

Raccomandazioni per anticorpi anti-nucleo (ANA)

- Noi raccomandiamo che il clinico richieda test per la rilevazione di autoanticorpi in ogni circostanza in cui sia presente un sospetto clinico per MAIS. Noi non consigliamo la ricerca di autoanticorpi come test di screening nei soggetti asintomatici e senza fattori di rischio.
- Noi riteniamo che la sola determinazione degli autoanticorpi anti-nucleo (ANA) di classe IgG, utilizzando un metodo sensibile e preciso, sia sufficiente quale prima indagine nella diagnostica delle MAIS.
- Noi consigliamo di effettuare la determinazione di ANA con il metodo di immunofluorescenza indiretta (IFI), dotato di buona sensibilità ed elevata specificità, di definire il quadro fluoroscopico (pattern) di positività e di quantificare i livelli anticorpali.
- Nell'esecuzione del metodo IFI, noi raccomandiamo l'impiego di cellule epiteliali da carcinoma laringeo umano (HEp-2, American Type Culture Collection CCL 23), in cui siano garantite l'espressione e l'integrità degli antigeni clinicamente significativi.
- Noi consigliamo la specificazione dei seguenti quadri fluoroscopici, accompagnata da un commento interpretativo sul rispettivo significato: quadri nucleari: omogeneo, periferico, granulare (speckled), centromerico, nucleolare, pleomorfo (PCNA), puntiforme (nuclear dots), della membrana; quadri mitotici: del fuso, dei centrioli, dei poli (NUMA), del corpo intermedio (midbody), CENP-F; quadri citoplasmatici: granulare (speckled), mitocondriale, ribosomiale, dell'apparato di Golgi, lisosomiale, dei filamenti citoscheletrici (actina, vimentina, citocheratina).
- Nella determinazione degli anticorpi anti-nucleo, noi raccomandiamo l'espressione quantitativa in titolo (reciproco dell'ultima diluizione del siero ancora reattiva), o, preferibilmente, in concentrazione (Unità Internazionali - UI/mL, WHO-IRP 66/233).
- Nella titolazione noi consigliamo la diluizione iniziale del campione di 1:40, e nel caso di reattività consigliamo diluizioni seriate del siero fino a scomparsa della fluorescenza, adottando come titolo il reciproco dell'ultima diluizione in cui si è osservata fluorescenza.

I titoli di 1:40 e di 1:160 (o le concentrazioni di 5 e 20 UI/mL) vanno considerati come livelli decisionali, che impongono differenti comportamenti operativi:

- a. titoli inferiori a 1:40 vanno considerati negativi ed i relativi pazienti, se asintomatici, non affetti da patologie autoimmuni;
- b. titoli superiori a 1:40 e inferiori ad 1:160 vanno considerati bassi positivi: il paziente non deve essere sottoposto ad approfondimento diagnostico, quanto invece a monitoraggio nel tempo;
- c. titoli uguali o superiori a 1:160 sono da considerare positivi e i pazienti vanno sottoposti ad approfondimento diagnostico, dato che è probabile che siano affetti da una patologia autoimmune.

Raccomandiamo inoltre che ogni laboratorio verifichi la consistenza di questi livelli decisionali in base alle caratteristiche della propria casistica/popolazione e fornisca indicazioni sulla percentuale di soggetti sani che sono positivi ai titoli indicati.

- Salvo rare eccezioni, noi non consigliamo l'utilizzo di variazioni del titolo di ANA in IFI nel monitoraggio del decorso e della terapia delle MAIS.
- Allo stato attuale delle conoscenze scientifiche e delle tecnologie biomediche, noi non consigliamo la determinazione di ANA con metodo immunoenzimatico, a meno che non siano soddisfatte le seguenti condizioni:
 - a. il metodo impiegato deve presentare sensibilità clinica e concordanza con metodo IFI non inferiore a 90%;
 - b. i risultati positivi devono essere successivamente confermati con il metodo IFI, con specificazione del pattern e del titolo;
 - c. i risultati discordanti (positivi in EIA, negativi in IFI) devono essere considerati falsi-positivi a meno che non vengano rilevati anticorpi anti-SSA e Jo-1; se il sospetto clinico di MAIS è forte, i pazienti EIA positivi vanno monitorati nel tempo;
 - d. i risultati negativi devono essere successivamente valutati nel tempo, nel caso di pazienti con quadro clinico sospetto per MAIS.

