

## Capitolo 10: *DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI NELLA PRATICA CLINICA*

### 10-6 AUTOANTICORPI ANTI-NUCLEARI (ANA)

Gli autoanticorpi anti-antigeni nucleari (ANA) rappresentano una nutrita famiglia di autoanticorpi non-organo e non-specie-specifici la cui rilevazione è di grande importanza nella diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS). Di recente sono state codificate delle linee guida per una corretta valutazione degli anticorpi antinucleo (ANA), degli anticorpi anti-dsDNA e degli anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA).

Da circa un decennio la continua revisione dei criteri clinico-laboratoristici per la diagnosi delle principali MAIS ha attribuito un ruolo maggiore alla diagnostica di laboratorio, dato che attualmente la presenza di criteri diagnostici riferiti all'assetto sierologico autoanticorpale del paziente rappresenta un requisito insostituibile per la diagnosi clinica. A solo scopo esemplificativo si ricorda che:

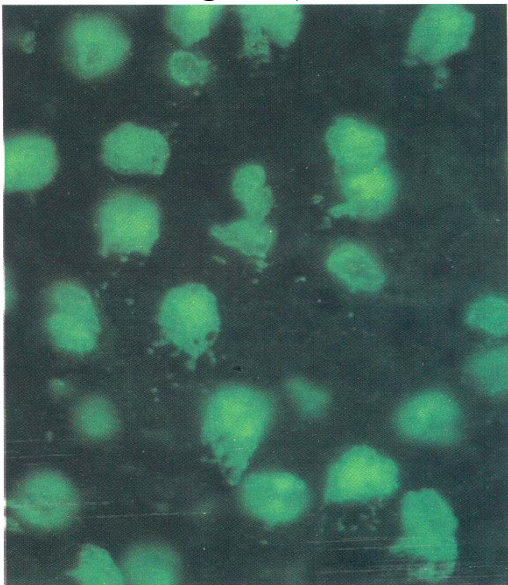
- a) La positività nel siero di autoanticorpi anti-nucleo (ANA) o la presenza di anticorpi anti-dsDNA o anti-Sm costituiscono 2 degli 11 criteri utilizzati per la diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES);
- b) La positività di autoanticorpi anti-nucleo (ANA) a titolo elevato o la presenza di autoanticorpi anti-Ro/SSA o anti-La/SSB rappresentano criteri diagnostici per la sindrome di Sjögren;
- c) La presenza di autoanticorpi anti-Jo-1 costituisce un criterio per la diagnosi di dermatopolimiosite;
- d) La presenza di autoanticorpi anti-centromero (CENP) o anti-topoisomerasi (anti-Scl-70) rappresenta un criterio per la classificazione dei sottotipi di sclerosi sistemica, diffusa (dSSc) o limitata (lSSc);
- e) Un titolo elevato di anticorpi anti-RNP costituisce il principale criterio diagnostico per la connettivite mista.

Con l'eccezione dell'artrite reumatoide che colpisce circa l'1% degli individui adulti (cfr. Capitolo 7), le malattie autoimmuni sistemiche hanno un'incidenza non elevata nella popolazione; (nel complesso non più dello 0,5%). La presenza di autoanticorpi ANA senza significato clinico, a basso titolo, in soggetti sani o con patologie diverse dalle MAIS è un'evenienza relativamente frequente (20-25%), con possibilità che tale reperto non indichi l'esistenza di una malattia autoimmune sistemica. Tuttavia, date le tipiche modalità di esordio delle MAIS, in genere con andamento subdolo e graduale, è possibile un riscontro casuale di alterazioni degli esami di laboratorio in soggetti asintomatici.

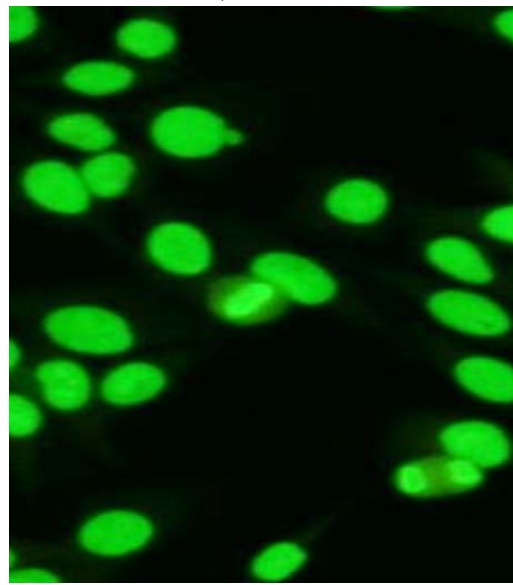
Nelle malattie autoimmuni sistemiche il reperto sierologico fondamentale è la presenza di **autoanticorpi anti-nucleo**, che rappresenta un criterio importante per la diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES), sindrome di Sjögren (SS), sclerosi sistemica progressiva (SSp), dermatomiosite-polimiosite (DM/PM) e della malattia mista del connettivo (MMTC). Esistono inoltre forme cliniche con caratteristiche miste (overlap sindrome) o con quadri clinici indifferenziati. Va ricordato che la positività della determinazione di ANA ha un diverso peso diagnostico per le differenti MAIS. Dal momento che la maggior parte degli ANA appartiene all'isotipo IgG e che la rilevazione di anticorpi di classe IgM od IgA non aumenta di molto la sensibilità, la determinazione dei soli ANA IgG è ritenuta sufficiente nella ricerca di questi autoanticorpi. L'**immunofluorescenza indiretta** (IF) è la tecnica più usata per la determinazione degli anticorpi anti-nucleo per le sue caratteristiche di sensibilità, facilità di esecuzione e basso costo. Nella tecnica IF come substrato si possono utilizzare sezioni criostatiche di fegato e rene di ratto o linee cellulari epiteliali neoplastiche (HEp-2) ottenute da carcinoma laringeo umano; queste ultime presentano numerosi vantaggi rispetto ai tessuti murini: 1) buona visualizzazione di tutte le strutture cellulari, 2) presenza di una popolazione cellulare omogenea in monostrato, 3) capacità di esprimere antigeni presenti in tutte le fasi del ciclo cellulare, 4) possibilità di identificazione di anticorpi ristretti per antigeni nucleari peculiari della specie umana.

