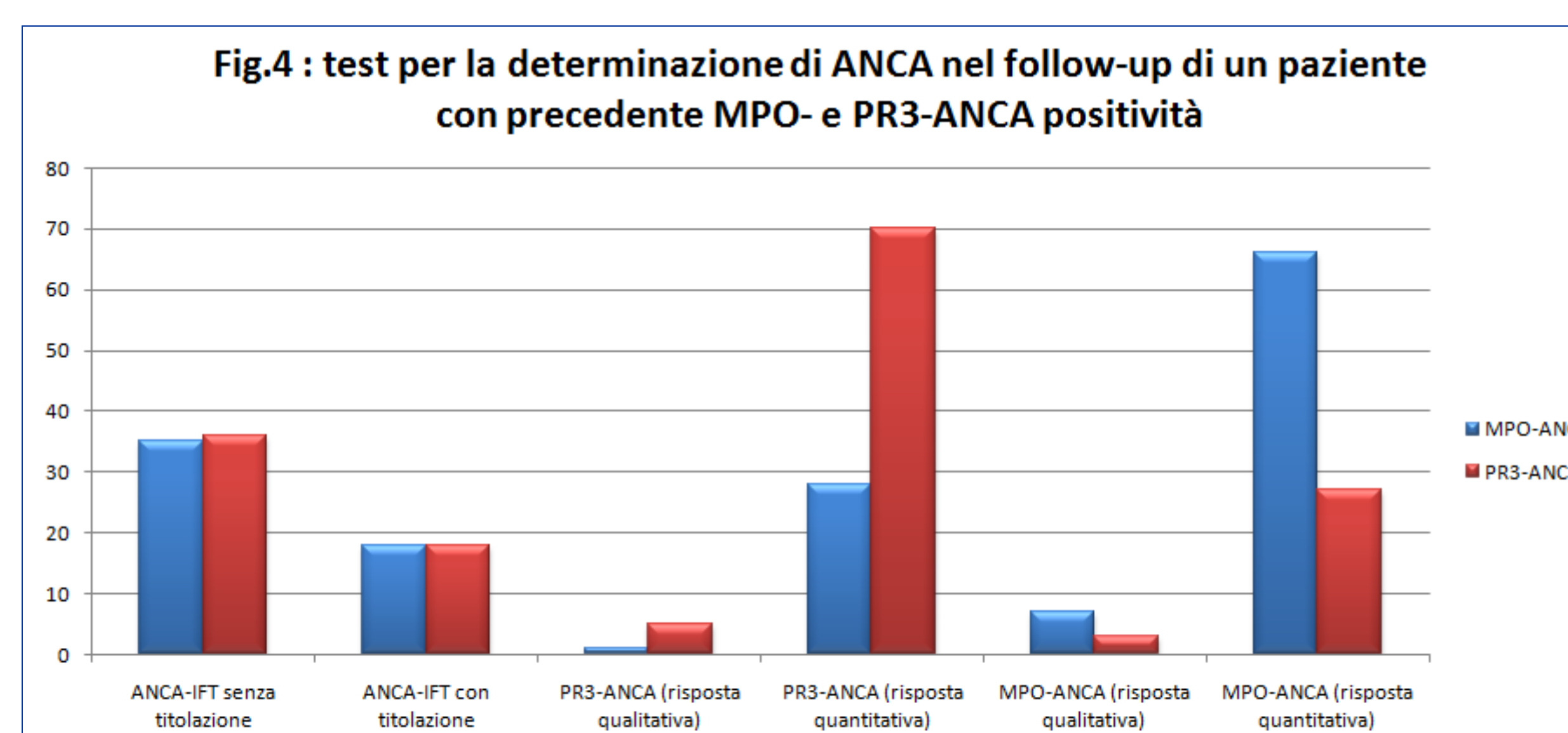


Fig.4 : test per la determinazione di ANCA nel follow-up di un paziente con precedente MPO- e PR3-ANCA positività

Strategie diagnostiche: algoritmi diversi sono applicati in caso di nuovi pazienti o nel monitoraggio dei pazienti noti (Tab. 2, Fig. 4). I campioni sono riportati come ANCA positivi su differenti basi (Fig. 5).

