

LINEE-GUIDA DELLE PATOLOGIE AUTOIMMUNI

Gruppo di Lavoro Patologie Autoimmuni (GLAPA):

Roberto Pozzoli, Elisa Cavanna¹, Maria Cristina Garlaschi², Calogero Barranco³, Annalisa Bianco⁴, Irene Diotto⁵, Pier Andrea Dusi⁶, Antonella Gera⁷, Lidia Grassia⁸, Giovanni Battista Pini⁹, Angelo Marino Vassallo¹⁰

Servizio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano

1 Laboratorio Centrale E.O. Ospedali Galliera, Genova

2 Laboratorio di Microbiologia, Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano

3 Patologia Clinica 1° A.O. Lecco

4 Laboratorio analisi, Ospedale Cairo Montenotte, ASL 2 Savonese

5 Laboratorio analisi, Ospedale Civile, USL 1 Imperiese, Imperia

6 Laboratorio analisi, USL 1 Imperiese- Ospedale, S. Remo

7 Servizio di Microbiologia, Ospedale S. Andrea ASL 11, Vercelli

8 Padiglione 5, Ospedale S. Martino, Genova

9 Ospedale Celesia, ASL Genovese, Genova

10 Laboratorio pluridisciplinare, USL1 Imperiese, S. Remo

Guidelines for Laboratory diagnostic of autoimmune diseases

Summary

These guidelines are designed to provide Laboratory with reviews and new methods for diagnosis of autoimmune diseases. In the different chapters authors describe more and more autoantigens and autoantibodies of potential diagnostic or pathogenic relevance

KEY WORDS

Guidelines, Autoimmune diseases

Ricerca degli autoanticorpi anti-nucleo (ANA)

INTRODUZIONE

La determinazione degli ANA rappresenta la prima tappa delle indagini sierologiche ai fini della diagnosi, prognosi e/o monitoraggio delle Malattie Autoimmuni Sistemiche.

Nella formulazione di linee guida in generale ed in particolar modo per quanto riguarda la diagnosi di laboratorio degli ANA, devono essere ben chiari i seguenti punti:

- 1) valenza scientifica
- 2) consenso interdisciplinare
- 3) applicabilità e riproducibilità delle indicazioni date
- 4) peso da attribuire al livello economico (rapporto costo/beneficio) di tests diagnostici che devono peraltro fornire al clinico una risposta chiara ed esaustiva

La presenza degli ANA non sempre è indice di malattia in quanto a basso titolo (1:40) sono presenti in circa il 20-30% della popolazione sana: la presenza di questi ANA definiti come autoanticorpi naturali dipende prevalentemente dal sesso (donne) e dall'età (>65a.).

La tabella seguente indica quanto emerso dalle linee guida presentate dal gruppo interdisciplinare costituito dai membri del College of American Pathologists, dell'American College of Rheumatology e del Clinical Immunology Society and Clinical Center of the National Institutes of Health (genn.2000), nella definizione di un test ANA-IFI (IFA) POSITIVO

	PATOLOGIA E/O SINDROME	FREQUENZA DI POSITIVITÀ
UTILITÀ DIAGNOSTICA (MOLTO UTILE)	L.E.S. (LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO)	95-100%
	SCLEROSI SISTEMICA (SCLERODERMIA)	60-80%
UTILITÀ DIAGNOSTICA (PIUTTOSTO UTILE)	DERMATOMIOSITE POLIMIOSITE	30-80%
	SINDROME SJÖGREN	40-70%
PARTE INTEGRANTE DEI CRITERI DIAGNOSTICI	L.E.S. INDOTTO DA FARMACI	∞100%
	MALATTIE EPATICHE AUTOIMMUNI	∞ 100%
	MCTD (MALATTIA DEL CONNETTIVO DI TIPO MISTO)	∞ 100%

UTILE AI FINI DEL MONITORAGGIO E/O DELLA PROGNOSI	FENOMENO DI RAYNAUD	20-60%
	ARTRITE GIOVANILE CRONICA OLIGOARTICOLARE CON UVEITE	20-50%
NESSUNA UTILITÀ DIAGNOSTICA	ARTRITE REUMATOIDE SCLEROSI MULTIPLA PORPORA TROMBOCITOPENICA IDIOPATICA MALATTIE DELLA TIROIDE LUPUS DISCOIDE NEOPLASIE MALATTIE INFETTIVE	IN TUTTE QUESTE PATOLOGIE: FREQUENZA VARIABILE (5-50%) PREVALENTEMENTE A BASSO TITOLO

⇒⇒ Si rileva inoltre una frequenza non significativa ai fini diagnostici di ANA positivi del 15-25% in persone aventi protesi mammaria di silicone e del 5-25% in familiari di pazienti con L.E.S. e Sclerodermia.

METODI DI LABORATORIO RACCOMANDATI

⇒ METODO DI RIFERIMENTO: IMMUNOFLOURESCENZA INDIRETTA (I.F.I.) in quanto:

- permette di individuare sia il GRADO DI POSITIVITÀ
- che il TIPO DI PATTERN FLUOROSCOPICO.

NOTA: sono a disposizione per lo screening degli ANA (dosaggio qualitativo a cut-off) prodotti diagnostici con metodo immunoenzimatico (ELISA) che possono essere affiancati ma **non ancora sostituire il metodo I.F.I.** in quanto non sempre sono in grado di esprimere tutti gli antigeni necessari per la determinazione degli ANA.

Tali metodi prima della loro introduzione devono essere attentamente valutati se corrispondono ai requisiti di specificità e sensibilità richiesti.

È buona norma inoltre valutare con attenzione le specifiche dei componenti del kit: caratteristiche degli antigeni utilizzati (preferibilmente almeno 10: SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, U1RNP, SCL-70, Jo-1, centromero, dsDNA, istoni, rRNP), metodi di estrazione e purificazione degli stessi, metodi di preparazione del coating, stabilità dei metodi di rivelazione del sistema, ecc...

⇒ **SUBSTRATO CONSIGLIATO:** CELLULE HEp-2 (ATCC-CCL 23) preferibili ad altri tipi di substrato (fegato di topo e/o ratto) in quanto costituito da popolazioni cellulari omogenee asincrone di origine umana (da carcinoma laringeo, con nuclei e nucleoli videnti ed elevato indice mitotico in grado di evidenziare anche gli antigeni presenti solo in determinate fasi del ciclo cellulare).

⇒ **TITOLO DI SCREENING CONSIGLIATO:** 1/80 in quanto il titolo 1/40 possiede maggiore sensibilità ma minore specificità nei confronti della malattia mentre il titolo 1/160 rappresenta la prima diluizione avente significatività clinica

⇒ **LA LETTURA DEVE ESSERE EFFETTUATA A 400X**

⇒ **I CAMPIONI CONSIDERATI POSITIVI ALLO SCREENING DEVONO ESSERE TITOLATI FINO A DETERMINARE IL GRADO DI POSITIVITÀ (TITOLO ESPRESSO COME RECIPROCO DELLA DILUIZIONE DEL SIERO) MEDIANTE DILUIZIONI IL CUI NUMERO PUÒ ESSERE STABILITO DALLA GESTIONE COSTO/SIGNIFICATIVITÀ CLINICA DEL TITOLO DATO**

⇒ **IL REFERTO DEVE INDICARE IL O I PATTERN DI FLUORESCENZA, IL TITOLO E LA SEGNALAZIONE SE SI È GIUNTI ALL'END-POINT O NO**

OSSERVAZIONI

La competenza, la qualificazione, nonché l'approfondita conoscenza delle specifiche dei componenti dei prodotti diagnostici e del microscopio a fluorescenza utilizzati, sono l'elemento indispensabile affinché si verifichino le condizioni di affidabilità e riproducibilità di quanto sopra esposto.

Si ritiene indispensabile:

⇒ **PRESTARE PARTICOLARI ATTENZIONI ALLA RACCOLTA, CONSERVAZIONE DEI SIERI UTILIZZATI:**

- sono ottimali i sieri **limpidi, privi di emolisi** esaminati freschi o tenuti a -20°C
- sieri con evidente contaminazione batterica possono possedere enzimi proteolitici in grado di digerire in parte il substrato
- in alcuni casi **l'aggiunta di albumina** nella diluizione dei sieri campione toglie le aspecificità che rendono difficile la lettura e l'interpretazione microscopica

⇒ **CONOSCERE LE CARATTERISTICHE DEI REATTIVI UTILIZZATI:**

- il **fissativo dei substrati cellulari** (preferibilmente acetone) deve permettere il riconoscimento di tutti gli antigeni clinicamente utili
- qualora i **substrati cellulari** contengano **iperespressività di alcuni antigeni** o di **fasi mitotiche**, è necessario valutare attentamente durante la lettura il grado e l'espressione del tipo di fluorescenza
- la **composizione del coniugato** dovrebbe essere nota (il rapporto FITC/proteine deve essere approssimativamente 3.0 in quanto un rapporto maggiore può causare un aumento di immagini aspecifiche)
- il **pH (7.2)** del PBS deve essere verificato prima della seduta analitica.

⇒ INSERIRE NELLE SEDUTE ANALITICHE COME STANDARD SECONDARI SIERI DI RIFERIMENTO A TITOLO NOTO O PREPARATI RIFERENTESI AGLI STANDARD PRIMARI (WHO ANA INTERNATIONAL REFERENCE PREPARATION 66/233)

⇒ CONOSCERE LE PROPRIETÀ DEL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA UTILIZZATO IN QUANTO LA SENSIBILITÀ DELLA LETTURA CON UNA LUCE FLUORESCENTE INCIDENTE PUÒ ESSERE MAGGIORE O MINORE A SECONDA DEI TIPI DI LAMPADA, DEI TIPI DI OBIETTIVO (a parità di ingrandimenti, ma con apertura numerica diversa) NONCHÈ DEI FILTRI DI ECCITAZIONE UTILIZZATI. SI CONSIGLIA L'UTILIZZO DI UN OBIETTIVO 40/0.65X E DI UN OBIETTIVO 50/0.90 X AD OLIO O 50/1.00X AD ACQUA

⇒ RILEVARE POSSIBILI ARTEFATTI :

- a volte nella lettura dei preparati si possono osservare artefatti che possono essere confusi con veri patterns ANA positivi o che comunque possono rendere difficoltosa l'interpretazione. In particolare queste fluorescenze aspecifiche possono avere come bersaglio il nucleolo che può apparire debolmente positivo
- diverse sono le cause identificate, quali un non corretto lavaggio, una contaminazione o un improprio pH del tampone di preparazione, la presenza di film lipidico nei sieri campione o una loro contaminazione microbica e l'utilizzo di matite o pennarelli vetrografici o autofluorescenti, utilizzati per marcare la superficie dei vetrini, che possono "sbavare" nei pozzetti

⇒ LA PARTECIPAZIONE A CONTROLLI DI QUALITÀ AI FINI DI INDIVIDUARE EVENTUALI PROBLEMI E/O NON CONFORMITÀ E PRODURRE EVENTUALI AZIONI CORRETTIVE

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- ANA positivo: titolo clinicamente significativo = 1:160
I nuclei delle cellule HEp-2 mostrano specifici patterns di fluorescenza
- ANA negativo: inferiore 1:80
I nuclei delle cellule HEp-2 non mostrano alcun pattern di fluorescenza
- ANA border-line: 1:80

NB: In caso di positività si consiglia il monitoraggio a cadenza semestrale.

BIBLIOGRAFIA

1. Quality assurance for the indirect immunofluorescence test for autoantibodies to nuclear antigen (IFI-ANA). Dec. 1996, Approved guideline –NCCLS.
2. Kavanaugh et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. Jan 2000, Arch Pathol Lab Med – 124.

PATTERN	AG.RICONOSCIUTO	PATOLOGIA ASSOCIATA
Anti-"envelope" nucleare:		
<i>Periferico:</i> fluorescenza della membrana nucleare associata a fluorescenza omogenea dei nuclei e positività dei cromosomi delle mitosi	Ds-DNA, LAP1, LAP2	LES
<i>Nuclear lamins:</i> fluorescenza della lamina nucleare sottile e cromosomi delle mitosi negativi	Lamina A, B, C	PBC, LES, AR, SSP
<i>Nuclear pore complex:</i> fluorescenza a livello dei pori della membrana nucleare che risulta discontinua	Proteine/glicoproteine della membrana nucleare (gp120, p62)	PBC
Omogeneo: fluorescenza uniforme dei nuclei e dei cromosomi delle mitosi	Ds-DNA, ss-DNA, DNP, istoni	LES
Speckled:		
<i>Fine speckled:</i> fluorescenza finemente granulare dei nuclei e cromosomi delle mitosi negativi	SS-A, SS-B	SS, SSP, BCC, Raynaud
<i>Coarse speckled:</i> fluorescenza granulare grossolana dei nuclei e cromosomi delle mitosi negativi	Sm, U1RNP	MCTD, LES
Nucleolare:		
<i>Speckled:</i> fluorescenza granulare dei nucleoli	RNA-polimerasi I	SSP, SS, LES
<i>Omogeneo:</i> fluorescenza omogenea dei nucleoli	4-6sRNA, 7-2RNP (To)	SSP, overlap syndrome
<i>Clumpy:</i> fluorescenza a masse raggruppate	U3-nRNP (fibrillarina)	SSP
NOR-90 : fluorescenza granulare dei nucleoli delle cellule in interfase con l'aggiunta di una fluorescenza nuclear dots	Proteina di 90 Kda	SSp, Raynaud
Nuclear matrix: fluorescenza granulare atipica con granuli localizzati soprattutto attorno ai nucleoli	RNA-proteine	LES, SSP, MCTD
Multiple nuclear dots (NspI): fluorescenza puntiforme del nucleo (6-10 granuli)	Proteina Sp 100	
Few nuclear dots: (1-3 granuli per nucleo)	Coilina p80	PBC, Ep.cronica
Diffuse grainy: fluorescenza a smeriglio del nucleo e dei nucleoli e cromosomi delle mitosi positivi	SCL-70	SSP
Centromerico (NspII,ACA): fluorescenza puntiforme dei nuclei e dei centromeri dei cromosomi delle cellule in mitosi	Kinetocore-proteine (CENP-A 17KDa, CENP-B 80KDa, CENP-C 140KDa)	CREST, Raynaud, Sclerodermia, CPB
PCNA/ciclina I: fluorescenza granulare del 30-60% delle cellule in interfase e mitosi negative	ciclica (36Kda)	LES

<p>Ciclina II: pattern simile al precedente con fluorescenza della zona pericromosomica</p>	Ciclica	LES
<p>Anti-antigeni mitosi associati:</p>		
<p><i>Anti-fuso mitotico:</i> ✓<i>NUMA 1, MSA-1:</i> fluorescenza delle fibre e dei poli del fuso mitotico delle cellule in mitosi. Le cellule in interfase possono presentare una debole fluorescenza granulare ✓<i>NUMA 2, MSA-3:</i> fluorescenza netta limitata ai soli poli del fuso mitotico delle cellule in mitosi, mentre le fibre proteiche interpolari sono negative</p> <p><i>Midbody (MSA-2:</i> fluorescenza brillante delle proteine dell'anello contrattile visibile nelle cellule in telofase o citokinesi. Le cellule in interfase presentano invece una fluorescenza della regione cromosomica simile a quella degli ACA</p> <p><i>Anti-antigeni cromosoma associati (MSA-3):</i> fluorescenza granulare delle cellule in metafase adiacente al fuso (negativo) e finemente granulare delle cellule in interfase</p> <p><i>Anti-centrioli:</i> fluorescenza dei centrioli, molto evidente nelle cellule in metafase</p>	<p>Centrofilina 250 KDa</p> <p>Kinesina 116 KDa</p> <p>Proteina con attività ATP-asi</p> <p>CENP F</p> <p>Enolasi e proteine</p>	<p>Malattia infiammatoria</p> <p>SSP</p> <p>Neoplasie</p> <p>SSP</p>

Le cellule Hep-2 consentono di rilevare la presenza di *anticorpi rivolti verso alcuni antigeni citoplasmatici*.