Vi è ampio consenso sul fatto che **la sola determinazione degli autoanticorpi anti-nucleo di classe**

**IgG con il metodo di immunofluorescenza indiretta (IF), sia sufficiente quale prima indagine nella diagnostica delle malattie autoimmuni sistemiche.** Nell'esecuzione del metodo IF si raccomanda l'impiego di cellule epiteliali da carcinoma laringeo umano (HEp-2, American Type Culture Collection CCL 23), in cui siano garantite l'espressione e l'integrità degli antigeni clinicamente significativi. Sono noti numerosi (circa 40) quadri IF di ANA, ma poco più di una decina sono ragionevolmente associati a quadri clinici; inoltre per molti autoanticorpi è stato identificato con certezza l'autoantigene bersaglio. Tra i quadri ANA con significato per la clinica i più frequenti sono:  
a) la **fluorescenza omogenea** (DNA, DNP, istoni) (Fig. 10-12a e 10-12b),

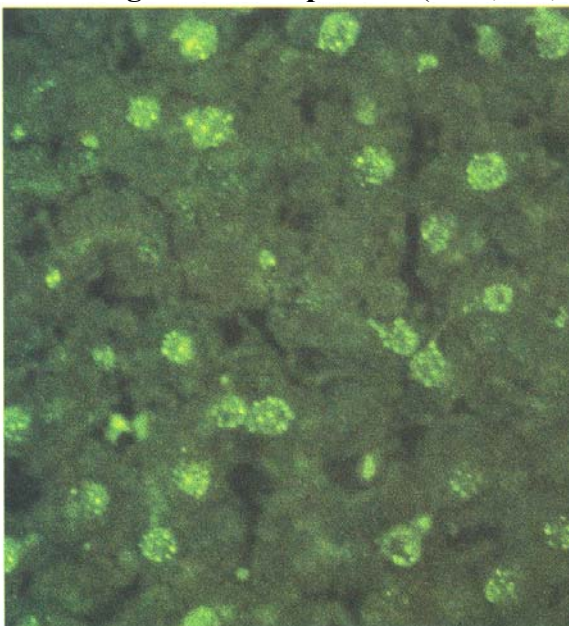


**Fig. 10-12a** (fegato di ratto)

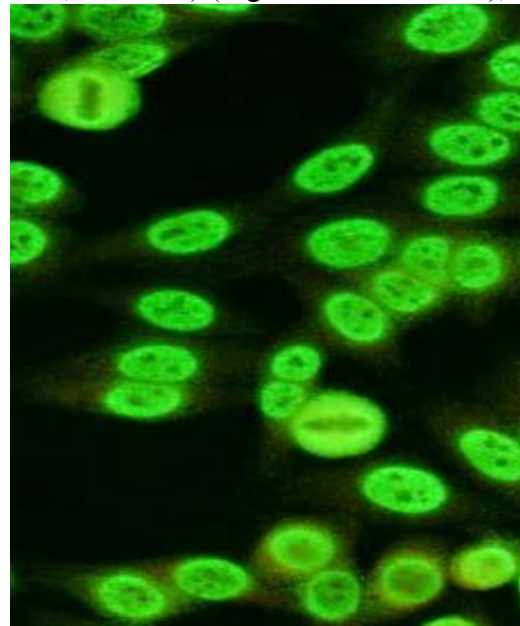


**Fig. 10-12b** (cellule Hep2)

b) **fluorescenza granulare o speckled** (RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La) (Fig. 10-13a e 10-13b),



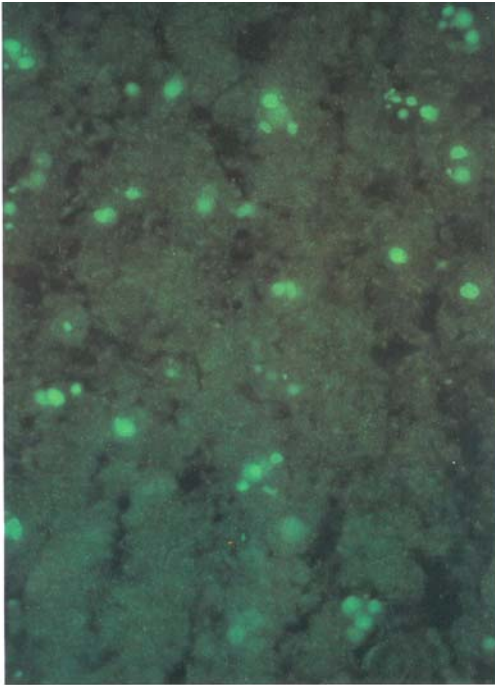
**Fig. 10-13a** (fegato di ratto)



