



Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università di Pavia

Diagnosi delle amiloidosi sistemiche

Linee Guida 2011 - 2012

Sommario

1. Introduzione.....	3
2. Quando sospettare un'amiloidosi sistemica?.....	4
3. Come diagnosticare un'amiloidosi sistemica?.....	5
3.1 Individuazione dei depositi di amiloide	5
3.1.1. Esecuzione dell'agoaspirato di grasso periombelicale	5
3.1.2 Colorazione con rosso Congo (secondo Westermark)	6
3.1.3 Interpretazione dell'agoaspirato di grasso periombelicale.....	7
3.2 Tipizzazione dei depositi di amiloide	7
3.2.1 Indagini genetiche.....	8

1. Introduzione

I metodi e le procedure impiegate nella diagnosi e nella tipizzazione delle amiloidosi sistemiche in Italia presentano una grande eterogeneità nei vari centri che fanno parte del Gruppo di Studio Italiano per l'Amiloidosi. In particolare, il Gruppo ha individuato alcuni punti critici che portano a difformità rilevanti nella pratica clinica dei diversi centri:

- la tecnica di esecuzione dell'agoaspirato di grasso periombelicale,
- la procedura di colorazione con rosso Congo,
- i metodi impiegati per la tipizzazione.

Per superare queste difficoltà, nella riunione del 2 aprile 2011, è stato convocato un gruppo di esperti della Società Italiana per l'Amiloidosi, cui ha partecipato anche il Prof. Per Westermark (Uppsala, Svezia), che ha raggiunto il consenso riportato in queste linee guida.

2. Quando sospettare un'amiloidosi sistemica?

Il sospetto diagnostico di amiloidosi deve essere posto in presenza di uno o più dei segni clinici di seguito elencati, in un contesto clinico suggestivo.

- Cardiomiopatia ipertrofica all'esame ecocardiografico. Si deve tenere presente che questo segno è spesso tardivo e rilevabile soltanto quando si è instaurato un grave danno funzionale del cuore, in particolare nell'amiloidosi AL.
La presenza di aumentata ecoriflettenza del miocardio accresce il sospetto ecocardiografico di amiloidosi, ma non è indispensabile per richiedere un approfondimento diagnostico.
La presenza di bassi voltaggi periferici all'ECG accresce ulteriormente il sospetto clinico, ma non è indispensabile per richiedere un approfondimento diagnostico.
- Cardiomiopatia ipertrofica con "*late enhancement*" alla RMN cardiaca con gadolinio.
- Concentrazione elevata (>332 ng/L) di NT-proBNP (o di BNP) in un paziente con gammopatia monoclonale.
- Proteinuria glomerulare con albuminuria superiore a 0.5 g/24 ore, con o senza insufficienza renale.
- Neuropatia periferica assonale, prevalentemente sensitiva (soprattutto termica e dolorifica, anche con elettro-neurografia negativa) associata a segni/sintomi disautonomici, a rapido peggioramento.
- Ipogonadismo ipergonadotropo con ingrossamento testicolare, dopo esclusione di processi proliferativi.
- Macroglossia.
- Porpora periorbitale e/o alla base del collo.
- Epatomegalia senza lesioni focali con elevati indici di colestasi.
- Ipotensione ortostatica con episodi lipotimici e/o sincopali.
- Diarrea cronica con malassorbimento e calo ponderale.
- Familiarità per amiloidosi ereditaria.

Quando sono presenti le condizioni sopraelencate, i seguenti criteri rafforzano il sospetto clinico di amiloidosi sistemica, ma non costituiscono elementi indispensabili per indurre un approfondimento diagnostico:

- l'età adulta del paziente;
- la presenza di uno o più dei seguenti sintomi: astenia, calo ponderale, disgeusia, impotenza;
- la presenza di una componente monoclonale sierica e/o urinaria all'immunofissazione e/o un rapporto κ/λ alterato alla determinazione delle catene leggere libere circolanti, con o senza diagnosi di mieloma multiplo;
- la presenza di familiarità per cardiomiopatia o nefropatia o neuropatia periferica;
- la presenza di una patologia cronica associata ad un quadro di flogosi persistente.

