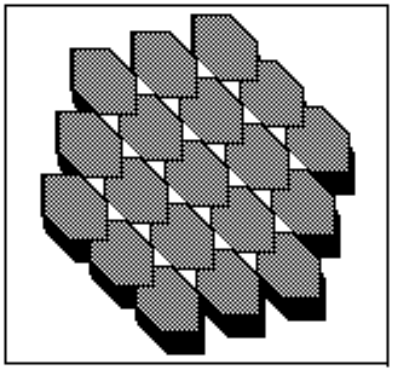
ISSN 0394 3291

Caleidoscopio



Carlomaurizio Montecucco
Roberto Caporali
Fabio De Gennaro

Anticorpi antinucleo

Metodi di determinazione e significato clinico

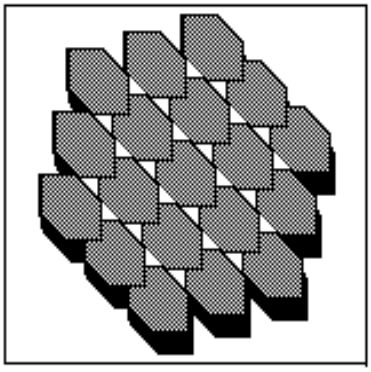
52

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 80.80.51
Stampato a Genova 1990.

Caleidoscopio



Carlomaurizio Montecucco
Roberto Caporali
Fabio De Gennaro

Anticorpi antinucleo

Metodi di determinazione e significato clinico

Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica
Sezione di Patologia Speciale Medica e Metodologia Clinica
IRCCS Policlinico S. Matteo
Università degli Studi
Pavia

52

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 80.80.51
Stampato a Genova 1990.

Editoriale

Le malattie autoimmuni comprendono, tra le altre, il Lupus Eritematoso Sistemico, la sclerodermia, la sindrome di Sjogren e la dermatopolimiosite. Queste malattie sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari. Ciascuna malattia è associata con un gruppo particolare di autoanticorpi che possono quindi essere utilizzati come marcatori ed aiutare il clinico nella diagnosi differenziale. Negli ultimi anni sono stati fatti dei notevoli progressi nella caratterizzazione delle specificità degli anticorpi antinucleo (ANA) e parallelamente anche degli autoantigeni intracellulari contro cui sono diretti. Inoltre è stato possibile raccogliere nuovi dati sul ruolo che queste molecole nucleari giocano nel processo di trascrizione e traslazione genica. La clonazione dei geni che codificano queste molecole ha permesso di allestire dei dosaggi estremamente sensibili e di comprendere meglio il ruolo che queste molecole giocano nella risposta autoimmune e nella patogenesi di queste malattie. E' un campo quindi in fermento e ospitiamo ben volentieri questa monografia che fa il punto delle conoscenze attuali sugli ANA.

Gli Autori, come nostra abitudine, lavorano su questo fronte ed hanno autorità e competenza specifiche. Il dottor Carlomaurizio Montecucco si è laureato in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Pavia. Specialista in Medicina Interna ed in Reumatologia, ha compiuto uno stage di perfezionamento presso la Clinica Reumatologica dell'Ospedale Lariboisière di Parigi, già diretta dal prof S. De Sèze. Ricercatore incaricato del CNR per studi di istochimica quantitativa e citometria, è assistente medico ospedaliero dal 1980 ed attualmente è responsabile dell'attività ambulatoriale e del laboratorio di Reumatologia presso l'istituto di Patologia Medica dell'Università e IRCCS S. Matteo di Pavia. Professore a contratto di Reumatologia presso la Scuola di Specializzazione in Medicina Interna dell'Università di Pavia, tiene inoltre il corso integrativo di "tecniche di studio degli autoanticorpi" presso la Scuola di Specializzazione in Ematologia Generale, Clinica e di Laboratorio della stessa Università. Fa parte del Comitato redazionale di Haematologica, organo ufficiale della Società Italiana di Ematologia.

L'attività di ricerca si é incentrata sulla citometria degli acidi nucleici e successivamente sulla specificità anticorpale dei diversi autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari. Questi studi si sono concretizzati con pubblicazioni sulle principali riviste internazionali sia in campo emato-oncologico che reumatologico, nonchè relazioni ufficiali a Congressi e Corsi post-laurea nazionali ed internazionali.