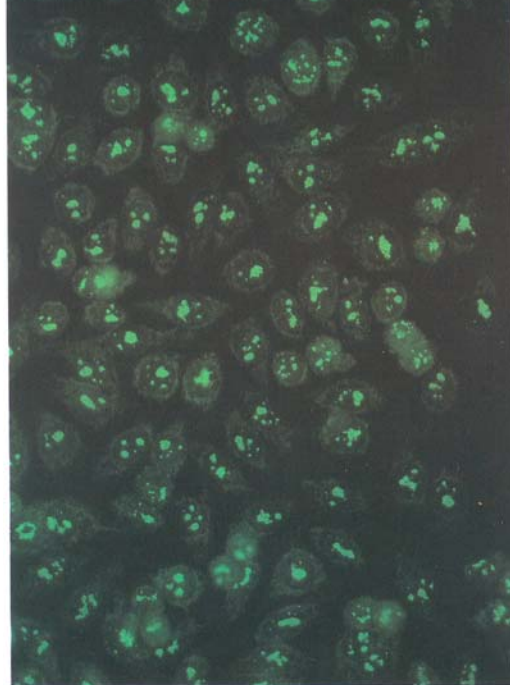
**Fig. 10-13b** (cellule Hep2)

c) **fluorescenza periferica** (DNA, DNP, istoni). Tra i quadri relativamente frequenti si sono la

d) **fluorescenza nucleolare** (PM/Scl, nucleolina, RNA polimerasi I) (Fig. 10-14a e 10-14b),

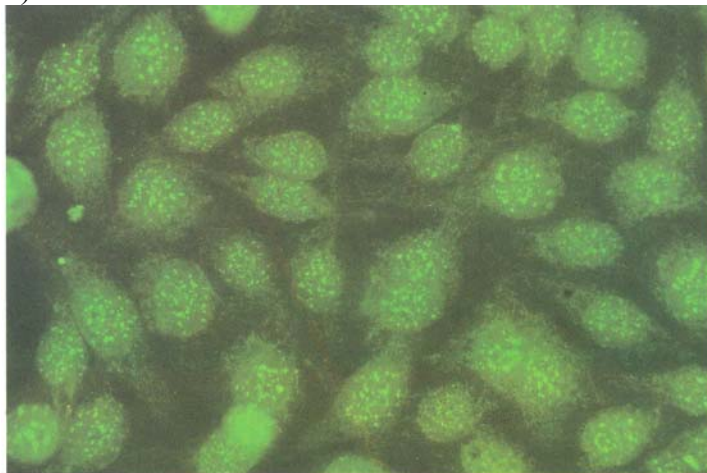


**Fig. 10-14a** (fegato di ratto)



**Fig. 10-14b** (cellule Hep2)

e) la **fluorescenza del centromero** (CENP-A,B,C) (Fig. 10-15), il quadro granulare-nucleolare (topoisomerasi I o Scl-70).



**Fig. 10-15** (cellule Hep2)

I quadri di fluorescenza citoplasmatici associati a patologia sono di riscontro relativamente poco frequente e sono costituiti dalla fluorescenza granulare (tRNA sintetasi), dalla fluorescenza mitocondriale (proteine del complesso piruvato deidrogenasi) (cfr. Capitolo 10-4), dalla fluorescenza ribosomiale (ribonucleoproteine ribosomiali), dalla fluorescenza dei filamenti del citoscheletro (actina, vimentina), dalla fluorescenza dell'apparato di Golgi e dei lisosomi.

Nella refertazione del test si consiglia la specificazione dei quadri di IF con un commento interpretativo sul rispettivo significato: a) quadri di positività a livello nucleare: omogeneo, granulare (speckled), periferico, nucleolare, centromerico; b) quadri di positività a livello citoplasmatico: granulare

(speckled), mitocondriale, ribosomiale, dell'apparato di Golgi, lisosomiale.

L'intensità di fluorescenza osservata in IF viene espressa in modi diversi: con una scala qualitativa ordinale di valori crescenti da + a ++++ (rapidità, a basso costo, per il ricorso ad una sola diluizione del siero); più correttamente la concentrazione anticorpale è espressa con il titolo (reciproco dell'ultima diluizione ancora reattiva). L'imprecisione connessa con l'uso delle diluizioni fanno preferire l'impiego di calibratori, tarati sul materiale standard di riferimento (WHO-IRP 66/233, pattern omogeneo) e l'espressione della concentrazione in Unità Internazionali (UI/mL).

Nel caso di espressione in titolo, la diluizione iniziale del campione raccomandata è 1:40 (pari a circa 5 UI/mL) e un titolo uguale o superiore a 1:160 (20 UI/mL) è da considerare positivo. ANA a basso titolo (1:40 - 1:80) possono essere presenti nei soggetti sani, in particolare in gravidanza, nelle donne sopra i 40 anni e negli anziani e, come epifenomeno senza significato clinico, in diverse patologie (infezioni virali, sindromi neurologiche paraneoplastiche, epatopatie, sindrome da stanchezza cronica, neoplasie, ecc.). Si tratta nella maggior parte dei casi di autoanticorpi naturali, a bassa avidità, cross-reattivi verso numerosi antigeni microbici e apteni chimici ambientali. Al contrario, gli autoanticorpi presenti nel siero dei pazienti affetti da MAIS sono in genere una miscela di autoanticorpi polireattivi di isotipo IgM e di autoanticorpi patogenetici ad alta avidità di isotipo IgG e IgA; i metodi di laboratorio abitualmente impiegati nei laboratori clinici non sono in grado di distinguere questi due tipi di autoanticorpi, per cui la diagnosi differenziale deve essere condotta necessariamente in base alla clinica del paziente ed ai livelli di autoanticorpi presenti nel siero. Bassi titoli di ANA (1:40) sono raramente presenti nei pazienti con MAIS, ma in circa il 32% dei soggetti sani; questa soglia presenta alta sensibilità e bassa specificità. Tuttavia essa può presentare valore diagnostico, nel caso in cui si vogliano classificare come ANA positivi virtualmente tutti i pazienti affetti da LES, sclerosi sistemica e sindrome di Sjögren. Elevati titoli di ANA (>1:160) sono presenti in molti pazienti, ma solo nel 5% dei soggetti sani: questa soglia presenta bassa sensibilità ed alta specificità. Tuttavia, a titoli inferiori a 1:160 i test EIA (vedi oltre, anti-dsDNA, anti-ENA, ecc) possono risultare positivi in circa il 5% dei casi. Titoli intermedi possono essere presenti in circa il 20% della popolazione sana e in una discreta percentuale di soggetti affetti. Una ragionevole griglia interpretativa suggerisce:

