

La determinazione degli autoanticorpi anti isola pancreatica nella diagnostica del diabete mellito*

Marco Songini, Marco Liguori

Ospedale S. Michele, Azienda Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari

Il Diabete di tipo 1, inquadrato in base all'ultima classificazione 1997 dell'ADA, è distinto in due categorie: A) autoimmune, caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi anti pancreas endocrino, e B) idiopatico, meno frequente, nel quale non è presente alcun segno di autoimmunità. Il tipo immunomediato risulta dalla distruzione autoimmune cronica selettiva delle cellule beta pancreatiche, in individui geneticamente predisposti ed innescata da fattori ambientali.

Una delle prime evidenze che l'autoimmunità era coinvolta nelle patogenesi del diabete tipo 1 A fu presentata da Bottazzo e coll. nel 1974, con la scoperta degli ICA (poi estesa ad altre specificità autoantigeniche della betacellula pancreatica). Tali autoanticorpi, e con essi gli altri scoperti successivamente, non sono patogenetici (essendo il danno beta cellulare mediato dai T linfociti), ne rappresentano probabilmente un epifenomeno ma allo stesso tempo sono gli unici marcatori sierologici di autoimmunità disponibili.

L'importanza della determinazione degli anticorpi anti-insula è dovuta al fatto che nella maggior parte dei casi di diabete di tipo 1 A essi appaiono in circolo già in fase prediabetica, ancora del tutto asintomatica. Utilizzandoli correttamente è pertanto possibile un inquadramento diagnostico più precoce e preciso nonché la realizzazione pratica ed efficace di eventuali interventi di tipo preventivo.

Sono stati individuati sino ad ora numerosi anticorpi rivolti verso varie strutture dell'insula; la diagnostica è attualmente orientata verso la ricerca degli ICA (Islet Cell Autoantibodies), GADA (Glutamic Acid Decarboxylases Autoantibodies), IAA (Insulin Autoantibodies), IA-2 (IA-2A Autoantibodies). Inoltre ha rappresentato un grosso progresso diagnostico il fatto che, a parte gli ICA, determinabili mediante IFI come verrà menzionato in seguito, per la determinazione dei GADA, IAA e IA-2 i rispettivi antigeni sono stati ottenuti con tecniche di DNA ricombinante, quindi altamente purificati, evitando

*Documento preparato per il 34° Congresso Nazionale SIBioC, sessione 6 (avanzamenti delle conoscenze nel diabete mellito), venerdì 20 settembre 2002.

Abbreviazioni:

ADA: American Diabetes Association

GABA: Gamma Aminobutyric Acid

GAD: Glutammato Decarbossilasi

GADA: Glutamic Acid Decarboxylases Autoantibodies

ICA: Islet Cell Autoantibodies

IA-2: IA-2A Autoantibodies

IAA: Insulin Autoantibodies

IDS: Immunology of Diabetes Society

IFI: Immuno Fluorescenza Indiretta

JDF: Juvenile Diabetes Federation

LADA: Latent Autoimmune Diabetes of Adults

SMS: Stiff Man Syndrome

così reazioni aspecifiche. Questo non è ancora possibile con gli antigeni verso cui sono diretti gli altri autoanticorpi scoperti, per i quali peraltro non è ancora chiaramente dimostrata una predittività paragonabile a quella degli anticorpi testati citati. I GADA, IA-2 e IAA possono così essere determinati con metodiche radioimmunologiche altamente sensibili, specifiche (validate da Workshop internazionali come metodiche di riferimento) e sono inoltre evidenziabili su spot e su sangue capillare.

Secondo le linee guida elaborate dall'Immunology of Diabetes Society (IDS), i familiari di primo grado di soggetti con diabete tipo 1 A dovrebbero eseguire un esame di primo livello che prevede la determinazione dei GADA e IA-2 (o IAA a nel caso di età inferiore a 15 anni). I soggetti riscontrati positivi per almeno un marcatore dovrebbero essere esaminati successivamente per la presenza di ICA più IA-2 o IAA. Tenendo conto che non tutti i soggetti positivi sviluppano la malattia ma semplicemente hanno un rischio maggiore di svilupparla rispetto ai negativi, la valutazione del rischio è associata al titolo ed al numero di anticorpi presenti. La presenza di un solo marcatore ha uno scarso significato, significato che è ancora inferiore se l'anticorpo è presente a basso titolo. (ad eccezione che nei bambini, in cui il rischio in tal caso merita una ponderata attenzione anche in monopresenza a basso titolo); il rischio è circa del 50 % nei soggetti positivi per almeno due o tre anticorpi e dell'80% in caso di presenza contemporanea di tutti i 4 gli anticorpi(2). Tali percentuali sono state calcolate in familiari di primo grado non essendo attualmente possibile una stima precisa del rischio nei casi senza positività familiare in cui comunque, anche in tal caso, aumenta con l'aumentare del numero di anticorpi contemporaneamente presenti nello stesso individuo, specie in regioni ad elevato rischio di malattia come Finlandia e Sardegna.

