

PERCORSO DIAGNOSTICO PER LA RICERCA DI AUTOANTICORPI NELLE CONNETTIVITI

Gruppo di Lavoro Patologie Autoimmuni (GLaPA):

Elisa Cavanna¹, Roberto Pozzoli, Maria Cristina Garlaschi², Irene Diotto³, PierAndrea Dusi⁴, Sergio Finazzi⁵, Pierluigi Congedo⁶, Maria Parmeggiani⁷, Daniela Perugini⁸

¹ Laboratorio Analisi E.O. Ospedali Galliera, Genova

² Laboratorio Analisi Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

³ Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, USL 1 Imperiese, Imperia

⁴ U.O. Microbiologia, USL 1 Imperiese, Ospedale di Sanremo, Imperia

⁵ Servizio Medicina di Laboratorio Ospedale di Cuggiono, Milano

⁶ Laboratorio Autoimmunologia, Biologia Molecolare e Genetica Umana, Ospedale Valduce, Como

⁷ Laboratorio di Autoimmunità, Allergologia e Biotecnologie Innovative, Az. Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

⁸ UOC Microbiologia e Virologia clinica e molecolare AO Annunziata Cosenza

Connettiviti – Il termine connettiviti indica un gruppo di malattie reumatiche, caratterizzate dall'infiammazione cronica del tessuto connettivo. Considerata la diffusione del tessuto connettivo, tali malattie sono definite "sistemiche". L'origine del processo infiammatorio è di tipo autoimmune. A questa categoria appartengono: il lupus eritematoso sistemico (LES), la sclerosi sistemica (SSc), la polimiosite (PM), la dermatomiosite (DM), la sindrome di Sjogren (SS) e l'artrite reumatoide (AR). Inoltre si parla di connettivite indifferenziata (UCTD) quando la malattia non presenta caratteristiche cliniche e di laboratorio in numero sufficiente per una classificazione o diagnosi definita e di connettivite mista (MCTD) quando la malattia presenta contemporaneamente sintomi di due o più connettiviti diverse e presenza di anticorpi anti RNP ad alto titolo. La grande maggioranza delle connettiviti è accompagnata dalla presenza di autoanticorpi che rappresentano, quindi, marcatori fondamentali per la diagnosi e, in alcuni casi, la prognosi. Le connettiviti sono in aumento nella popolazione generale, sia per un effettivo incremento in prevalenza sia per un miglioramento degli strumenti diagnostici, in particolare quelli di laboratorio. Attualmente si preferisce definirle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS) dato che tutti gli organi e apparati possono essere colpiti dal processo infiammatorio.

Ricerca di autoanticorpi - Va comunque sottolineato che i test di laboratorio per la ricerca di autoanticorpi non hanno sempre un valore assoluto per la diagnosi, la prognosi o il monitoraggio delle connettiviti e i risultati vanno sempre integrati con i dati anamnestici, clinici e strumentali.

La determinazione degli autoanticorpi deve essere eseguita soltanto in caso di forte sospetto di malattia autoimmune.

Nel formulare il referto è importante ricordare che gli autoanticorpi possono essere considerati:

- marcatori patogenetici
- marcatori non patogenetici
- epifenomeni

Appropriatezza della richiesta - È fondamentale, nel percorso diagnostico delle connettiviti, che il clinico formuli una richiesta appropriata, al fine di evitare esami inutili, eseguire più rapidamente test mirati, ridurre i tempi di refertazione ed aumentare la capacità diagnostica del risultato.

La richiesta di dosaggio di autoanticorpi deve riportare almeno:

- sospetto diagnostico
- fase di indagine (iniziale, approfondimento, monitoraggio di terapia)

RICERCA DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-NUCLEO (ANA) - La determinazione degli ANA rappresenta la prima tappa (1° livello diagnostico) delle indagini sierologiche ai fini della diagnosi, prognosi e/o monitoraggio delle Malattie Autoimmuni Sistemiche (MAIS)

La presenza degli ANA non sempre è indice di malattia: essi sono presenti a titolo 1:40 (basso) e 1:160 (cut-off) nel 31,7% e 5% rispettivamente nella popolazione sana, in particolare nelle donne sopra i 40 anni, negli anziani e come epifenomeno. Il College of American Pathologists, dell'American College of Rheumatology e la Clinical Immunology