Raccomandazioni per autoanticorpi anti-dsDNA

- titoli uguali o superiori a 1:160 sono da considerare positivi e i pazienti vanno sottoposti ad approfondimento diagnostico, dato che è probabile che siano affetti da una patologia autoimmune. Raccomandiamo inoltre che ogni laboratorio verifichi la consistenza di questi livelli decisionali in base alle caratteristiche della propria casistica/popolazione e fornisca indicazioni sulla percentuale di soggetti sani che sono positivi ai titoli indicati.
- Salvo rare eccezioni, noi non consigliamo l'utilizzo di variazioni del titolo di ANA in IFI nel monitoraggio del decorso e della terapia delle MAIS.
- Allo stato attuale delle conoscenze scientifiche e delle tecnologie biomediche, noi non consigliamo la

determinazione di ANA con metodo immunoenzimatico, a meno che non siano soddisfatte le seguenti condizioni:

- a. il metodo impiegato deve presentare sensibilità clinica e concordanza con metodo IFI non inferiore a 90%;
- b. i risultati positivi devono essere successivamente confermati con il metodo IFI, con specificazione del pattern e del titolo;
- c. i risultati discordanti (positivi in EIA, negativi in IFI) devono essere considerati falsi-positivi a meno che non vengano rilevati anticorpi anti-SSA e Jo-1; se il sospetto clinico di MAIS è forte, i pazienti EIA positivi vanno monitorati nel tempo;
- d. i risultati negativi devono essere successivamente valutati nel tempo, nel caso di pazienti con quadro clinico sospetto per MAIS.

Raccomandazioni per autoanticorpi anti-dsDNA

- Noi non consigliamo la determinazione di autoanticorpi anti-DNA, come prima indagine nella diagnosi delle MAIS; è raccomandata la determinazione di anti-DNA nativo a doppia elica (dsDNA) solo in caso di positività della determinazione di ANA con quadro di fluorescenza nucleare, o, in caso di negatività, solo in presenza di sintomi clinici chiaramente ascrivibili a LES.
- In fase diagnostica, noi consigliamo per la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA il metodo radioimmunologico (tecnica di Farr) per la sua elevata sensibilità e specificità; in alternativa, è consigliata la determinazione con metodo immunoenzimatico (ELISA) e la successiva conferma dei risultati positivi con il metodo IFI su *Crithidia luciliae*, alla diluizione iniziale del siero di 1:10.
- Nella fase di monitoraggio del decorso e della terapia del LES, noi raccomandiamo la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-dsDNA ogni 4-6 settimane, utilizzando il metodo RIA o, in alternativa, il metodo ELISA, in cui i risultati siano espressi in UI/mL (WHO/ISP Wo/80).

Raccomandazioni per autoanticorpi anti-ENA

- Noi non consigliamo la determinazione di autoanticorpi anti-ENA (antigeni nucleari estraibili o solubili), come prima indagine nella diagnosi delle MAIS; è raccomandata la determinazione di anti-ENA, solo in caso di positività della determinazione di ANA o, in caso di negatività, solo in presenza di sintomi clinici chiaramente ascrivibili a MAIS.
- In fase di approfondimento diagnostico, noi consigliamo la rilevazione di autoanticorpi anti-ENA estesa almeno ai seguenti autoantigeni:
 - a. Ro/SS-A
 - b. La/SS-B
 - c. Sm
 - d. RNP o U1RNP
 - e. Topoisomerasi I (Scl-70)
 - f. Istidil-tRNA sintetasi (Jo-1)
 - g. Proteina B centromerica (CENP-B)
 - h. Ribonucleoproteine ribosomiali (rRNP);
 - i. Nucleosomi (cromatina).
- In fase diagnostica, noi consigliamo la determinazione di autoanticorpi anti-ENA con metodi di immunodiffusione doppia (IDD), contro-immunoelettroforesi (CIE), immunoenzimatico (ELISA), immunoblot - IB), immunodot (ID).
- Noi consigliamo l'impiego del metodo di Western blot (WB) nell'approfondimento diagnostico delle malattie reumatiche, cioè nella conferma delle specificità anticorpali identificate e nell'eventuale identificazione di autoanticorpi che riconoscono autoantigeni non comuni o rari.
- Considerata l'attuale affidabilità analitica dei metodi, noi riteniamo che per l'identificazione di autoanticorpi anti-ENA, sia sufficiente un metodo tra quelli sopracitati; tuttavia, in presenza di basse concentrazioni anticorpali o di un risultato negativo in un paziente con forte sospetto clinico di MAIS, è raccomandato l'uso di un secondo metodo.
- Noi consigliamo l'espressione quantitativa del risultato in titolo o in concentrazione (UI/mL), solo in caso di positività isolata per RNP/U1snRNP, in quanto criterio diagnostico per la malattia mista del tessuto connettivo (MMTC).

