

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

WWW.FISIOKINESITERAPIA.BIZ

I tests diagnostici dovrebbero:

- fornire elementi utili alla diagnosi
- contribuire a formulare una prognosi
- contribuire a valutare la risposta alla terapia
- non essere dannosi/pericolosi per il paziente
- essere di costo contenuto

Sensibilità e specificità

Sensibilità=probabilità di un risultato positivo nel soggetto malato (percentuale di veri positivi nella popolazione di malati)

Specificità= probabilità di un risultato negativo nel soggetto sano (percentuale di veri negativi nella popolazione di soggetti sani)

Tests di laboratorio nelle malattie reumatiche

- Misura di reattanti di fase acuta
- Misura dei livelli di complemento
- Determinazione di autoanticorpi

Reattanti di fase acuta

- Gruppo di proteine prodotte nella maggior parte dei casi dal fegato la cui sintesi aumenta in corso di infiammazione e necrosi tissutale.
- Comprende fibrinogeno, transferrina, C3, C4, proteina C reattiva, proteina A dell'amiloide.

Velocità di eritrosedimentazione

Si misura in provetta graduata cilindrica dopo 1 ora ed aumenta in rapporto alla concentrazione delle proteine di fase acuta ed in particolare del fibrinogeno

Aumenta in:

- malattie infiammatorie
- anemia
- gravidanza
- obesità
- necrosi tissutale (infarto miocardico, ictus)

Proteina C reattiva

- Proteina del gruppo delle pentraxine.
- Lega la fosfocolina, costituente della parete di molti batteri e funghi.
- La fosfocolina è presente anche nel foglietto esterno delle membrane cellulari delle cellule eucariote come gruppo polare di lecitina e sfingomieline.
- La PCR non lega la fosfocolina del foglietto esterno: infatti non lega le membrane di cellule intatte ma solo di cellule apoptotiche.
- La fosfolipasi A2 secretoria agisce sui fosfolipidi di membrana solo dopo il flip-flop che espone la fosfatidilserina sul lato esterno, generando lisofosfatidilserina.
- La fosfocolina diventa così accessibile alla PCR.

Proteina C reattiva

- La PCR facilita la fagocitosi delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi e non delle cellule dendritiche.
- La PCR attiva la formazione di una C3 convertasi ma non C5 convertasi: solo funzione opsonizzante del complemento, ma non azione proinfiammatoria e litica
- La PCR si lega a LDL ossidate che hanno proprietà proinfiammatorie e proaterogeniche