**Percorso Diagnostico presentato durante il
XL Congresso Nazionale AMCLI – Rimini, 8-11 novembre 2011**

Society and Clinical Center of the National Institutes of Health (genn.2000), definiscono l'utilità di un test ANA-IFI POSITIVO ai fini diagnostici:

Utilità diagnostica	Patologia	Prevalenza %
Molto	Lupus eritematoso sistemico (LES)	95-100
	Sclerodermia (SSc)	60-80
Talvolta	Sindrome di Sjogren (SS)	40-70
	Polimiosite/dermatomiosite (PM/DM)	30-80
Utili per il monitoraggio o la prognosi	Artrite Reumatoide giovanile (uveite)	20-50
	Fenomeno di Raynaud	20-60
Parte integrante per la diagnosi	LES da farmaci	100
	Epatite Autoimmune	100
	Malattia del tessuto connettivo misto (MCTD)	100
Non utili per la prognosi	Artrite reumatoide (AR)	30-50
	Sclerosi Multipla	25
	Porpora trombotica autoimmune	10-30
	Parenti di paz. autoimmuni	5-25
	Malattie infettive	varia
	Neoplasie	varia

Metodo di riferimento – Immunofluorescenza indiretta (IFI), permette di individuare il grado di positività e il tipo di pattern fluoroscopico. Entrambi i dati devono essere riportati nel referto.

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 evidenti ed elevato indice mitotico in grado di evidenziare anche gli antigeni presenti solo in determinate fasi del ciclo cellulare).

TITOLO DI SCREEN **Titolo di screening:** 1:80

Titolo clinicamente significativo: \geq 1:160

Valori di riferimento : ANA negativo: 1:80, ANA positivo: \geq 1:160

Valutazione microscopica - Microscopio a fluorescenza (led) 400X. I campioni considerati positivi allo screening devono essere sottoposti a diluizione a raddoppio (1:160, 1:320, 1:640). Il titolo deve essere espresso come reciproco della diluizione del siero.

Refertazione - Il referto deve indicare il Quadro Fluoroscopico, il Pattern di fluorescenza e il Titolo

1. **Quadro Fluoroscopico** – NUCLEARE, CITOPLASMATICO, MITOTICO
2. **Pattern** – SPECKLED, OMOGENEO, NUCLEOLARE, CENTROMERICO, PLEOMORFO, PERIFERICO, FINEMENTE GRANULARE, FUSO MITOTICO, ecc....
3. **Titolo** – 1:160, 1:320, \geq 1:640

RICERCA DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-ENA - ENA (Extractable Nuclear Antigens) è un termine improprio ed ormai superato con cui si individuano genericamente molti autoantigeni sia nucleari che citoplasmatici che possono essere estratti in soluzione salina.

Nell'ambito degli ENA si possono individuare:

- Proteine associate al DNA: istoni, antigeni Scl-70, PCNA, Ku, proteine centromeriche.

• Proteine associate all' RNA: U1RNP, Sm, fibrillarina, RNA-polimerasi I, NOR-90, nucleolina, SSA/Ro, SS-B/La, Jo1, PL-7, PL-12, RNP ribosomiali.

La ricerca degli autoanticorpi anti-ENA rappresenta il **2° livello diagnostico**, infatti si deve ricorrere alla loro determinazione quando la positività ANA in IFI è almeno uguale o superiore al titolo 1:160. Al di sotto di tale titolo non è necessario eseguire sistematicamente la determinazione degli ENA, ma essa è consigliata quando, in assenza di positività ANA, ci siano sintomi clinici di una malattia autoimmune.

Metodi consigliati

1. ENA-screening ELISA/CLIA pannello minimo: Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70, Jo-1
2. Dot-Blot Line-Blot

Flow-chart consigliata

▲ **Secondo Livello** - Dopo l'esecuzione dell'ENA screening ELISA (pannello minimo) si effettua la tipizzazione con Dot o Line-Blot.