Il dottor Roberto Caporali, laureatosi in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Pavia, si è specializzato in Medicina Interna, fruisce attualmente di un grant biennale dell' IRCCS S. Matteo per studi sul significato clinico e biologico delle specificità autoanticorpali nelle connettiviti reumatiche. Il dottor Caporali svolge una intensa attività scientifica, in collaborazione con il Centro di Genetica Biochimica ed Evoluzionistica del CNR, utilizzando tecniche di biologia molecolare nello studio degli autoanticorpi. Tale attività è documentata dalle già numerose pubblicazioni su prestigiose riviste internazionali e dall'attiva partecipazione a congressi internazionali.
Il dottor Fabio De Gennaro ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Pavia. Specializzando in Medicina Interna, fruisce attualmente di una borsa di Studio presso l'Istituto di Patologia Medica dell'Università di Pavia. L'attività di ricerca, svolta presso il laboratorio di Reumatologia dello stesso Istituto, è soprattutto indirizzata allo studio degli anticorpi antifosfolipidi nelle diverse patologie infettive ed autoimmuni.

Sergio Rassu

Introduzione

Una delle caratteristiche distintive di alcune malattie autoimmuni quali lupus eritematoso sistemico (LES), sclerosi sistemica progressiva (sclerodermia), sindrome di Siögren, dermato-polimiosite, connettivite mista e connettiviti overlap è una risposta immunologica rivolta contro antigeni intracellulari risultante nella formazione di anticorpi non organo specifici, che vengono indicati comunemente come anticorpi antinucleo (antinuclear antibodies, ANA). La storia degli ANA inizia nel 1948 con la scoperta da parte di Hargraves e coll. del fenomeno di opsonizzazione di materiale nucleare leucocitario con successiva fagocitosi da parte di un polimorfonucleato, che prese il nome di "fenomeno LE" (Hargraves e al 1948). Questa particolarità, descritta nei pazienti affetti da LES, fu attribuita nel decennio successivo alla presenza di anticorpi diretti contro il complesso desossiribonucleoproteico del nucleo, in grado di attivare il complemento e determinarne la successiva fagocitosi (Miesher e Straessle 1957). Nel 1957 alcuni gruppi di ricercatori, indipendentemente l'uno dall'altro, dimostrarono la presenza di anticorpi diretti contro il DNA a doppia elica (dsDNA) nel siero di pazienti con LES (Seligman 1957, Robbins e al 1957, Ceppellini e al 1957). Due anni più tardi, sempre in sieri di pazienti con LES, furono scoperti anticorpi contro sostanze solubili nucleari e citoplasmatiche (Asherson 1959): si trattava della prima descrizione di quegli anticorpi che più tardi verranno indicati come anti-ENA (extractable nuclear antigens). Da allora sono stati identificati numerosi autoanticorpi contro specifici antigeni nucleari e citoplasmatici, il primo dei quali fu descritto nel 1966 e denominato Sm dal cognome del paziente (Smith), nel cui siero furono evidenziati anticorpi contro tale antigene (Tan e Kunkel 1966). Negli ultimi due decenni il progredire degli studi in questo settore ha notevolmente ampliato il concetto di autoimmunità antinucleare, rendendo possibile l'identificazione, all'interno dell'eterogeneo gruppo degli anticorpi antinucleo, di numerose specificità autoanticorpali dirette contro svariati antigeni che differiscono tra loro per struttura e ruolo biologico (Tan 1967, Scopelitis et al 1980, Northway e Tan 1972, Mattioli e Reichlin 1974). Sono inoltre stati individuati anticorpi diretti contro antigeni non strettamente nucleari che tuttavia sembrano rivestire un ruolo importante nella diagnosi e fors'anche nella patogenesi di alcune connettiviti. Numerosissimi sono stati gli studi sulla frequenza dei diversi anticorpi nelle varie malattie autoimmuni, sulla specifica associazione con particolari sintomi clinici e sul loro possibile ruolo patogenetico (Nakamura e Tan 1978, Tan 1982, Morrow e Isemberg 1986, Reeves e al 1986). Lo sviluppo di nuove e sempre più sensibili metodiche di determinazione di questi anticorpi porta inoltre ad una continua revisione della interpretazione dei risultati per quanto riguarda sia la frequenza che il valore diagnostico e prognostico dei diversi autoanticorpi.