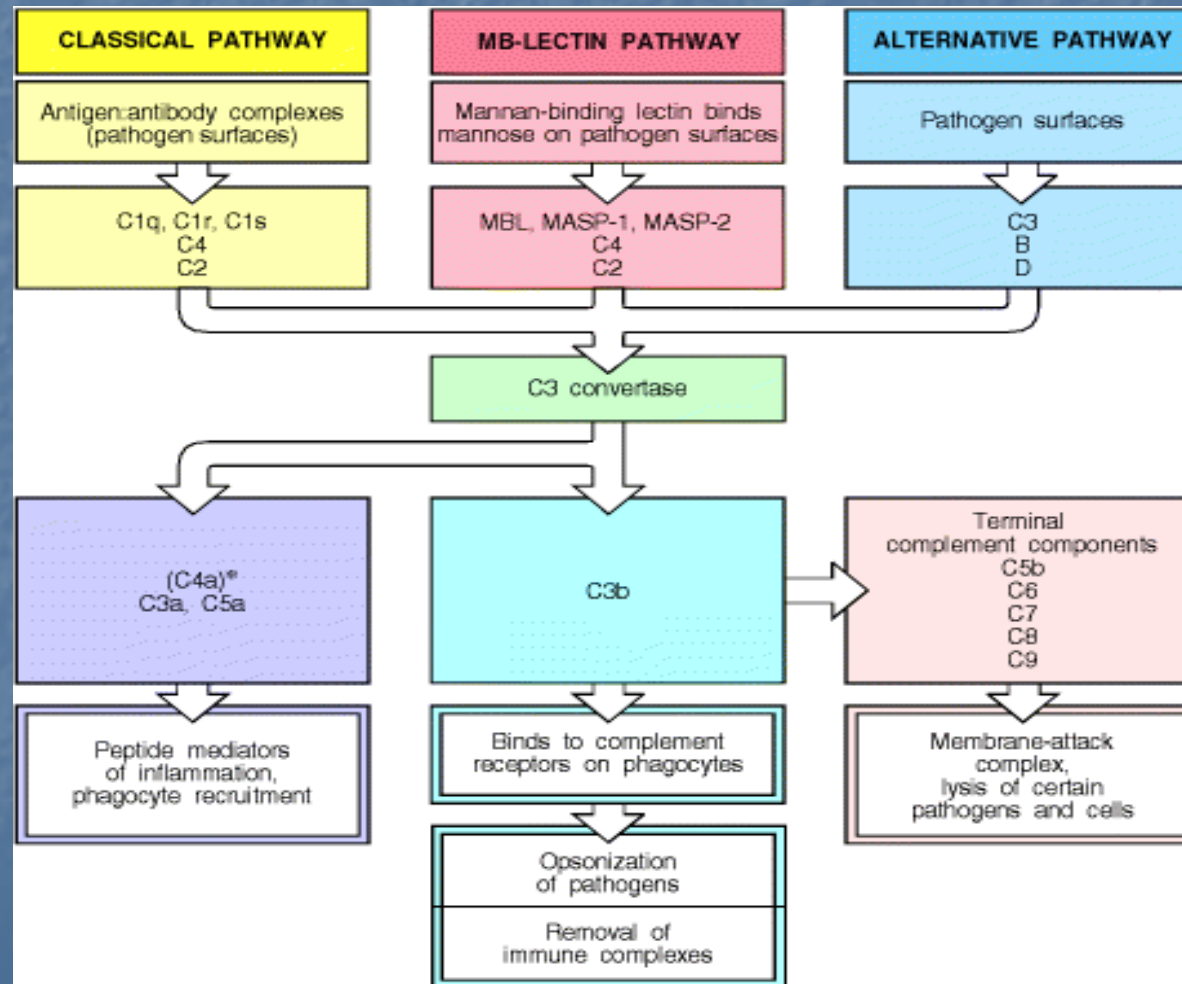
Proteina C reattiva

- Ha emivita di 19 ore
- Sale 8-10 ore dopo stimoli flogistici ed aumenta fino a 100 volte la sua concentrazione
- IL6 è il principale induttore del gene della PCR
- IL1 agisce sinergisticamente con IL6

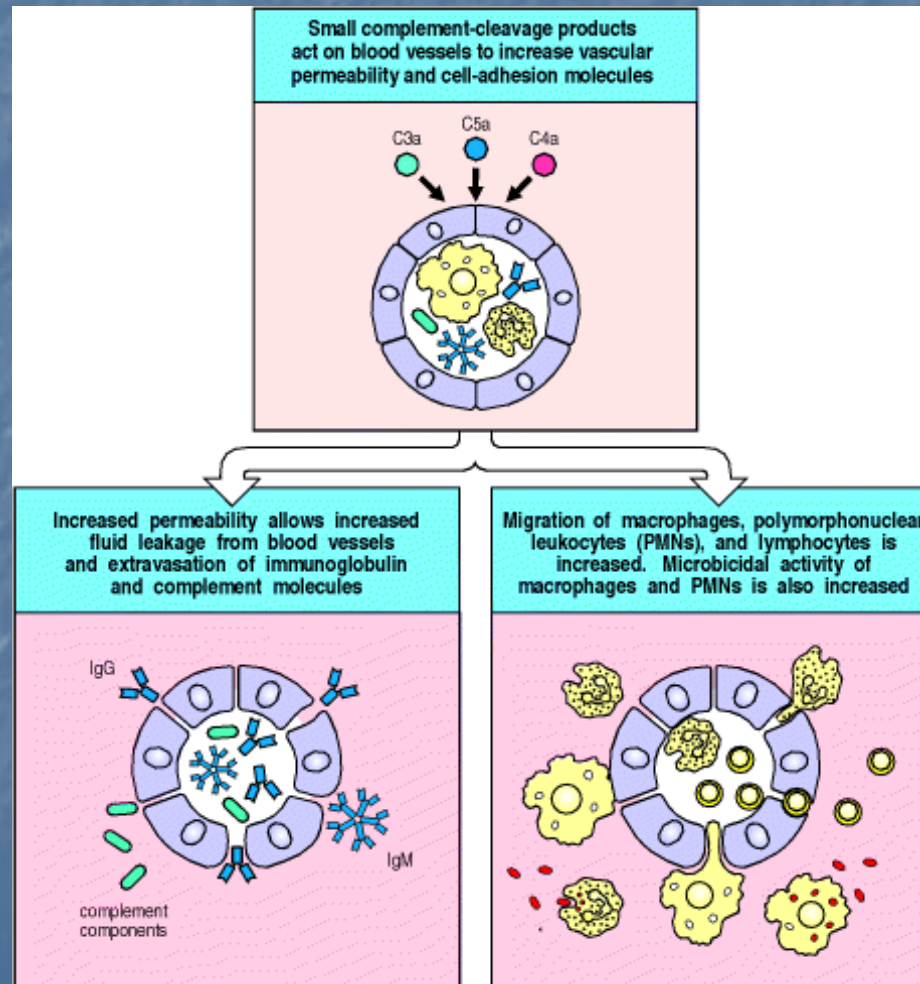
Tests di flogosi: qualche notizia pratica