- titoli < 1:40 (5 UI/ml) vanno considerati negativi;
- titoli > 1:40 e < 1:160 (tra 5 e 20 UI/ml) vanno considerati bassi positivi; in assenza di elementi clinici, il dato va monitorato nel tempo;
- titoli  $\geq$  1:160 (> 20 UI/ml) sono da considerare positivi

Le variazioni dei titoli degli ANA non correlano con l'andamento clinico/biologico della malattia.

La negatività di un test per la ricerca di ANA in IF può riscontrarsi nelle malattie del connettivo sopra ricordate sia per l'effettiva assenza di autoanticorpi anti-nucleo, sia a causa dell'estrema solubilità di alcuni antigeni (come SS-A/Ro), sia per la presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni non propriamente nucleari (come Jo-1).

Sono disponibili in commercio **metodi immunoenzimatici** su fase solida (EIA) da impiegare nella diagnostica delle malattie autoimmuni sistemiche in sostituzione dell'IF. Dalla letteratura scientifica internazionale si desume che i test EIA sono in grado di rilevare la presenza di autoanticorpi rivolti verso i principali autoantigeni nucleari, ma non presentano una sensibilità clinica del 100% e non sono sempre correlati con il metodo IF.

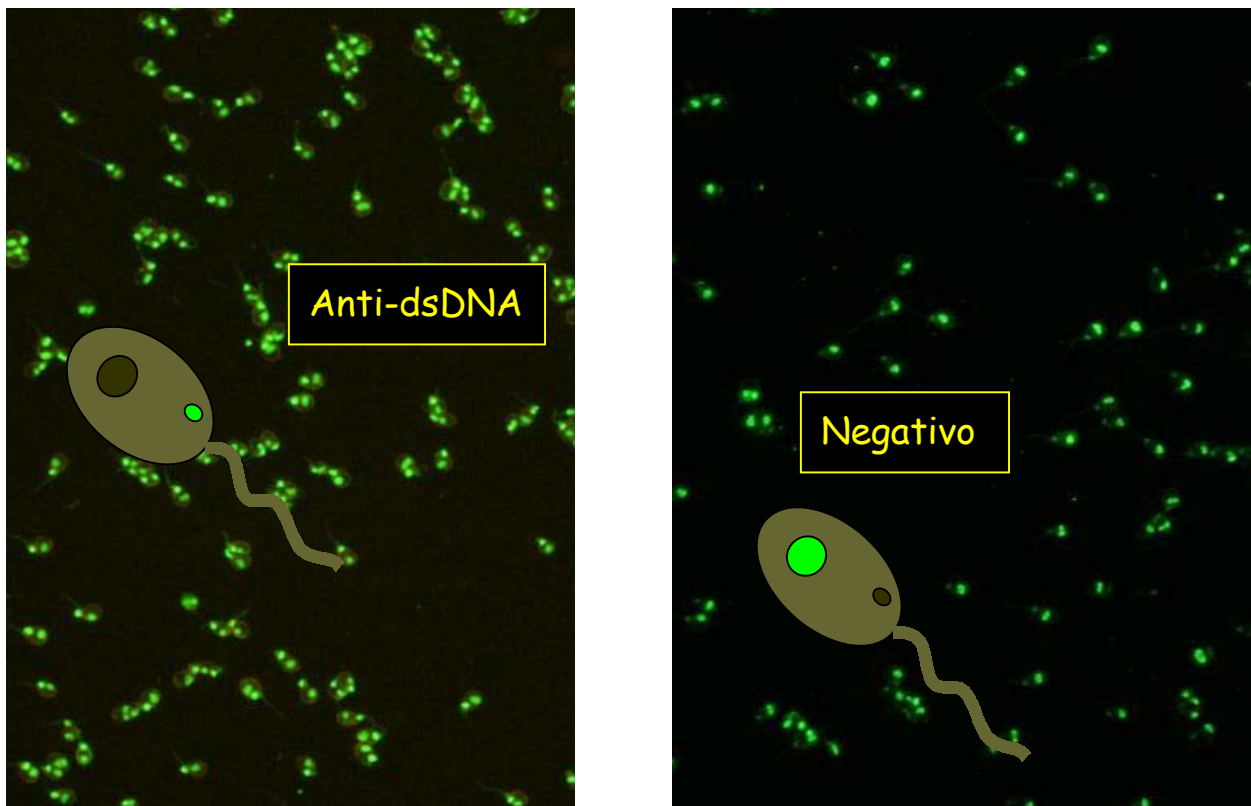
### **Autoanticorpi anti-dsDNA**

L'esistenza di autoanticorpi anti-DNA in pazienti con LES è nota fin dagli anni cinquanta: ben presto è risultato evidente che la molecola di DNA presenta numerosi epitopi e di conseguenza gli anticorpi anti-DNA comprendono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi con differenti specificità.

