



Il ruolo della biopsia delle ghiandole salivari minori nella diagnosi di amiloidosi sistemica: risultati di uno studio retrospettivo su 62 pazienti

Paolo Milani¹, Giovanni Palladini¹, Andrea Foli¹, Roberto Caporali², Laura Verga¹,
Patrizia Morbini³, Laura Obici¹, Paola Russo¹, Gabriele Sarais¹, Simona Donadei¹,
Carlomaurizio Montecucco², Giampaolo Merlini¹

¹Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, ²S.C. di Reumatologica, ³S.C. di Anatomia Patologica, Università degli studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Il ruolo della biopsia delle ghiandole salivari minori nella diagnosi di amiloidosi sistemica: risultati di uno studio retrospettivo su 62 pazienti

La dimostrazione istologica dei depositi di amiloide è necessaria per la diagnosi di amiloidosi. Sono possibili approcci meno invasivi rispetto alla biopsia degli organi interessati, come ad esempio la biopsia del grasso periombelicale che la biopsia delle ghiandole salivari minori. Nell'amiloidosi AL la sensibilità dell'analisi del grasso periombelicale è di circa l'80%. Riportiamo i risultati dell'analisi di 62 biopsie delle ghiandole salivari di pazienti consecutivi in cui è stata sospettata un'amiloidosi sistemica ed è risultata negativa l'analisi del grasso periombelicale. I depositi di amiloide sono stati riscontrati per mezzo dell'analisi delle ghiandole salivari, in 7 pazienti dei 12 in cui è stata posta diagnosi di amiloidosi. I depositi sono stati caratterizzati come AL λ in 4 casi, AL κ in 2 e AA in 1. Nei rimanenti 5 pazienti la diagnosi di amiloidosi è stata posta attraverso l'analisi di una biopsia d'organo, e caratterizzata come λ in 3 soggetti e κ in 2. Complessivamente la sensibilità diagnostica della biopsia delle ghiandole salivari è risultata del 58%, la specificità del 100% e il valore predittivo negativo del 91%. Un approccio diagnostico sequenziale basato sull'utilizzo della biopsia delle ghiandole salivari come secondo step diagnostico può permettere di limitare la biopsia d'organo in circa la metà dei pazienti con amiloidosi sistemica.

The role of minor salivary gland biopsy in the diagnosis of systemic amyloidosis: results of a prospective study in 62 patients

Histological demonstration of amyloid deposits is required for the diagnosis of amyloidosis. Less invasive approaches than the biopsy of the organs involved, such as abdominal fat and salivary gland biopsy are feasible. In AL amyloidosis the sensitivity of abdominal fat aspiration is approximately 80%. We report the results of salivary gland biopsy in 62 consecutive patients with suspected systemic amyloidosis and negative abdominal fat aspirates. Amyloid deposits were detected in 7 of the 12 patients in whom amyloidosis was eventually diagnosed.

The deposits were characterized as AL λ in 4 cases, AL κ in 2 and AA in 1. In the remaining 5 patients amyloidosis was diagnosed by organ biopsy, and characterized as λ in 3 subjects and κ in 2. Overall, the diagnostic sensitivity of the salivary gland biopsy in patients with negative fat aspirate was 58%, specificity 100% and negative predictive value 91%. A sequential diagnostic approach based on second step salivary gland biopsy can spare organ biopsy to more than half the patients with systemic amyloidosis.

Introduzione

La dimostrazione istologica e un'accurata caratterizzazione dei depositi di amiloide sono centrali nella diagnosi di amiloidosi [1-2]. Quando è sospettata l'amiloidosi, deve essere ottenuta una documentazione istologica. Sebbene recenti studi clinici non abbiano confermato la presenza di un aumentato rischio emorragico associato con la biopsia d'organo nell'amiloidosi sistemica, la possibilità di effettuare una biopsia meno invasiva, rispetto a quella dell'organo interessato, prelevando ad esempio il grasso addominale o le ghiandole salivari minori, rappresenta un'alternativa utile. In un ampio gruppo di pazienti visitati presso il nostro centro per il sospetto di amiloidosi sistemica, abbiamo recentemente riportato che la sensibilità dell'analisi del grasso periombelicale è dell'87% [3]. Quindi, circa il 15% dei pazienti con amiloidosi sistemica non è diagnosticato tramite il solo agoaspirato di grasso periombelicale. La biopsia delle ghiandole salivari minori è una tecnica sicura e semplice che ha un'elevata sensibilità per la diagnosi di amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche (AL) [4-7], come anche per la diagnosi dell'amiloidosi associata a polineuropatia familiare di tipo portoghese [8]. In questo studio riportiamo i risultati di un approccio sequenziale in cui è stata impiegata la biopsia delle ghiandole salivari minori come seconda indagine diagnostica in pazienti con sospetta amiloidosi sistemica e agoaspirato di grasso periombelicale negativo.