▲ **Livello Specialistico** - In caso di quadro fluoroscopico significativo per presenza di autoanticorpi diversi da quelli del secondo livello diagnostico, si effettua (su reali sospetti clinici e/o diagnostici) la tipizzazione profilo specifico

1. ENA profilo allargato – Istoni, Nucleosomi, PCNA, CENP-B, P-rib.
2. ENA profilo Epatico – AMA-M2, Sp100, PML, SLA, LC1, LKM1
3. ENA profilo Miositi – Mi-2, Ku, PL-7, PL-12, EJ, OJ, SRP, PM-Scl75/100

AUTOANTICORPI ANTI-DNA - Immunoglobuline con differenti specificità ed avidità. Possono essere:

• 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. 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. Ad elevata concentrazione sono prognostici di una riacutizzazione di malattia, 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. Dal momento che la concentrazione degli anticorpi anti dsDNA correla con l'andamento clinico del LES e della nefrite lupica, la loro determinazione quantitativa è utile per il monitoraggio della terapia e si deve eseguire obbligatoriamente in tutti i casi in cui il test ANA in fluorescenza risulti positivo al titolo maggiore o uguale a 1:160 con pattern omogeneo.

• anticorpi diretti **verso il DNA a singola elica (ssDNA)** che si legano principalmente agli epitopi localizzati in zone ricche di basi puriniche e pirimidiniche quando la molecola di DNA è aperta o denaturata. Sono molto aspecifici: si ritrovano, oltre che nel LES, in molte altre malattie autoimmuni (Lupus da farmaci, SSP ,AR,PM/DM) e per questo motivo hanno scarso valore diagnostico.

Ricerca degli anticorpi anti-dsDNA (nDNA)

1. **IFI (IFA)** rileva anticorpi ad alta e media avidità (presenti solo nel LES).

Substrato cellulare: Crithidia luciliae.

Titolo di screening 1:10. Rappresenta anche il titolo minimo significativo, se positivo si procede alla diluizione per raddoppio fino all'end point.

Valutazione microscopica: deve essere valutata la fluorescenza del Kinetoplasto, organulo ricco di DNA nativo posto in posizione sub terminale della Crithidia. 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). Metodica semiquantitativa

2. **RIA (tecnica di Farr)** metodo sensibile, specifico (rileva Ab ad alta avidità), quantitativo è il gold standard per gli anti dsDNA.

3. **ELISA:** permette il dosaggio quantitativo in rapporto a standards di riferimento internazionali (WHO 80). E' il sistema più sensibile ma meno specifico (rileva anche Ab a bassa avidità, presenti anche in patologie diverse dal LES).

Il test ELISA può essere utilizzato per lo screening quantitativo, i risultati positivi devono essere confermati in IFI.

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.

Gli anticorpi rivolti contro una o più frazioni istoniche o contro il complesso H2A-H2B si ritrovano prevalentemente nel LES farmaco-indotto (procaïnamide, idralazina, sulfonamidi, isoniazide, tranquillanti, anticonvulsivanti), ma si possono riscontrare anche nell'artrite reumatoide (AR), vasculiti, cirrosi biliare primitiva, SSc, HAI, neoplasie, AIDS

Ricerca degli anticorpi anti-istoni

1. **IB o WB** sensibile, permette l'identificazione de pattern di reattività anticorpale verso le varie componenti istoniche.
2. **EIA** sia per screening (nel pozzetto sono coattate tutte le specificità antigeniche) che Ag specifici

AUTOANTICORPI ANTI-NUCLEOSOMA - 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).

Gli anticorpi anti-nucleosomi sono presenti nel 100% dei pazienti affetti da LES e nella nefrite lupica , in particolare durante la fase attiva della malattia. Ne rappresentano un utile marcatore diagnostico soprattutto nei pazienti anti dsDNA negativi.

La positività degli anticorpi anti dsDNA e anti nucleosoma ha una predittività diagnostica maggiore per LES rispetto alla loro singola positività.

Ricerca degli anticorpi anti nucleosoma

1. ELISA
2. Immunodot

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE – Il percorso diagnostico delle connettiviti rappresenta uno strumento di supporto alla valutazione clinica nel soggetto con segni e sintomi suggestivi di perdita del self immunologico.

L'algoritmo da noi suggerito, sulla base delle evidenze scientifiche, surrogate dai percorsi costruiti e condivisi nei reparti di degenza reumatologica con i laboratori di autoimmunologia, rappresenta un "cammino" verso la diagnosi reumatologica o differenziale con elevato valore positivo predittivo (VPP).

l'iter diagnostico dovrebbe essere articolato su tre livelli come sopra esposto:

1° livello - ANA-screening.