ANA - ENA

Anticorpi anti-nucleo (ANA): sono gli autoanticorpi diretti contro autoantigeni intracellulari, evidenziabili mediante un metodo di immunofluorescenza indiretta (IFI, IIF) (ANA test) (Friou, 1957); tale terminologia è ormai obsoleta, in quanto numerosi autoantigeni-bersaglio di autoanticorpi,

cl clinicamente importanti in alcune malattie autoimmuni sistemiche (MAIS, ARD) non sono strettamente localizzati nel nucleo, ma anche nel citoplasma.

I titoli di 1:40 e di 1:160 (o le concentrazioni di 5 e 20 UI/mL) vanno considerati come livelli decisionali, che impongono differenti comportamenti operativi:

a. titoli inferiori a 1:40 vanno considerati negativi;

b. titoli superiori a 1:40 e inferiori ad 1:160 vanno considerati bassi positivi; in assenza di sintomi specifici, il paziente non deve essere sottoposto ad approfondimento diagnostico, quanto invece a monitoraggio nel tempo;

c. titoli uguali o superiori a 1:160 sono da considerare positivi e i pazienti vanno sottoposti ad approfondimento diagnostico, dato che è probabile che siano affetti da una patologia autoimmune.

La negatività di un test per la ricerca di ANA in IFI può riscontrarsi nelle patologie del connettivo sia per l'effettiva assenza di autoanticorpi anti-nucleo (46), sia a causa dell'estrema solubilità di alcuni antigeni (come Ro/SS-A), sia per la presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni non propriamente nucleari (come Jo-1).

Gli autoanticorpi anti-dsDNA sono i principali responsabili del quadro fluoroscopico nucleare (omogeneo e periferico) in IFI, ma possono essere presenti anche con un quadro nucleare granulare o citoplasmatico

ANA IF IHEP (Immunofluorescenza indiretta)

i quadri nucleari patologia-associati i più frequenti sono costituiti dalla fluorescenza

- omogenea (DNA, DNP, istoni),
- periferica (DNA, DNP, istoni)
- granulare (RNP, Sm, Ro/SS-A, La/SS-B) (sm: Lupus)

tra i relativamente frequenti si annoverano

- centromerico (CENP-A, B, C o Scl 70) sclerosi sistemica Cenp A PBC
- nucleolare (PM/Scl, nucleolina, fibrillarina, RNA polimerasi I, hUBF)
- granulare-nucleolare (topoisomerasi I marcatore di sclerosi sistemica o Scl-70)

tra i più rari

- PCNA (ciclina) marcatore di LES
- puntiforme o 'nuclear dots' (coilina, Sp-100)
- membrana (laminine A, B, C, gp 210)

- anticorpi anti-RNP : connettivite mista
- anti-centromero (ACA) o anti-topoisomerasi (anti-Scl-70) : sclerosi sistemica, diffusa (dSSc) o limitata (lSSc)
- anti-Jo-1: dermatopolimiosite
- autoanticorpi anti-nucleo (ANA) a titolo elevato o la presenza di autoanticorpi anti-Ro/SSA o anti-La/SSB: Sindrome di Sjogren
- autoanticorpi anti-nucleo (ANA) o la presenza di anticorpi anti-dsDNA o anti-Sm : Lupus

ANTICORPO	ASSOCIAZIONE CLINICA
Topoisomerasi	30-40% SSc
CENP-B	40-98% IcSSc
Jo1	48% DM/PM
SSA/RO	60-90% SS e 20-50% LES
SSB/La	40-60% SS e 10-20% LES
CENP-A	40-98% IcSSC 25% PBC
Sm proteina D	25-30% LES
Sm proteina E	5%-30% LES

Anticorpi anti-DNA: sono costituiti da autoanticorpi diretti contro il DNA a singola elica (ssDNA) e contro il DNA nativo a doppia elica (dsDNA): nel primo caso i determinanti antigenici sono localizzati nelle sequenze piriniche e pirimidiniche, mentre nel secondo caso sono individuati lungo lo

scheletro desossiribosio-fosfato. A fronte di una notevole aspecificità degli anticorpi anti-ssDNA, gli anticorpi anti-dsDNA sono altamente specifici per il LES (presenti con frequenza variabile tra 50 e 80%) e rappresentano il 10° criterio classificativo-diagnostico proposto dall'ACR (Hochberg 1997).