Metodiche di determinazione

In considerazione delle diverse caratteristiche fisico-chimiche dei numerosi antigeni nucleari e citoplasmatici riconosciuti dai vari autoanticorpi, non esiste un metodo ideale capace di caratterizzare completamente tutti gli ANA. Il modo migliore di ricercarli è quello di ricorrere contemporaneamente a più metodiche, ciascuna delle quali offre particolari vantaggi per la ricerca o il dosaggio di un determinato anticorpo o gruppo di anticorpi.

Fenomeno LE

Consiste in una tecnica indiretta per la dimostrazione di anticorpi anti-desossiribonucleoproteina (DNP) ed ha, come già detto, valore storico in quanto rappresenta la prima evidenziazione di ANA (Hargraves e al 1948). Secondo la metodica descritta da Marmont e coll. (1957), 10 cc di sangue in toto vengono posti in una beuta contenente microsfere di vetro e defibrinati mediante agitazione per circa 20 minuti. Il sangue, così defibrinato viene poi incubato in provetta per 2 ore a 37°C, aspirando successivamente il materiale all'interfacie fra il surnatante e la componente cellulare sedimentata. Tale materiale, ricco in leucociti, viene strisciato su di un vetrino portaoggetti, fissato all'aria e colorato utilizzando, per un comune microscopio ottico, la colorazione panottica di May Grünwald Giemsa oppure, disponendo di microscopio a fluorescenza, la colorazione con arancio di Acridina. La positività del fenomeno LE è data dalla presenza di almeno un granulocito neutrofilo che abbia fagocitato un nucleo nudo di aspetto omogeneo e che presenti il caratteristico salto di colore legato all'azione patogena degli anticorpi (cellula LE). E' possibile anche notare la presenza di nuclei alterati non fagocitati detti "corpi LE", ovvero di aggregati polimorfonucleari attorno ad un corpo LE (rosette LE) che hanno lo stesso significato di una cellula LE (vedi tavola a colori).

Immunofluorescenza indiretta e immunoistochimica

L'immunofluorescenza indiretta è attualmente la tecnica più usata per lo screening degli anticorpi antinucleo (ANA test) in quanto sensibile e di semplice esecuzione. Consente inoltre di determinare il titolo, la classe immunoglobulinica e la capacità di fissare il complemento di questi anticorpi. Il test prevede una prima incubazione del siero in

esame, diluito opportunamente in tampone fosfato (PBS) a pH 7,2-7,6, sul substrato, fissato su un vetrino portaoggetti, per 30' in camera umida a temperatura ambiente. Quindi, dopo accurato lavaggio in PBS, viene posto sul vetrino un anticorpo diretto contro immunoglobuline umane coniugato con isotiocianato di fluoresceina ed incubato per altri 30' in camera umida. Dopo un ulteriore lavaggio il vetrino viene montato ponendovi sopra una goccia di glicerina tamponata e quindi un vetrino coprioggetto. Il preparato viene poi osservato con un microscopio a luce fluorescente. Per la ricerca di ANA in immunofluorescenza possono essere utilizzate due categorie di substrati: sezioni criostatiche tissutali o cellule in coltura fissate su vetrino. Tra i primi vengono soprattutto utilizzati fegato e rene di ratto o di topo: i quadri fluoroscopici evidenziabili su questo tipo di substrato si dividono classicamente in omogeneo, punteggiato, periferico e nucleolare (Friou 1957, Miller e al 1985). Il test è comunemente ritenuto positivo in presenza di uno dei suddetti quadri fluoroscopici ad una diluizione del siero uguale o superiore a 1:10. L' impiego, come substrato, di colture cellulari (Akizuki e al 1977, Alarcon-Segovia 1983) ha permesso, in questi ultimi anni, di descrivere un maggior numero di quadri fluoroscopici grazie alla maggiore ricchezza di antigene e alla presenza di figure mitotiche in queste cellule a rapida proliferazione. La linea cellulare più frequentemente utilizzata è quella denominata HEp-2 le cui cellule derivano da un carcinoma umano (Tan e al 1980, Kozin e al 1980). Utilizzando questo substrato è possibile osservare svariati pattern di fluorescenza (vedi tavola a colori) quali: omogeneo con o senza rinforzo periferico, nucleolare (a sua volta suddivisibile in omogeneo, punteggiato o periferico), punteggiato a grossi o fini granuli, centromerico, a granulia diffusa etc. Vi è inoltre la possibilità di evidenziare anticorpi diretti contro particolari strutture cellulari quali il centriolo, il fuso mitotico etc.