- VES elevata: criterio utile per la diagnosi di polimialgia reumatica; utile per la diagnosi ed il follow up di pazienti con artrite reumatoide; poco utile per lupus e spondiloartriti
- PCR: utile per diagnosi e follow up di pazienti con artrite reumatoide
- PCR nel lupus è in genere normale:livelli elevati possono indicare la coesistenza di un'infezione

Complemento



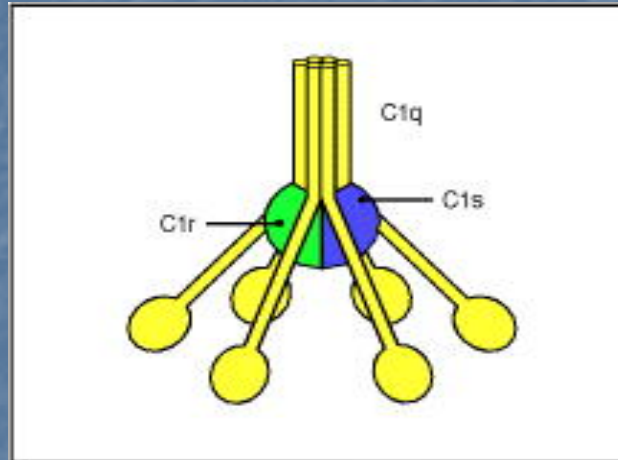
Complemento



Complemento

Proteins of the classical pathway of complement activation		
Native component	Active form	Function of the active form
C1 (C1q: C1r ₂ -C1s ₂)	C1q	Binds directly to pathogen surfaces or indirectly to antibody bound to pathogens, thus allowing autoactivation of C1r
	C1r	Cleaves C1s to active protease
	C1s	Cleaves C4 and C2
C4	C4b	Covalently binds to pathogen and opsonizes it. Binds C2 for cleavage by C1s
	C4a	Peptide mediator of inflammation (weak activity)
C2	C2b	Active enzyme of classical pathway C3/C5 convertase: cleaves C3 and C5
	C2a	Precursor of vasoactive C2 kinin
C3	C3b	Many molecules of C3b bind to pathogen surface and act as opsonins. Initiates amplification via the alternative pathway. Binds C5 for cleavage by C2b
	C3a	Peptide mediator of inflammation (intermediate activity)

Complemento: C1q



Complemento nelle malattie reumatiche

- Il complemento è necessario per l'eliminazione di immunocomplessi e cellule apoptotiche
- Il deficit di C1q, C4 e in minor misura di C2 si associa a LES congenito
- Il complemento è il principale mediatore del danno da immunocomplessi
- Nel LES c'è deficit acquisito del complemento per accelerato consumo (da immunocomplessi circolanti o in situ)

Dosaggio del complemento

Metodi funzionali o antigenici

Test funzionale: CH50 (misura dell'attività emolitica totale)

Dosaggio di singole componenti mediante antisieri specifici in nefelometria: C3, C4

Dosaggio dei prodotti di attivazione: C3a, C5a, C3d

Antigene è una sostanza che reagisce con un anticorpo o con un recettore di cellule T.
Autoantigene=antigene self cioè proprio dell'organismo.

La risposta immune anticorpale o cellulo-mediata ad antigeni self è la caratteristica fondamentale delle malattie autoimmuni.

Il risultato della risposta immune ad un antigene non self è l'eliminazione dell'antigene.

Se l'antigene è self tale eliminazione è impossibile.

Lo stimolo antigenico mantiene la risposta.

I meccanismi effettori causano un danno infiammatorio cronico ai tessuti.