Anticorpi anti-ENA (Extractable Nuclear Antigens: Antigeni nucleari estraibili o solubili): nell'accezione originaria (Sharp 1971), questo termine arcaico si riferisce agli autoantigeni solubili, estraibili in soluzione salina dal nucleo e dal citoplasma cellulare: attualmente il termine, ormai entrato nell'uso corrente, comprende tutti gli autoantigeni intracellulari noti, solubili ed insolubili, bersaglio di autoanticorpi clinicamente importanti nelle malattie autoimmuni (MAI)

Antigene Sm: rappresenta un complesso macromolecolare costituito da almeno 8 diversi polipeptidi (B, B', D1, D2, D3, E, F, G), che rappresentano il sito di legame dell'RNA messaggero nella particella subcellulare nota come spliceosoma, che ha funzioni della maturazione dell'RNA messaggero (mRNA), mediante lo splicing delle sequenze non codificanti dello mRNA). L'antigene Sm è storicamente il primo ENA riconosciuto (Tan 1966): il termine rappresenta le iniziali del cognome della paziente affetta da LES (Stephanie Smith) nel cui siero furono identificati autoanticorpi specifici. Tali autoanticorpi sono rilevabili con discreta frequenza (30%) e con elevata specificità (prossima al 100%) nel LES, di cui rappresentano il 10° criterio classificativo-diagnostico, secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR) (Hochberg 1997).

Antigene RNP: il termine si riferisce ad alcune piccole proteine nucleari RNA-associate (SnRNP), che costituiscono la maggior parte di un complesso proteico macromolecolare responsabile dello splicing, meccanismo attraverso il quale sequenze non codificanti del pre-mRNA sono rimosse per ottenere un mRNA funzionale: le principali sono rappresentate dalle proteine U1RNP, U2RNP, U4/U6RNP, U5RNP. Nel complesso macromolecolare tali RNP si legano ad un complesso macromolecolare comune, cioè presente in tutte, costituito dall'antigene Sm. Autoanticorpi diretti contro queste ribonucleoproteine, in particolare contro U1snRNP, sono stati inizialmente identificati (Sharp 1971), con frequenza e concentrazione sierica elevate, nella connettivite mista (MCTD), di cui rappresentano un fondamentale criterio classificativo-diagnostico e successivamente nel LES (Northway 1972).

Antigene Scl-70: questo autoantigene, identificato come l'enzima DNA-topoisomerasi I (Shero 1986), deve il suo nome alla specificità per la sclerosi sistemica-sclerodermia (SSc) e al suo apparente peso molecolare (70 kDa): è il bersaglio di autoanticorpi specifici presenti in circa il 30-40% dei soggetti affetti da SSc, inizialmente riconosciuti con un quadro fluoroscopico finemente granulare all'immunofluorescenza indiretta (Douvas 1979), il cui rilievo rappresenta un criterio classificativo-diagnostico per la SSc (Leroy 1988).

Antigene SSA/Ro: è costituito da due particelle proteiche di 60 (Ro60) e 52 (Ro52) kDa, la prima delle quali è legata a una molecola di RNA ricco in uridina. Gli autoanticorpi specifici, diretti in parte contro entrambe le molecole proteiche, in parte contro l'una o l'altra, sono gli anticorpi di più frequente riscontro nelle malattie autoimmuni sistemiche (sindrome di Sjogren: 60-90%, LES: 30-50%, sclerodermia, connettivite mista, dermatopolimiosite: 5-15%, cirrosi biliare primitiva, artrite reumatoide: 2-3%): sono riconoscibili all'immunofluorescenza indiretta con un quadro finemente granulare nucleare e talora citoplasmatica e costituiscono uno dei criteri classificativo-diagnostici per la SS (Vitali 1996).

Antigene SSB/La: è composto da particelle di RNA legate ad una fosfoproteina di 48kDa: rappresenta il bersaglio di autoanticorpi presenti principalmente nella sindrome di Sjogren (30-90%) e raramente in altre connettiviti: questi autoanticorpi sono riconoscibili all'immunofluorescenza indiretta con un quadro fluoroscopico finemente granulare e costituiscono un criterio classificativo-diagnostico per la SS (Vitali 1996).

Antigene Jo-1: questo autoantigene, riconosciuto da autoanticorpi presenti nel siero di soggetti affetti da

dermatopolimiosite (DM/PM), è stato identificato come l'enzima istidil-tRNA sintetasi (Nishikai 1980); questi anticorpi, riconoscibili all'immunofluorescenza con un quadro granulare citoplasmatico, costituiscono uno dei criteri classificativo-diagnostici per la DM/PM (Tanimoto 1995).

Anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA): sono un gruppo di autoanticorpi evidenziabili nel siero di pazienti affetti da vasculiti sistemiche e diretti contro enzimi presenti nei granuli primari e secondari dei polimorfonucleati neutrofili e dei monociti: i principali enzimi bersaglio sono rappresentati nell'ordine da proteinasi 3 (PR3 - Ludemann 1990), mieloperossidasi (MPO – Falk 1988)) elastasi, catepsina G, lisozima, proteina cationica (CAP 57), lattoferrina, enolasi, BPI, etc.

