

## Il Laboratorio clinico delle immunopatologie: tra diagnostica e comunicazione scientifica

Sara Pasqualetti<sup>1</sup>, Alberto Dolci<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>SC Patologia Clinica, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche, Università degli Studi di Milano

Gli errori congeniti dell'immunità comprendono una serie di disordini caratterizzati da alterazioni della risposta immunitaria imputabili a difetti genetici o anomalie cromosomiche che coinvolgono lo sviluppo del sistema immunitario. Clinicamente si manifestano con una maggiore suscettibilità alle infezioni, con risposte autoimmuni e autoinfiammatorie, allergia, insufficienza midollare e predisposizione allo sviluppo di neoplasie. Gli errori congeniti del sistema immunitario si distinguono in dieci gruppi in relazione al coinvolgimento nel difetto immunologico dell'immunità innata, dell'immunità adattativa o dei meccanismi di regolazione della risposta immunitaria (1). Questi ultimi rappresentano un gruppo emergente di disordini congeniti dell'immunità che si manifestano con patologie indotte da autoimmunità, iperinfiammazione, linfoproliferazione, proliferazione neoplastica e atopia (2). Sebbene il difetto sia presente sin dalla nascita, i disordini congeniti dell'immunità possono, in alcuni casi, manifestarsi anche in età adulta, in associazione ad altri disordini autoimmuni acquisiti che ne complicano la diagnosi.

In questo fascicolo di Biochimica Clinica, Mahajne e Della-Torre presentano il percorso diagnostico intrapreso per la diagnosi, in un paziente in età adulta, di sindrome linfoproliferativa autoimmune, un raro disordine primario a carico dei meccanismi di regolazione del sistema immunitario caratterizzato da un'alterata omeostasi linfocitaria che si estrinseca come difetto di apoptosi (3). La manifestazione clinica di questo difetto di apoptosi dipende sia dall'aumento della sopravvivenza dei linfociti in circolo che dal loro accumulo in sede linfonodale e splenica. La maggior parte dei pazienti, inoltre, associa fenomeni autoimmuni riconducibili alla maggior permanenza in circolo delle cellule autoreattive (4). La diagnosi di sindrome linfoproliferativa autoimmune del caso risultava intricata dalla sovrapposizione di altre complicanze autoimmuni ed immunomediata come la malattia da IgG4 e la tiroidite autoimmune. Gli autori dimostrano come la diagnosi sia stata possibile solo grazie ad una sinergia tra indagini cliniche, strumentali e di laboratorio. La scelta degli autori di presentare questo interessante e complesso caso clinico su Biochimica Clinica, riconosce il contributo fondamentale del laboratorio clinico nella diagnostica delle immunopatologie.

Ripercorrendo il caso clinico presentato, la prima diagnosi posta dagli autori riguardava la malattia da immunoglobuline G di tipo 4 (IgG4) correlata (IgG4-RD), una condizione fibroso-infiammatoria ad eziologia immunomediata. L'ampio spettro di sedi d'organo che possono essere colpite dalle lesioni IgG4 mediate ha determinato che la IgG4-RD raggruppasse nel tempo un insieme di patologie ritenute nosologicamente distinte (5). Inoltre, le diverse diagnosi ipotizzabili richiedono un approccio multidisciplinare che comprende anche indagini strumentali e di laboratorio utili alla conferma istologica e biochimica della malattia. I criteri diagnostici di IgG4-RD, proposti nel 2012 (6), si basano sulla clinica, con esclusione di altre patologie, e sul riscontro dell'aumento della concentrazione di IgG4 nel siero (livello decisionale >1350 mg/L) e sull'indagine istologica che dimostri la presenza di infiltrato plasmacellulare IgG4 positivo (livello decisionale, rapporto tra plasmacellule IgG4 positive e IgG positive >40%). La revisione del 2020 di tali criteri ha enfatizzato la difficoltà di ottenere il campione biotico, sebbene la presenza di infiltrato plasmacellulare IgG4 positivo sia un criterio diagnostico necessario e la sensibilità diagnostica di questo criterio aumenti ulteriormente se supportato dalla dimostrazione del processo fibrotico e flebitico a livello tissutale. Resta confermato come criterio diagnostico, l'aumento delle IgG4 sieriche (7). In sostanza l'aggiornamento più recente dei criteri diagnostici per confermare la diagnosi di IgG4-RD prevede il riscontro di ben definiti aspetti clinici e radiologici (tumefazione d'organo pseudo tumorale e/o ingrossamento d'organo tipica dell'accumulo tissutale di IgG4), associati però a definiti criteri biochimici e istologici. Nel 2019 l'American College of Rheumatology e l'European League Against Rheumatism hanno proposto un algoritmo per la classificazione dei pazienti con sospetto di IgG4-RD (classificazione ACR/EULAR) che prevede la conferma o l'esclusione del sospetto di malattia sulla base di criteri clinici, radiologici, ematochimici ed istologici. Se la diagnosi di IgG4-RD non può essere esclusa per la presenza in un organo bersaglio tipico della patologia (pancreas, ghiandole salivari, dotti biliari, orbite, rene, polmone, aorta, retroperitoneo, pachimeninge o tiroide)