La loro utilità è stata inoltre dimostrata anche nella sorveglianza dei pazienti sottoposti a trapianto di pancreas: la loro ricomparsa o aumento rappresenta infatti un indice prognostico sfavorevole di sopravvivenza dell'organo trapiantato.

ICA

Furono scoperti da Bottazzo e collaboratori nel 1974 in soggetti con poliendocrinopatia e/o diabete. Infatti mentre nel diabete di tipo 1A i vari anticorpi possono essere presenti anche solo transitoriamente, nelle sindromi poliendocrinopatiche persistono nel tempo.

La frequenza degli ICA risulta mediamente del 70 % all'insorgenza della malattia, del 50 % dopo 6 mesi, del 35 % dopo 2 anni e del 15 % oltre i 2 anni. Vengono rilevati in immunofluorescenza indiretta su pancreas umano di gruppo 0, evitando così la rivelazione di antigeni gruppo specifici contro cui possono reagire isoanticorpi naturali presenti nel siero in esame rendendo difficile l'interpretazione del preparato.

La concentrazione di tali anticorpi nel siero viene espressa in UI-JDF (Juvenile Diabetes Foundation) sulla base di un Siero Standard Internazionale di riferimento di concentrazione pari a 80 JDF. Il problema principale consiste nel reperimento del pancreas adatto da cadavere donatore di organi.

Un'alternativa può essere rappresentata dall'uso del pancreas di primate ma con sensibilità e specificità nettamente inferiori.

Gli ICA sono rivolti contro un'eterogeneità di antigeni bersaglio dell'insula, non solo quelli riconosciuti dagli anticorpi GADA, IA-2 e IAA, ma anche altri antigeni non tutti ancora caratterizzati.

IAA

Scoperti da Palmer nel 1983. L'insulina è stato il primo autoantigene ad essere caratterizzato da un punto di vista molecolare. Gli IAA sono rivolti contro l'insulina nativa: non devono essere determinati dopo l'inizio della terapia insulinica, poiché pochi giorni dall'inizio della terapia si ha la produzione di IAA indistinguibili da quelli contro l'insulina nativa. Riconoscono un epitopo conformazionale dell'insulina con leucina in posizione 13 della catena alfa (la sostituzione di questo aminoacido comporta la perdita del legame degli IAA all'insulina). Possono essere presenti in altre malattie autoimmuni (S. di

Hashimoto, LES, epatiti trattate con Interferon, Malattia di Hirata).

Gli IAA sono un marcatore precoce di autoimmunità, nella prima infanzia sono i più frequentemente trovati e spesso in tale età la loro comparsa precede quella degli I-CA, GADA e IA-2. Sono inoltre caratterizzati dalla rapida scomparsa. Gli IAA sono determinabili con metodiche radioimmunologiche utilizzando Insulina marcata con I¹²⁵

GADA

Sono caratterizzati da prolungata persistenza dopo l'esordio della malattia, sono quindi determinanti nella diagnostica del LADA (Latent Autoimmune Diabetes of Adults).

Nel 1982 Baekeskov scoprì che sieri di diabetici tipo 1A messi in contatto con lisati di cellule insulari precipitavano una proteina da 64 kDa che invece non era precipitata da sieri di non diabetici. Trattando con tripsina tale proteina si otteneva un frammento da 50 kDa. Nel 1990 Baekeskov scoprì che tale frammento corrispondeva all'enzima Glutamato Decarbossilasi (GAD). Infatti sieri di pazienti con Stiff Man Syndrome (SMS) precipitavano tale frammento. La SMS è caratterizzata da aumento del tono muscolare e ridotta capacità di rilasciare i muscoli volontari per carenza di GABA (un neurotrasmettitore inibitorio) dovuto alla carenza di GAD, enzima che catalizza la trasformazione dell'acido glutammico a GABA (1/3 dei pazienti con SMS è anche diabetico). Era quindi ragionevole ipotizzare che il GAD è un autoantigene sia nella SMS che nel diabete tipo 1. Infatti mettendo in contatto sieri di diabetici tipo 1 con GAD questo veniva precipitato per la presenza del GADA: a questo punto gli stessi sieri non erano più in grado di precipitare il frammento da 50 kDa.