Pattern anti-mitocondri: fluorescenza granulare filamentosa del citoplasma, più intensa a livello perinucleare.

Pattern anti lisosomi: fluorescenza di aspetto granulare puntiforme distribuita irregolarmente nel citoplasma.

Pattern anti-ribosomi: fluorescenza molto fine del citoplasma (spesso anche a carico dei nucleoli) detta "milky way".

Pattern anti-Golgi: fluorescenza granulare paranucleare dell'apparato del Golgi.

Pattern anti reticolo endoplasmatico: fluorescenza citoplasmatica granulare soprattutto a carico di una zona perinucleare.

Pattern anti-actina (F-actina): fluorescenza dei microfilamenti lungo tutto l'asse cellulare ricoprendo in parte anche il nucleo.

Pattern anti-vimentina: fluorescenza di fibre più sottili di quelle dell'actina distribuite tangenzialmente al nucleo, talvolta aggregate.

Pattern anti-cheratina: fluorescenza sottile reticolare dei filamenti intermedi concentrata in zona perinucleare che attraversa il citoplasma delle cellule in interfase (nelle cellule in mitosi è presente una fluorescenza di tipo speckled).

Pattern anti-Jo1: fluorescenza a fini granuli concentrati nella zona perinucleare.

Pattern anti-tropomiosina: fluorescenza di fibre corte provviste di propaggini di tipo dendritico.

RICERCA DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-ENA

INTRODUZIONE

ENA (Extractable Nuclear Antigens) è un termine improprio ed ormai superato con cui si individuano genericamente molti antigeni sia nucleari che citoplasmatici che possono essere estratti in soluzione salina (1).

Nell'ambito degli ENA si possono individuare:

- Proteine associate al DNA: istoni, gli antigeni Scl-70, PCNA, Ku, le proteine centromeriche.
- Proteine associate al RNA: U1RNP, Sm, fibrillarina, RNA-polimerasi I, NOR-90, nucleolina, SSA/Ro, SS-B/La, Jo1, PL-7, PL-12, RNP ribosomiali (6).

Si deve ricorrere alla determinazione degli anticorpi anti ENA quando la positività ANA in fluorescenza è almeno uguale o superiore al titolo 1:160. Non ha senso eseguire sistematicamente la loro determinazione al di sotto di tale titolo, ma essa è consigliata quando, in assenza di positività ANA, ci siano sintomi clinici di una malattia autoimmune.

TEST DI LABORATORIO RACCOMANDATI

Per la scelta del metodo di studio degli ENA è necessario tenere presenti alcuni fattori:

- Il tipo di laboratorio che può essere di riferimento o meno.
- Il budget del laboratorio e di conseguenza il costo dei reattivi.
- L'organizzazione del laboratorio.
- L'esperienza e la manualità del personale addetto.
- Il dialogo continuo tra laboratorio e clinico.
- Il metodo di dosaggio dovrebbe possedere caratteristiche di sensibilità e di specificità ottimali, ma essendo ciò difficilmente realizzabile si rende necessario l'impiego di più di un metodo per la determinazione di questi anticorpi.

I metodi di laboratorio attualmente impiegati sono:

- **IDD (Immunodiffusione doppia)**
Consiste in una diffusione passiva degli antigeni e degli anticorpi in gel di agarosio (15). La risposta positiva si manifesta con la comparsa di linee di precipitazione. Non necessita di alcuna strumentazione e la specializzazione richiesta dell'operatore è minima. Il tempo di preparazione del test è ridotto, ma l'incubazione dura da 24 a 48 ore. Il tipo di dosaggio è qualitativo; la sensibilità è scarsa, mentre la specificità è buona. La riproducibilità è scarsa. L'interpretazione dei risultati è soggettiva. È un metodo piuttosto conveniente e può essere usato come tecnica di routine.
- **CIE-PDS (Controimmunolettroforesi-fosfododecilsolfato)**
SI tratta di un'elettroforesi eseguita su gel di agarosio (8). La risposta positiva si ha dalla comparsa di linee di precipitazione. È richiesta una camera per elettroforesi ed il grado di specializzazione richiesto è moderato. Il tempo di preparazione del test è di un'ora, ma l'incubazione dura 4 ore. Il tipo di dosaggio è semiquantitativo. Sia la sensibilità che la specificità sono buone. La riproducibilità è moderata ed è legata alla manualità dell'operatore. L'interpretazione del risultato è soggettiva. Si tratta di un metodo rapido, ma difficoltoso. È sconsigliato per il dosaggio di anticorpi anti-Scl70 essendo questi un antigene caricato negativamente rispetto agli altri antigeni.
- **ELISA (Immunoenzimatico)**
In questo metodo l'antigene è adeso alla fase solida. In ELISA, la risposta è colorimetrica ed il risultato può essere sia qualitativo che quantitativo. La sensibilità, la specificità, la riproducibilità e l'interpretazione dei risultati sono buone. È un metodo conveniente ed è considerato di routine. È più sensibile di ID e di CIE. Con questa tecnica si possono avere fino al 50-60% di cross-reattività tra nRNP ed Sm. Per il dosaggio degli anticorpi anti-rP il metodo ELISA è quello di riferimento.

- **IB (Immunoblotting)**

Il metodo si basa sulla tecnica SDS-PAGE. La risposta è colorimetrica; la strumentazione richiesta consiste in una camera per elettroforesi e blotting. Il grado di specializzazione dell'operatore deve essere molto alto. Il tempo di preparazione è di 2 ore e quello di dosaggio è di 36-48 ore. Il risultato è di tipo qualitativo. La sensibilità e la specificità sono buone, mentre la riproducibilità è moderata e dipende dall'operatore. L'interpretazione del risultato è soggettiva. È una metodica sensibile ma delicata ed è riservata ad operatori esperti. Lo spettro anticorpale è ridotto rispetto a quello rilevabile con la tecnica WB. Ci possono essere problemi per l'individuazione di anti-Sc170 a causa della labilità della molecola antigenica sensibile alle proteasi in fase di estrazione.

- **WB (Western blot)**

Il metodo si basa sulla tecnica SDS-PAGE (16). La strumentazione può essere automatica. Il risultato è di tipo qualitativo e la lettura è soggettiva e di difficile interpretazione. Questo metodo consente l'identificazione di un grande numero di anticorpi compresi quelli più rari. Ci possono essere problemi per l'individuazione di anti-Sc170 a causa della labilità della molecola antigenica sensibile alle proteasi in fase di estrazione.

- **DB (Dot blot)**

Gli antigeni purificati sono blottati su strisce di nitrocellulosa. Il dosaggio è abbastanza rapido (circa 30') e semplice. Il risultato è qualitativo e la lettura è soggettiva. Il pattern anticorpale è ridotto.

NB: Per la ricerca degli ENA il sistema più diffuso è la metodica immunoenzimatica con la quale si determinano i 6 antigeni principali (Sm, U1RNP, SS-A, SS-B, Jo-1, SCL-70). Per gli altri antigeni estraibili, la determinazione è effettuata con metodiche quali WB, DB o ELISA laddove esista il kit appropriato.

OSSERVAZIONI

In conclusione possiamo dire che attualmente:

- Esiste una certa difficoltà di rilevazione degli anticorpi anti-Sm, anti-Sc170, anti-Jo1 dovuta sia alla labilità antigenica, sia alla difficoltà di legarsi a supporti solidi.
- Il metodo WB dovrebbe essere utilizzato come metodo di conferma di IDD, CIE, ELISA, DB.
- Considerando che attualmente le tecniche maggiormente impiegate per ottenere gli antigeni purificati sono di due tipi, ricombinanti ed estrattive, ne consegue che si possono avere diverse sensibilità e specificità e precisione analitica nell'ambito di uno stesso metodo di dosaggio a seconda che l'antigene impiegato sia stato ottenuto con l'una o con l'altra tecnica.
A tal proposito, sono indicati sia gli antigeni estrattivi che quelli ricombinanti, anche se questi ultimi sembrerebbero mantenere gli epitopi antigenici allo stato nativo.
Bisogna tener presente che anche il diverso tipo di supporto a cui sono adesi gli antigeni influisce sulla sensibilità e la specificità del metodo di dosaggio.
- Per tutti questi motivi pensiamo che una tecnica da sola non sia sufficiente ad individuare correttamente tutti i principali autoanticorpi, e che sia utile invece avere a disposizione un secondo metodo di conferma che potrebbe essere individuato nel WB, anche se è una tecnica piuttosto indaginosa e richiede una certa esperienza sia nell'esecuzione che nell'interpretazione dei risultati.

AUTOANTICORPI PIÙ SIGNIFICATIVI DAL PUNTO DI VISTA DIAGNOSTICO E DEL MONITORAGGIO:

1) AUTOANTICORPI ANTI-SS-A/Ro

L'antigene SS-A è una piccola ribonucleoproteina costituita da una molecola di RNA e da due proteine. Gli anticorpi sono diretti verso epitopi che si trovano sulle proteine. Questo antigene gioca un ruolo nel processo di traduzione del mRNA a molecole attive. È localizzato principalmente nel nucleo, ma si può trovare anche nel citoplasma.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-SS-A/Ro

- Gli anticorpi diretti verso entrambe le proteine da 52 e 60 kDa (2) si trovano sia nella Sindrome di Sjögren, sia nel LES.
- Gli anticorpi diretti esclusivamente contro la proteina di 52 kDa si trovano nella Sindrome di Sjögren e nel blocco atrio-ventricolare congenito.
- Gli anticorpi diretti esclusivamente contro la proteina di 60 kDa si trovano solo nel LES.
- Anticorpi anti-SS-A si trovano nel 50% dei casi di LES. Possono essere trasmessi al feto attraverso la placenta e causare una semplice reazione infiammatoria o causare un blocco cardiaco congenito nel neonato.

Pertanto in fase diagnostica, si consiglia il dosaggio di questi anticorpi per l'individuazione della patologia.

AUTOANTICORPI ANTI – SSA/Ro

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Fine speckled	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none">• Diagnosi di Sindrome di Sjögren, LES• Blocco atrio-ventricolare congenito	Una sola volta	IDD	<ul style="list-style-type: none">• Semplice• Affidabile
				ELISA	<ul style="list-style-type: none">• Automatizzabile• Semplice, di routine• Buona sensibilità• Conveniente
				IB	<ul style="list-style-type: none">• Facile interpretazione
				DB	<ul style="list-style-type: none">• Rapida• Semplice

2) AUTOANTICORPI ANTI-SS-B/La

L'antigene SS-B è una fosfoproteina (13) localizzata principalmente nel nucleo, soltanto il 10% dell'antigene può trovarsi nel citoplasma. Nel nucleo, l'antigene si comporta da proteina ausiliaria per l'RNA polimerasi III enzima che sintetizza piccole molecole di RNA. Durante la trascrizione, l'antigene SS-B si unisce alle molecole di RNA neoformate, dopo di che viene rilasciato.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-SS-B/La

- Gli anticorpi anti-SS-B si ritrovano praticamente solo in donne affette da Sindrome di Sjögren o da LES.
 - Nella Sindrome di Sjögren gli anticorpi anti-SS-A e anti-SS-B si ritrovano quasi sempre contemporaneamente.
 - Gli anticorpi anti-SS-B sembrano essere associati ad un coinvolgimento renale del LES (nefrite lupica).
- Pertanto in fase diagnostica, si consiglia il dosaggio di questi anticorpi per l'individuazione della patologia.

NOTA: L'antigene SS-A/Ro esiste sotto forma nativa, purificata o sotto forma ricombinante, utilizzato nei Kit nelle forme isolate SS-A 52 KDa e SS-A 60 KDa o come cocktail SS-A 52 KDa+SS-A 60 Kda.
 Gli autoanticorpi che riconoscono tali diversi epitomi non sono gli stessi e non presentano le stesse correlazioni cliniche.
 A seconda del tipo di Kit commerciale utilizzato si potranno, pertanto, avere risultati diversi e discordanti da quelli ottenuti con l'uso di altri Kit.

AUTOANTICORPI ANTI – SSB/La

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Fine speckled	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnosi di Sindrome di Sjögren, LES • Nefrite lupica 	Una sola volta	IDD	<ul style="list-style-type: none"> • Semplice • Affidabile
				ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizzabile • Semplice, di routine • Buona sensibilità • Conveniente
				IB	<ul style="list-style-type: none"> • Facile interpretazione
				DB	<ul style="list-style-type: none"> • Rapida • Semplice

3) AUTOANTICORPI ANTI-SCL70

L'antigene Scl70 è una proteina nucleare identificata come l'enzima DNA-topoisomerasi I (7) la cui funzione consiste nello svolgimento della doppia elica del DNA in fase di trascrizione.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-SCL70

- Gli anticorpi anti-Scl70 sono presenti in circa il 30-40% dei pazienti affetti da sclerodermia sistemica progressiva, di cui sono marker specifico.
- La contemporanea negatività per anti-Scl70 ed anti-centromero esclude la sclerodermia.
- Non c'è correlazione tra la loro concentrazione e l'andamento della malattia.

Pertanto in fase diagnostica, si consiglia la loro determinazione per l'individuazione della patologia. Una volta però che siano stati trovati in un paziente, non è di alcuna utilità rifare il test nel tempo, perché non esiste variazione per questo tipo di anticorpi, per cui non sono utili nel monitoraggio della malattia.

AUTOANTICORPI ANTI – Scl 70

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 nucleolare e granulare atipico o omogeneo (vetro smeriglio)	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnosi di Sclerodermia 	Una sola volta	CIE – PDS	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizzo di Ag non denaturato
				ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizzabile • Semplice, di routine • Buona sensibilità • Conveniente
				DB	<ul style="list-style-type: none"> • Rapida • Semplice

4) AUTOANTICORPI ANTI-PROTEINE CENTROMERICHE

Gli antigeni target degli anticorpi anti-centromeri sono tre differenti proteine localizzate nel cinetocoro: CENP-A, CENP-B, CENP-C, che sono legate alla cromatina centromerica. L'antigene principale è costituito dalla proteina centromerica B, che reagisce con tutti i sieri che contengono anticorpi anti-centromero.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-PROTEINE CENTROMERICHE

- Gli anticorpi anti-proteine centromeriche sono presenti nel 50-80% dei pazienti affetti da sclerodermia circoscritta (sindrome di CREST) (5), di cui sono marker specifico.
- La presenza contemporanea di anticorpi anti-centromero ed anti-mitocondrio M2 caratterizza la cirrosi biliare primitiva.

Pertanto in fase diagnostica, si consiglia la loro determinazione per la individuazione della patologia, ma riteniamo che non siano utili nel monitoraggio della malattia.

AUTOANTICORPI ANTI – PROTEINE CENTROMERICHE

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Centromerico	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnosi di Sclerodermia circoscritta (Sindrome CREST) 	Una sola volta	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizzabile • Semplice, di routine • Buona sensibilità • Conveniente

5) AUTOANTICORPI ANTI-PCNA O CICLINA

La ciclina o antigene nucleare delle cellule in proliferazione è una proteina ausiliaria della DNA-polimerasi delta (4) che gioca un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare: la sua concentrazione aumenta durante la fase G1, quando inizia la sintesi di DNA.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-PCNA

- Gli anticorpi anti-PCNA sono presenti in circa il 3% di pazienti affetti da LES in fase attiva, di cui sono marker specifico.
- Sono indicativi di un decorso sfavorevole della malattia verso glomerulonefrite.
- Questi anticorpi correlano con l'andamento della malattia; infatti se la loro concentrazione è alta, sono prognostici di una riacutizzazione, anche se il LES o la nefropatia sono quiescenti.
- Il quadro PCNA-pleomorfico è presente sempre da solo.