Corrispondenza a: Sara Pasqualetti, UOC Patologia Clinica ASST-Fatebenefratelli Sacco, Via Giovanni Battista Grassi 74, 20157 Milano. E-mail: sara.pasqualetti@asst-fbf-sacco.it

Ricevuto: 24.09.2024

Accettato: 24.09.2024

Published on-line: 21.10.2024

DOI: 10.19186/BC\_2024.064

di alterazioni cliniche o radiologiche caratteristiche, oppure dell'evidenza istologica di un processo infiammatorio accompagnato da infiltrato linfoplasmacitico di eziologia incerta, si procede con la sua conferma sulla base di uno score ricavato da altri criteri, sempre riconducibili alla diagnostica per immagini (presenza di tumefazioni pseudo tumorali e/o ingrossamento d'organo a seconda del distretto corporeo interessato), all'esame istopatologico (dimostrazione di infiltrato linfoplasmocitico policlonale a prevalenza di plasmacellule IgG4 positive e di fibrosi tissutale), e alle indagini di laboratorio che dimostrano l'aumento della concentrazione di IgG4 nel siero caratteristica della IgG4-RD (8).

Analizzando da un punto di vista della medicina di laboratorio questi criteri, l'aumento della concentrazione di IgG4, indicato come indice di malattia nello score ACR/EULAR, si riferisce al limite superiore dell'intervallo di riferimento (LSR) mentre i criteri del 2012 utilizzavano il limite decisionale di 1350 mg/L, poi riconfermato nella revisione 2020. I due approcci sono stati messi a confronto da un gruppo italiano che ha evidenziato come essi possono essere ritenuti validi in funzione dell'organo coinvolto nella patologia (9). Ad esempio, quando il coinvolgimento è di tipo neurologico, l'inaccessibilità al prelievo bioptico e i valori di IgG4 che non raggiungono il livello decisionale definito, rendono la classificazione ACR/EULAR raccomandata perchè utilizza criteri clinici stringenti e criteri radiologici. Alcuni autori hanno evidenziato come i saggi attualmente disponibili in commercio per la determinazione di IgG4 dichiarino intervalli di riferimento molto discordanti tra loro, anche in ragione del fatto che un sistema internazionale di riferimento per la standardizzazione della misura di questo analita non è ancora disponibile (10). Risulta pertanto evidente come l'utilizzo di un valore decisionale delle IgG4 per la diagnosi di IgG4-RD richieda ancora un processo di validazione nel quale il contributo del laboratorio clinico è essenziale. A questo proposito è sicuramente interessante menzionare uno studio nel quale sono stati definiti tre differenti livelli decisionali in funzione del sistema analitico utilizzato (11). Il contributo dimostra inequivocabilmente l'esigenza di chiarire il ruolo diagnostico delle IgG4 nella diagnosi di IgG4-RD, evidenziando come per il suo corretto impiego, in qualsiasi criterio o algoritmo diagnostico, la standardizzazione della misura di questo analita sia irrinunciabile, considerata anche la disponibilità di un materiale di riferimento proposto per questo scopo (12). Sempre soffermandoci sugli aspetti analitici inerenti la misura delle IgG4, a nostra conoscenza non sono attualmente disponibili dati sulla variabilità biologica dell'analita che potrebbero rappresentare un approccio utile per la definizione delle specifiche di qualità della sua misura. Sarebbe interessante verificare sperimentalmente se i traguardi analitici utilizzati per le IgG totali possono essere utilizzati anche per le sottoclassi IgG4, assumendo una proporzionalità tra IgG e IgG4 delle oscillazioni intorno al punto omeostatico. Nel caso clinico di Mahajne e Della-Torre, l'interpretazione della concentrazione di IgG4 è stata condotta mediante confronto con il LSR (846 mg/L) specifico per il sistema analitico utilizzato (Optilite IgG4, The Binding Site, UK).