Malattie autoimmuni

& Le malattie autoimmuni si classificano in sistemiche o organo-specifiche a seconda della distribuzione del/degli antigeni self riconosciuti da anticorpi o cellule T:

ubiquitari

localizzati in un organo

Organ-specific autoimmune diseases

Type I diabetes mellitus

Goodpasture's syndrome

Multiple sclerosis

Graves' disease
Hashimoto's thyroiditis
Autoimmune pernicious anemia
Autoimmune Addison's disease
Vitiligo
Myasthenia gravis

Systemic autoimmune diseases

Rheumatoid arthritis

Scleroderma

Systemic lupus erythematosus
Primary Sjögren's syndrome
Polymyositis

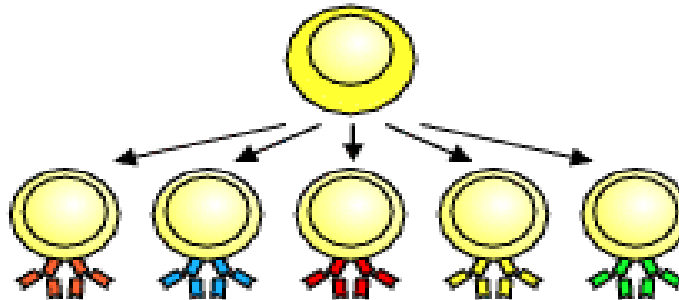
Malattie autoimmuni

- Le risposte autoimmuni sono innescate dall'attivazione delle cellule T
- Le risposte T ad antigeni self possono causare danno direttamente (T citotossiche, attivazione di macrofagi etc da parte di cellule TH1) o indirettamente (T helper espandono cellule B produttrici di autoanticorpi)

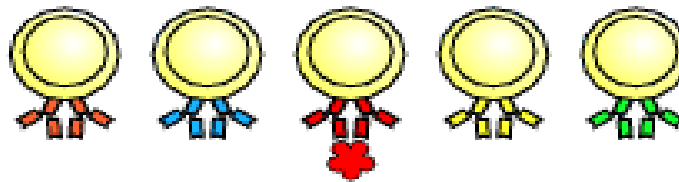
Malattie autoimmuni

- Le risposte autoimmuni sono conseguenza del repertorio “completo” di cellule T e B che sono in grado di rispondere a qualsiasi patogeno.
- Da questi repertori sono eliminati durante l'ontogenesi cellule T e B con i recettori che legano antigeni self con alta affinità.

Somatic hypermutation generates novel antibody specificities within germinal centers



Some of these B cells may now be able to bind self antigens



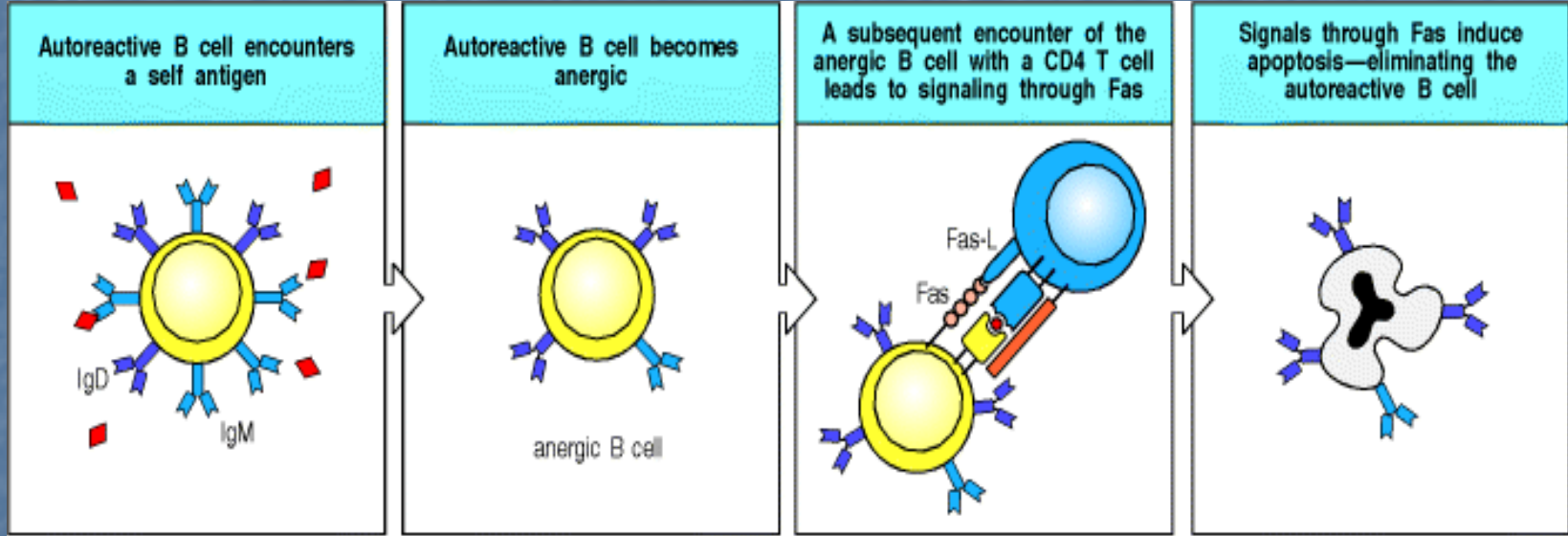
Encounter of autoreactive B cell with soluble antigen causes apoptosis