AUTOANTICORPI ANTI – PCNA O CICLINA

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 PCNA	Quantitativo	<ul style="list-style-type: none">• Diagnosi di Glomerulo-nefrite• Monitoraggio terapia• Andamento clinico	Mensile	IFI DB	<ul style="list-style-type: none">• Semplice• Sufficiente sensibilità• Conveniente • Semplice• Buona sensibilità• Alta specificità

6) AUTOANTICORPI ANTI-U1RNP e Sm

Si tratta di due complessi costituiti da un gruppo di piccole ribonucleoproteine (9) che intervengono come spliceosomi nella maturazione dei pre-mRNA in mRNA definitivi, con la funzione di eliminare gli introni dal pre-mRNA. Gli anticorpi sono rivolti esclusivamente su epitopi situati sulle proteine.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-U1RNP E Sm

- Un alto titolo di anticorpi anti-U1RNP è caratteristico della Connettivite Tissutale Mista (MCTD) nel 90-100% dei casi. Questi anticorpi correlano con l'andamento della malattia di cui sono marker specifico.
- Gli anticorpi anti-Sm hanno un'alta specificità per il LES. Insieme agli anticorpi anti-dsDNA sono patognomonici per il LES per il 20-40% dei casi, ma sono dotati di una bassa sensibilità analitica.

Pertanto, si ritiene che sia utile esprimere quantitativamente il dosaggio degli anticorpi anti-U1-nRNP, in quanto correla con l'andamento clinico della malattia ed è quindi utile nel monitoraggio.

NOTA: Perché un autoanticorpo possa essere identificato anti-Sm specifico del LES è necessario che l'antigene utilizzato nel Kit non contenga la proteina B/B' per la quale è nota una cross-reattività superiore del 60% con RNP.

AUTOANTICORPI ANTI – nRNP

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Corse speckled	Quantitativo	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnosi di MCTD • Monitoraggio terapia • Andamento clinico 	Mensile	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizzabile • Semplice, di routine • Buona sensibilità • Conveniente
				DB	<ul style="list-style-type: none"> • Semplice

AUTOANTICORPI ANTI – Sm

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Corse speckled	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnosi di LES 	Una sola volta	DB	<ul style="list-style-type: none"> • Rapida • Semplice
				ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizzabile • Semplice, di routine • Buona sensibilità • Conveniente
				CIE-PDS	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizzo di Ag non denaturato

7) AUTOANTICORPI ANTI-RNP RIBOSOMIALE (rP)

I ribosomi risultano dall'associazione di molecole proteiche con molecole di RNA e sono composti da due unità distinte. Un epitopo lineare costituito da 22 aminoacidi e comune alle fosfoproteine P0, P1, P2 costituisce il target specifico degli anticorpi anti-RNP ribosomiale, così come l'rRNA 28S.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-RNP RIBOSOMIALE

- Gli anticorpi anti-Ribosomi P rappresentano un marker specifico (99%) per il LES, in circa il 10-20% dei casi.
- Alti livelli di anticorpi anti-Ribosomi P si riscontrano nel 40-80% di pazienti affetti da LES con manifestazioni psicotiche acute (3).

Pertanto in fase diagnostica, si consiglia il dosaggio di questi anticorpi per l'individuazione della patologia, tanto più che il test IFI non è né specifico né sensibile per il Lupus psicotico. Il metodo ELISA è considerato il metodo di riferimento.

Inoltre in caso di sintomi clinici evidenti di LES o di patologie LES associate quali nefriti, psicosi, epatopatie, ma in assenza di markers specifici, questo test rimane l'unico strumento diagnostico attendibile.

AUTOANTICORPI ANTI – RNP RIBOSOMIALE

Pattern (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Ribosomiale citoplasmatico milky-way	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none"> Diagnosi di Lupus psicotico 	Una sola volta	ELISA IFI	<ul style="list-style-type: none"> Automatizzabile Semplice, di routine Buona sensibilità Conveniente

8) AUTOANTICORPI ANTI-Jo1

L'antigene Jo1 è stato identificato come l'enzima istidil-tRNA sintetasi (12) che si trova sia nel nucleo che nel citoplasma, e che catalizza l'unione di un aminoacido al corrispondente t-RNA.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-Jo1

- Gli anticorpi anti-Jo1 si ritrovano in circa il 50% di pazienti affetti da Dermato/Polimiosite, di cui sono marker specifico.

Pertanto in fase diagnostica, si consiglia il dosaggio di questi anticorpi per l'individuazione della patologia.

AUTOANTICORPI ANTI – Jo1

Pattern (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 punteggiatura citoplasmatica	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none"> Diagnosi di DM/PM 	Una sola volta	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> Automatizzabile Semplice, di routine Buona sensibilità Conveniente
				CIE-PDS	<ul style="list-style-type: none"> Utilizzo di Ag non denaturato
				IB	<ul style="list-style-type: none"> Facile interpretazione
				DB	<ul style="list-style-type: none"> Rapida Semplice

RICERCA DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-DNA, ANTI-ISTONI, ANTI-NUCLEOSOMI

1) AUTOANTICORPI ANTI-DNA

Nel caso di anticorpi diretti contro la molecola del DNA, la differenziazione va fatta tra due tipi:

- anticorpi diretti verso il DNA a doppia elica (dsDNA) o DNA nativo (nDNA) che si legano con epitopi situati sulla struttura esterna di deossiribofosfato del DNA (14);
- anticorpi diretti verso il DNA a singola elica (ssDNA) che si legano principalmente agli epitopi localizzati in zone ricche di basi puriniche e pirimidiniche.

Proposta Linee-guida delle patologie autoimmuni.doc

Gruppo di lavoro Patologie Autoimmuni (GLAPA) - AMCLI

Pagina 15 di 15

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI-DNA

- Gli anticorpi diretti verso il dsDNA si ritrovano esclusivamente in casi di LES, ed il loro rilevamento dipende sia dalla sensibilità del metodo impiegato, sia dalla fase più o meno attiva della malattia. Se la loro concentrazione è alta, sono prognostici di una riacutizzazione anche se il LES o la nefropatia sono quiescenti. A causa dell'alto grado di specificità, la loro presenza rappresenta uno degli 11 criteri di diagnosi di LES.
- Gli anticorpi anti ssDNA, oltre che nel LES, si ritrovano in molte altre malattie autoimmuni come ad esempio il Lupus da farmaci, la sclerosi sistemica progressiva, l'artrite reumatoide, la polimiosite/dermatomiosite ecc... e, per questo sono molto aspecifici.

Pertanto, dal momento che la concentrazione degli anticorpi anti dsDNA correla con l'andamento clinico del LES e della nefrite lupica, riteniamo che la loro determinazione quantitativa sia un mezzo utile per il monitoraggio della terapia e che lo si debba comunque eseguire obbligatoriamente in tutti i casi in cui il test ANA in fluorescenza risulti positivo al titolo \geq a 1:160 con pattern omogeneo. Si dovrebbe comunque tenere presente come la diagnosi di LES non possa essere esclusa sulla base del non rilevamento di questo tipo di anticorpi e come d'altra parte, la loro presenza, in assenza di sintomi clinici, è indicativa di un LES subclinico.

Per contro, data la grande aspecificità degli anticorpi anti-ssDNA, riteniamo che il loro dosaggio sia superfluo, in quanto esso non offre alcun chiarimento diagnostico in più rispetto alla determinazione degli anticorpi anti-nucleo eseguito su cellule Hep-2.

Test di Laboratorio raccomandati per evidenziare gli anticorpi anti-dsDNA (nDNA)

1. IFI (IFA)

- *Substrato cellulare: Crithidia luciliae.* Condizione indispensabile per definire positivo un campione è la fluorescenza del Kinetoplasto, organulo ricco di DNA nativo posto in posizione subterminale quasi a cavaliere della membrana del flagellato). Una fluorescenza isolata del nucleo, non accompagnata da quella del Kinetoplasto, non è significativa ed il campione in esame va considerato negativo così pure la sola fluorescenza del corpuscolo basale (polare sull'impianto del flagello)
- *Diluizione del campione in esame: 1:10. Rappresenta anche il titolo minimo significativo*

2. RIA (Tecnica di Farr)

3. ELISA: permette il dosaggio quantitativo in rapporto a standards di riferimento internazionali (WHO 80)

4. Dot blot

Osservazioni

IFI (IFA): è un test di non elevata sensibilità, ma altamente specifico in grado di evidenziare anticorpi ad alta e media avidità e di valutarne la classe e la capacità di legare il complemento. Non consente una valutazione quantitativa molto accurata (la positività viene espresso come reciproco della massima diluizione del siero ancora positiva)

RIA (test di Farr): è un test quantitativo molto sensibile e specifico in grado di evidenziare soprattutto anticorpi ad alta avidità. È ritenuto il golden standard per questa determinazione.

ELISA: è un sistema quantitativo sensibile, ma non di elevata specificità: Determina anticorpi sia ad alta che a bassa avidità (di minor significato clinico).

L'utilizzo come antigene di DNA ricombinante ne ha aumentato la specificità e la sensibilità.

Dot blot: test qualitativo semplice e specifico, ma non molto sensibile e con lettura molto soggettiva

NB: Gli anticorpi anti-dsDNA si possono evidenziano sulle cellule HEp-2 come pattern omogeneo o periferico. Alla positività per anticorpi anti-dsDNA determinata con i metodi sopradescritti corrisponde sempre una positività su cellule HEp-2 (ANA di tipo omogeneo o periferico), ma non è sempre vero il contrario.

AUTOANTICORPI ANTI-dsDNA

Pattern ANA su cellule HEp-2. Titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	dsDNA Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 omogeneo o periferico	Quantitativo	<ul style="list-style-type: none"> • Screening monitoraggio terapia • Andamento clinico • Diagnosi di LES 	Mensile	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizzabile • Semplice, di routine • Buona sensibilità • Conveniente
				RIA (Farr)	Più specifica
				IFA (C.luciliae) Da diluizione 1: 10	Per conferma diagnosi di LES in fase acuta attiva

NOTA: Gli anticorpi anti-nDNA rilevati in IFI su *Crithidia luciliae* sono specifici della fase acuta attiva del LES. Scompaiono generalmente nella fase di remissione. Sono invece ben evidenziabili gli anticorpi anti-dsDNA (purificato o ricombinante) rilevati mediante tecnica in ELISA indipendentemente dalla fase della malattia.

2) AUTOANTICORPI ANTI-ISTONI

Gli istoni sono proteine basiche associate al DNA. Il loro compito consiste nello stabilizzare la doppia elica di DNA ed è possibile che possano giocare un ruolo importante nella regolazione dei geni. Ci sono cinque tipi diversi di istoni: H1, H2A, H2B, H3, H4 e gli autoanticorpi possono essere rivolti contro ciascuno di essi.

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI ISTONI

- Gli anticorpi rivolti contro una o più frazioni istoniche o contro il complesso H2A-H2B si ritrovano prevalentemente nel LES farmaco-indotto (procainamide, idralazina, sulfonamidi, isoniazide, tranquillanti, anticonvulsivanti), (10) ma si possono riscontrare anche nel LES spontaneo, nell'artrite reumatoide, nelle vasculiti, nella cirrosi biliare primitiva.

Riteniamo che il dosaggio degli anticorpi anti-istoni possa non essere di grande aiuto nella differenziazione di varie malattie autoimmuni, considerando anche il fatto che non c'è correlazione tra la loro concentrazione e l'andamento clinico della malattia.

AUTOANTICORPI ANTI – ISTONI

Pattern ANA Titolo di partenza	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Omogeneo	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnosi di LES farmaco indotto 	Una sola volta	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Automatizzabile • Semplice, di routine • Buona sensibilità • Conveniente

3) AUTOANTICORPI ANTI-NUCLEOSOMI

I nucleosomi consistono in un nucleo formato da quattro coppie degli istoni H2A, H2B, H3 E H4, avvolte da due spire di doppia elica di DNA (dsDNA).

Nel LES gli anticorpi reagiscono in modo specifico con epitopi conformazionali esposti sui nucleosomi.

Pazienti affetti da LES producono inizialmente anticorpi anti-nucleosomi e successivamente anticorpi anti dsDNA.

Proposta Linee-guida delle patologie autoimmuni.doc

Gruppo di lavoro Patologie Autoimmuni (GLAPA) - AMCLI

Pagina 17 di 17

SIGNIFICATO DIAGNOSTICO DEGLI ANTICORPI ANTI NUCLEOSOMI

- Gli anticorpi anti-nucleosomi sono presenti nel 100% dei pazienti affetti da LES ed in particolare durante la fase attiva della malattia.
- Compaiono prima della manifestazione dei sintomi tipici di LES.
- Sono marker specifico di Nefrite Lupica.
- La loro concentrazione è sensibile al trattamento farmacologico per il LES.

Pertanto gli anticorpi anti-nucleosomi sono marker più precoce degli anticorpi anti dsDNA e permettono il monitoraggio del paziente in terapia.

Riteniamo che il dosaggio degli anticorpi anti-nucleosomi possa affiancare ma non sostituire il dosaggio degli anticorpi anti dsDNA nella diagnosi di LES.

NOTA: La rilevazione degli anticorpi anti-nucleosomi oltre che con la tecnica ELISA può essere ottenuta con Immunodot

AUTOANTICORPI ANTI – NUCLEOSOMI

Pattern ANA (IFI): titolo di partenza significativo	Tipo di dosaggio	Utilità	Cadenza	Tecnica di dosaggio consigliata	Motivazione
1 : 160 Omogeneo	Quantitativo	<ul style="list-style-type: none">• Diagnosi di LES in fase attiva• Diagnosi di nefrite lupica• Marker precoce di LES	Mensile	ELISA	<ul style="list-style-type: none">• Automatizzabile• Semplice, di routine• Buona sensibilità• Conveniente
	Qualitativo	<ul style="list-style-type: none">• Idem		DB	<ul style="list-style-type: none">• Ottima specificità• Buona sensibilità

BIBLIOGRAFIA

1. Asherson GL. Antibodies against nuclear and cytoplasmic cell constituents in systemic lupus erythematosus and other diseases. *Br J Exp Pathol* 1959; 40: 219-5.
2. Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kDa protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; 167: 1560-71.
3. Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman L, et al. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987; 317: 265-71.
4. Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. Cyclin PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . *Nature* 1987; 326: 515-7.
5. Earnshaw WC, Bordwell BJ, Marino C, Rothfield N. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera of patients with anti-centromere antibodies. *J Clin Invest* 1986; 77: 426-30.
6. Hang LM, Nakamura RM. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997; 34: 275-311.
7. Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, et al. Identification of a universal B cell epitome on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1580-7.
8. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 574-9.
9. Lührmann R, Kastner B, Bach M. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1087: 265-92.
10. Monestier M, Kotzin BL. Antibodies to histone in systemic lupus erythematosus and drug induced luous syndromes. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 415-36.

11. Neri R, Vitali C, Bombardieri S. Gli anticorpi anti nucleo: importanza clinica e metodi di determinazione. *Giorn It Allerg Immunol Clin* 1991; 1: 295-311.
12. Nishikai M, Reichlin M. Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis: characterization of the Jo-1 antibody system *Arthritis Rheum* 1980; 23: 881-8.
13. Pruijin GJM, Slobbe RL, van Venrooij WJ. Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep* 1990; 14: 43-8.
14. Reeves WN, Satoh M, Wang J, et al. Antibodies to DNA, DNA binding proteins, and histones. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 1-28.
15. Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1966; 96: 464-70.
16. Vauerfein S, Heide KG. Determination of autoimmune antibodies using western blot technique in the routine laboratory. *Z Reumatol* 1994; 53: 66-71.