Gli **autoanticorpi anti-DNA nativo a doppia elica (dsDNA)** riconoscono epitopi localizzati lungo lo scheletro deossiribosio-fosfato. A fronte di una notevole aspecificità degli anticorpi anti-ssDNA (singola elica), gli anticorpi anti-dsDNA sono risultati **altamente specifici per il LES** e presenti nei soggetti affetti con prevalenza tra 40 e 80%, così da costituire il 10° tra i criteri diagnostici del LES. Peraltro, la presenza di anticorpi anti-dsDNA in un paziente asintomatico è fortemente suggestiva di un LES subclinico, essendo negativa la ricerca di tali anticorpi nel LES indotto da farmaci ed essendo positiva in meno del 2% dei casi in altre patologie autoimmuni. Gli autoanticorpi anti-dsDNA sono i principali responsabili del quadro IF nucleare (omogeneo e periferico), ma possono essere presenti anche con un quadro nucleare granulare; pertanto i pazienti affetti da LES e da altre patologie autoimmuni possono essere riconosciuti inizialmente mediante questo test, che costituisce l'11° criterio diagnostico per il LES. Pertanto la determinazione degli autoanticorpi anti-dsDNA è raccomandata in ogni caso in presenza di sintomi riferibili a LES, ovvero in caso di positività degli ANA ad un titolo uguale o superiore a 1:160, in particolar modo quando sia presente un quadro di IF nucleare.

L'utilità diagnostica e prognostica del dosaggio degli autoanticorpi anti-dsDNA ha portato allo sviluppo di numerose tecniche per la loro quantificazione: tra queste le tecniche di radiobinding (tra cui la tecnica originale di Farr) (Wold ET, Young FE, Tan EM, Farr RS. Science 1968; 161:806-7), l'IF su *Crithidia luciliae* e l'EIA.

L'**immunofluorescenza indiretta (IF) su *Crithidia luciliae*** è una metodica altamente specifica, ha una buona sensibilità, una relativa accuratezza, evidenzia anticorpi ad avidità alta e intermedia, permette l'individuazione delle varie classi anticorpali e la loro capacità di fissare il complemento, ma non consente una determinazione quantitativa accurata. Il quadro di positività è dato dalla fluorescenza del chinetoplasto che contiene DNA a doppia elica (Fig. 10-16)



**Fig. 10-16**

Le **tecniche EIA** sono automatizzabili, sono quantitative e sensibili; possono però rilevare anticorpi a bassa avidità di incerto valore clinico. Un'alternativa è rappresentata dall'impiego in fase iniziale delle tecniche EIA, dotate di simile sensibilità, con successiva conferma dei risultati mediante la più specifica tecnica IF, utilizzando un coniugato anti-IgG.

Uno dei sistemi EIA per anticorpi anti-dsDNA prevede l'uso di micropozzetti rivestiti di DNA plasmidico a doppio filamento in cui vengono incubati i campioni in esame (dil. 1:10), i controlli positivi e negativi e la curva di calibrazione. Alla fine dell'incubazione i pozzetti vengono lavati e viene aggiunto un anticorpo (anticorpi monoclonali di topo) anti-IgG umane coniugato con  $\beta$ -galattosidasi. Dopo un ulteriore periodo di incubazione e successivi lavaggi per allontanare il coniugato non legato specificamente, si aggiunge il substrato (derivato di  $\beta$ -D-galattoside) e dopo circa 30' di reazione, questa viene arrestata con l'aggiunta di carbonato di sodio. Si misura in OD la fluorescenza nella miscela della reazione. Quanto maggiore è la misura, tanto maggiore è la quantità di IgG anti-dsDNA presenti nel campione. Per elaborare i risultati del test, la risposta dei campioni in esame viene confrontata direttamente con la risposta dei campioni calibratori in curva di dose espressi in IU/ml.

I limiti inferiore e superiore del test sono rispettivamente 0,5 e 400 IU/ml. Studi su ampie casistiche hanno individuato tre fasce di valori:

< 10 IU/ml = valori negativi

10-15 IU/ml = valori dubbi (da riteutare o da controllare nel tempo)

> 15 UA/ml = valori positivi

**In fase diagnostica iniziale, per la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA è preferibile il metodo IF su *Crithidia luciliae*, alla diluizione iniziale del siero di 1:10 per la sua elevata specificità; è valida anche la determinazione con metodo EIA purchè i risultati positivi vengano successivamente confermati con il metodo IF.**

La misurazione degli autoanticorpi anti-dsDNA è molto utile nell'iter clinico dei pazienti con LES. Numerosi studi hanno documentato una stretta relazione tra titolo anticorpale e attività della malattia, in modo particolare della nefrite lupica: un incremento nella concentrazione anticorpale può precedere di alcune settimane le riacutizzazioni della malattia. In generale, i pazienti con malattia in fase di attività possono essere monitorati con un dosaggio degli autoanticorpi anti-dsDNA ogni 6-12 settimane, mentre in quelli con bassa attività di malattia, il dosaggio può essere effettuato ogni 6-12 mesi. Quindi, **nella fase di monitoraggio del decorso e della terapia del LES è preferibile la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-dsDNA, utilizzando il metodo EIA in cui i risultati siano espressi in UI/ml** (secondo lo standard WHO/ISP Wo/80).