Malattie autoimmuni

La tolleranza al self è acquisita attraverso:

- la delezione a livello del timo delle cellule T immature che riconoscono antigeni self ubiquitari
- la delezione o l'anergia di cellule T mature che incontrino antigeni self espressi perifericamente in quantità elevate



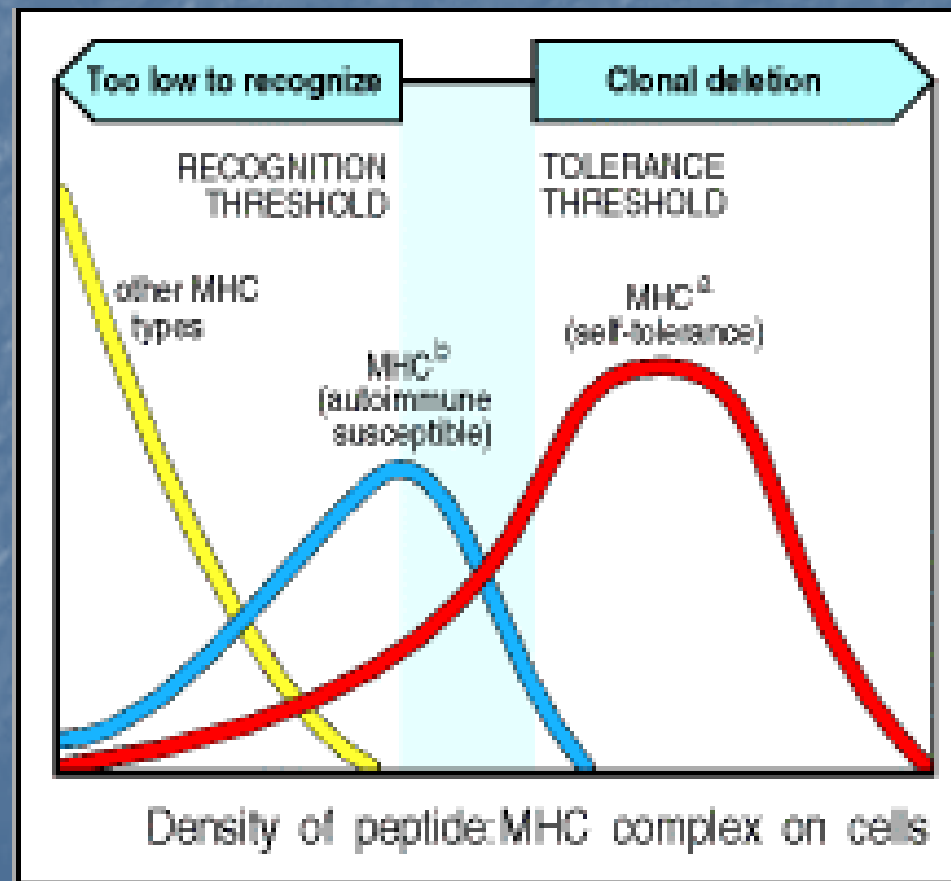
Autoantigeni

- Un autoantigene deve essere espresso ad un livello sufficiente da essere riconosciuto dalle T effettrici, ma abbastanza basso da non indurre tolleranza nelle T.
- Gli autoantigeni sono più spesso espressi selettivamente in un tessuto.
- Il numero di autoantigeni è relativamente limitato.

Autoantigeni e HLA

- Un autoantigene deve essere presentato alle cellule T dalle molecole HLA di classe I e II.
- L'attivazione della cellula T richiede l'interazione con una cellula presentante l'antigene che esprima HLA complessato con peptide antigenico e molecole costimolatorie.