Ricerca dei marcatori sierologici anticorpali e autoanticorpali della malattia celiaca

Introduzione

La formulazione corretta di malattia celiaca non può che essere la risultante della necessaria interazione tra il clinico e il laboratorista.

Il primo pone la diagnosi avvalendosi della biopsia, che rimane il "gold standard" nella diagnostica di questa malattia, e valutando i dati anamnestici e la storia familiare del paziente in esame. Il secondo lo supporta con i dati di laboratorio ricercando i marcatori sierologici più specifici e sensibili.

Per far ciò il laboratorista ha oggi a disposizione diversi test diagnostici, tutti di buona qualità, ma basati su diversi metodi analitici che li portano a differire tra loro in termini di sensibilità e specificità. Sta a lui scegliere e utilizzare quelli migliori studiandone e valutandone le caratteristiche peculiari.

Il test ideale per la ricerca di anticorpi e autoanticorpi per la malattia celiaca deve associare alla più alta specificità la più elevata sensibilità. Deve essere riproducibile e di facile impiego. I substrati antigenici proteici devono pertanto essere omologhi, privi di contaminazioni e altamente stabili. La loro molecola deve conservare sia gli epitopi lineari che quelli conformazionali per garantire il massimo di specificità e sensibilità.

I test diagnostici oggi commercialmente disponibili sono riportati di seguito:

TEST DIAGNOSTICI	
Marker sierologici	Metodo analitico
◆ Anticorpi IgA/IgG anti-gliadina (AGA)	EIA, ELISA,
◆ Anticorpi IgA anti-gliadina (spots di gliadina di frumento su vetrino)	IFI
◆ Anticorpi IgA anti-reticolina (ARA) (stomaco, rene, fegato di ratto)	IFI
◆ Anticorpi IgA anti-endomisio (EMA):	
– esofago di scimmia (terzo inferiore)	IFI
– ileo di scimmia	IFI
– cordone ombelicale umano	IFI
– arterie isolate da cordone ombelicale	IFI
– utero di primate	IFI
◆ Transglutaminasi tissutale (tTG)	ELISA

La tTG è stata identificata come l'autoantigene della malattia celiaca.

La gliadina rappresenta il substrato preferenziale per questo enzima calcio dipendente la cui azione provoca la formazione di nuovi epitopi antigenici.

In commercio esistono varie formulazioni di tTG in base alle fonti di antigene:

- Fonti naturali: guinea pig, estrattiva da fegato umano
- Fonti ricombinanti: *E. coli*, Baculovirus/cellule di insetto, 293-EBNA

La tTG che sembra aver evidenziato maggior specificità e sensibilità è quella umana ricombinante.

Così come dei vari substrati che si possono utilizzare per evidenziare gli anticorpi anti-endomisio IgA (EMA) quelli preferibili per la facilità di lettura e la sensibilità sono l'esofago o l'ileo di scimmia e il cordone ombelicale.

I test sierologici rivestono una fondamentale importanza perché vengono utilizzati primariamente per identificare i pazienti che necessitano di biopsia intestinale per una diagnosi definitiva, ma anche per monitorare la risposta alla terapia e la "compliance" della dieta.

Essi rappresentano, d'altra parte, uno strumento d'ausilio a volte decisivo cui il clinico fa ricorso per orientarsi tra l'ampia gamma di manifestazioni della malattia.

Grazie al loro utilizzo sono stati evidenziati alcuni individui che rimanevano asintomatici nonostante avessero le tipiche stigmati della celiachia alla biopsia intestinale. Di più, sono noti casi in cui l'ingestione di glutine in individui geneticamente suscettibili ha indotto la malattia clinica senza evidente danno mucosale.

Ciò ci porta a supporre che il completo spettro clinico della malattia celiaca non sia stato ancora del tutto descritto e che nuove manifestazioni possano essere riconosciute in futuro proprio attraverso l'utilizzo continuo di un programma di screening sierologico.

Gli anticorpi anti t-TG IgA compaiono solo nella malattia celiaca e hanno una specificità quasi totale. Anche gli EMA e gli anti-reticolina IgA (ARA1) hanno una specificità quasi del 100% e compaiono unicamente nella celiachia e nella dermatite erpetiforme che è ormai considerata un sintomo di questa.

Minore è la specificità degli AGA IgA (80-95%) mentre molto aspecifici sono gli AGA IgG che sono presenti anche nei casi di intolleranza alle proteine del latte vaccino, nella giardiasi, nelle enteriti severe e in alcuni casi di malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

Varia è pure la sensibilità di questi test come si evince dalla seguente tabella.

Tabella 1. Sensibilità e specificità degli anticorpi IgA nella malattia celiaca

ANTICORPO	SENSIBILITÀ	SPECIFICITÀ	METODO
IgA tTG	90-98%	Quasi 100%	ELISA
IgA EMA	90-96%	Quasi 100%	IF
IgA AGA	70%	80-95%	ELISA
IgA ARA1	60%	Quasi 100%	IF

Test di Laboratorio raccomandati

La scelta del tipo e del numero di test di Laboratorio da utilizzare deve essere necessariamente funzione della loro sensibilità e specificità non prescindendo l'importante aspetto costo-benefici.

Si consiglia l'utilizzo della combinazione dei test anti-EMA in IFA e anti tTG poiché consente la determinazione massima degli anticorpi presenti nei pazienti celiaci.

La determinazione degli autoanticorpi IgG AGA e IgA AGA, ancora oggi largamente diffusa, dovrebbe essere a poco a poco abbandonata considerando la limitata sensibilità e specificità del metodo. Al più si potrebbe ricorrere alla determinazione degli anticorpi IgG AGA nei casi di pazienti EMA IgA negativi, ma con sospetto clinico di malassorbimento o in pazienti con deficit selettivo di IGA.

❖ Anti-EMA in IFI (IFA)

- Substrato

Il substrato più idoneo è rappresentato dal terzo inferiore di esofago o dall'ileo di scimmia.

Il terzo inferiore dell'esofago rappresenta il substrato tradizionale, da anni conosciuto e utilizzato. L'ileo sembra essere ancora più specifico e sensibile dell'esofago rappresentando l'organo bersaglio della patologia enterica da intolleranza al glutine.

Anche il cordone ombelicale umano è un buon substrato, di minor costo rispetto ai primi due, ma a nostro avviso di più difficile lettura microscopica, soprattutto per chi non possiede grande esperienza. In particolare può risultare difficile la differenziazione dai quadri fluoroscopici dovuti alla presenza nel siero campione di anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA).

- Diluizione del campione di siero

La diluizione base del campione è 1:10. Anche se si può partire da diluizione inferiore si deve considerare 1:10 come il titolo clinicamente significativo di partenza da cui far iniziare le diluizioni scalari. Infatti, in caso di positività il siero deve essere diluito scalarmente a raddoppio. La positività deve essere espressa come reciproco della più alta diluizione del siero che appare ancora fluorescente.

- Lettura a microscopio a fluorescenza

Il vetrino va letto a 400X. La positività su substrato costituito da terzo inferiore di esofago si manifesta come una fluorescenza di tipo reticolare nella cappa della muscolatura liscia prossima alla mucosa dell'esofago. Su ileo la presenza di autoanticorpi conferisce una fluorescenza brillante alla lamina propria attorno alle cripte e sotto i villi e alla *muscularis mucosae*.

❖ tTG in ELISA (test quantitativo in micropiastre)

La formulazione dell'antigene coattato ai micropozzetti attualmente consigliata è la tTG umana ricombinante. La tTG umana mostra una maggior specificità e sensibilità in quanto assicura una totale omologia con l'autoantigene nativo e una struttura spaziale della proteina integra. Ciò consente di esprimere tutti gli epitopi antigenici, sia quelli lineari che conformazionali.

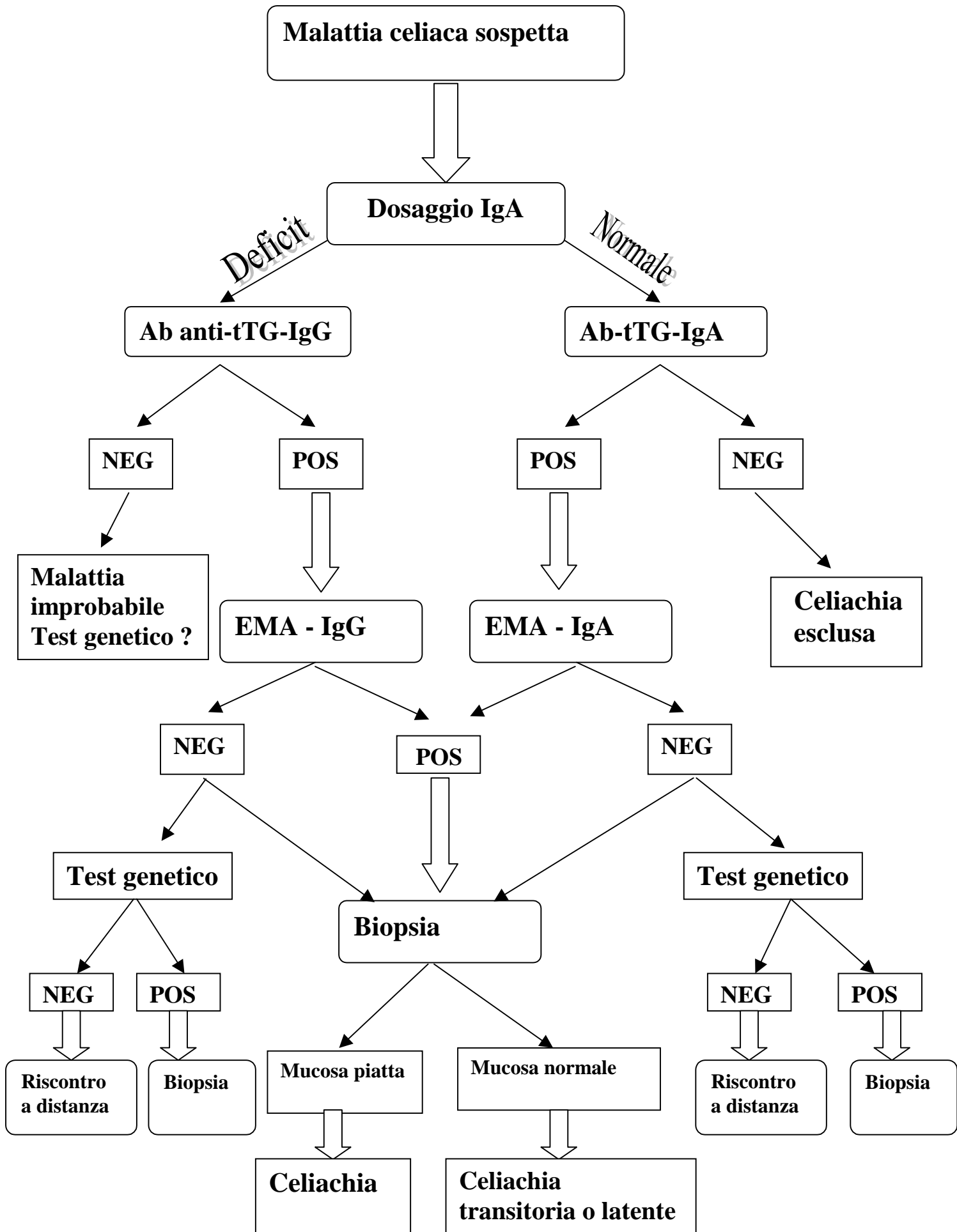
Da dati in letteratura questo test è altamente specifico e leggermente più sensibile dell'EMA.

Osservazioni

Con i metodi EMA e TTG deve essere ricercata solo la classe IgA di autoanticorpi poiché è la sola considerata diagnostica della malattia celiaca. Tuttavia è sempre più pressante la domanda se non sia utile dosare anche la classe IgG (come avviene da sempre per le IgG anti-gliadina).

Si è del parere che si possa ricorrere alla ricerca degli isotipi IgG1 EMA, IgG tTG e IgG AGA nei casi di pazienti EMA IgA negativi, ma con sospetto clinico di malassorbimento o in pazienti con deficit selettivo di IGA. Da studi preliminari è stato evidenziato che anticorpi IgG1 EMA e IgG tTG sono più utili degli IgG AGA nell'identificare questa tipologia di pazienti, ma sono meno soddisfacenti per monitorare la "compliance" della dieta.

Da quanto esposto ci sembra che il seguente algoritmo proposto possa consentire il recupero di marcatori autoanticorpali di più elevata sensibilità e specificità della malattia celiaca eseguendo il minor numero di test disponibili.



Note:

- ◆ La tTG deve essere di origine umana.
- ◆ Il test genetico, per la ricerca degli alplotipi HLA II DQ2 e DQ8, è utile in caso di sintomatologia presente, ma sierologia negativa o dubbia e nello studio dei familiari. Se il test è negativo la celiachia è esclusa
- ◆ Per deficit IgA si intendono valori inferiori a 5 mg/dl
- ◆ Nei bambini di età fino a 3 anni sintomatici è stata evidenziata in casi eccezionali la positività AGA IgA e negatività tTG IgA/IgG. Pertanto può essere valutata la possibilità di eseguire la ricerca di AGA IgA in tutti questi bambini.

BIBLIOGRAFIA

1. Cataldo F, Lio D, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR, the Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue. IgG1 antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. Reprinted from GUT. September 2000; 47 (3): 366-9.
2. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, et al. Celiac disease in the years 2000, exploring the iceberg. Lancet, 1994; 343: 200-3.
3. Dietrich W, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature med 1997; 3: 797-801.
4. Hansson T, Dahlbom I, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A, Klareslog L. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30: 379-84.
5. Maasen A, Conrad K, Porstmann. Diagnosis of celiac disease by ELISA: The importance of the formation of neoepitopes of tissue transglutaminase (tTG) versus the human or guinea pig origin. Report on the 5th Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden October 18-21, 2000; 552-3.
6. Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, et al. Celiac Disease Diagnosis in Misdiagnosed Children. Pediatric Research 2000; 48 (5).

Ricerca dei marcatori sierologici autoanticorpali delle malattie infiammatorie dell'intestino (IBD)

INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie dell'intestino (IBD) si possono suddividere in colite ulcerosa (UC) e malattia di Crohn (CD). La loro patogenesi non è stata ancora del tutto chiarita. Indubbiamente giocano un ruolo determinante fattori genetici, ambientali e immunologici. Recentemente è stata chiamata in causa anche l'azione di antigeni alimentari, in particolare le proteine del latte vaccino.

D'altra parte è stata evidenziata un aumento di casi di intolleranza al glutine in pazienti con UC ed un aumento di titolo di anticorpi rivolti in modo specifico verso *Saccharomyces cerevisiae* in pazienti con CD, se paragonati a pazienti con UC o a persone sane di controllo.

La ragione della presenza in queste patologie di titoli elevati di anticorpi rivolti contro antigeni della dieta fa presupporre che ci sia un difetto nella barriera intestinale che consente alle macromolecole di passare senza essere degradate.

L'attenzione è oggi focalizzata sull'autoimmunità che si suppone reciti un ruolo di primissimo piano nell'eziologia dell'UC e del CD. In particolare si pone un particolare interesse alla diagnosi sierologica per la ricerca di eventuali autoanticorpi coinvolti e prima di intraprendere la terapia mirata.

I principali autoanticorpi indagati sono gli anti-neutrofili (pANCA/NANA), gli anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e gli anti-pancreas esocrino (PAB).

La tabella seguente (modificata da Seibold, 2000) riporta la prevalenza di questi diversi tipi di autoanticorpi nelle diverse malattie infiammatorie dell'intestino.