### **Autoanticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA)**

In fase diagnostica iniziale, in pazienti con sintomi clinici sospetti per una malattia autoimmune sistemica, il test "di ingresso" è rappresentato dalla rilevazione degli anticorpi anti-nucleo in IF; il quadro di fluorescenza nucleare o citoplasmatico determina la scelta successiva, rappresentata dalla ricerca di autoanticorpi diretti verso uno o più specifici autoantigeni intracellulari.

Poichè in alcuni pazienti affetti da Sindrome di Sjogren (SS), Dermatomiosite/Polimiosite (DM/PM), Sclerosi sistemica (SSc), il test ANA-IF può risultare negativo, dovrebbe essere condotta comunque un'indagine di approfondimento per autoanticorpi anti-ENA con metodi alternativi alla IF.

La varietà di autoantigeni bersaglio degli autoanticorpi anti-nucleo è estremamente ampia: nell'ottica di un corretto rapporto costo-beneficio, non è ragionevole tentare l'individuazione dell'autoanticorpo specifico in tutti i casi di pazienti con quadro IF noto; è ragionevole limitare la ricerca almeno ai 7 autoanticorpi per i quali è stata assegnata importanza nella diagnosi clinica, come criteri di

classificazione; attualmente gli autoanticorpi con queste caratteristiche sono:

- **anti-SSA/Ro,**
- **anti-SS-B/La,**
- **anti-Sm,**
- **anti-RNP o U1-snRNP,**
- **anti-Topoisomerasi I (Scl-70)**
- **anti-Proteina B centromerica (CENP-B),**
- **anti-Istidil-tRNA sintetasi (Jo-1)**

**Autoanticorpi anti-SS-A/Ro:** gli autoanticorpi contro le particelle RNP subcellulari SS-A/Ro e SS-B/La sono considerati come i marcatori sierologici dominanti nella sindrome di Sjogren e nel lupus eritematoso sistemico (LES). Nella sindrome di Sjogren primaria (sicca sindrome), gli anticorpi SS-A/Ro possono essere rilevati fra il 60 ed il 70% dei pazienti, rispetto al 40-50% dei pazienti con LES ANA-positivi. Una sindrome di Sjogren secondaria può insorgere come complicazione di varie malattie, soprattutto nel corso della poliartrite cronica sieropositiva (15-25%) e meno di frequentemente nel LES, sclerodermia e dermatomiosite/polimiosite. Il rilevamento degli autoanticorpi anti-SS-A/Ro può precedere, anche di molti anni, lo sviluppo dei sintomi della sindrome secca. Anche nei pazienti LES SS-A/Ro positivi con sindrome secca, vengono individuati frequentemente anche gli anticorpi SS-B/La. L'analisi specifica degli anticorpi SS-A/Ro è di primaria importanza nella diagnosi di speciali sottogruppi di LES, soprattutto di LES ANA-negativo, Lupus eritematoso cutaneo subacuto, LES ad insorgenza tardiva ed infine nella cosiddetta sindrome di lupus neonatale. Nel test EIA non competitivo indiretto per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-SS-A/Ro nel siero umano i pozzetti della micropiastra sono rivestiti con antigeni SS-A/Ro ricombinanti umani (52 kDa, 60 kDa). Per elaborare i risultati del test, la risposta dei campioni in esame viene confrontata direttamente con la risposta dei campioni calibratori in curva di dose espressi in IU/ml. I limiti inferiore e superiore del test sono rispettivamente 0,3 e 240 U/ml. Studi su ampie casistiche hanno individuato tre fasce di valori:

< 7 U/ml = valori negativi

7-10 U/ml = valori dubbi (da ritestare o da controllare nel tempo)

> 10 UA/ml = valori positivi

**Autoanticorpi anti-SS-B/La.** Gli autoanticorpi anti-SS-B/La sono presente in circa il 90% dei pazienti con sindrome di Sjogren primaria, ma solo nel 6-15% dei pazienti ANA-positivi con LES; in corso di LES la presenza di anticorpi anti-SS-B/La tende ad associarsi ad una minore prevalenza di anticorpi anti-dsDNA e ad una minore incidenza di nefrite lupica. Il rilevamento di questi autoanticorpi può precedere anche di molti anni lo sviluppo dei sintomi della sindrome secca. Anche nei pazienti LES con sindrome secca e positivi per anti-SS-A/Ro si possono rilevare frequentemente gli anticorpi anti-SS-B/La. Questi autoanticorpi si ritrovano nel siero della maggioranza delle madri di bambini con LES neonatale. Nel test EIA per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-SS-B/La nel siero umano i pozzetti della micropiastra sono rivestiti con l'antigene SS-B/La ricombinante umano. Le procedure ed i livelli di significatività dei dati sono identici a quelli riportati per gli anti-SS-A/Ro.