3. Come diagnosticare un'amiloidosi sistemica?

L'approccio diagnostico si fonda sui seguenti tre accertamenti fondamentali:

1. la dimostrazione di materiale birifrangente in luce polarizzata dopo colorazione con rosso Congo;
2. la tipizzazione dei depositi di amiloide con l'individuazione certa della proteina amiloidogenica;
3. l'identificazione di una mutazione amiloidogenica nota associata alla dimostrazione di depositi di amiloide (nelle amiloidosi ereditarie);

La tipizzazione immunoistochimica deve essere coerente con il quadro clinico.

3.1 Individuazione dei depositi di amiloide

La diagnosi di amiloidosi deve fondarsi sul riscontro istologico di depositi di materiale con birifrangenza verde mela all'osservazione in luce polarizzata dopo colorazione con rosso Congo.

Accertamenti strumentali (per esempio RMN cardiaca o scintigrafia) possono suscitare il sospetto di amiloidosi, ma non sono sufficienti per formulare la diagnosi.

L'indagine di elezione è costituita dall'agoaspirato di grasso periombelicale, che ha buona sensibilità (82%) e specificità (94%).

Se il grasso periombelicale non è diagnostico, la presenza di un quadro clinico suggestivo (in base ai criteri di ingresso indicati in precedenza) rende necessario insistere nella ricerca, estendendo l'indagine bioptica ad altri tessuti. In primo luogo si propone la biopsia delle ghiandole salivari minori labiali. Questa indagine ha una sensibilità del 58% in pazienti con amiloidosi sistemica e agoaspirato di grasso periombelicale negativo.

Se anche la biopsia delle ghiandole salivari minori labiali è negativa, se il sospetto diagnostico persiste, dopo aver considerato il rischio emorragico relativo del paziente, si può procedere alla biopsia dell'organo coinvolto.

3.1.1. Esecuzione dell'agoaspirato di grasso periombelicale

Occorrente:

- Disinfettante cutaneo e garze.
- Cloruro di etile spray per l'anestesia locale superficiale.
- Aghi da 19 G (o 18 G ma l'uso di questi aghi aumenta il rischio di contaminazione con sangue).
- Siringhe da 20 mL
- Vetrini porta-oggetto.

Procedura:

1. Verificare l'assenza di ernia ombelicale, chiedendo al paziente supino di porsi a sedere sul letto senza aiuto.
2. Identificare la zona del prelievo, 2 - 3 cm a lato della cicatrice ombelicale e disinfettare la cute.
3. Anestetizzare la zona.
4. Inserire l'ago tenendolo tangenziale al piano cutaneo e portare lo stantuffo della siringa in aspirazione tra -15 e -20 mL, effettuando movimenti di "avanti e indietro" nel tessuto sottocutaneo. Si raccomanda massima attenzione a rimanere nello spazio sottocutaneo.
5. Quando il grasso è aspirato, compare come piccolo deposito giallastro alla base dell'ago. Occorre ora far ritornare lo stantuffo in posizione "-1 mL" ed estrarre la siringa.
6. Il grasso così ottenuto deve essere tolto con attenzione dall'ago e dalla siringa, aiutandosi con un altro ago e deve essere posto su un vetrino. Se il prelievo presenta contaminazione ematica, occorre ripulirlo dal sangue in eccesso.
7. Separare il grasso in frammenti di circa 4 mm di diametro, ponendone ognuno su di un vetrino diverso.
8. Coprire il campione con un altro vetrino porta-oggetto e schiacciare energicamente il materiale tra i due vetrini, senza strisciarlo.
9. Infine, separare i vetrini, sempre senza strisciarli.

Se il primo prelievo non fornisce una quantità di materiale sufficiente, è possibile ripetere la procedura dall'altro lato dell'ombelico.

Il prelievo può essere eseguito anche su soggetti molto magri, poiché è sempre possibile trovare una minima quantità di tessuto adiposo in zona periombelicale. Controindicazioni alla procedura sono la presenza d'importanti ernie ombelicali o diastasi dei retti addominali e la diatesi emorragica (inclusa la terapia anticoagulante).

Una volta preparati i vetrini non devono essere fissati, ma è sufficiente che si asciughino prima della colorazione.