CD= Crohn; UC= colite ulcerosa; CAH= epatite cronica attiva; PBC= cirrosi biliare primitiva

Prevalenza di ASCA, p-ANCA e PAB in varie malattie e in controlli

	N°	ASCA	pANCA	PAB
CD	125	90 (72%)	18 (14%)	37 (30%)
UC	40	0	31 (78%)	0
CAH	12	0	3 (25%)	0
PBC	10	0	1 (10%)	0
Celiachia	10	1 (1%)	0	0
Vasculite	20	0	2 (10%)	0
Per. sane	30	0	0	0

(da Seibold modificata, 2000)

Si può evincere che gli ASCA sono prevalentemente presenti nei pazienti affetti da CD, mentre i p-ANCA in quelli con UC. Meno indicativi sembrano essere i PAB anche se sono esclusivi della CD.

Se ne deduce che la determinazione contemporanea degli anticorpi ASCA e pANCA è un importante mezzo che consente una diagnosi differenziale tra CD e UC.

Test di Laboratorio raccomandati

❖ anticorpi anti-p-ANCA (NANA)

Si consiglia la loro determinazione in IFA su substrato costituito da granulociti. È, infatti, necessario precisare che questi anticorpi anti-neutrofili non sono p-ANCA classici, ma sono atipici. Con l'ausilio della microscopia elettronica è stato evidenziato che l'antigene bersaglio non è localizzato a livello del citoplasma, come i p-

ANCA classici, ma è associato alla cromatina alla periferia del nucleo. Da qui il termine NANA che sta per "nuclear associated neutrophil antibodies". Si deve far ricorso obbligatoriamente all'IFA su granulociti poiché l'antigene specifico non è stato ancora identificato.

- **Substrato**

È rappresentato da polimorfonucleati fissati non solo tradizionalmente in etanolo e formalina, ma anche in metanolo. Su quest'ultimo substrato il pattern si manifesta in modo più marcato.

- **Diluizione del campione di siero**

La diluizione base del siero in esame è 1:20. In caso di positività il siero deve essere diluito scalarmente a raddoppio. La positività deve essere espressa come reciproco della più alta diluizione del siero che appare ancora fluorescente.

- **Lettura a microscopio a fluorescenza**

La lettura deve essere effettuata a 400X. La presenza di anticorpi NANA conferisce ai granulociti fissati in etanolo una fluorescenza perinucleare molto sottile, ancor più evidente sui granulociti fissati in metanolo, diversa da quella data dai p-ANCA classici che è più spessa e meno netta. Inoltre i NANA si differenziano dai p-ANCA classici anche perché sono completamente negativi sui neutrofilii fissati in formalina.

❖ **ASCA**

La determinazione degli anticorpi *anti-Saccharomyces cerevisiae* può essere effettuata sia in IFA che in ELISA.

- **IFI**

Il substrato è rappresentato da cellule di *Saccharomyces cerevisiae*.

Il siero in esame deve essere testato per entrambi gli isotipi IgG e IgA e va diluito in accordo con il protocollo del test in uso: normalmente 1:100 per le IgA e 1:1000 per le IgG, diluizioni che vengono considerate di norma come soglie di significatività.

In caso di positività il siero deve essere diluito scalarmente a raddoppio. La positività deve essere espressa come reciproco della più alta diluizione del siero che appare ancora fluorescente.

All'osservazione microscopica la presenza di ASCA conferisce una fluorescenza marcata alla parete delle cellule del lievito.

- **ELISA**

Il test va effettuato in micropiastre nei cui pozzetti è stato coattato l'antigene.

Osservazioni

E' consigliato determinare sia in IFI che in ELISA entrambe gli isotipi IgG e IgA.

BIBLIOGRAFIA

1. Conrad K, Schmechta H, Schafer A, Lobeck G, Hhling HH, Gerdi S, Henker J. Autoantibody profile in patients with inflammatory bowel disease. Report on the 5th Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden october 18-21, 2000; 540-1.
2. Quinton IF, Sendid B, Reumaux D, et al. Anti-saccharomyces mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. Gut 1998; 42: 788-91.
3. Seibold F. Autoimmunity in gastrointestinal disease. Report on the 5th Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden october 18-21, 2000; 516-29.
4. Vermeire S, Joossen S, Peeters M, et al. Comparative study of ASCA (anti-saccharomyces cerevisiae) assay in inflammatory bowel disease (IBD) Report on the 5th Dresden Symposium on Autoantibodies., Dresden october 18-21, 2000; 537.
5. Zerbe B, Teegen B, Dahnrich C, et al. Relevance of antibodies against *Saccharomyces cerevisiae* for the diagnosis of chronic-inflammatory bowel disease. Report on the 5th Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden october 18-21, 2000; 358-9.

Ricerca degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA)

Gli ANCA sono autoanticorpi rivolti contro antigeni (proteine enzimatiche) citoplasmatici dei granulociti neutrofili e dei monociti sono stati riconosciuti come importanti marker delle vasculiti primarie sistemiche dei piccoli vasi.

Si rinvencono soprattutto nella granulomatosi di Wegener, nella poliarterite microscopica nodosa, nella glomerulonefrite progressiva idiopatica, nella sindrome di Churg-Strauss e nella colite ulcerosa.

Raramente sono presenti anche nel LES, nell'artrite reumatoide e nel morbo di Crohn, mentre solo eccezionalmente sono riscontrabili nei sieri di pazienti con neoplasie o HIV positivi.

La tabella seguente evidenzia gli antigeni target e le manifestazioni cliniche associate:

ANCA, ANTIGENI TARGET E PATOLOGIE ASSOCIATE		
PATTERN	ANTIGENI	PATOLOGIE
c-ANCA	PR-3 BPI	Granulomatosi di Wegener, infezioni polmonari, mucoviscidosi
c-ANCA (rari)	PR-3	Poliarterite microscopica
c-ANCA (falsi positivi)	?	Pazienti HIV positivi, neoplasie
a-ANCA	?	?
p-ANCA	MPO	Poliarterite nodosa microscopica, glomerulonefrite necrotizzante, sindrome di Churg-Strauss, colangite sclerosante primitiva
p-ANCA	LF E Catapsina G (Cat.G)	Vasculiti secondarie, LES LES, artrite reumatoide Coliti infiammatorie
p-ANCA/NANA	Antigene cromatina associato	Colite ulcerosa Morbo di Crohn (raro)

Test di Laboratorio raccomandati

Due sono le tecniche di laboratorio consigliate: IFA ed ELISA

❖ ANCA in IFI (IFA)

Questa tecnica utilizza come substrato colture di granulociti umani stabilizzati, fissati in etanolo o in formalina. Si consiglia di testare ogni siero campione alla diluizione 1:20 con entrambi i substrati.

All'osservazione microscopica (a 400X) si possono evidenziare i seguenti pattern autoanticorpali:

- **c-ANCA:** l'antigene riconosciuto dagli autoanticorpi è la Proteinasi-3 (PR-3), un enzima (serin-proteinasi) presente nei granuli alfa azzurrofilo dei granulociti con attività proteolitica e antibatterica. La reazione conferisce un quadro fluoroscopico caratterizzato da una fluorescenza granulare del citoplasma dei neutrofili fissati in etanolo.

Gli autoanticorpi evidenziati sono specifici della granulomatosi di Wegener essendosi ritrovati in circa il 90 % dei pazienti con tale patologia.

In alcuni pazienti con infezioni polmonari o affetti da mucoviscidosi sono stati osservati anticorpi che conferivano un quadro fluorescente di c-ANCA, ma riconoscevano un antigene diverso dalla PR3, la BPI (bactericidal permeability-increasin protein) o CAP57, una proteina cationica con spiccata attività battericida espletata soprattutto sui batteri Gram negativi. Interagisce con la sua carica con le cariche negative dei lipopolisaccaridi delle membrane batteriche alterandone la permeabilità e causandone la morte.

Un quadro atipico dei c-ANCA, chiamato a-ANCA è rappresentato da una fluorescenza citoplasmatica non granulare, ma più omogenea. È attribuibile alla reazione degli autoanticorpi con un antigene diverso non ancora noto e non è specifico di alcun quadro clinico.

- **p-ANCA:** gli autoanticorpi presenti hanno come bersaglio antigeni differenti dai c-ANCA e sono rappresentati soprattutto da mieloperossidasi (MPO), una glicoproteina anch'essa presente nei granuli azzurrofilo con attività antimicrobica.

Altri antigeni minori (molto rari) bersaglio di autoanticorpi che conferiscono questo tipo di pattern fluoroscopico sono stati identificati nella lattoferrina (LF), elastasi (E), catepsina G (Cat.G.) differenziabili con sistemi ELISA.

I p-ANCA manifestano una **spessa fluorescenza perinucleare** dei neutrofili fissati in etanolo. Sono dei marcatori più generici dei c-ANCA e sono stati individuati nel 70% dei pazienti con poliarterite microscopica o con glomerulonefrite necrotizzante, nel 5-40% dei pazienti con sindrome di Churg-Strauss e in pochi casi di colangite sclerosante primitiva (CSP), LES e artrite reumatoide.

Osservazioni

Il pattern p-ANCA è un artefatto, poiché la fissazione dei neutrofili in etanolo distrugge la membrana dei granuli e le proteine solubili ivi contenute tendono a distribuirsi nelle cellule secondo la loro carica elettrica. La PR3 è una molecola neutra e resta nei granuli, mentre la MPO avendo una carica elettropositiva si ridistribuisce nella cellula attorno al nucleo.

Ciò può creare dei problemi di lettura microscopica quando sono presenti degli anticorpi anti-nucleo granulociti specifici (GS-ANA), caratteristici di alcune patologie reumatiche come la sindrome di Felty, che danno un pattern fluorescente che si sovrappone a quello dei p-ANCA.

Per differenziare i veri p-ANCA dai GS-ANA si deve ricorrere all'utilizzo di vetrini che utilizzano come substrati **granulociti fissati in formalina** che impedisce alle proteine dei granuli di migrare attorno al nucleo.

In tale maniera i c-ANCA e i p-ANCA daranno un uguale pattern granulare citoplasmatico e i GS-ANA verranno ben distinti in quanto non fluorescenti.

In alternativa si possono distinguere i p-ANCA dagli ANA con pattern omogeneo o periferico, a volte associati in sieri di certi pazienti, che potrebbero interferire e portare a letture microscopiche confuse, ricorrendo all'utilizzo contemporaneo di un altro substrato costituito da tessuto epatico di scimmia.

Il nucleo degli epatociti manifesta una fluorescenza a piccole zolle e di intensità minore rispetto a quella dei granulociti presenti nei sinusoidi che è perinucleare, più omogenea e brillante e pertanto nettamente differenziabile.

- **P-ANCA/NANA:** l'antigene target è verosimilmente non un antigene citoplasmatico, ma un antigene cromatina-associato dei neutrofili (nuclear associated neutrophil antibodies o NANA). Gli autoanticorpi sono presenti in circa il 70-80% dei pazienti con colite ulcerosa, mentre sono evidenziabili solo in minima parte (10% circa) nei pazienti con malattia di Crohn.

All'osservazione microscopica su substrato fissato in etanolo il pattern si manifesta con un quadro perinucleare simile al pattern p-ANCA, ma la fluorescenza attorno ai lobi del nucleo è molto più sottile e lineare.

Questo pattern si evidenzia in modo più marcato utilizzando come substrato granulociti fissati in metanolo mentre è completamente **negativo sui neutrofili fissati in formalina**.

Il seguente schema riassume i pattern fluoroscopici di ANCA sui diversi substrati

Pattern	Etanolo	Formalina	Metanolo
c-ANCA	Granulare citoplasmatico	Granulare citoplasmatico	
p-ANCA	Perinucleare	Granulare citoplasmatico	
p-ANCA/NANA	Perinucleare molto sottile	Negativo	Perinucleare molto sottile (molto evidente)

Commenti

- ◆ Si dovrebbe ricorrere all'IFI per testare i sieri campione di tutti i **nuovi pazienti** poiché nel 10% dei pazienti affetti da malattia di Wegener o da poliarterite microscopica si possono evidenziare autoanticorpi ANCA-positivi solo con questa metodica.
- ◆ Sieri di pazienti in precedenza positivi per ANCA esclusivamente con IFA devono essere in seguito testati solo con la stessa metodica.
- ◆ In caso di positività è consigliato diluire il siero in esame ed esprimere nella risposta il titolo come reciproco della diluizione più elevata del siero ancora positiva alla fluorescenza.

- ◆ La diluizione base del siero consigliata dal First International ANCA Workshop per determinare gli ANCA in IFA è 1:20, ma 1:40 potrebbe aiutare ad escludere i risultati falsamente positivi.
- ◆ Come tutte le reazioni in IFI l'aggiunta di albumina bovina all'1% al diluente del siero campione e al tampone di lavaggio può abbassare la fluorescenza background.
- ◆ È consigliato l'uso di un coniugato fluoresceinato IgG.
- ◆ I sieri campione **non devono** essere inattivati a 56°C poiché potrebbero dare risultati falsamente positivi

❖ ANCA in ELISA

Il test in ELISA, che utilizza come antigeni una preparazione purificata di granuli azzurrofilii dei granulociti, consente l'identificazione e il dosaggio quantitativo degli ANCA specifici anti-PR3, anti-MPO, anti-elastasi, anti-lattoferrina, anti-catepsina G, anti-BPI e anti-lisozima.

In particolare il dosaggio anti-PR3 rappresenta un test indispensabile per la conferma della diagnosi di malattia di Wegener e permette di monitorare l'evoluzione del tasso degli autoanticorpi che correlerà con l'attività della malattia.

Molto importante è il cut-off, la cui scelta deve essere determinata per ciascun Laboratorio dopo aver testato un certo numero di sieri normali e patologici.

I kit devono contenere necessariamente controlli positivi e negativi e almeno 5 o 6 punti standard per costruire la curva di riferimento su cui calcolare i risultati.

Nello studio delle vasculiti la ricerca degli ANCA deve essere limitata a PR3 e a MPO in quanto sono solamente questi gli autoantigeni che rivestono un interesse diagnostico. È sconsigliato l'utilizzo di test per la ricerca di autoantigeni minori (LF, E, BPI, CatG) in quanto non è stata evidenziata alcuna correlazione con quadri clinici specifici.

Commenti

- ◆ Tutti i sieri campione si dovrebbero testare in ELISA per PR3 e MPO poiché il 5% di essi è positivo solo con questa tecnica.
- ◆ Il ricorso al sistema ELISA è raccomandato per i sieri ANCA-positivi in IFA con un pattern fluorescente che non sia citoplasmatico laddove ci possa essere l'interferenza di ANA
- ◆ Si dovrebbe sospettare una reazione aspecifica se nello stesso campione sono riscontrati PR3-ANCA e MPO-ANCA a bassi titoli.
- ◆ L'International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA dell'American Society of Clinical Pathologists (Am. J. Clin. Pathol. 1999; 111: 507-13) preferisce l'utilizzo di antigeni nativi a quello di antigeni ricombinanti, la cui utilità necessita di ulteriori verifiche.

Conclusioni

- L'optimum nella diagnostica degli ANCA per lo Studio Europeo di standardizzazione delle metodiche condotto da Hagen e altri autori è quello di unire la ricerca in IFA con quella in ELISA per ogni campione da esaminare. Infatti l'IFA da sola scopre circa il 90-95% degli ANCA positivi in sieri di pazienti con granulomatosi di Wegener, poliarterite microscopica e glomerulonefrite necrotizzante e l'ELISA per PR3 e MPO circa il 90%.
- L'esecuzione di entrambe i test è in particolar modo consigliabile nelle fasi di screening e diventa imperativo per i pazienti con forte sospetto clinico di vasculite associato agli ANCA.

BIBLIOGRAFIA

1. Boosma MM, et al. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 20-5.
2. Kallemberg CGM, Cohen Tervaert JW. What is new with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: diagnostic, pathogenetic and therapeutic implications. *Curr Opin Nephrol Hypertension*. 1999; 8: 307.
3. Malickova K, Janatkova I, Fucikova T, Lukas M, Adamec S. Diagnostic value of ASCA and p-ANCA in inflammatory bowel diseases. Report on the 5th Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden October 18-21, 2000; 542.
4. Hagen EC et al.: Diagnostic value of standardized assay for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int*; 53-743; 1998.