Materiali e metodi

Sono stati arruolati nello studio sessantadue pazienti, valutati presso il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche tra il 2002 e il 2007, per sospetta amiloidosi sistemica, in cui non sono stati riscontrati depositi di amiloide all'analisi del grasso periombelicale e che sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari minori. Tutti i pazienti hanno dato il proprio consenso informato scritto in accordo con le linee guida adottate dalla Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. In tutti i pazienti è stata ricercata la presenza del clone plasmacellulare tramite un'immunofissazione ad alta risoluzione di siero ed urine e tramite la quantificazione delle catene leggere libere circolanti. Le mutazioni associate a forme ereditarie di amiloidosi sistemica sono state ricercate tramite l'analisi del DNA. La biopsia delle ghiandole salivari minori è stata effettuata presso il dipartimento di Reumatologia della Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico San Matteo di Pavia come descritto in precedenza [4]. I pezzi biotici sono stati fissati in formalina e successivamente colorati con ematossilina-eosina e con la colorazione al Rosso Congo. Tale colorazione è stata eseguita in accordo con le linee guida di Westermarck *et al.*[9] i campioni risultati positivi sono stati analizzati attraverso un'analisi in microscopia elettronica [10]. Le sezioni ultrasottili sono state colorate tramite uranile acetato 5% ed analizzate con microscopio elettronico Philips CM2. Sono stati utilizzati anticorpi mono o policlonali per caratterizzare la malattia. Nei pazienti con biopsia delle ghiandole negativa, la diagnosi di amiloidosi è stata esclusa tramite un follow-up di due anni dopo la biopsia.

Risultati e conclusioni

Sessantadue pazienti sono stati inclusi nello studio. L'età mediana era 62 anni (intervallo 29-79 anni) e il 68% erano maschi. In trentanove pazienti (63%) è stata identificata una componente monoclonale. La componente monoclonale era κ in 15 pazienti (24%), λ in 21 pazienti (34%), e in 3 pazienti (5%) è stata identificata una gammapatia biclonale. Le caratteristiche cliniche che hanno condotto al sospetto di amiloidosi sistemica sono state sindrome nefrosica in 39 pazienti (63%), 18 pazienti (29%) avevano un elevato spessore del setto interventricolare (mLVW), in 15 pazienti (24%) era presente sindrome del tunnel carpale e neuropatia periferica in 13 soggetti (21%).

L'esame in microscopia ottica delle ghiandole salivari ha permesso di identificare depositi di amiloide in 7 pazienti (11%). L'analisi immunoistochimica in microscopia elettronica è stata eseguita in tutti i campioni che sono stati giudicati positivi alla microscopia ottica, per identificare il tipo di amiloidosi. Le fibrille di amiloide sono state identificate in tutti i sette pazienti esaminati e lo studio immunoistochimico ha permesso di definire in quattro casi un'amiloidosi AL λ , AL κ in due casi e AA in un caso. Nei sei pazienti con amiloidosi AL è stata identificata una componente monoclonale dello stesso tipo rispetto alla catena leggera identificata nei depositi. Nel paziente con amiloidosi AA la causa dell'infiammazione cronica non è nota. Il paziente, un uomo di 43 anni di origine africana, si è presentato con una grave insufficienza epatica e renale ed è deceduto due giorni dopo la biopsia delle ghiandole salivari minori. L'autopsia non è stata effettuata.

È stata posta diagnosi di amiloidosi sistemica in altri 5 pazienti in cui sia l'agoaspirato di grasso periombelicale che la biopsia delle ghiandole salivari sono risultati negativi (Tabella 1). In due casi la diagnosi si è basata su una biopsia renale e in tre pazienti su una biopsia endomiocardica. Una biopsia renale e tre biopsie endomiocardiche sono state eseguite presso il nostro centro e i depositi di amiloide sono stati caratterizzati per mezzo di un'analisi immunoistochimica in microscopia elettronica come AL λ nelle 3 biopsie cardiache e AL κ nella biopsia renale. Nell'altro paziente, la biopsia renale non è stata eseguita presso il nostro centro e i depositi di amiloide sono stati caratterizzati come AL κ (Tabella 1). Nei rimanenti 50 pazienti la diagnosi di amiloidosi sistemica è stata esclusa definitivamente con un follow-up di due anni dopo la biopsia delle ghiandole. In 11 soggetti su 12 (90%) con amiloidosi sistemica erano presenti due o più caratteristiche cliniche che potevano portare al sospetto di amiloidosi sistemica al momento della presentazione clinica, rispetto a 35 su 50 (70%) di coloro nei quali la diagnosi di amiloidosi è stata successivamente esclusa. Questa differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0.13$). Complessivamente, la sensibilità della biopsia delle ghiandole salivari in pazienti con agoaspirato di grasso periombelicale negativo è del 58%, la specificità è del 100% e il valore predittivo negativo è del 91%.