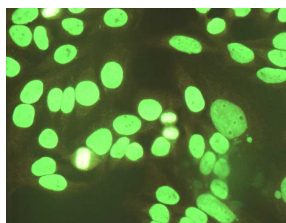
Anticorpi anti fosfolipidi (aPL): sono un gruppo di autoanticorpi diretti contro i diversi componenti del gruppo anionico di fosfolipidi, quali cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerolo, acido fosfatidico, etc: tali anticorpi, in particolare gli autoanticorpi anti-cardiolipina (aCL – Harris, 1983), sono strettamente associati ad una sindrome (trombosi e/o patologia gravidica e/o piastrinopenia) detta da anticorpi anti-fosfolipidi (APS – Hughes 1985), primaria o secondaria ad altre patologie autoimmuni (in particolare il LES).

GLI ANTICORPI ANTINUCLEO

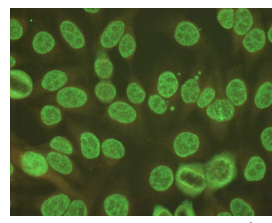
Gli anticorpi antinucleo (ANA) sono autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari, nucleolari o perinucleari; essi rappresentano una caratteristica delle malattie autoimmuni. Sebbene il ruolo patogenetico di tali anticorpi non è ancora chiaro, la loro presenza ha significato solo a titoli significativi e persistenti e nel contesto del quadro clinico a cui si associano. Nell'ambito degli anticorpi anti-nucleo esistono differenti tipi a seconda degli antigeni verso i quali sono diretti, che presentano specificità diverse per le varie patologie autoimmuni.

La tecnica laboratoristica per la determinazione degli ANA è quella dell'immunofluorescenza indiretta che utilizza come substrato la linea cellulare Hep- 2 (una linea di cellule epiteliali umane). Si riconoscono vari tipi di fluorescenza: il tipo omogeneo e quello punteggiato sono i più comuni (2). Il disegno della fluorescenza può suggerire il bersaglio degli anticorpi ed indicare l'esecuzione del test ELISA per la ricerca di specifici anticorpi.

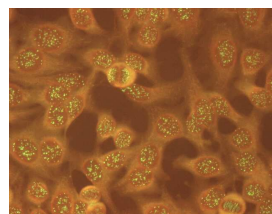
La positività degli ANA con fluorescenza di **tipo omogeneo**, è determinata dalla presenza degli anticorpi antiDNA a doppia elica ed è presente nel LES; la fluorescenza di **tipo punteggiato (speckled)** è associata alla presenza degli anticorpi anti sm, anti SSA ed SSB e si ritrova nei pazienti con sindrome di Sjögren e nella malattia mista del connettivo. La fluorescenza di **tipo nucleolare** dovuta agli anticorpi anti Scl70 si ritrova nella sclerodermia sistemica mentre gli **anticentromero** sono altamente specifici della sindrome CREST.

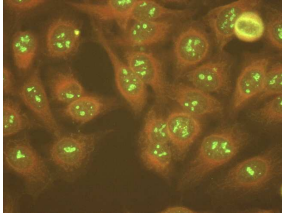


ANA pattern omogeneo



ANA pattern granulare





ANA pattern nucleolare

Si considerano positivi i titoli superiori ad 1:40. Tuttavia, nelle patologie reumatologiche si osservano titoli anticorpali molto più elevati (1). Gli anticorpi antinucleo sono frequentemente positivi in pazienti con malattie del connettivo: nel LES e nel LES indotto da farmaci la sensibilità si avvicina al 100%; la specificità nel LES è di circa il 90% (1). Gli ANA sono presenti nel 30- 40% dei bambini con artrite idiopatica giovanile poliarticolare e nel 40- 60% di quelli con forma pauciarticolare ed individuano un gruppo a rischio di sviluppare iridociclite. Una positività degli ANA si riscontra in molte altre patologie infiammatorie, in alcune malattie infettive e nei soggetti normali. Secondo alcuni studi, il 31% dei soggetti normali ha un titolo ANA di 1:40, il 5% ha un titolo di 1:160 (tabella 4).

Quando i test di screening per gli ANA risultano positivi specialmente se a titolo elevato, (> 1:160), e vi è un forte sospetto clinico di una malattia autoimmune, è indicato effettuare la ricerca dei singoli autoanticorpi (tabella 5).

Le tecniche utilizzate sono diverse ma principalmente il test ELISA, l'immunoblotting ed il test radioimmunologico di Farr (2).