2° livello – ENA-screening e tipizzazione minima.

Livello specialistico – tipizzazione quadro fluoroscopico dipendente o secondo puntuali indicazioni cliniche.

Tale approccio porta ad una riduzione dei test di screening non francamente necessari ed a una diminuzione dei costi di gestione della diagnostica, con il vantaggio di poter investire in test di laboratorio sempre più mirati, utili a raggiungere nel minor tempo possibile un miglior risultato a supporto del clinico con esiti diagnostici e prognostici validi.

Allegati:

Allegato 1	Pattern ANA (IFI su HEp-2)
Allegato 2	Metodi di laboratorio per determinazione autoAb

Bibliografia:

- Tan EM, et al. Range of antinuclear antibodies in 'healthy' individuals. *Arthritis Rheum.* 1997;9:1601-11
- Kavanaugh A, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.*2000;124(1):71-81.
- Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines.
- Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. [Arthritis Rheum.](#) 2002 Aug;47(4):434-44.
- D. Almeida Gonzáles, et al. Efficiency of different strategies to detect autoantibodies to extractable nuclear antigens. *J of Imm Methods.* 2010;360:89-95.
- NCCLS Quality Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay from Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline- Second Edition I/LA2-A2 (26)
- Bonaguri C., et al. An Italian multi center study for application of a diagnostic algorithm in autoantibody testing. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2009;1173:124-9.

All. 1 Pattern ANA (IFI su HEp-2)

Quadro fluoroscopico	Pattern HEp-2	Descrizione morfologica	Antigene	Patologie associate
Nucleare	Membrana Nucleare	Periferico – fluorescenza della membrana nucleare associata a fluorescenza omogenea dei nuclei e positività dei cromosomi delle mitosi	Ds-DNA, LAP1, LAP2	SLE
		Nuclear lamins - fluorescenza della lamina nucleare sottile e cromosomi delle mitosi negativi	Lamina A, B1, B2, C	PBC, APS/SLE (LAC positive), AR, SSP, thrombocytopenia, CFS, autoimmune liver diseases
		Nuclear pore complex – fluorescenza punteggiata e discontinua della membrana nucleare (a livello dei pori nucleari) delle cellule in interfase, negativi i cromosomi delle cellule in metafase.	gp120, Nucleoporin p62	AIH, PBC, PM, MTCTD
Nucleare	Omogeneo	Fluorescenza diffusa uniforme dell'intero nucleo delle cellule in interfase, fluorescenza associata alla cromatina condensata nelle cellule in mitosi.	Ds-DNA, ss-DNA, DNP, istoni, nucleosomi	SLE, DIL (o DILE), RA, ACG, SSC
Nucleare	Speckled	Fine speckled - fluorescenza finemente granulare e uniformemente distribuita su tutto il nucleo che possono ricoprire anche i nucleoli, negativi i cromosomi delle cellule in metafase	Mi-2, Ku, ki, SS-A/Ro, SS-B/La, RNA-pol.II e III, Topoisomerasi I	SS, SSc, DM/PM, Raynaud, SLE, MCTD, porpora ipergammaglobulinemica,
		Coarse speckled - fluorescenza che copre tutto il nucleo con granulazione di media grandezza, negativi i cromosomi delle cellule in metafase	Sm, U1-snRNP, U2-snRNP, U4/U6-snRNP SS-A/Ro	MCTD, SLE, PM/SSc overlap, Raynaud, Psoriasi, SS, SSc
		Nuclear matrix - fluorescenza a grandi granuli localizzati soprattutto attorno ai nucleoli	hnRNA-A1, A2, B1, B2 hnRNA-C1, C2, I	SLE, MCTD, RA, SSc
		Diffuse grainy - fluorescenza a smeriglio del nucleo e dei nucleoli e cromosomi delle mitosi positivi	DNA topoisomerasi I (Sci-70)	dcSSc, SLE, Raynaud
Nucleare	Nuclear dots	Multiple nuclear dots - fluorescenza puntiforme del nucleo (> 6 granuli), negativi i cromosomi delle cellule in interfase	Sp-100, PML, SUMO 1 -2 NDP53	PBC, AIH, SS, SLE
		Few nuclear dots – fluorescenza di corpi nucleari (1-5), negativi i cromosomi delle cellule in interfase	p80-coilin	PBC, AIH, SLE, MCTD, SSc