**Autoanticorpi anti-Sm.** Gli autoanticorpi rivolti contro la ribonucleoproteina Sm costituiscono un marcatore sierologico altamente specifico del LES, ma la sua sensibilità è modesta in quanto è dimostrabile solo nel 20-30% dei casi (un po' più elevata nei pazienti con LES di origine africana). In immunofluorescenza gli anticorpi anti-Sm danno un quadro di tipo punteggiato (speckled). Nel test EIA per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-Sm nel siero umano i pozzetti della micropiastra sono rivestiti con proteine Sm native purificate da tessuto bovino. Le procedure del test sono identiche a quelle sopra riportate ed i livelli di significatività dei risultati sono:

- < 5 U/ml = valori negativi
- 5-10 U/ml = valori dubbi (da ritestare o da controllare nel tempo)
- > 10 UA/ml = valori positivi

**Autoanticorpi anti-RNP o U1-snRNP.** Gli autoanticorpi rivolti contro il gruppo delle ribonucleoproteine U1-snRNP (proteina A, proteina C e proteina 70 kDa) sono in genere presenti sia nel LES che nella malattia mista del tessuto connettivo (MCTD o sindrome Sharp). Per la diagnosi di MCTD è necessaria la presenza degli anticorpi anti-U1-snRNP, che sono invece presenti solo nel 30-40% dei pazienti con LES. Anche se la risposta autoimmune anti-U1-snRNP comprende anticorpi contro tutte le tre componenti proteiche (70 kDa, A, C), gli autoanticorpi anti-RNP 70 kDa, specie a titolo elevato sono ritenuti più specifici per la MCTD, poiché la loro presenza nel LES è inferiore (circa 12 %) rispetto agli anticorpi anti-proteine A o C (circa 23 %). Vari studi hanno dimostrato che la risposta anti-U1-snRNP in assenza di anticorpi anti-RNP 70 kDa è fortemente associata alla presenza di LES. Sono disponibili due EIA, uno per gli anti-U1-snRNP (3 proteine) ed uno per gli anti-RNP 70 kDa. Le procedure ed i livelli di significatività dei risultati sono simili a quelli riportati per l'EIA anti-Sm.

**Autoanticorpi anti-Topoisomerasi I (anti-Scl-70).** Come il LES, la sclerosi sistemica progressiva (SSp) o sclerodermia è una malattia autoimmune sistemica. I segni caratteristici da cui deriva il nome della malattia sono l'ispessimento e l'indurimento della cute. Ciò porta lentamente a fibrosi progressiva e, nelle fasi più avanzate della malattia, a sclerosi in vari organi. Oltre alla sclerosi sistemica senza scleroderma, esiste una forma particolare di SSp chiamata sindrome CREST. L'acronimo deriva dalle iniziali dei sintomi maggiori: calcinosi cutanea, sindrome di Raynaud, disturbi della motilità esofagea, sclerodattilia e telangiectasie. La variante CREST della malattia è 8 volte superiore in frequenza nelle donne rispetto agli uomini (nella SSp è 4:1). Oltre ai risultati più generali delle analisi di laboratorio (anemia, ipergammaglobulinemia, positività del fattore reumatoide), l'analisi degli autoanticorpi è abbastanza significativa. Infatti fra il 30 ed il 100% di tutti i casi di SSp, si ottengono risultati positivi nei test degli anticorpi antinucleari (ANA). Nella SSp un risultato ANA positivo con un test di immunofluorescenza si basa su due specificità anticorpali: gli autoanticorpi anti-Scl-70 e gli autoanticorpi diretti contro le proteine centromeriche associate ai cromosomi. Un dato rilevante associato alla SSp è la ridotta eterogeneità degli anticorpi ANA. A differenza dei pazienti con LES (dove nel siero si ritrovano tre o più diversi tipi di anticorpi in circolo), in questa patologia raramente un singolo paziente presenta più di una specificità anticorpale. È stato dimostrato, per gli **anticorpi anti-Scl-70** rispetto agli **anticorpi anti-centromero** (cfr. paragrafo successivo), che la presenza di uno esclude la presenza contemporanea dell'altro. Referti che riportano entrambi gli anticorpi sono rari. Dopo molte controversie riguardo all'identificazione dell'autoantigene Scl-70, è stato stabilito che gli anticorpi anti-Scl-70 reagiscono con l'enzima DNA-topoisomerasi I, una proteina basica non istonica con un PM di 100 kDa. La degradazione proteolitica in assenza di inibitori è responsabile della formazione del frammento 70 kDa. Nel test EIA per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-Scl-70 nel siero umano i pozzetti della micropiastra sono rivestiti con l'antigene Scl-70 ricombinante umano. Le procedure ed i livelli di significatività dei dati sono identici a quelli riportati per gli altri EIA del gruppo.

**Autoanticorpi anti-Proteina B centromerica (CENP-B).** Gli autoanticorpi anti-centromero o proteine centromeriche si ritrovano nel 70-90% dei pazienti con sclerosi sistemica, variante CREST (cfr. sopra). Le proteine centromeriche più studiate appartengono ad un gruppo di autoantigeni definiti come CENP-A (17 kDa), CENP-B (80 kDa) e CENP-C (140 kDa). Al momento attuale la proteina B centromerica umana rappresenta l'antigene CENP meglio caratterizzato. La sua sequenza in cDNA è conosciuta da diverso tempo ed è disponibile un prodotto ricombinante per la rilevazione di



autoanticorpi specifici in sieri di pazienti usando una metodica EIA. Nei pazienti francamente positivi per anticorpi anti-centromero è stata dimostrata una correlazione positiva del 100% con i risultati anti-CENP-B definiti con il test Western Blot. Indagini con estratti nucleari di cellule HeLa confermano la funzione di marcatore dell'antigene CENP. In questi studi il titolo assoluto è risultato più elevato per gli anti-CENP-B e più basso per gli anti-CENP-A e gli anti-CENP-C. Tutti gli studi clinici eseguiti finora dimostrano che i sieri dei pazienti positivi per anticorpi anti-centromero all'immunofluorescenza (Fig. 10-15) sono reattivi verso l'antigene CENP-B ma non necessariamente verso gli antigeni CENP-A, CENP-C o CENP-D. Nel test EIA per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-CENP-B nel siero umano i pozzetti della micropiastra sono rivestiti con CENP-B ricombinante umano. Le procedure ed i livelli di significatività dei dati sono identici a quelli riportati per gli altri EIA del gruppo.