Tabella 4: Condizioni associate a positività degli ANA

Soggetti normali (età avanzata, sesso femminile)

Farmaci : procainamide, idralazina, isionazide, minociclina, penicillamina, anticonvulsivanti, diltiazem, clorpromazina, metildopa

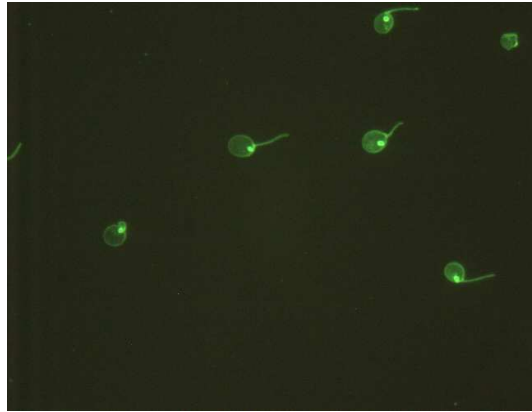
Infezioni : Epstein- Barr virus, tubercolosi, endocardite batterica subacuta, malaria, epatite C

Malattie autoimmuni: LES, sclerodermia, connettivite mista, dermatomiosite, sindrome di Sjögren, artrite reumatoide, artrite idiopatica giovanile, polimiosite.

Malattie autoimmuni organo specifiche: epatite autoimmune, colangite primaria autoimmune, tiroidine autoimmune

(*Pediatr Ann. June, 31(6): 362- 71; 2002*)

a) **ANTICORPI ANTI-DNA A DOPPIA ELICA**: questi anticorpi sono identificabili con varie tecniche (ELISA, FARR, Crithidia luciliae) La tecnica della Crithidia luciliae utilizza un protozoo il cui flagello è costituito da DNA a doppia elica; la presenza di anticorpi anti-DNA determina una fluorescenza. Questi anticorpi sono specifici del LES e sono presenti nel 70% dei pazienti durante il corso della malattia; essi formano immunocomplessi e si ritrovano soprattutto a livello renale. Il titolo di questi anticorpi correla con l'attività di malattia e con il rischio di sviluppare nefrite.



Autoanticorpi anti-dsDNA (Crithidia luciliae)

- b) **ANTICORPI ANTI ISTONI:** sono spesso associati con il LES da farmaci.
- c) **ANTICORPI ANTI-Ro (o anti SSA).** Tali anticorpi sono associati con la sindrome di Sjögren e possono riscontrarsi anche in assenza di una positività degli ANA. Sono fortemente associati con il LES neonatale e risultano implicati nella patogenesi del blocco cardiaco congenito. Gli **ANTICORPI ANTI-La (o anti SSB)**, si riscontrano nel LES e nella sindrome di Sjögren; sono anch'essi associati al LES neonatale non con la stessa frequenza degli anti SSA. L'**anti Scl70** è riscontrabile nel 25% degli adulti con sclerosi sistemica progressiva ma è poco frequente in età pediatrica. Gli anticorpi anti centromero, sono specifici della sindrome **CREST (calcinosi, Raynaud, disfunzione esofagea, sclerodattilia, teleangectasia)**, una variante della sclerodermia. Gli anticorpi anti Jo 1 si ritrovano nel 20% degli adulti con dermatomiosite o polimiosite, raramente nei bambini (< 5%) (2).

ANTICORPI ANTI NUCLEARI ESTRAIBILI: si tratta di anticorpi diretti contro antigeni nucleari che si ritrovano nel LES e nella connettivite mista. L'**anti-sm** (da Smith) è specifico del LES sebbene non sensibile essendo presente solo nel 20% dei pazienti affetti da LES. La connettivite mista è spesso definita dalla presenza degli anticorpi **anti U1 snRNP**. Gli **anticorpi anti Ro (o anti SSA)** sono associati alla sindrome di Sjögren e possono essere presente nel LES; essi possono essere riscontrati anche in assenza di una positività degli ANA (2).

L'utilità diagnostica degli ANA è limitata a causa dell'ampio numero di bambini sani con bassa positività. **Se un test per gli ANA risulta negativo, la diagnosi di LES e connettivite mista è altamente improbabile.** Un test positivo, anche con valori moderatamente aumentati di 1:160, si ritrova di frequente nei bambini senza patologia reumatologica e quindi ha un basso valore predittivo per il LES e la connettivite mista. A diluizioni maggiori (1: 320) si riducono i falsi positivi e l'utilità del test come screening aumenta. Titoli > 1: 1080 sono altamente predittivi di LES (5). E' stato, inoltre, recentemente osservato che la maggior parte dei bambini che ha una positività degli ANA non associata ad alcuna sintomatologia, non svilupperà nel tempo malattie autoimmuni (5, 6).