All. 1 Pattern ANA (IFI su HEp-2)

Quadro fluoroscopico	Pattern HEp-2	Descrizione morfologica	Antigene	Patologie associate
Nucleare	Nucleolare	Speckled - fluorescenza granulare dei nucleoli; oppure fluorescenza granulare densa che può apparire omogenea	RNA-polymerase I, II, III RNA-helicase II/Gu (RH II/Gu)	SSc, SLE, RA, MCTD, UCTD
		Omogeneo - fluorescenza omogenea dei nucleoli	PM-Scl, Th/To	SSc, PM, overlap PM-SSc Raynaud, SLE, RA
		Clumpy - fluorescenza a granulazioni grossolane conglomerate	U3-snoRNP (fibrillarin)	SSc (<i>anche in ipertensione polmonare</i>), HCC, (1 negli Afroamericani)
		Speckled con mitotic dots (NOR) - fluorescenza granulare dei nucleoli delle cellule in interfase con l'aggiunta di una fluorescenza nuclear dots mitotici	hUBF/NOR-90, ASE-1 RNA-polymerase I	SSc, Raynaud, SLE, RA, MCTD, Neoplasie (HCC)
Nucleare	Centromerico	ACA - fluorescenza puntiforme (40-60) del nucleo nelle cellule in interfase localizzata a livello dei centromeri dei cromosomi. I centromeri dei cromosomi delle cellule in mitosi sono fluorescenti	CENP-A, B, C, D	CREST, IcSSc, PBC, Raynaud, SS
Nucleare (ciclo cellulare)	PCNA	Fluorescenza omogenea o granulare del 30-60% dei nuclei delle cellule in fase S con negatività delle cellule in fase G0 e G1; la regione cromosomica delle cellule in metafase può essere negativa o presentare una fluorescenza granulare brillante.	DNA polymerase δ (ciclina)	SLE, AIH B o C
	CENP-F	Fluorescenza nelle cellule in mitosi, marcata nella regione pericromosomica poiché gli anticorpi sono diretti contro i centromeri delle cellule in profase e metafase	CENP-F	Neoplasie (breast e lung), SLE

All. 1 Pattern ANA (IFI su HEp-2)

Quadro fluoroscopico	Pattern HEp-2	Descrizione morfologica	Antigene	Patologie associate
Mitotico (ciclo cellulare)	Centriolo/Centrosoma	Fluorescenza viva a spot (1-2) localizzata ai centrioli, evidente nelle cellule in metafase oppure nel citoplasma in prossimità del nucleo nelle cellule in interfase; negativi i cromosomi delle cellule in metafase	Enolase (gg isoforma), hsp48, PMC-1, Pericentrin, Cep250	Raynaud, SSc, SS, CREST, infez. da Mycoplasma pneumoniae
Mitotico (ciclo cellulare)	Mitotic spindle (<i>Tubulina</i>)	Fluorescenza del fuso mitotico (pole-pole); fluorescenza di fibre filamentose concentrate attorno al nucleo ed estese in tutto il citoplasma	Tubulin	Inf. EBV, CPI, Hashimoto's thyroiditis, Grave's disease, PBC, Hepatitis in chronic liver
Mitotico (ciclo cellulare)	NuMA/MSA-1	Fluorescenza concentrata ai poli del fuso mitotico delle cellule in metafase senza che siano evidenti le fibre interpolari; negativi i cromosomi delle cellule in metafase	NuMA-1 (210 kDa)	SLE, SS, MCTD, Polyarthritis
	NuMA-2	Fluorescenza dei poli del fuso durante la metafase e l'anafase, le fibre interpolari sono negative. Il midbody e ponti intercellulari sono fluorescenti in telofase	HsEg5 (kinesin-like protein – 130 kDa)	SLE, SS
	Midbody (MSA-2)	Fluorescenza brillante delle proteine fibrillari dell'anello contrattile visibile solo nelle cellule in telofase; nelle altre fasi del ciclo cellulare si può osservare sia nelle cellule in interfase che nelle cellule in metafase un aspetto simil centromerico.	ATPasi	SSc, Raynaud.
	MSA-3	Fluorescenza fine speckled densa del nucleo in alcune cellule in interfase con granulazioni allineate lungo il fuso in profase e metafase. Le cellule in telofase non sono fluorescenti	Sconosciuto	Tumori del tratto respiratorio