Autoantigeni e HLA



Malattie autoimmuni

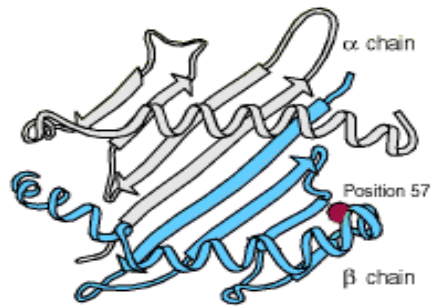
La suscettibilità ad una malattia autoimmune è determinata da fattori genetici:

- uno dei più importanti è il sistema HLA.

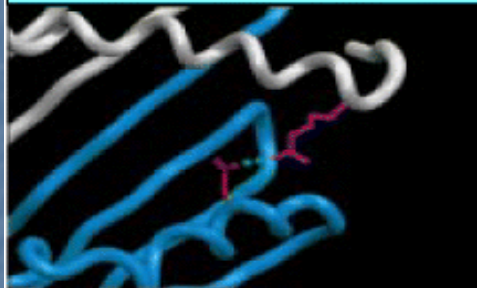
Associations of HLA serotype with susceptibility to autoimmune disease

Disease	HLA allele	Relative risk	Sex ratio (♀: ♂)
Ankylosing spondylitis	B27	87.4	0.3
Acute anterior uveitis	B27	10	<0.5
Goodpasture's syndrome	DR2	15.9	~1
Multiple sclerosis	DR2	4.8	10
Graves' disease	DR3	3.7	4-5
Myasthenia gravis	DR3	2.5	~1
Systemic lupus erythematosus	DR3	5.8	10-20
Type I insulin-dependent diabetes mellitus	DR3/DR4 heterozygote	~25	~1
Rheumatoid arthritis	DR4	4.2	3
Pemphigus vulgaris	DR4	14.4	~1
Hashimoto's thyroiditis	DR5	3.2	4-5

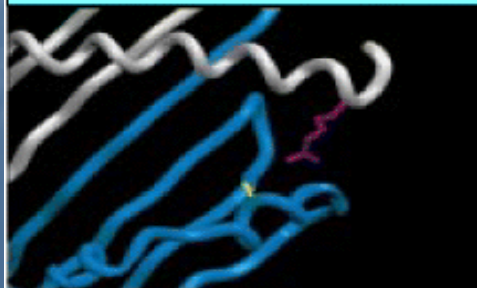
Position 57 of the DQ β chain affects susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)