5. Hagen EC, Ballieux Bart EPB, van Es Leendert A, Daha MR, van der Woude FJ. Antineutrophil Cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays and the clinical and possible pathogenetic consequences. *Blood* (april 15), 1993; 81 (8): 1996-2002.
6. Radice A, et al. Contribution of immunofluorescence to the identification and characterization of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. The role of different fixatives. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 707.
7. Savige J, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *AM J Clin Pathol*. 1999; 111: 507.
8. Segelmark M, et al. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol*. 2000; 18: 629.
9. Zhao Ming-Hui, Lockwood CM Ph D. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity other than PR3 and MPO (X-ANCA). Peter JB and Shoenfeld Y editors. *Autoantibodies*. Elsevier Science BV. 1996; 68-72.

Ricerca degli autoanticorpi anti-fosfolipidi

INTRODUZIONE

Gli autoanticorpi anti-fosfolipidi (aPL) caratterizzano una patologia autoimmune recente, la *sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS)*, così denominata perché questi anticorpi sono presenti nella maggior parte dei malati (3) (5).

La APS viene definita in base a criteri clinici e di Laboratorio:

(1) Criteri clinici essenziali

- Trombosi venose, arteriose o dei piccoli vasi in qualsiasi tessuto od organo (eccezion fatta per trombosi venose superficiali) con conferma istologica o strumentale (doppler).
- Tre o più aborti spontanei consecutivi prima della 10^a settimana di gestazione escludendo cause di anomalie materne od ormonali e cause cromosomiche parentali.
- Una o più morti fetali inspiegabili (oltre la 10^a settimana di gestazione, con morfologia fetale normale, documentata con indagini ad ultrasuoni o esame diretto del feto).
- Uno o più parti prematuri con morfologia normale del neonato (prima della 34^a settimana di gestazione, per una grave preeclampsia, eclampsia o insufficienza placentare).

(1a) Altri criteri clinici

- Trombocitopenia
- Livedo reticularis
- Anemia emolitica

NB: La presenza di aPL caratterizza anche il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), ragion per cui la loro ricerca viene routinariamente richiesta per l'inquadramento di questa patologia.

(2) Criteri di Laboratorio

- Positività persistente per anticorpi anti-cardiolipina (aCL) β 2glicoproteina I-dipendenti (β 2GPI) di classe IgG e/o IgM a titolo medio-elevato, riscontrata mediante tecnica ELISA in due o più campioni distanziati di almeno 8 settimane
- Positività persistente per Lupus Anticoagulant (LA) riscontrata in due o più occasioni ad almeno 6 settimane di distanza

NB: Per porre diagnosi di APS devono essere soddisfatti almeno 1 criterio clinico essenziale (punto 1) e 1 criterio di Laboratorio (punto 2) (6).

Altre manifestazioni frequenti di APS

Oltre che in quelle menzionate più frequenti gli aPL sono riscontrabili in molte altre manifestazioni di sistemiche:

- Cardiache: infarto del miocardio, patologia delle valvole
- Neurologiche: ischemia cerebrale, corea, demenza
- Reumatologiche: oltre al LES, sindrome di Sjogren, artrite reumatoide, vasculiti
- Nefrologiche: trombosi glomerulare

Prevalenza di anticorpi anti-fosfolipidi

- | | |
|-----------------------------|--------|
| • Popolazione sana | 1-4% |
| • Trombosi venosa/arteriosa | 25-30% |
| • Poliabortività idiomatica | 25-50% |
| • Trombocitopenia | 50-60% |
| • Sifilide | 93% |
| • AIDS | 93% |
| • LES | 15-50% |
| • Artrite reumatoide | 33% |
| • Sclerodermia | 25% |
| • Disturbi neurologici | 20-30% |

Test di Laboratorio raccomandati

1) aPL

Nonostante siano disponibili diversi tests commerciali in ELISA per la determinazione di aPL (anti-cardiolipina, anti-fosfolipidi totali elettronegativi, anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidiletanolamina) o per l'evidenziazione di proteine capaci di legare i fosfolipidi (anti- β 2 glicoproteina I) di classe IgG, IgM, e IgA, l'indirizzo classificativo attuale considera significativi e probanti per APS unicamente la positività a titolo medio-alto del LAC e degli aCL β 2-dipendenti di classe IgG e/o IGM.

2) aCL

Il test raccomandato è quello in ELISA per il quale non esiste ancora una standardizzazione internazionale.

- È comunque **imprescindibile che il test evidenzi autoanticorpi aCL β 2GPI-dipendenti di classe IgG e/o IgM**. Per tale motivo il kit deve contenere questa proteina sotto forma di siero bovino fetale al 10% nel tampone di diluizione dei sieri, di lavaggio e bloccaggio. Ancora discusso è il ruolo dell'isotipo IgA. Mentre alcuni autori sostengono che sia di nulla o scarsa rilevanza, altri raccomandano di dosarlo ugualmente per non perdere alcuna informazione.
- È consigliato testare i campioni (siero o plasma) in doppio
- È sempre opportuno determinare il cutt-off del proprio Laboratorio testando un certo numero di sieri di soggetti sani scelti in modo eterogeneo sia per sesso che per fasce di età
- I valori devono essere espressi in unità GPL e MPL (μ g/ml) e riferiti a range di valori che esprimono negatività, bassa positività, media positività e alta positività (7).

3) Lupus Anticoagulant (LA)

Il LA è un anticorpo di classe IgG e/o IgM capace di prolungare "in vitro" tutti i test di coagulazione fosfolipidi-dipendenti. In particolare esso prolunga il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), con o senza concomitante prolungamento del tempo di protrombina, e il *Russel Viper venom time*. (8)

Per le relative Linee-guida si rimanda al lavoro di Brandt JT, et al. (Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 74:1185; 1995) (2).

4) Anticorpi anti- β 2 glicoproteina I (anti- β 2GPI)

La β 2GPI è una glicoproteina cationica di 50 Kda presente nel plasma di soggetti normali e rappresenta il principale antigene-target anticorpale nella APS. Data la sua carica positiva essa si lega facilmente alla cardiolipina caricata negativamente.

Si possono dosare gli anticorpi rivolti unicamente contro la β 2 glicoproteina I (anti- β 2GPI) mediante un test in ELISA, in cui l'antigene umano purificato è direttamente immobilizzato in assenza di fosfolipidi.

Questo test però necessita ancora di essere rifinito e standardizzato per consentire un miglior confronto di dati tra i Laboratori che utilizzano kits home-made e commerciali.

Anche se il significato degli anticorpi anti- β 2GPI è ancora molto controverso viene consigliata la loro determinazione per pazienti con sospetto di APS, ma negativi per aCL e LA.

Infatti, sembrerebbe che il test per anti- β 2GPI presenti una maggior specificità rispetto al test per aCL anche se con una minor sensibilità (1) (4).

BIBLIOGRAFIA

1. Arvieux J. Testing for and Clinical significance of Anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Elias Journal*. June 2000; 1: 6-8.
2. Brandt JT, et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost*. 1995; 74: 1185.
3. Harris EN, et al. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Int Med* 1986; 146: 2153.
4. Meroni PL. Anticorpi anti β 2glicoproteina: il primo membro della famiglia degli anticorpi anti-fosfolipodi con dignità diagnostica e patogenetica. *Atti del Simposio: Malattie Autoimmuni Sistemiche*. Hotel Sheraton, Firenze 24 febbraio 2000; 77-84.
5. Olschowka N. Anticardiolipin antibodies and pregnancy. *Elias Journal*. June 2000; 1: 8-10.
6. Olschowka N. The Antiphospholipid Syndrome: classification criteria. *Elias Journal*. June 2000; 1: 11.
7. Tincani A, et al. Overview on Anticardiolipin ELISA Standardization. *J Autoimmun* 2000; 15: 195.
8. Valesini G, et al. Gli anticorpi antifosfolipidi. *Giornale Italiano di Allergologia e Immunologia Clinica*. Diagnostica delle malattie autoimmuni. Estratto da: Agosto 1991; 1 (4).

Ricerca dei marcatori sierologici autoanticorpali delle patologie tiroidee

INTRODUZIONE

Anti-TPO Ab. Gli anticorpi anti perossidasi tiroidea (TPO) sono autoanticorpi (Ig di classe IgG1) diretti contro l'enzima perossidasi tiroidea. Questo enzima catalizza la iodinazione della tirosina in tireoglobulina durante la biosintesi del T3 e del T4. Storicamente questi anticorpi venivano definiti antimicrosomiali in quanto si legano alla parte microsomiale delle cellule tiroidee. Si è successivamente identificata la perossidasi quale prima componente antigenica dei microsomi.

Gli anticorpi anti TPO hanno dimostrato, *in vitro*, un'attività bloccante la tireoperossidasi.

Anti-TG Ab. Gli anticorpi anti tireoglobulina sono autoanticorpi di classe IgG (IgG1, poi IgG4) diretti verso la tireoglobulina (hTG), glicoproteina di 660 Kd prodotta solo dalla ghiandola tiroidea, che rappresenta il componente maggiore del colloide follicolare della tiroide. Dalla tireoglobulina vengono sintetizzati gli ormoni tiroidei: 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3).

Non sono note attività biologiche di significato clinico dei TgAb.

Anti-recettore hTSH Ab (TRAb). Gli autoanticorpi contro il recettore per l'hTSH hanno azione prevalentemente attivante sul recettore stesso (causa di ipertiroidismo), ma una frazione di minore entità può bloccare il recettore (causa di ipotiroidismo). L'azione biologica dei TRAb del singolo paziente può cambiare nel corso del tempo, per esempio dal blocco si può passare alla stimolazione del recettore stesso.

Gli autoanticorpi attivanti, legandosi al recettore specifico localizzato sulla membrana dei tireociti, stimolano la sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei.

Tabella 1. Frequenza (%) degli anticorpi anti tiroide nei soggetti senza segni di tireopatia

Familiari di soggetti con malattie autoimmuni tiroidee	40-60
PAZIENTI:	
- con malattie autoimmuni organo-specifiche	20-40
- con malattie autoimmuni intermedie	10-40
- con malattie autoimmuni non organo-specifiche	10-20
- con anomalie cromosomiche (S. di Turner, S. di Down)	16-50
- con orticaria cronica o angioedema	10-15
- con depressione endogena	20-30
- terapia con interferone o granulochine	0-10
Soggetti apparentemente sani di controllo:	
- femmine	12
- maschi	2

Tabella 2. *Malattie della tiroide*

	TPOAb	TgAb	TRAb
Tiroidite di Hashimoto	+	+	-
Tiroidite atrofica	+	+	-
Tiroidite post partum	+	+	-
Malattia di Graves	+	+	+
Gravidanza con malattia di Graves presente o precedente	+	+	+
Carcinoma tiroideo	+	+	-

Tabella 3. *Malattie autoimmuni tiroidee: frequenza e prevalenza*

Frequenza: >0.5%		
Tiroidite cronica asintomatica	F = 8-20% secondo l'età	M = 2-5%
Malattia di Graves	F = 2.0-2.7%	M = 0.1-0.2%
Tiroidite di Hashimoto	F = 1.0-2.0%	M = 0.1-0.2%
Mixedema idiopatico	F = 1.4-1.9%	M = 0.1%

Uso diagnostico degli autoanticorpi anti-tiroide

Premessa: una minoranza rilevante di persone eutiroidee ha livelli patologici di Ab anti tiroidei, soprattutto se di età superiore ai 60 anni. Peraltro valori negativi di anticorpi non escludono la presenza di patologie autoimmuni.

La malattia della tiroide si sviluppa generalmente quale risultato di un processo autoimmune nel quale vengono prodotti anticorpi contro uno o più dei 3 antigeni specifici della tiroide: perossidasi tiroidea (TPO), tireoglobulina (TG), recettori del TSH (TR). Questi anticorpi possono causare una disfunzione tiroidea in modo diretto o essere associati al processo distruttivo autoimmune.

In alcuni casi sono i linfociti T in grado di indurre un danno all'organo bersaglio infiltrato attraverso un meccanismo diretto o mediato dalla liberazione di linfocine e quindi con meccanismo indipendente dagli autoanticorpi.

1) TPO Ab: la loro produzione è verosimilmente reattiva al danno cellulare indotto dall'infiltrato linfocitario in corso di patologie autoimmuni tiroidee.

Indicazioni al dosaggio:

- Ipotiroidismo
- Ipertiroidismo
- Tiroiditi autoimmuni
- Gozzo
- Noduli tiroidei
- Oculopatia endocrina isolata
- Familiarità per malattie autoimmuni tiroidee
- Malattie autoimmuni organo-specifiche
- Fattori di rischio per tiroiditi post-partum
- Prima e durante trattamento con IFN

2) TG Ab: sono prodotti in seguito al danno cellulare indotto dall'infiltrato linfocitario.

Indicazioni al dosaggio:

Proposta Linee-guida delle patologie autoimmuni.doc

Gruppo di lavoro Patologie Autoimmuni (GLAPA) - AMCLI

- Ipotiroidismo
- Tiroiditi autoimmuni
- In supporto al dosaggio della Tireoglobulina (perché possono interferire con il suo dosaggio).

Conclusioni: Gli Ab anti-tiroide sono correlati significativamente con le malattie autoimmuni tiroidee, pur non permettendo di discriminare una dall'altra. La loro presenza non sempre indica la presenza di una malattia autoimmune tiroidea, né la loro negatività contrasta con tale diagnosi.

Tabella 4. Positività in percentuale degli Ab anti-tiroide nelle patologie autoimmuni della tiroide e forme ad esse correlate

	TG Ab	TPO Ab
Tiroidite di Hashimoto	60-85%	99-100%
Mixedema	60-85%	99-100%
M. di Basedow	30-80%	97%
Oftalmopatia	25%	50%
Tireopatie non autoimmuni	<10%	25%
Soggetti sani	<5%	5%

3) Gli anticorpi anti recettore del TSH sono prodotti da un clone di cellule B in seguito ad una diminuzione dell'attività dei linfociti T suppressor (base genetica).

Indicazioni al dosaggio:

- Diagnosi di Morbo di Basedow.
- Differenziazione dell'ipertiroidismo su base autoimmune dal gozzo micronodulare iperfunzionante.
- Oftalmopatia basedowiana isolata.
- Rischio di distiroidismo neonatale.
- Follow up in corso di terapia medica dell'ipertiroidismo basedowiano.

Gli anticorpi anti recettore del TSH sono molto specifici, ma il loro dosaggio deve essere limitato solo a casi clinici dubbi o per il monitoraggio terapeutico e nelle donne in gravidanza.