All. 1 Pattern ANA (IFI su HEp-2)

Quadro fluoroscopico	Pattern HEp-2	Descrizione morfologica	Antigene	Patologie associate
Citoplasmatico	Fine speckled	Fluorescenza a fini granuli del citoplasma che si condensa in zona perinucleare e diminuisce d'intensità verso la membrana citoplasmatica	tRNA-synthetases (Jo1, PL-7, PL-12, EJ, OJ)	PM con fibrosi polmonare
Citoplasmatico	Apparato di Golgi	Fluorescenza citoplasmatica granulare, posta a "calotta" ad un polo del nucleo, localizzata a livello dell'apparato di Golgi	Golgi complex: Golgin-67, 95, 97, 160, 245, macrogolgin/giantin	SLE, SS, altre malattie reumatiche croniche, inf. Da EBV o HIV
Citoplasmatico	Mitocondriale	Fluorescenza a granuli irregolari con netto rinforzo in sede perinucleare e con aspetto citoplasmatico filamentoso. Si confronta con tipica fluorescenza su sezione di fegato, rene e stomaco di ratto	M2, PDC-E2	PBC
Citoplasmatico	Lisosomiale	Fluorescenza di aspetto granulare puntiforme distribuita irregolarmente nel citoplasma con granuli di grandi dimensioni (rispetto a quelli del pattern mitocondriale)	LAMPs	SLE e malattie infettive
Citoplasmatico	Perossisomiale	Fluorescenza fine di dimensioni uniforme del citoplasma. Si confronta con tipica fluorescenza su sezione di fegato, rene e stomaco di ratto/topo.	Perossisomi (Ag sconosciuto)	Associazione non ben definita
Citoplasmatico	SRP	(<i>Signal Recognition Particle</i>) Fluorescenza citoplasmatica da fine speckled a granulare. Negativi i nuclei e nucleoli.	SRP (del ER)	PM, DM
Citoplasmatico	Ribosomiale	Fluorescenza densa di aspetto omogeneo o finemente granulare che ricopre tutto il citoplasma detta "milky way" con addensamento perinucleare, che nella maggior parte dei casi interessa anche i nucleoli sede di sintesi riposomiale, negativo lo spazio internucleolare.	proteine P-ribosomiale: P0, P1, P2 di sub unità rib. 60S. S10, Ja, L12, L5/5S di sub. 28S rRNA	SLE con manifestazioni psicotiche e renali

All. 1 Pattern ANA (IFI su HEp-2)

Quadro fluoroscopico	Pattern HEp-2		Antigene	Patologie associate
Citoplasmatico	Actina	Fluorescenza dei microfilamenti del citoscheletro che assumono l'aspetto di fasci fibrosi paralleli che si estendono lungo tutto l'asse delle cellule in interfase. La fluorescenza ricopre in parte il nucleo. Nelle cellule in metafase la fluorescenza si condensa in granuli citoplasmatici. Le fibre appaiono disposte su un unico piano. Si confronta con tipica fluorescenza su sezione di stomaco di roditore.	Actin	AIH, PBC, malattie tessuto connettivo
Citoplasmatico	Vimentina	Fluorescenza dei filamenti intermedi del citoscheletro che assumono l'aspetto di fasci fibrosi radiali o di strie attorcigliate o spiraliformi, che si estendono lungo tutto l'asse delle cellule in interfase. Le cellule in metafase presentano fluorescenza granulare del citoplasma.	Vimentina	RA, SSc,
Citoplasmatico	Cheratina	Fluorescenza dei filamenti intermedi del citoscheletro che si presentano come fasci fibrosi sottili disposti a reticolo, che interessano l'intera area citoplasmatica delle cellule in interfase; le cellule in metafase presentano fluorescenza granulare del citoplasma.	Cytokeratin	RA, AIH, MCTD, Crohn, SCCL
Citoplasmatico	Tropomiosina	Fluorescenza di fibre corte provviste di propaggini di tipo dendritico. "stress fibres" percorrono la lunghezza della cellula che appare sotto tensione.	Tropomyosin	RA, SSc
Citoplasmatico	Vinculina	Fluorescenza di fibre corte adiacenti al nucleo e membrana citoplasmatica	Vinculin	Myasthenia gravis, Immune thrombocytopenia.
Citoplasmatico	Desmina	Fluorescenza fine di filamenti citoplasmatici. Le cellule in mitosi mostrano citoplasma granulare.	Desmin	Associazione non ben definita
Citoplasmatico	Ring/Rod	<i>Fluorescenza di strutture ad anello (ring) ed a bastoncino (rod) di circa 2-5µm di diametro e 3-10µm di lunghezza rispettivamente.</i>	<i>In corso di valutazione, candidati: CTPS1, IMPDH2.</i>	<i>Probabile associazione a terapia antivirale INF/R in soggetti HCV+</i>