Non esiste concordanza nelle modalità di refertazione dei campioni P-ANCA/PR3 positivi e C-ANCA/MPO positivi.

directMPO/PR3 positivi + captureMPO/PR3 positivi senza conferma con IFT

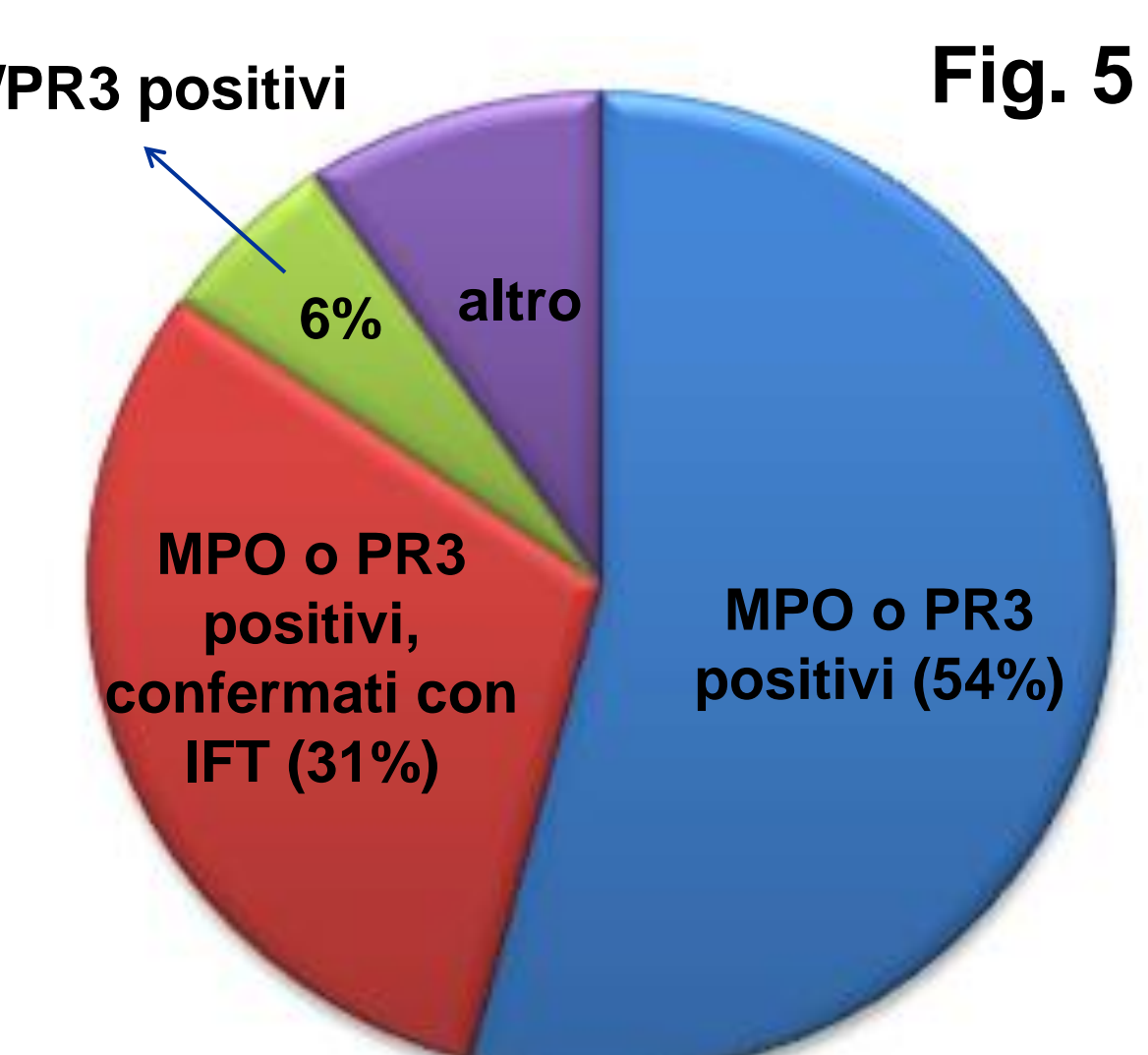


Fig. 5