B) IL FATTORE REUMATOIDE

I fattori reumatoidi (FR) sono un gruppo di autoanticorpi diretti contro il frammento Fc delle immunoglobuline di classe G. Nella pratica clinica vengono considerati solo i fattori reumatoide IgM rilevati con varie metodiche (fissazione al lattice, agglutinazione, ELISA, nefelometria). Il fattore reumatoide si riscontra nell'85% degli adulti con Artrite reumatoide ma solo nel 10% dei bambini con AIG (forma poliarticolare FR positivo). Pertanto, il FR non può essere utilizzato come test di screening per l'artrite idiopatica giovanile. La presenza del FR nell'artrite sia del bambino che dell'adulto, ha un significato prognostico importante in quanto si associa ad una malattia più aggressiva a livello delle articolazioni (2).

I bambini con AIG a FR negativo, raramente presentano una conversione nel corso degli anni; pertanto, non ha senso ripetere il test più volte. Il fattore reumatoide si riscontra frequentemente in altre patologie reumatologiche come il LES(10- 30%), la sclerodermia (25- 40%), la crioglobulinemia mista (40- 100%) ma anche in corso di infezioni in modo particolare nell'endocardite batterica subacuta e nell'epatite B e C (1,2).

C) ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI

Gli anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) sono un gruppo eterogeneo di anticorpi rivolti contro i fosfolipidi di membrana. Si riscontrano frequentemente in pazienti con LES ed altre malattie reumatologiche, nella sindrome primaria da antifosfolipidi, in alcune malattie infettive (HIV) ed occasionalmente nei soggetti sani. La loro presenza è associata ad un aumentato rischio di trombosi arteriose e venose ed altre manifestazioni cliniche della sindrome da antifosfolipidi (piastrinopenia, anemia emolitica, aborti spontanei). Si distinguono quattro gruppi di anticorpi rilevati con metodica (2):

- a) **falsa positività della VDRL** per la presenza nel substrato del fosfolipide cardiolipina; a causa della scarsa sensibilità e specificità, questo test non è più utilizzato di routine per la ricerca degli anticorpi anti fosfolipidi
- b) **lupus anticoagulant**: prolunga in vitro i test di coagulazione come il PTT attivato e l'aggiunta di plasma fresco normale non corregge il difetto che è dovuto alla presenza di anticorpi;
- c) **anticorpi anti-cardiolipina**: vengono rilevati con metodica ELISA. Alti titoli di IgG si riscontrano nella sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi mentre le IgM sono più frequenti nelle infezioni;
- d) **anticorpi anti β 2glicoproteina** la beta 2 glicoproteina lega i fosfolipidi ed è un inibitore naturale della coagulazione e dell'aggregazione piastrinica; l'anticorpo inibisce questi effetti.

D) ANCA

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono anticorpi diretti contro enzimi presenti nel citoplasma dei neutrofili. La presenza degli ANCA va ricercata in pazienti con sospetta vasculite sistemica. All'immunofluorescenza indiretta si identificano due tipi: pANCA con fluorescenza perinucleare e cANCA con fluorescenza citoplasmatica. I pANCA si ritrovano frequentemente nella sindrome di Churg-Strauss, nella poliangiite microscopica, nelle malattie infiammatorie intestinali (colite ulcerosa), nella colangite sclerosante primaria, e raramente nella poliarterite nodosa e nella malattia di Kawasaki. Pertanto, l'utilità clinica dei pANCA è limitata. Il test cANCA è invece altamente specifico della granulomatosi di Wegener essendo positivo in oltre l'80% dei soggetti affetti (2).

E) ANTICORPI ANTI-CCP

Si tratta di anticorpi diretti contro il peptide citrullinato ciclico che si rilevano con metodica ELISA nel siero di pazienti con artrite reumatoide. E' stato ampiamente dimostrato che questi anticorpi hanno una elevata specificità (89- 98%) ed una buona sensibilità (41- 88%) per l'artrite reumatoide dell'adulto. Al contrario, non sembrano essere significativi nell'artrite idiopatica giovanile, come dimostrato da studi recenti (7, 8).

F) TEST GENETICI

Molti antigeni di istocompatibilità del sistema HLA di classe I e II sono associati con malattie reumatologiche . L'antigene *HLA B27* si ritrova in circa il 90% dei pazienti di razza bianca con spondilite anchilosante giovanile e solo nell'8% della popolazione generale. La presenza dell'*HLA*

B27 supporta la diagnosi di spondiloartrite ma non la esclude. L'*HLA B27* si ritrova frequentemente anche nelle artriti reattive secondarie ad infezioni enteriche o da clamidia. La prevalenza di questo antigene negli asiatici e negli africani d'America è molto più bassa rispetto ai bianchi.