All. 1 Pattern ANA (IFI su HEp-2)

Acronimi:

ACG	Arterite a Cellule Giganti
AIH	AutoImmune Hepatitis
APS	Antiphospholipid Antibody Syndrome
CFS	Chronic Fatigue Syndrome
CPI	Chronic Parasite Infections)
CREST	Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, and Telangiectasia
dcSSc	diffuse cutaneous Systemic Sclerosis
DIL o DILE	Drug-Induced Lupus Erythematosus
DM	DermatoMyositis
HCC	Hepatocellular Carcinoma
LAC	Lupus AntiCoagulant
IcSSc	limited cutaneous Systemic Sclerosis
MCTD	Mixed Connective Tissue Disease
PBC	Primary Biliary Cirrhosis
PM	PolyMyositis
RA	Rheumatoid Arthritis
SCCL	Squamous Cell Carcinoma of the Lung
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SS	Syndrome of Sjogren
SSc	Systemic Sclerosis (scleroderma)
SSP	Progressive Systemic Sclerosis
UCTD	Undifferentiated Connective Tissue Diseases

Bibliografia:

E. Cavanna, P. Congedo, I. Diotto, PA. Dusi, S. Finazzi, ML. Garlaschi, MA, Parmeggiani. D.Perugini,R.Pozzoli Principali Pattern Autoimmunologici rilevabili su cellule HEp-2. Allegato 1 a Percorsi Diagnostici

All. 1 Pattern ANA (IFI su HEp-2)

1 - Gerli R, Caponi L. Anti-ribosomal P protein antibodies. *Autoimmunity*. 2005;**38**:85-92

2 - A.R. Bradwell, R.G. Hughes. Atlans of HEp-2 patterns 3rd Edition. 2007

3 - Tozzoli R. Bizzaro N. Villalta D. Tonutti E. Il Laboratorio nelle Malattie Reumatiche Autoimmuni. Società Editrice Esculapio; 2007

4 – Shoenfeld Y. Gershwin ME. Meroni PL. Editors. Autoantibodies. 2nd Edition. Elsevier Science; 2007

5 - Conrad K., et al. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases, A Diagnostic Reference. 2nd Edition; 2007

6 - Wiik A.S., et al. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J of Autoimmunity* 2010;**35**:276-290.

7 - Conrad K., et al. From Prediction to Prevention of Autoimmune Diseases. *Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity*. Volume 7 - 2011

METODI DI DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI NELLE

Anti-nucleo ANA	
IFI su HEp-2 fissate in acetone o acetone/metanolo	
Metodo di riferimento	
Diluizione di partenza 1:80	
VANTAGGI	LIMITI
Possibilità di evidenziare più autoanticorpi	Metodo semiquantitativo (titolazione)
Maggiore sensibilità rispetto ai test immunometrici (vicina al 100%)	Titolo non utile per il monitoraggio della terapia
Preparazione dei vetrini automatizzabile	Bassa specificità
Lettura dei preparati al microscopio automatizzabile (screening dei negativi e interpretazione dei pattern fluoroscopici)	VPP basso
Possibilità di archiviare immagini	Soggettività di lettura al microscopio
	Rapida caduta della fluorescenza
ELISA	
Estratto nucleare di HEp-2 purificato e/o alcuni antigeni purificati adesi alla superficie del supporto	
Coniugato : anti-IgG oppure anti-IgG+anti-IgM	
VANTAGGI	LIMITI
Riproducibilità del risultato	Metodo qualitativo (positivo , negativo , borderline)
Facile esecuzione ed automatizzabile	Diversi livelli di sensibilità e specificità per i kit in commercio
Oggettività di lettura	Non garantisce la rilevazione di tutte le specificità anticorpali
Utile come test di screening in alternativa all'IFI	Sensibilità ridotta rispetto ad IFI
	Accuratezza diagnostica variabile