Indicazioni per la ricerca di Ab anti-tiroide in alcune situazioni cliniche

- I pazienti affetti da ipotiroidismo primario hanno generalmente dei livelli anormali di anticorpi anti-tiroide, particolarmente quelli diretti contro la tireoperossidasi. Il dosaggio di tali anticorpi, benché possa essere di supporto alla diagnosi, generalmente non aiuta nella diagnosi né nel trattamento dell'ipotiroidismo, anche se questo dosaggio può essere di aiuto per la prognosi. Quindi non si raccomanda la determinazione di routine degli anticorpi tiroidei nell'ipotiroidismo primario fatta eccezione per situazioni cliniche particolari.
- I pazienti affetti da Tiroidite di Hashimoto (malattia autoimmune cronica linfocitica che colpisce più le donne che gli uomini con un rapporto 20:1, con un corso ipertrofico e atrofico, e che conduce frequentemente ad un'atrofia della tiroide con ipotiroidismo), pur presentando le percentuali di positività viste in tabella 4, hanno un titolo anticorpale che non implica necessariamente una diretta correlazione con lo stato funzionale della ghiandola e/o con la prognosi della malattia.
- I pazienti con mixedema idiopatico dell'adulto con assenza di gozzo presentano titoli elevati di Ab anti-tiroide nella percentuale di casi vista in tabella 4. I TRAb sono presenti nel 40% dei casi.
- I pazienti con Morbo di Graves presentano Ab anti-tiroide nell'86% dei casi. I TRAb sono presenti in oltre il 95% dei casi all'esordio e tendono a calare di titolo nei pazienti in trattamento con farmaci anti-tiroidei, scompaiono nei pazienti con M. di Graves in remissione.
- Il Morbo di Basedow è una malattia autoimmune che stimola la tiroide attraverso autoanticorpi (principalmente TRAb). Gli anticorpi si legano ai recettori del TSH dei tireociti e stimolano la tiroide a rilasciare ormoni con conseguente ipertiroidismo non regolato dall'asse ipotalamo-ipofisi.
- Altre tireopatie nelle quali sono presenti Ab anti-tiroide sono la tiroidite di Riedel (tiroidite cronica sclerosante con ipotiroidismo), la tiroidite in corso di emocromatosi in cui l'ipotiroidismo è la risultante di

un rilascio di antigeni tiroidei, secondario al danno, con produzione di anticorpi, flogosi, fibrosi, atrofia e danno funzionale.

- L'oculopatia endocrina e il mixedema pretibiale sono 2 condizioni a patogenesi sconosciuta correlate con le tireopatie autoimmuni iperfunzionali e nelle quali sono presenti Ab anti-tiroide di utilità clinica non chiara.
- Un'indicazione clinica al dosaggio dei TPO Ab è la gravidanza o la donna in post-partum, specialmente se è presente una patologia tiroidea. In queste donne dei livelli anormali di TPO Ab possono predisporre alla tiroidite post-partum. Prevalenza di TPO Ab in gravidanza: 33%. TPO Ab e TG Ab sono positivi nelle donne colpite da tiroidite post-partum. Donne affette da diabete di tipo I° presentano un'incidenza maggiore di tiroidite post-partum e quindi vanno seguite con maggiore attenzione in gravidanza. Per le altre donne è consigliabile un dosaggio degli anticorpi anti-tiroide nel I° trimestre di gravidanza per selezionare quelle anticorpo positive, a più alto rischio di sviluppare una tiroidite post-partum, a cui dosare il TSH al 3° e 6° mese dopo il parto.

Valori di riferimento

Per stabilire i valori di riferimento per i test di ricerca di Ab anti-tiroide vanno selezionati 120 soggetti normali che rispondono alle seguenti caratteristiche:

- Sesso maschile
- Età <30 anni
- TSH nel siero compreso tra 0.5 e 2.0 uIU/L
- Assenza di gozzo
- Assenza di storia familiare per patologie tiroidee
- Assenza di patologie autoimmuni
- Assenza di malattie sistemiche (lupus, etc.)

TPO Ab = < 35 IU/ml, anche se può variare a seconda del metodo e del kit utilizzato (da 2 a 100 IU/ml)

TG Ab = < 40 IU/ml (da 2 a 325 IU/ml nei vari metodi)

TRAb = < 4 U/L

Campione utilizzato: Siero o Plasma (eparina, EDTA, citrato) conservato sino a 2 giorni a 2-8°C e sino a 2 mesi a -20°C.

Test di laboratorio utilizzati e test raccomandati per la ricerca di Ab anti-tiroide

1) I dosaggi per TPO Ab erano effettuati in passato con metodiche quali l'immunofluorescenza, la fissazione del complemento, l'emoagglutinazione passiva; successivamente con metodo radioimmunologico (RIA), immunoradiometrico (IRMA), immunoenzimatico (ELISA) e in chemiluminescenza. Gli antigeni utilizzati per il dosaggio nei kit di ultima generazione sono rappresentati da TPO ricombinante, dopo che, nel passato, sono stati utilizzati antigeni umani e di maiale.

Gli immunodosaggi sono quantizzati in unità internazionali (U/L) utilizzando la preparazione di riferimento MRC 66/387.

La specificità dei vari dosaggi è diversa e anche le prestazioni del dosaggio sono diverse, nonostante l'uso dello stesso standard, in quanto sono influenzate dai principi metodologici che ne stanno alla base e dalla purezza dell'antigene TPO. Le differenze tra i metodi sono legate a:

- risposta anticorpale a diverso profilo epitopico
- diversità delle classi sottoclassi anticorpali
- antigene ricombinante (metodica ricombinante – metodica estrattiva)
- diversità delle condizioni di reazione (diluizione, incubazione, termostatazione, tamponi, automazione)
- diversa preparazione dei calibratori (pool di sieri, IgG purificate)
- selezione della popolazione per la definizione dei valori di riferimento

I coefficienti di variazione tra i vari metodi sono compresi tra il 65% e l'87%. La sensibilità analitica dei metodi utilizzati varia dallo 0.3 all'1% U/L.

2) I dosaggi dei TG Ab sono passati nel tempo dal metodo in immunoprecipitazione e in immunofluorescenza su sezioni fissate di tiroide con il caratteristico quadro fluoroscopico "a nuvola" (attualmente in disuso o che rivestono solo un significato storico), al metodo (altamente insensibile) delle

emazie sensibilizzate in emoagglutinazione a quello radioimmunologico e immunoradiometrico (IRMA), più sensibile e, più recentemente, alle tecniche immunoenzimatiche (ELISA) e in chemiluminescenza.

Standard di riferimento utilizzato: MRC 65/93.

La variabilità tra metodo dei valori di TG Ab è legata alla differenza qualitativa nell'affinità dell'anticorpo nei differenti campioni dei pazienti con difetti immunologici diversi oppure a differenti matrici tra i mezzi utilizzati per la diluizione.

È fondamentale la disponibilità di metodi sensibili per la ricerca di TG Ab nel siero, al fine di identificare i sieri con TG Ab che possono interferire con il dosaggio della tireoglobulina nel siero.

Si raccomanda di utilizzare i dosaggi specifici per Ab TPO rispetto ai dosaggi meno specifici degli anticorpi microsomiali. I test raccomandati sono attualmente quelli che utilizzano metodiche immunoenzimatiche e in chemiluminescenza. I test devono utilizzare antigene Tg o TPO puri, ma con inalterate caratteristiche native. È necessario un reagente specificanti Ig umane e calibratori (o master curva) costituiti da anticorpi umani TgAb o TPOAb. In ogni seduta analitica va inserito un controllo di qualità interno su almeno 2 livelli (normale-alto).

I livelli elevati di TPO Ab si verificano in maniera più frequente di quanto non accada per i livelli di TG Ab nelle patologie autoimmuni tiroidee; per cui la determinazione dei TG Ab non sembra aggiungere nulla ai risultati forniti dai test anti-TPO. Meglio comunque usare entrambi i test, in quanto, in ELISA, i positivi solo per TPO e non per TG sono solo il 2%. La misurazione dei TG Ab è comunque più utile per la valutazione di campioni sottoposti a test per la tireoglobulina, in quanto i TG Ab possono interferire sia con gli immunodosaggi competitivi che con i dosaggi immunometrici per la tireoglobulina.

3) I metodi per il dosaggio dei TRAb comprendono vari dosaggi biologici e differenti tipi di dosaggi recettoriali con tracciante radioattivo o chemiluminescente. Non è noto quale sia l'esatto epitomo (i) presente nel recettore del TSH che reagisce nei vari tipi di dosaggio.

Va inizialmente ricordata l'eterogeneità funzionale di questa famiglia di autoanticorpi: stimolazione e blocco del recettore del TSH, stimolazione della crescita della tiroide, inibizione del legame del TSH. Anche nel singolo paziente l'azione del TRAb può cambiare nel tempo: dal blocco si può passare alla stimolazione del recettore del TSH.

I metodi in commercio si basano sulla capacità delle Ig di inibire il legame alla tiroide e viene espresso come percentuale di inibizione del legame del TSH bovino marcato con I 125 al preparato con il recettore del TSH (dosaggio radiorecettoriale degli Ab anti-recettore del TSH); si utilizza come antigene un TSH-R solubilizzato da membrane tiroidee porcine. Non esiste preparato di riferimento internazionale. I valori ottenuti dipendono dal metodo individuale e dalla popolazione di riferimento utilizzata per determinare il cut-off per la positività. Il livello di positività dei TRAb dipende dal metodo: il valore può essere 2DS in più o in meno dalla media di un gruppo di persone normali a seconda che venga cercata l'azione stimolante o inibente. La precisione è estremamente variabile.

I dosaggi biologici valutano la funzione stimolante il TSH-R o bloccante il TSH da parte degli autoanticorpi.

I sistemi impiegati per il dosaggio dei TRAb ad azione stimolante (TSAb) sono basati sulla valutazione della produzione in vitro di cAMP da parte di cellule esprimenti il TSH-R. Vengono utilizzate cellule tiroidee di ratto ben differenziate o, più recentemente, fibroblasti ovarici di criceto transfettati con il gene del TSH-R umano; queste ultime, pur non essendo di origine tiroidea, esprimono il TSH-R umano sulla superficie cellulare.

Il metodo per il dosaggio degli autoanticorpi bloccanti (TSHBAb) si basa sulla capacità delle IgG in esame di bloccare in vitro alcune azioni biologiche del TSH sulle linee cellulari prima citate, ottenendo l'effetto biologico di stimolare la produzione di cAMP da parte del TSH.

Le problematiche legate al dosaggio dei TRAb sono:

- eterogeneità degli Ab (bloccanti, stimolanti)
- bassa concentrazione
- non completa conoscenza degli epitopi immunodominanti
- incertezza nella definizione del valore di cut-off
- assenza di preparazione di riferimento
- imprecisione analitica elevata (>10%).

Per il dosaggio dei TRAb si raccomanda il metodo radiorecettoriale, che tuttavia non consente di valutare le caratteristiche funzionali dei TRAb.

Il dosaggio biologico dei TSAb (Thyroid Stimulating Antibodies) e TSHBAb (TSH Blocking Antibodies) vanno effettuati solo in laboratori altamente specializzati.

I dosaggi degli autoanticorpi tiroidei possono essere utilizzati per individuare la progressione di una condizione tiroidea o per valutare una risposta alla terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Aw T, et al. The use of a chemiluminescent enzyme immunoassay for thyroglobulin autoantibodies. Clin Chem Lab Med 1999; 37 (suppl.).
2. Betterle C, et al. Gli autoanticorpi. Manuale-Atlante a colori di diagnostica. 1997. PICCIN Ed. Padova.
3. Doullay F, et al. Prevalence of autoantibodies to thyroperoxidase in patients with various thyroid and autoimmune diseases. Autoimmunity 1991; 9: 237-44.
4. Feldt – Rasmussen U. Analytical and clinical performance for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin and thyrotropin receptor. Clin Chem 1996; 42: 160-3.
5. Khono Yoichi, et al. Comparison of the IgG subclass distribution of anti-thyroid peroxidase antibody in healthy subjects with that in patients with chronic thyroiditis. Endocrine Journal 1993, 40: 317-21.
6. Koppers RC, et al. Quantitative measurements of human thyroglobulin-specific antibodies by use of a sensitive enzyme-linked immunoassay. Clinical Immunology and Immunopatology 1993; 68-77.
7. NACB. Proposed NACB Laboratory Medicine Practice Guidelines for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease – Section 3 D: Thyroid Autoantibody Measurements – 17-8-2001.
8. Okamoto Y, Hamada N, Saito H. Thyroid peroxidase activity-immunoglobulins in patients with autoimmune thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab 1989; 68: 730-4.
9. Scherbaum WA, Berg PA. The importance of autoantibodies in the diagnosis of endocrine disease. Dtsch Med Wschr 1981; 106: 308-13.

Ricerca dei marcatori sierologici per le malattie epatiche autoimmuni

INTRODUZIONE

Per epatite cronica si intende una infiammazione del fegato conseguente a varie cause: infezioni virali (dovute a virus B, C, D ecc), assunzione di sostanze tossiche (farmaci, alcool), fattori autoimmuni (dovuti alla presenza di cloni di cellule T reattive che stimolano i linfociti B a produrre autoanticorpi), fattori metabolici (M. di Wilson, deficit di alfa1antitripsina) ed altre cause. La sintomatologia è assai varia partendo dalla astenia con letargia e malessere fino all'evento fulminante.

Le epatiti croniche autoimmuni (ECAI) sono malattie ad eziologia sconosciuta ma con evidenti disregolazioni a carico del sistema immunitario. L' ECAI è una forma rara di epatite, caratterizzata dalla presenza di lesioni epatiche infiammatorie e necrotiche, con quadro istologico di infiltrato mononucleare nello spazio portale.

Nell'ambito delle epatopatie croniche autoimmuni c'è una ulteriore suddivisione:

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| 1. epatite cronica attiva di tipo 1 | ECAI 1 |
| 2. " " " di tipo 2 | ECAI 2 |
| 3. " " " di tipo 3 | ECAI 3 |
| 4. cirrosi biliare primitiva | CBP |
| 5. colangite sclerosante primitiva | CSP |

Tutte le patologie sopraelencate sono associate ad un quadro istologico di epatite cronica attiva caratterizzata da un **infiltrato linfocitario** nello spazio portale e necrosi cosiddetta "a morso di topo".

Dal punto di vista della **sierologia** sono presenti alti valori di immunoglobuline IgG (criterio diagnostico differenziale dalle epatiti croniche da sostanze tossiche dove esiste l'aumento selettivo delle immunoglobuline di classe IgA) e autoanticorpi.

Epidemiologicamente sono malattie ubiquitarie con una prevalenza di un caso su 10000 circa e a predominanza femminile (75%). L'età non è un criterio differenziale poiché sussistono sia forme pediatriche che adulte. Possiamo quindi riassumere i criteri diagnostici nella tabella 1.

Tabella 1. Criteri diagnostici generali per ECAI

• ipergammaglobulinemia (>30 g/l)
• alti livelli di transaminasi
• predominanza sesso femminile (F/M 4/1)
• associazione con HLA DR3 (sogg. giovani) e HDLA DR4 (sogg. adulti)
• buona risposta ai trattamenti immunosoppressori
• presenza di autoanticorpi
• esclusione di infezioni virali, epatopatie alcoliche e da farmaci ad eccezione delle sindromi da sovrapposizione

➤ ECAI (tipo 1, tipo 2 e tipo 3)

Nella tabella che segue sono descritte le caratteristiche principali che evidenziano sia dal punto di vista sierologico che clinico una ECAI

Tabella 2. Classificazione e diagnostica differenziale delle ECAI

	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3
Autoanticorpi	ANA,ASMA	LKM 1	SLA
Età (anni)	12-20 / 45-70	2-14 (rara in adulti)	30-50
% femmine	78	89	90
aumento gammaglobuline	+++	+	++
risposta al tratt. steroideo	+++	++	+++
progressione vs. cirrosi	45%	82%	75%

Test di laboratorio consigliati

Gli autoanticorpi nelle ECAI hanno un ruolo nella cura, nella diagnosi e nella patogenesi. Si rilevano in IFI su substrati tessutali di ratto (stomaco, fegato e rene). La rilevazione su tre tessuti è importante per le indicazioni che fornisce nell'identificazione dell'autoanticorpo specifico (vedi tabella 3).