Associated with resistance to IDDM



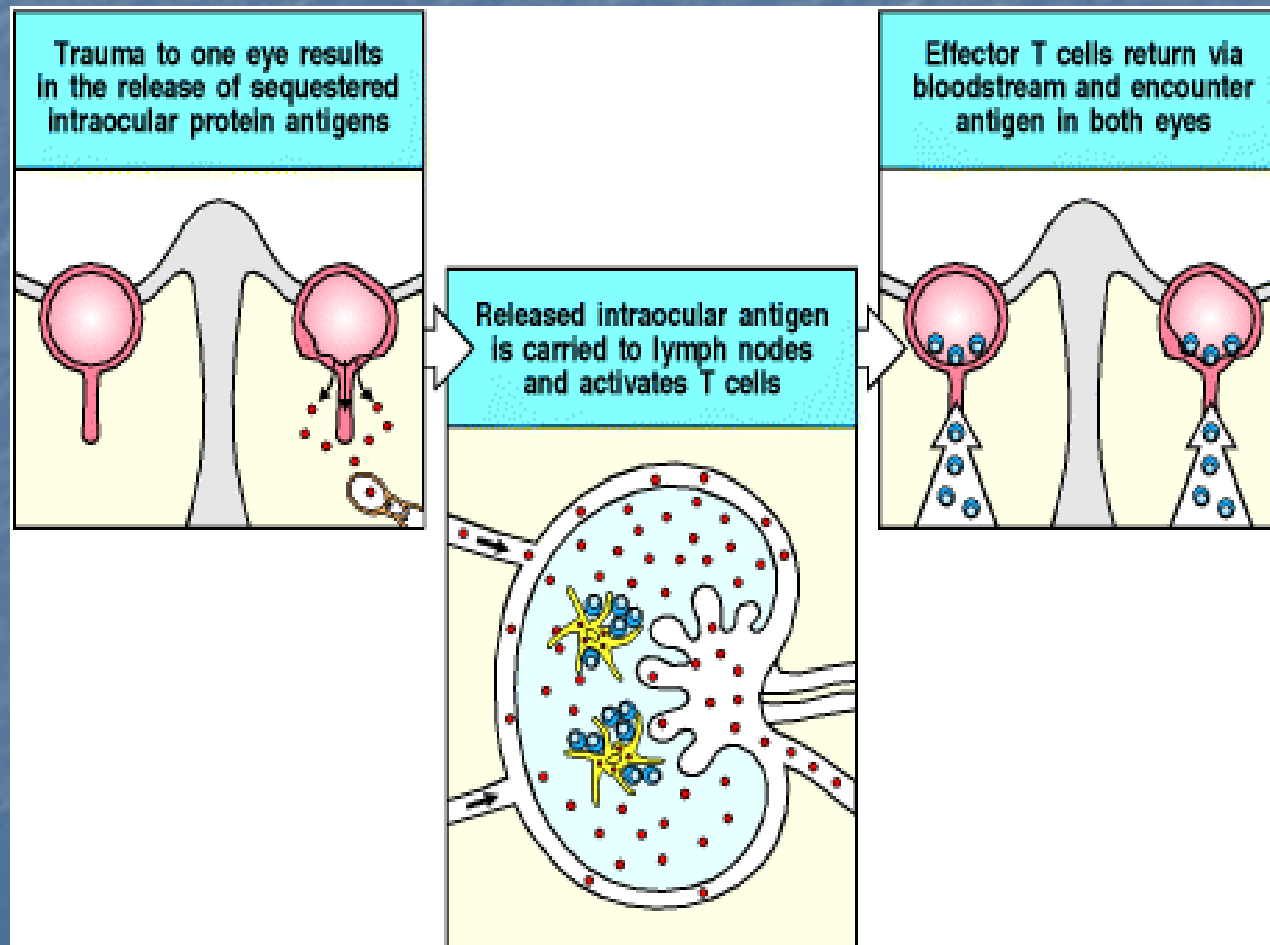
Associated with susceptibility to IDDM



**Siti immunologicamente privilegiati:
linfociti esclusi da barriere anatomiche; produzione
locale di citochine “soppressive”;
espressione di FAS ligand**

Immunologically privileged sites
Brain
Eye
Testis
Uterus (fetus)
Hamster cheek pouch