Al paziente è stata successivamente posta la diagnosi di immunodeficienza comune variabile (CVID), un raro disturbo di immunodeficienza, che può essere di tipo primitivo o secondario, che induce deficit d'immunità umorale ed è caratterizzato da ipogammaglobulinemia e talvolta agammaglobulinemia, con conseguente aumentata suscettibilità alle infezioni. La diagnosi di CVID prevede un inquadramento clinico ed uno biochimico basato sull'elettroforesi delle sieroproteine per la ricerca di ipogammaglobulinemia e sulla misura delle specifiche classi immunoglobuliniche. Una recente disamina dei criteri diagnostici di CVID evidenzia come la valutazione biochimico-clinica sopra descritta rappresenti un criterio diagnostico comune (13), senza che esista un consenso sulla definizione di riduzione della concentrazione delle immunoglobuline circolanti, se inferiore ad un livello decisionale oppure ad un intervallo di riferimento opportunamente stabiliti. Inoltre, le concentrazioni delle differenti classi di immunoglobuline dovrebbero essere stratificate per età e, come recentemente dimostrato, anche per etnia (14, 15). La diagnosi di tiroidite autoimmune linfocitica o tiroidite di Hashimoto, una malattia cronica della tiroide causa di ipotiroidismo, prevede la determinazione degli autoanticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi (16). La diagnosi di sindrome linfoproliferativa autoimmune viene posta sulla base di manifestazioni cliniche e di laboratorio inserite nell'algoritmo diagnostico che prevede lo studio delle sottoclassi linfocitarie per la ricerca dell'espansione di cellule linfocitarie CD3<sup>+</sup>, recettore  $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> e CD8<sup>-</sup> T (linfociti T doppi negativi) e, sebbene sia un criterio diagnostico secondario, anche il riscontro di una ipergammaglobulinemia sostenuta da IgG (17). L'analisi genetica non ha tuttavia permesso di identificare alcun difetto genetico tra quelli già noti per errori congeniti dell'autoimmunità, ma gli autori attraverso questo caso clinico hanno dimostrato come altri esami di laboratorio possono rappresentare un ulteriore, fondamentale supporto diagnostico. Attualmente sono infatti noti 485 differenti errori congeniti dell'autoimmunità (suddivisi in 10 gruppi a seconda del difetto immunologico coinvolto) e viene da sé che l'analisi genetica dovrebbe rappresentare il criterio diagnostico di conferma della malattia (1). Tuttavia, ciascun gruppo si caratterizza anche per le alterazioni di specifiche indagini di laboratorio in grado di meglio identificare il disordine immunologico alla base della malattia.

Ripercorrendo il caso clinico di Mahajne e Della-Torre da un punto di vista del laboratorio clinico è possibile comprendere come concetti propri della nostra professione possono essere applicati anche agli analiti coinvolti nella diagnosi e nel monitoraggio delle immunopatologie. Abbiamo già analizzato alcuni aspetti inerenti la misura delle IgG4 che richiedono di essere definiti per permettere l'impiego ottimale di questo analita nell'ambito della immunopatologia clinica. Tuttavia, se consideriamo i contributi inviati alla rivista di *Biochimica Clinica* dal 2019 ad oggi, eliminando notizie, errata corrige e i riassunti di atti e convegni, si riscontra che su 445 contributi pubblicati tra casi clinici, comunicazioni/contributi scientifici, documenti, editoriali, lettere all'editore, opinioni e rassegne, solo 18 (4,0%) sono attinenti all'immunopatologia, nello specifico 8 casi clinici, 7 contributi scientifici, 2 documenti e 1 editoriale. Tuttavia, diversi studi dimostrano come le immunopatologie, tra cui l'artrite reumatoide e il lupus eritematoso sistemico, patologie

per le quali il laboratorio riveste un ruolo fondamentale per la diagnosi, sono in continuo aumento nella popolazione generale (18). Traslando il concetto di immunopatologia illustrato da Coombs nel 1968 (19), secondo il quale, essendo l'immunologia e la patologia due discipline distinte, l'immunopatologia deve essere una intersezione tra loro, in un laboratorio clinico il settore dedicato alla diagnostica delle immunopatologie richiede competenze sia di patologia clinica che di immunologia clinica. Le competenze proprie della patologia clinica risultano necessarie per affrontare la diagnostica di laboratorio legata alla funzionalità e al danno d'organo, come esito delle manifestazioni autoimmuni, per gestire gli aspetti analitici, requisito essenziale per garantire la qualità analitica del risultato e gli aspetti tecnologici per valutare ogni metodologia innovativa alla luce dell'utilità clinica dell'esito prodotto. Invece, le competenze di immunologia clinica sono essenziali sia per la diagnostica che per la ricerca applicata, per comprendere i meccanismi dell'immunità e dei loro disordini, e permettere di affrontare in maniera qualificata l'imprescindibile confronto con il clinico. Il settore dedicato alla immunopatologia potrebbe pertanto configurarsi come qualsiasi altra unità operativa interna ad una struttura complessa di laboratorio, non tanto per la numerosità dei casi affrontati, nonostante il costante aumento di pazienti con disordini ad eziopatogenesi autoimmune, ma quanto per la competenza specialistica richiesta sia da un punto di vista dei metodi in continua evoluzione che in relazione ai meccanismi fisiopatologici, agli obiettivi diagnostici e alle opportunità terapeutiche per perseguire l'appropriatezza delle richieste e la corretta interpretazione dei risultati in relazione al quesito clinico. Questa visione collima perfettamente con quella di una medicina di laboratorio orientata più al valore clinico dei risultati che all'incremento costante del numero di esami eseguiti, visione strategica per il futuro del laboratorio clinico (20).