Alcuni antigeni di classe II si associano al LES ed all'artrite idiopatica giovanile. L'*HLA DR2* e *DR3* aumentano il rischio di LES nei bianchi, mentre il *DR2* ed il *DR7* sono associati ad un maggior rischio di LES negli africani d'America. Nei bambini con AIG pauciarticolare si trovano frequentemente il *DR8* ed il *DR5* mentre il *DR4*, il *Dw4* ed il *Dw14* sono tipicamente associati alle artriti con fattore reumatoide positivo.

Negli ultimi anni sono stati compiuti numerosi progressi riguardo alla diagnosi delle febbri periodiche; studi genetici possono attualmente confermare il sospetto diagnostico di gran parte di queste patologie (2).

Tabella 5: Autoanticorpi nelle malattie autoimmuni

Autoanticorpo	Malattia	Frequenza (%)	caratteristiche
<i>ANA</i>	LES	99%	Anticorpi sensibili ma non specifici delle malattie del connettivo
	LES da farmaci	100%	
<i>Anti dsDNA</i>	LES	60%	Specifici ma non sensibili del LES correlano con la nefrite e l'attività di malattia
<i>Anti ssDNA</i>	Poco frequenti		Scarsa utilità clinica
<i>Anti istone</i>	LES da farmaci	90%	Sensibili ma non specifici del LES da farmaci
	LES	50%	
<i>Anti sm</i>	LES	20- 30%	Specifici ma non sensibili del LES
<i>Anti UI snRNP</i>	Malattia mista del connettivo	100%	Associati con l'attività di malattia del LES
	LES	30- 40%	
<i>Anti Ro (SSA)</i>	Sjogren	75%	Associati con la fotosensibilità, malattia polmonare, linfopenia e blocco cardiaco congenito nel LES
	LES	40%	
<i>Anti La (SSB)</i>	Sjogren	40%	LES ad insorgenza tardiva, Sjogren secondaria, LES neonatale
	LES	10- 15%	
<i>Anti ribosoma</i>	LES	10- 20%	Associati con la psicosi del LES
<i>Anti centromero</i>	sclerodermia	22- 36%	Associati con sindrome CREST
<i>Anti Scl 70</i>	sclerodermia	22- 40%	Altamente specifici ma non sensibili di sclerodermia
<i>Anti Jo1</i>	Dermatomiosite e polimiosite	30%	Associati con fibrosi polmonare e Raynaud
<i>C ANCA</i>	Granulomatosi	> 90%	Altamente specifici e sensibili per la granulomatosi di Wegener
	Di Wegener		

<i>p-ANCA</i>	Granulomatosi di Wegener	10%	Bassa specificità e sensibilità per la granulomatosi di Wegener
<i>Fattore reumatoide</i>	AR	80%	Sensibile ma non specifico per l'artrite reumatoide dell'adulto
	AIG poliarticolare	10%	Scarsa sensibilità per l'AIG

(*Am Fam Physician* 2002; 65: 1073- 80)

Bibliografia:

1. Stephen K. Lane, and Joseph W. Gravel, JR., MD. Clinical utility of common serum rheumatologic tests. *Am Fam Physician*, 2002 March; 65(6):1073-80.
2. Linda Wagner-Weiner, MD. Laboratory evaluation of children with rheumatic disease. *Pediatr. Ann*, 2002 June 31(6):362-71.
3. Harold E. Paulus, MD, Ernest Brahn, MD. Is erythrocyte sedimentation rate the preferable measure of the acute phase response in rheumatoid arthritis? *J Rheumatol* 2004 May.
4. C. A. Scirè, R. Caporali, C. Perotti, C. Montecucco. Plasma procalcitonin in rheumatic disease. *Reumatismo*, 2003; 55(2): 113- 18.
5. Julie L. McGhee, Lauren M. Kickingbird and James N. Jarvis. Clinical utility of antinuclear antibody tests in children. *Pediatrics*. 2004 July; 4(13):1471-2431.
6. Peter N. Malleon, Michaela Sailer, Murray J. Mackinnon. Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic diseases. *Arch Dis Child*, 1997; 77:299-304
7. Herold M., Boeser V., Russe E., Klotz W.. Anti-CCP: history and its usefulness. *Clin Dev Immunol*. 2005 June;12(2):131-5.
8. T. Avčin, R. Cimaz, F. Falcini et al. Prevalence and clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2002; 61: 608- 11.