CONNETTIVITI (MAIS)

Anti-nDNA Anti-ds-DNA	
Radioimmunometrico di Farr	
Metodo di riferimento	
VANTAGGI	LIMITI
Altamente specifico (rileva ab ad alta avidità)	Difficoltà di gestione delle sostanze radioattive
VPP alto	Applicazione limitata
Utile per il monitoraggio del LES	
IFI su Crithidia Luciliae	
Diluizione di partenza : 1:10	
VANTAGGI	LIMITI
Molto specifico (rileva ab ad alta e media avidità)	Metodo semiquantitativo (titolazione)
Discreta sensibilità	Rapida caduta della fluorescenza
Preparazione dei vetrini automatizzabile	
ELISA	
VANTAGGI	LIMITI
Metodo quantitativo	Meno specifico dei precedenti
Molto sensibile (rileva anche ab a bassa avidità)	Diversi livelli di sensibilità e specificità per i kit in commercio a seconda dell'Ag utilizzato (purificato o ricombinante)
Facile esecuzione ed automatizzabile	Accuratezza diagnostica variabile
Affidabilità analitica	
Riproducibilità del risultato	
Utile per il monitoraggio del LES	
Lettura contro Standard Internazionale WHO/ISP Wo/80	

Anti-ENA	
ELISA FIA CLIA	
Molto sensibile (rileva anche Ab a bassa avidità) Diversi livelli di sensibilità e specificità per i kit in commercio a seconda dell'Ag utilizzato (purificato o ricombinante)	
VANTAGGI	LIMITI
Metodo quantitativo	Pannello ENA limitato
Molto sensibile	Specificità variabile per i kit in commercio a seconda dell'Ag utilizzato (purificato o ricombinante)
Facile esecuzione ed automatizzabile	Accuratezza diagnostica variabile
Affidabilità analitica	
Riproducibilità del risultato	
Definisce specificità antigenica	
IMMUNOLINE-BLOT (IB) Array planare: immunoblot lineare su membrane di nitrocellulosa	
VANTAGGI	LIMITI
Buone sensibilità e specificità	Metodo semiquantitativo
Consente determinazione di diversi profili autoanticorpali	Pannello ENA limitato
Facile esecuzione ed automatizzabile	
Affidabilità analitica	
Riproducibilità del risultato	
Facile interpretazione dei risultati	
Accuratezza diagnostica e clinica	
WESTERN-BLOT (WB) Array planare: immunoblot lineare su membrane di nitrocellulosa	
VANTAGGI	LIMITI
Buona sensibilità	Metodo qualitativo
Buona specificità	Difficile interpretazione dei risultati
Facile esecuzione ed automatizzabile	
Pannello ENA completo	

MULTIPLEXING	
Array non planare – Microsfere o particelle codificate – Tecnologia : fluorimetria laser in citometri a flusso	
VANTAGGI	LIMITI
Buona sensibilità	Rischio di aumento di falsi positivi
Dosaggio multiparametrico	Metodo qualitativo o semiquantitativo
Facile esecuzione ed automatizzabile	Pannello ENA limitato
Buona affidabilità analitica	Specificità variabile per i kit in commercio a seconda dell'Ag utilizzato (purificato o ricombinante)
Buona riproducibilità	
Rilevazione simultanea di più anticorpi in un singolo campione : possibilità di lavorare su profili autoanticorpali	
Possibile utilizzo a scopo preventivo nello screening di popolazioni o di gruppi a rischio	

E. Cavanna, P. Congedo, I. Diotto, PA. Dusi, S. Finazzi, ML. Garlaschi, MA, Parmeggiani. D.Perugini,R.Pozzoli Principali Pattern Autoimmunologici rilevabili su cellule HEP-2.

Allegato 2 a Percorsi DiagnosticiGLaPA-AMCLI 2012