In studi precedenti, la sensibilità di questa tecnica è stata dell'80-86% [6-7]. Noi abbiamo osservato una minore sensibilità (58%). Questa differenza può essere spiegata dal fatto che in questo gruppo di pazienti sono stati inclusi solo i pazienti con un agoaspirato di grasso periombelicale negativo. Quest'approccio diagnostico sequenziale basato sulla biopsia delle ghiandole salivari come secondo *step* diagnostico in pazienti con agoaspirato di grasso periombelicale negativo, permette di risparmiare la biopsia d'organo in circa la metà dei pazienti con amiloidosi sistemica. Tuttavia, circa il 9% dei pazienti con amiloidosi sistemica non hanno depositi di amiloide né nel grasso periombelicale né nelle ghiandole salivari minori labiali. Tale dato non è trascurabile, soprattutto considerando la severità della malattia e la necessità di eseguire una diagnosi precoce. Perciò, la biopsia d'organo deve essere presa in considerazione in casi in cui sussista il sospetto di amiloidosi sistemica anche se il grasso periombelicale e la biopsia delle ghiandole salivari labiali sono negativi.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche dei 12 pazienti con amiloidosi sistemica e biopsia del grasso periombelicale negativa, che sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari.

ID	Biopsia GS	IEM su biopsia GS	MC tipo	Biopsia d'organo positiva	IEM su biopsia d'organo	Interessamento d'organo
1	positivo	AL λ	λ	non eseguita	non eseguita	SNP
2	positivo	AL λ	λ	non eseguita	non eseguita	cuore, rene, fegato
3	positivo	AL κ	κ	non eseguita	non eseguita	cuore, rene
4	positivo	AL κ	biclonale	non eseguita	non eseguita	cuore, fegato
5	positivo	AA	no	non eseguita	non eseguita	rene, fegato
6	positivo	AL λ	λ	non eseguita	non eseguita	SNP, tessuti molli
7	positivo	AL λ	λ	non eseguita	non eseguita	cuore, tessuti molli
8	negativo	n.a.	λ	cuore	AL λ	cuore, rene
9	negativo	n.a.	biclonale	rene	AL κ^*	rene, fegato
10	negativo	n.a.	λ	cuore	AL λ	cuore, tessuti molli
11	negativo	n.a.	κ	rene	AL κ	rene, GI
12	negativo	n.a.	λ	cuore	AL λ	cuore, rene

*la microscopia elettronica non è stata effettuata, la caratterizzazione è avvenuta per mezzo di immunofluorescenza su biopsia renale.
 Abbreviazioni: GS: ghiandole salivari; IEM: immunistoichimica in microscopia elettronica; O: organo; MC: componente monoclonale; GI: tratto gastrointestinale; SNP:sistema nervoso periferico; TM tessuti molli n.a.: non applicabile; n.e. non eseguita.

Bibliografia

1. Lachmann HJ, Booth DR, Booth SE et al. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *N Engl J Med* 2002;346(23):1786-1791.
2. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH et al. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis, Tours, France, 18-22 April 2004. *Am J Hematol* 2005;79(4):319-328.
3. Obici L, Perfetti V, Palladini G et al. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta* 2005;1753(1):11-22.
4. Caporali R, Bonacci E, Epis O et al. Safety and usefulness of minor salivary gland biopsy: retrospective analysis of 502 procedures performed at a single center. *Arthritis Rheum* 2008;59(5):714-720.
5. Delgado WA, Mosqueda A. A highly sensitive method for diagnosis of secondary amyloidosis by labial salivary gland biopsy. *J Oral Pathol Med* 1989;18(5):310-314.
6. Hachulla E, Janin A, Flipo RM et al. Labial salivary gland biopsy is a reliable test for the diagnosis of primary and secondary amyloidosis. A prospective clinical and immunohistologic study in 59 patients. *Arthritis Rheum* 1993;36(5):691-697.
7. Fatihi E, Zahiri K, Hachim K et al. Value of the biopsy of accessory salivary glands in amyloidosis. *Rev Med Interne* 1999;20(9):759-761.
8. Do Amaral B, Coelho T, Sousa A et al. Usefulness of labial salivary gland biopsy in familial amyloid polyneuropathy Portuguese type. *Amyloid* 2009;16(4):232-238.
9. Westermarck P, Davey E, Lindbom K et al. Subcutaneous fat tissue for diagnosis and studies of systemic amyloidosis. *Acta Histochem* 2006;108(3):209-213.
10. Arbustini E, Verga L, Concardi M et al. Electron and immuno-electron microscopy of abdominal fat identifies and characterizes amyloid fibrils in suspected cardiac amyloidosis. *Amyloid* 2002;9(2):108-114.