**Autoanticorpi anti-Istidil-tRNA sintetasi (Jo-1).** La ricerca degli autoanticorpi anti-Jo-1 è un utile supporto di laboratorio alla diagnosi dermatomiosite/polimiosite. Gli autoanticorpi più comuni associati a queste forme sono quelli diretti contro la istidil-tRNA sintetasi, il cosiddetto antigene Jo-1, che catalizza l'esterificazione del residuo istidile con il suo tRNA specifico. La prevalenza degli anticorpi Jo-1 viene riferita al 33% nella polimiosite primaria, al 25% nella dermatomiosite primaria e al 15% nelle miositi associate ad altre malattie del tessuto connettivo. Oltre il 70% dei pazienti con risultati positivi per gli anticorpi anti-sintetasi dell'amminoacil-tRNA presentano segni di alveolite fibrotica, poliartrite e occasionalmente un fenomeno di Raynaud o altri segni di sclerosi sistemica. Soprattutto questi pazienti affetti da miosite e da una sindrome "di sovrapposizione od overlap" possono presentare anche livelli significativi di anticorpi antinucleari, compresi gli anticorpi SS-A/Ro, SS-B/La ed U1-snRNP. I livelli sierici dell'anticorpo anti-Jo-1 possono variare in base all'attività della malattia. Gli anticorpi anti-Jo-1 sono rilevabili mesi prima dell'insorgenza della miosite. Ciò suggerisce un utilizzo di questo autoanticorpo come marcatore di malattia. Nel test EIA per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-Jo-1 nel siero umano i pozzetti della micropiastra sono rivestiti con Jo-1 ricombinante umano. Le procedure ed i livelli di significatività dei dati sono identici a quelli riportati per gli altri EIA del gruppo.

### **Considerazioni conclusive**

Gli anticorpi anti-ENA nel siero possono essere messi in evidenza anche con altre tecniche utilizzate in laboratorio: immunodiffusione doppia (IDD), contro-immunoelettroforesi (CIE), immunoblot (IB), immunodot blot (DB), Westernblot (WB). La strategia della scelta delle tecniche e della sequenza di utilizzo dipendono dalle necessità della clinica, dal costo dei reagenti, dai tempi di risposta, dall'organizzazione e dall'esperienza del laboratorio. Il metodo ideale dovrebbe rispondere a criteri di sensibilità e specificità clinica, precisione ed accuratezza, facilità di esecuzione, limitato impiego di tecnologia, facile reperibilità e costo contenuto: allo stato attuale non esiste metodo in grado di rispondere a tutti questi requisiti.

- IDD e CIE non risultano adeguate ad applicazioni routinarie estese, risentono in modo sensibile delle modalità di preparazione e di esecuzione, hanno una sensibilità soddisfacente solo nei confronti di alcuni ENA (anti-Ro/SS-A). Sono inoltre metodi qualitativi.
- WB è un metodo qualitativo, fornisce informazioni limitate agli antigeni selezionati, dà indicazioni circa la composizione ed il peso molecolare dei differenti sistemi antigenici, ma le proteine utilizzate come antigeni risultano modificate nella loro conformazione dal trattamento SDS-PAGE.
- L'Immuno Blotting lineare è un metodo qualitativo, fornisce un profilo completo degli ENA, ma presenta le stesse limitazioni tecniche del WB.
- DB è un metodo qualitativo, che utilizza proteine native e risulta di facile esecuzione ed interpretazione: tuttavia presenta il limite di offrire un pannello ENA limitato.

- Gli EIA od altri metodi immunometrici hanno un'ottima sensibilità, sono metodi quantitativi, ma non danno adeguata risposta sull'intero pannello di anticorpi anti-ENA: se non si usano metodi di screening per anti-ENA, è necessario eseguire un test per ciascun antigene.

In conclusione, un corretto iter diagnostico per la ricerca degli anticorpi anti-ENA non può che avvalersi di più approcci metodologici.

Le più recenti Linee guida su tema consigliano: **in fase diagnostica, la determinazione di autoanticorpi anti-ENA con metodi di controimmunolettroforesi (CIE), immunoenzimatico (ELISA), immunoblot (IB), immunodot (ID)**. Il metodo WB consente l'identificazione di un completo spettro autoanticorpale anti-ENA ed in particolare degli autoanticorpi rivolti verso antigeni rari (cioè di non frequente riscontro), offre la possibilità di evidenziare diversi epitopi di uno stesso antigene e consente la conservazione delle strisce per una revisione e una rivalutazione successiva.

**Considerata l'attuale affidabilità analitica dei metodi, per l'identificazione di autoanticorpi anti-ENA è sufficiente un metodo tra quelli sopracitati; tuttavia, in presenza di basse concentrazioni anticorpali o di un risultato negativo in un paziente con forte sospetto clinico di malattia autoimmune sistemica, è raccomandato l'uso di altri due metodi tra quelli citati.**

In tutte le malattie autoimmuni sistemiche la rilevazione della concentrazione degli autoanticorpi anti-ENA non fornisce informazioni aggiuntive circa il decorso o la prognosi della malattia o dell'efficacia della terapia, con l'unica eccezione della malattia mista del tessuto connettivo (MMTC), nella quale la determinazione del titolo degli autoanticorpi anti-RNP rappresenta il principale criterio diagnostico.