3.1.2 Colorazione con rosso Congo (secondo Westermarck)

Si esegue usando una soluzione di base sopparsatura di rosso Congo contenente cloruro di sodio in etanolo all'80% (durata 1 anno al riparo dalla luce). La soluzione colorante si ottiene filtrando su carta bibula a doppio strato un'aliquota della soluzione base (diluire il filtrato 1:20 in cloruro di sodio in etanolo all'80%, quindi aggiungere 1% di NaOH all'1%). La soluzione di colorazione, così ottenuta, deve essere preparata al momento dell'uso e conservata al massimo 24 ore.

Esecuzione:

1. Fissare i vetrini con acetone, quindi porre la soluzione colorante sui preparati (ne occorrono circa 2.5 ml per ogni vetrino).

2. Dopo 90 minuti di colorazione, eliminare l'eccesso di colorante lavando rapidamente i vetrini sotto acqua corrente.
3. I vetrini, lasciati asciugare in termostato a 37°C, sono inclusi con DPX (porre una goccia di DPX su un vetrino copri-oggetto e lasciare aderire delicatamente sul vetrino porta-oggetto).

Preparazione del rosso Congo:

- 80% etanolo al 95%: 800 mL
- 20% acqua distillata: 200 mL
- 0.3% Rosso Congo: 3 g

Versare il tutto in un cilindro da 1 L ed agitare un'ora. Quindi, in agitazione, aggiungere 20 g di NaCl. Coprire il cilindro con carta stagnola e lasciare in agitazione ON. Trasferire in una beuta e conservare per un anno (avvolgere la beuta con carta stagnola).

Si ricorda che il rosso Congo è una sostanza cancerogena ed è necessario mettere in atto le opportune precauzioni per minimizzare il rischio degli operatori.

3.1.3 Interpretazione dell'agoaspirato di grasso periombelicale

I vetrini di grasso periombelicale devono essere esaminati al microscopio ottico in luce polarizzata (con una potente fonte di luce).

Sono diagnostiche aree con ben definita birifrangenza verde mela. Anche la positività focale (presenza di poche aree con birifrangenza) è sufficiente per porre diagnosi.

È consigliato riportare nel referto la quantità di aree birifrangenti, perché questo permette di prevedere la facilità di tipizzare l'amiloide sul tessuto in esame.

3.2 Tipizzazione dei depositi di amiloide

La tipizzazione immunoistochimica o proteomica dei depositi di amiloide è indispensabile per il completamento della diagnosi.

Non è corretto iniziare la terapia in assenza di una tipizzazione certa dei depositi di amiloide. Nell'insieme, infatti, il rischio di un errore nella definizione della natura della malattia non è trascurabile, poiché l'associazione di due potenziali cause di amiloidosi concomitanti nello stesso paziente (ad esempio la presenza di una componente monoclonale in un paziente con una mutazione genetica di transtiretina o apolipoproteina A-I, o con una patologia infiammatoria cronica) non è un evento infrequente.

La caratterizzazione immunoistochimica richiede l'impiego di anticorpi diretti contro le diverse proteine amiloidogeniche. Per il momento, **l'immunoistochimica in microscopia ottica (come anche l'immunofluorescenza su preparati renali) non è sufficientemente sensibile e specifica per permettere una tipizzazione inequivocabile dei depositi** nell'amiloidosi AL, mentre gli anticorpi anti-SAA hanno una buona specificità.

Fino a che non saranno disponibili anticorpi con migliori sensibilità e specificità l'uso delle tecniche in microscopia ottica potrà essere considerato sufficiente soltanto nei seguenti casi:

- depositi di amiloide immunoreattivi all'anticorpo anti-SAA (diagnosi di amiloidosi AA);
- depositi immunoreattivi alla transtiretina in presenza di una mutazione in questo gene (diagnosi di amiloidosi da transtiretina).

Per il momento, in tutti gli altri casi è indicata la **caratterizzazione ultrastrutturale delle fibrille di amiloide mediante l'uso di anticorpi marcati con particelle d'oro**. In casi particolarmente difficili, le **tecniche di proteomica** consentono di identificare in modo inequivocabile la proteina che forma i depositi di amiloide.

3.2.1 Indagini genetiche

La diagnosi di amiloidosi ereditaria si fonda sulla dimostrazione di una mutazione patologica in uno dei seguenti geni: transtiretina; fibrinogeno; apolipoproteina A-I; lisozima; apolipoproteina A-II; gelsolina.