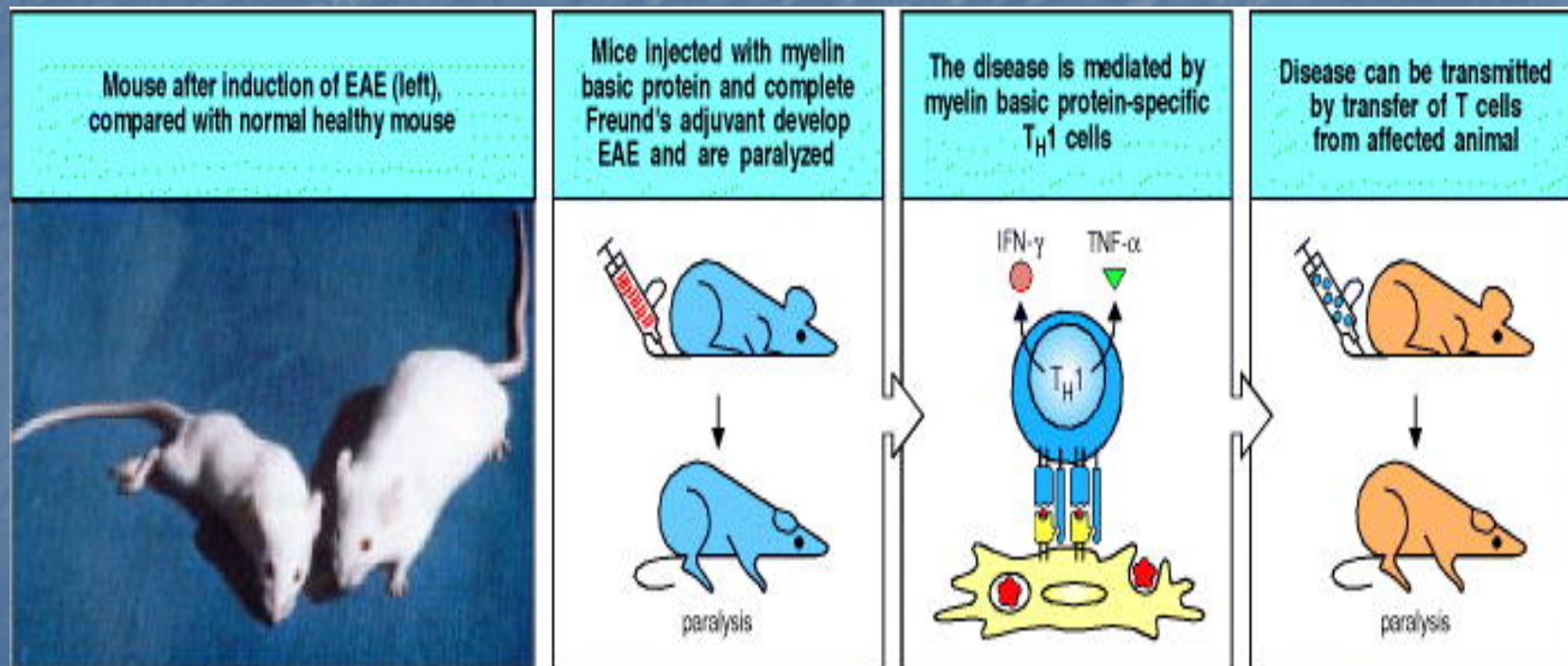
Oftalmia simpatica



Autoantigeni in siti immunologicamente privilegiati

- ↳ Non inducono tolleranza nè attivazione di cellule T.
- ↳ Se le T sono attivate (es. a seguito di infezioni) possono diventare l'oggetto di una risposta autoimmune e dell'attacco di cellule effettrici.

Encefalomielite autoimmune sperimentale



Diseases mediated by autoantibodies against cell-surface receptors

Syndrome	Antigen	Consequence
Graves' disease	Thyroid-stimulating hormone receptor	Hyperthyroidism
Myasthenia gravis	Acetylcholine receptor	Progressive weakness
Insulin-resistant diabetes	Insulin receptor (antagonist)	Hyperglycemia, ketoacidosis
Hypoglycemia	Insulin receptor (agonist)	Hypoglycemia

Fattore reumatoide

Anticorpo di classe IgM, IgG o IgA specifico per vari epitopi sulla parte CH2 e CH3 della porzione Fc delle IgG

L'interazione con l'epitopo avviene fuori dall'antigen binding site

Fattore reumatoide: determinazione

- A: IgM RF
 - Agglutinazione:
 - emazie di montone (test di Waaler-Rose) con IgG di coniglio
 - particelle di lattice o bentonite con IgG umane

Nefelometria: scala continua, maggior sensibilità e specificità

- ELISA
- B: IgG RF
 - Stessi metodi del IgM RF ma dopo eliminazione del IgM RF

Fattore reumatoide nell'artrite reumatoide

- 50-70% dei pazienti con AR
- Pazienti sieronegativi con AR possono avere:
 - FR IgM “nascosto”
 - FR IgG

Pazienti sieronegativi hanno malattia meno grave

Fattore reumatoide nell'artrite reumatoide

- RF nell'AR
 - alto titolo, alta affinità, molto eterogenei nella struttura, mutati
- RF nei soggetti normali:
 - basso titolo, bassa affinità, poco eterogenei nella struttura, non mutati.

Positività del fattore reumatoide

- Soggetti normali: 2% (5-10% se anziani)
- Malattie autoimmuni
 - AR, LES, MCTD, SS
- Infezioni
 - virali: es. HIV, HCV, HBV, EBV
 - parassitarie: es. Malaria
 - batteriche: es. Tubercolosi, brucellosi
- Malattie neoplastiche

Gli autoanticorpi più comunemente ricercati nelle malattie autoimmuni sistemiche

- ANA (anticorpi anti-nucleo)
- Anticorpi anti-DNA
- Anticorpi anti-ENA
- Anticorpi anti-fosfolipidi
- ANCA

Anticorpi anti-fosfolipidi

Si determinano mediante ELISA o con un test “funzionale” (LAC)

Specificità (ELISA)

- Anticorpi anti-fosfolipidi
- Anticorpi anti- b2 glicoproteina
- Anticorpi anti-complesso b2 glicoproteina-fosfolipidi
- Anticorpi anti-protrombina

Anticorpi anti-fosfolipidi

- Gli anticorpi che reagiscono con fosfolipidi “isolati” sono spesso prodotti in modo transitorio nelle malattie infettive
- Gli anticorpi che hanno attività protrombotica sono diretti contro complessi proteina-fosfolipide o contro la protrombina o la b2 glicoproteina

Il Lupus Anticoagulante

- il test, eseguito su plasma, si articola in:
 - ↪ valutazione del tempo di coagulazione con un test fosfolipidi-dipendente (KCT, aPTT, DRVVT, etc.);
 - ↪ mancata correzione dell'eventuale prolungamento con mixing di plasma normale;
 - ↪ correzione ottenuta con aggiunta di fosfolipidi;