In questa prospettiva, siamo certi che la creazione di un laboratorio di immunopatologia permetterebbe di raggiungere un livello di competenze sia analitico-tecnologiche che clinico-diagnostiche tali da aprire un dibattito scientifico e di confronto anche all'interno della Medicina di Laboratorio al pari di altri ambiti specialistici.

A questo proposito, il caso clinico di Mahajne e Della-Torre rappresenta certamente uno spunto di riflessione per il laboratorio clinico ed uno stimolo per procedere in questa direzione virtuosa per ora limitata a pochi centri di eccellenza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2022;42:1473-507.
2. Chan AY, Torgerson TR. PIRD: Primary immune regulatory disorders, a growing universe of immune dysregulation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2020;20:58290.
3. Mahajne J, Della-Torre E. When autoimmune diseases hide human inborn errors of immunity. *Biochim Clin.* 2024. DOI: 10.19186/BC\_2024.038. Ahead of print.
4. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356:314-7.
5. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, et al. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Mod Pathol* 2012;25:1181-92.
6. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, et al. Research program for intractable disease by Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) Japan G4 team. A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. *Mod Rheumatol* 2012;22:1-14.
7. Umehara H, Okazaki K, Kawa S, Takahashi H, Goto H, Matsui S, et al. The 2020 revised comprehensive diagnostic (RCD) criteria for IgG4-RD. *Mod Rheumatol* 2021;31:529-33.
8. Wallace ZS, Naden RP, Chari S, Choi H, Della-Torre E, Dicaire J-F, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism IgG4-Related Disease Classification Criteria Working Group. The 2019 American college of rheumatology/european league against rheumatism classification criteria for IgG4-related disease. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72:7-19.
9. Costanzo G, Puccetti L, Capecchi R, Bilia S, Puxeddu I, Tavoni A, et al. The IgG4-related disease: performance of classification and diagnostic criteria in a single-centre cohort of patients. *Clin Exp Rheumatol* 2022;40:1811.
10. Xia CS, Fan CH, Liu YY. Diagnostic performances of serum IgG4 concentration and IgG4/IgG ratio in IgG4-related disease. *Clin Rheumatol* 2017;36:2769-74.
11. Usami Y, Sugano M, Uehara T, Koinuma M, Ishimine N, Kawasaki K, et al. Cut-off values of serum IgG4 among three reagents, including a novel IgG4 reagent: a multicenter study. *Sci Rep* 2021;11:7280.
12. Schauer U, Stemberg F, Rieger CH, Borte M, Schubert S, Riedel F, et al. IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents. *Clin Chem* 2003;49:1924-9.
13. Wang LA, Abbott JK. Common variable immunodeficiency: Challenges for diagnosis. *J Immunol Methods* 2022;509:113342.
14. Bohn MK, Wilson S, Schneider R, Massamiri Y, Randell EW, Adeli K. Pediatric reference interval verification for 17 specialized immunoassays and cancer markers on the Abbott Alinity i system in the CALIPER cohort of healthy children and adolescents. *Clin Chem Lab Med* 2022;61:123-32.
15. Tahmasebi H, Asgari S, Hall A, Higgins V, Chowdhury A, Thompson R, et al. Influence of ethnicity on biochemical markers of health and disease in the CALIPER cohort of healthy children and adolescents. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:605-17.
16. McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid peroxidase as an autoantigen. *Thyroid* 2007;17:939-48.
17. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for

- the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010;116:e35-40.
18. Miller FW. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention. *Curr Opin Immunol* 2023;80:102266.
  19. Coombs RR. Immunopathology. *Br Med J* 1968;1:597-602.
  20. Plebani M, Cadamuro J, Vermeersch P, Jovičić S, Ozben T, Trenti T, et al. A vision to the future: value-based laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2024 doi: 10.1515/cclm-2024-1022. (ahead of print)