Tabella 3. Diagnostica differenziale ECAI correlata agli autoanticorpi

	ANA	ASMA	SLA	LC1	AMA	ANCA	ASGPR1	LKM
ECAI 1	+	++		+/-			+	
ECAI 2a				+				+
ECAI 2b								+ (HCV+)
ECAI 3		++	+					
CBP					+++			
CSP						+		

ECAI: EPATITE CRONICA AUTOIMMUNE, CBP: CIRROSI BILIARE PRIMITIVA, CSP: COLANGITE SCLEROSANTE PRIMITIVA

ANA (ANTICORPI ANTI NUCLEO)

- Identificati nel 40.50% dei soggetti con ECAI 1 di cui il 20% è anche dsDNA positivo. La positività al dsDNA sembra giocare un ruolo fondamentale nell'identificare la risposta al trattamento corticosteroidico (Hepatology 1997, Sep 26 (3) 567-572). Anche la metodologia utilizzata fornisce informazioni al riguardo: i soggetti ELISA positivi sembrano meno responsivi rispetto a quelli IFI positivi.
- Non sono malattia specifici ma alti titoli e la associazione con gli ASMA danno l'evidenza di una ECAI
- Metodica di riferimento: IFI su cellule HEP-2 poiché ELISA dà ancora falsi positivi
Pattern: omogeneo ad alto titolo
Titoli significativi clinicamente: >1/80 Adulti; >1/20 Pediatrici

ASMA (ANTICORPI ANTI MUSCOLO LISCIO)

- Identificati nel 40% dei pazienti, la specificità è diretta verso la F-actina.
- Non sono malattia specifici alti titoli associati ad ANA predispongono diagnosi di ECAI.
- Metodica di riferimento: IFI su tre tessuti (stomaco, fegato e rene di ratto). Si rileva la positività della muscolatura liscia (ASMA di tipo T) dell' endotelio vasale (ASMA tipo V) o del glomerulo (ASMA tipo G).
- Titoli clinicamente significativi >1/160
- Il titolo correla con l'attività di malattia
- Titoli inferiori sono ascrivibili a malattie infettive (es. mononucleosi)

NOTA: Il muscolo liscio comprende un'ampia famiglia di antigeni (desmina, vimentina, F-actina...) e solo F-actina è un marker dell'ECAI. Una positività per ASMA sui tessuti deve essere identificata su cellule Hep-2 (fluorescenza dei filamenti di F-actina)

SLA/LP (SOLUBLE LIVER ANTIGEN/LIVER PROTEIN)

- Identificati nel 20-30% dei soggetti
- Tipica dell'ECAI 3 con sintomatologia sovrapponibile alla ECAI 1
- Non è organo né specie specifico
- Metodica di riferimento: ELISA o BLOT
- Marker specifico di ECAI poiché non dà cross-reazioni con le epatopatie virali e alcoliche
- Raramente è presente in soggetti con CBP (3%)
- La positività di SLA/LP correla con la recidiva di malattia

LC 1 (LIVER CITOSOL 1)

- Anticorpo anti-citosol epatico tipo 1 (PM 210-290 kDa)
- Anticorpo organo specifico (reazione solo con fegato ma non specie-specifico)
- Metodiche disponibili:
 - immunodiffusione (di elezione)
 - IFI (difficoltosa interpretazione)
 - BLOT
- Differenzia la ECAI 2 (specie nei bambini) dalla ECAI 1 e nel 14% dei casi è presente come anticorpo unico, mentre è frequente l'associazione con LKM 1 (20-30% dei casi)
- Possibile la correlazione con l'attività di malattia ma è invece ancora controversa la correlazione in corso di HCV+
- Marcatore ancora in fase di studio

ASGPR 1 (ASIALO GLICOPROTEINA 1)

- Presente nel 50% dei soggetti con ECAI, tra questi l'88% dei soggetti con alta attività infiammatoria in cui raggiunge alti titoli sia IgG che IgM
- Non è malattia specifico poiché è presente anche nella CBP (13%), Ep. Virali (14%), è invece organo specifico
- Correla con attività di malattia
- Metodica di riferimento: ELISA

LKM (LIVER KIDNEY MICROSOME)

- Anticorpo diretto verso citocromo P450
- Presenti solo nel 2.4% delle ECAI 1 ma più frequentemente in ECAI 2 soprattutto nei bambini
- Sono specifici di ECAI solo gli LKM 1
- In soggetti HCV+ è frequente la presenza di LKM 1 (importante per la terapia con IFN)
- LKM 1 in ECAI 2 è presente in bambini di sesso femminile in associazione con altre malattie autoimmuni (organo-specifiche). Ha decorso severo ma la terapia corticosteroidica è attiva
- LKM 1 in ECAI 2b si rileva in soggetti adulti affetti da HCV
- Metodica di riferimento:
 - IFI su tessuti (fegato e rene)
 - ELISA (test di conferma e quantitativo)
 - BLOT
- Frequente è l'associazione con LC1

- Titoli clinicamente significativi: Adulti >1/80; Bambini >1/20

La ricerca degli anticorpi per LKM è fondamentale per la corretta terapia da somministrare in caso di ECAI piuttosto che in una infezione da HCV (tabella 4.)

Tabella 4. Diagnostica differenziale tra ECAI 2 e HCV

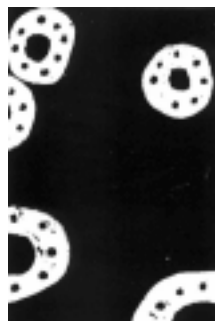
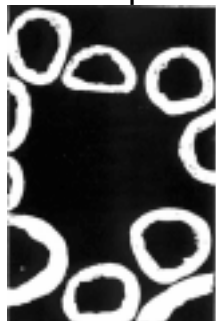
	ECAI 2	EP: CRONICA HCV+
Età	Bambini	Adulti
Sesso	F	M e F
Aumento transaminasi	+++	+
LKM	+++	+
Terapia immunosoppressoria	+++	-
Terapia con IFN	-	++

La lettura del quadro fluoroscopico di LKM si presta a dubbi interpretativi dovuti alla somiglianza con altri quadri rilevabili sulle sezioni di tessuti di ratto, come ad esempio gli AMA e gli anticorpi anti ribosomi (ARIA). È importante perciò saper individuare le positività relative a i tre autoanticorpi.

Tabella 5. Positività LKM rispetto AMA ed ARIA (ribosomiali)

	LKM 1	AMA	ARIA
Fegato	+++	+	+/-
Rene t. distale		+++	
t. prossimale	+++		
Stomaco c. parietali	-	++	-
c. principali	-	-	+
Quadro fluoroscopico	Smeriglio	Granulare	Diffuso

I quadri fluoroscopici sotto riportati sono esempi di come si evidenziano gli LKM dagli AMA su tessuto epatico e renale:



AMA positivo
Fluorescenza nel
citoplasma di tutte le
cellule tubulari

Tessuto renale

LKM positivo
Fluorescenza solo
nei tubuli prossimali

Tessuto epatico

LKM positivo
Fluorescenza
citoplasmatica
degli epatociti

CBP

Malattia cronica rara con una incidenza di 60 casi/milione, colestatica, in cui i dotti biliari intraepatici vengono distrutti attraverso un processo immunologico. È frequentemente misconosciuta e presenta 4 stadi istologici di cui il primo corrisponde alla fase florida. I fattori eziologici scatenanti sono: 1) mimicrosmo molecolare tra AMA e l'epatocita; 2) elevata espressione di HLA; 3) presenza di cellule citotossiche disregolate.

La malattia colpisce solo soggetti adulti soprattutto femmine (F/M 18/1).

La sintomatologia e la clinica riconoscono alcuni indici di colestasi soprattutto nel soggetto asintomatico: - aumento della ALP

- AMA positivi (titolo significativo >1/40)
- Collagenopatie, tiroiditi

L'evoluzione lenta. Dal punto di vista clinico si assiste ad un inizio insidioso i cui primi sintomi sono dispepsia, astenia, malessere vago e, successivamente, prurito ed ittero. Sono molto frequenti le associazioni con malattie di tipo: a) reumatologico (Sjogren, sclerodermia, MCTD, LES, RA). b) Metabolico (tiroiditi), c) Renale (glomerulonefriti), d) Calcolosi colecistica.

Test di laboratorio consigliati

AMA:

- Presente nel 95% dei malati di CBP con specificità diretta verso l'antigene M2 (piruvato-deidrogenasi)
- Sono malattia specifici
- Esistono positività AMA da M1 a M10 ma solo le subunità M2, M4 ed M9 sono tipiche della CBP. La subunità M2 si evidenzia in IFI
- Markers frequenti associabili sono anticorpi anti-centromero, nuclear dots, nuclear pore complex, membrana nucleare
- Sistemi di identificazione: IFI su sezioni di tessuto di fegato, rene, stomaco di ratto. La positività si evidenzia su tutti e tre i tessuti con diversa intensità; maggiore nello stomaco e sul rene, meno evidente nel fegato. La positività può essere rilevata anche su cellule Hep-2 dove si evidenzia una fluorescenza granulare del citoplasma più intensa in prossimità del nucleo. ELISA in cui la sorgente antigenica è la subunità M2; la determinazione è quantitativa ma non esistono attualmente standard internazionali di riferimento. La conseguenza è che ogni ditta produttrice ha i suoi valori di normalità. BLOT di cui esistono sistemi di identificazione multipli di subunità M2-M4-M9 usato come sistema di conferma
- Esistono forme di CBP senza presenza di M2 rilevabile (6-7%) ma sono ANA o AMA o ASMA positivi
- Pazienti AMA positivi senza segni clinici di malattia presentano al 70% segni istologici compatibili per CBP; pertanto devono essere considerati affetti da CBP potenziale o subclinico

CSP

Malattia rara caratterizzata da colestasi determinata da infiammazione diffusa e fibrosi del sistema biliare. I dotti sono ispessiti con aspetti a pellicola di cipolla, l'aspetto radiografico è a collana di perle. Può essere scatenata da fattori genetici e/o agenti infettivi.

Nel 70% è associata alla Rettocolite ulcerosa (RCU). Si presenta con ittero, dolori addominali o nel 10% dei casi asintomatica. Gli esami ematologici evidenziano un aumento di tutti gli indici di colestasi e delle gammaglobuline, soprattutto di classe IgG.

Test di laboratorio consigliati

ANCA

- Gli ANCA sono positivi con pattern atipico (p-ANCA) rilevabili in IFI.
- Non sono evidenziate positività per AMA

SINDROMI OVERLAP

La patologia delle forme miste è discussa, si tratta di una associazione tra 2 malattie distinte, di una evoluzione tra le due o di una forma epatitica associata in soggetti geneticamente predisposti.

Più conosciute sono le forme colestatiche:

- ECAI-PBC
- ECAI-CSP
- ECAI-Colangite autoimmune

Ma esistono anche associazioni tra ECAI-virus

ECAI e PBC

Sono presenti 2 criteri di PBC (ALP > 1.5 N e/o GGT > 3N; AMA M2 > 1/80)

colangite distruttiva linfocitaria e 2 di ECAI (ALT > 5N; IgG > 2 o ASMA +) infiammazione marcata periportale o globulare.

Associazione presente nel 9% dei casi. Infiammazione epatica insorge spontaneamente o sotto ac. ursodesossicolico.

ECAI e colangite autoimmune

Sinonimo di CBP sieronegativa/AMA negativa.

Nel 90% dei casi ASMA + e/o ANA anti gp210 dei pori nucleari.

ECAI e CSP

Criteri diagnostici da precisare (105 di CSP hanno ASMA +).

Non conosciuta esatta frequenza (10% ?), presente in bambini e adulti giovani.

ECAI e virus

Associazione più conosciuta è tra ECAI di tipo 2b e HCV.

Diagnosi di epatite C deve essere fatta con PCR (screening con test ELISA dà spesso falsi positivi).

Nella maggioranza dei casi coesistenza PCR+ e LKM 1 in vera epatite C.

In epatite virale C o B 20-40% dei casi hanno ANA e/o ASMA, 3-6% LKM 1 +p-ANCA raramente presenti.

Ricerca anticorpi anti-cellule parietali gastriche (APCA)

Gli anticorpi anti-cellule parietali gastriche (APCA) hanno come antigene bersaglio una proteina enzimatica di 94 kDa, la H⁺K⁺ ATPasi (pompa protonica) presente sulla membrana delle cellule parietali gastriche e deputata alla produzione di ac.cloridrico. Essa è costituita da due subunità, α e β , entrambe target degli autoanticorpi.

Gli APCA si ritrovano nel siero e nel succo gastrico di soggetti affetti da gastrite atrofica cronica di tipo A [80%, anemia perniziosa (80%)] associata o meno all'anemia di Biemer. Non infrequentemente si possono trovare anche in soggetti con disordini endocrini autoimmuni, come tiroiditi e diabete insulino-dipendente (DID o tipo I), nel morbo di Graves e nella malattia di Addison.

Test di Laboratorio consigliati

1. IFA

- *Sustrato*: sezione di tessuto gastrico di ratto o meglio umano. Con questo substrato la positività agli APCA si evidenzia come una fluorescenza molto intensa e netta del citoplasma delle cellule parietali gastriche.
- *Diluizione del campione*: 1:40. Vengono considerate significative titolazioni > 1:80.

NB: Esiste la possibilità di cross-reattività tra anticorpi anti-cellule dell'orletto a spazzola dei tubuli renali prossimali (ABBA = Anti-Brush Border Antibodies), di scarso significato clinico o nullo, e gli APCA quando viene utilizzato come substrato il tessuto gastrico di ratto a causa di una componente antigenica comune.

Si devono considerare veri APCA quegli anticorpi che contemporaneamente **non reagiscono con le cellule dell'orletto a spazzola dei tubuli renali**.

Circa l'80% dei sieri di pazienti affetti da anemia perniziosa e che, quindi, presentano APCA specifici non reagiscono con gli ABBA.

Per ovviare a questa possibilità di cross-reattività si consiglia di utilizzare come substrato tessuto gastrico umano verso il quale gli ABBA non reagiscono.

È necessario ricordare che la presenza di AMA M2 conferisce una fluorescenza positiva alla cellule parietali gastriche il cui citoplasma è ricco di mitocondri, ma l'osservazione contemporanea del tessuto epatico e renale scongiura la possibilità dell'equivoco in quanto i veri APCA, a differenza degli AMA M2, non danno alcuna reazione positiva con questi tessuti.

Inoltre la presenza di anticorpi anti-ribosoma (ARiA) induce una fluorescenza delle cellule principali dell'epitelio gastrico che non devono essere confuse con quelle parietali che, invece, non si colorano.

La somiglianza strutturale di alcuni epitomi della H⁺K⁺ ATPasi con analoghi epitomi della perossidasi tiroidea (TPO) può rendere ragione della presenza contemporanea di APCA e anti-microsomi tiroidei nella sindrome poliendocrina di tipo II (SPA II o sindrome di Schmith-Carpenter).

- 2. ELISA, DOT, Immunoblotting: Sono tecniche molto meno utilizzate o impiegate solo a scopo di ricerca

INDICAZIONI GENERALI PER LA REFERTAZIONE DEI TESTS DI AUTOIMMUNITA'

La refertazione deve sempre comprendere:

- **La metodica utilizzata**

- **IFI (IFA):**
 1. tipo di substrato utilizzato e titolo come reciproco della più alta diluizione del siero campione ancora positivo
 2. tipo/i di pattern fluoroscopico
 3. segnalare comunque eventuali quadri fluoroscopici misti
- **ELISA:** unità di misura e intervallo di riferimento
- **WB, IB, DB:** specificità delle bande evidenziate

NB: È auspicabile che sia allegato al campione inviato un modulo di accompagnamento che riporti i dati anamnestici significativi che possono essere utili per la diagnostica di Laboratorio. Questo per favorire il colloquio con il clinico avente la finalità di ottimizzare i risultati di Laboratorio.

Autore di riferimento:

dr. Roberto Bozzoli

Ospedale Niguarda Ca' Granda - Servizio di Microbiologia e Virologia

P.zza Ospedale Maggiore 3; 20162 Milano

Tel. 02 64443877; Fax 02 64442916

e-mail: microbiologia@ospedale-niguarda.it