Esistono due isoforme di GAD, da 65 e 67 kDa. I GADA riconoscono prevalentemente la forma da 65. La GAD è espressa prevalentemente nel sistema nervoso ma è stata trovata anche nel rene e nelle isole pancreatiche. E' ancora controversa la sua espressione nelle gonadi, tube di Fallopio e midollare del surrene.

E' tutt'ora allo studio il possibile ruolo patogenetico svolto dai GADA sull'immunità cellulo-mediata. I GADA sono determinabili con metodiche radioimmunologiche utilizzando S35 o I125.

IA-2

Caratterizzerebbero il rapido evolvere della malattia verso l'insulino dipendenza e sono più frequenti nei giovani. L'antigene riconosciuto da IA-2 è stato scoperto utilizzando librerie di DNA estratte da insulinoma umano: una delle proteine clonate è risultata reattiva con sieri di pazienti con diabete tipo 1 ed è poi risultata una proteina formata da 979 aminoacidi, localizzata nelle vescicole secretorie delle beta cellule, e costituita da 3 porzioni: intracellulare, transmembrana ed extracellulare.

Trattasi di una tirosinfosfatasi che interviene nel trasporto dei segnali dal citoplasma

Tabella 1
Alcune caratteristiche relative alla determinazione degli auto-anticorpi del siero

Caratteristica	Campione e sua conservazione
Interferenze	- campioni lipemici e/o emolizzati - sieri di pazienti in terapia o sotto accertamento diagnostico con radioisotopi (1) - contaminazione del campione o delle attrezzature con radioisotopi (1)
Condizioni di conservazione	Sino a 24 ore: 2-8°C Periodi più lunghi: -20°C.
Valori di riferimento	Variano a seconda del kit in uso. Ogni laboratorio dovrebbe definire i propri valori di normalità
Rideterminazione	Dipende dalla clinica e dal titolo anticorpale

(1) Non interferiscono sugli ICA determinati in IFI

alle vescicole secretorie delle cellule beta. Gli IA-2 sono determinabili con metodiche radioimmunologiche utilizzando S^{35} o I^{125} .

CONCLUSIONI

Sembra opportuno concludere con la considerazione che le determinazioni degli autoanticorpi menzionati andrebbero eseguite a seguito di una richiesta specifica del diabetologo ed interpretate nel contesto di un sospetto diagnostico. Sarebbe preferibile che le determinazioni dei GADA, IAA e IA-2, per i quali esistono in commercio kits di buona sensibilità e specificità, fossero comunque eseguite solo presso i centri di riferimento. L'esecuzione presso centri specializzati è sostanzialmente obbligatoria per la determinazione degli ICA, eseguiti con tecnica IFI su pancreas umano, ed i cui risultati sono espressi in JDF.

BIBLIOGRAFIA

1. Bingley P.J., Bonifacio E., Ziegler A.G., Shatz D.A., Atkinson M.A., Eisenbarth G.S.: Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 :398,2001.
2. Bingley P.J., Williams A.J.K., Gale E.A.M.: Optimized autoantibody-based risk assesment in family members. *Diabetes Care* 22:1796-1801,1999.
3. Liguori M., Pedini B., Moscon A., Songini M., Schirru P., Betterle C.: Ricerca degli ICA: Pancreas umano o di primate? Risultati di uno studio comparativo. *Riv Med Lab-JLM*, Vol.1, S.1, 178.2000
4. Liguori M., Meloni P., Cogoni F., Vargiu T., Casu A., Palomba A., Schirru P., Frongia P., Angius E., Songini M.: Applicazione di una proposta di linee guida per lo screening del ri-schio di Diabete tipo 1: dati preliminari. *Riv Med Lab-JML*, Vol. 2, S.1, 172.2001
5. Songini M. Diabete di tipo 1 in Sardegna: "Il progetto Hot and Cold Spots" *Aggiornamento medico*, 21,1,27-33.1997