Con tecniche di immunofluorescenza, utilizzando un substrato particolare, è anche possibile valutare la presenza di anticorpi anti-DNA a doppia elica (dsDNA). Tale substrato è costituito da un emoflagellato, la Crithidia Luciliae, dotato di in cinetoplasto che contiene quasi esclusivamente DNA allo stato nativo. La fluorescenza di tale organulo è quindi indice, con rare eccezioni, della presenza di anticorpi anti dsDNA nel siero in esame (Aarden 1975) (Fig. 1).

Tecniche di immunofluorescenza sono state utilizzate anche per la determinazione di anticorpi anti istoni su substrati tissutali. In presenza di questi anticorpi, infatti, la fluorescenza nucleare scompare o si riduce grandemente quando si proceda preventivamente all'estrazione delle proteine istoniche in HCl. La fluorescenza potrà poi ricomparire dopo ricostituzione del patrimonio istonico (Tan e Portanova 1981). Questo metodo è tuttavia indaginoso e poco affidabile oltreché scarsamente specifico. Per questo motivo vengono oggi preferiti a questo scopo metodi immunoenzimatici in fase solida che permettono anche di identificare gli anticorpi diretti contro singole proteine istoniche (H1, H2 etc.) (Rubin e al 1985). Lo stesso principio utilizzato dai test in immunofluorescenza indiretta, può agevolmente essere impiegato per test immunocitochimici nei quali l'anticorpo fluoresceinato viene sostituito da uno coniugato con un enzima (comunemente perossidasi o fosfatasi alcalina) e successivamente evidenziato con un sistema rivelatore che reagisce cataliticamente con l'enzima stesso (Benson e Cohen 1970, Walwick e al 1975). I preparati così ottenuti vengono valutati su un normale

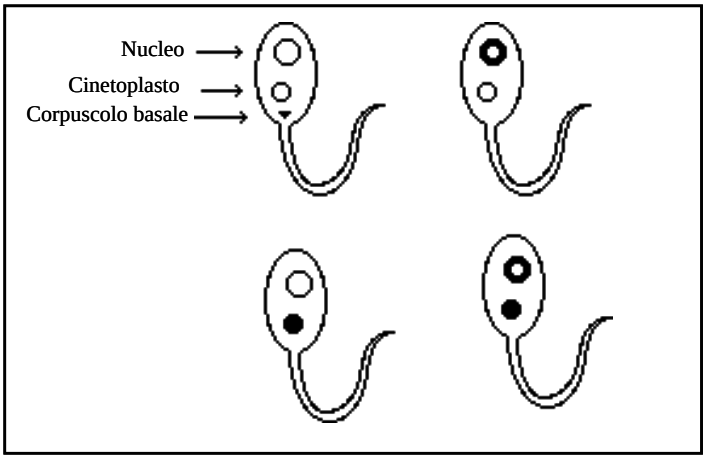


Figura 1. Rappresentazione schematica del test in immunoflurescenza su Crithidia luciliae. L'eventuale fluorescenza del corpuscolo basale o del solo nucleo (disegni superiori) non è significativa. La fluorescenza del cinetoplasto associata o meno a fluorescenza nucleare (disegni inferiori) è invece indicativa di anticorpi anti-DNA a doppia elica (dsDNA).

microscopio senza bisogno di ricorrere alla fluorescenza. Oltre a questo vantaggio la tecnica immunocitochimica permette una più lunga conservazione dei preparati; ha tuttavia lo svantaggio di una minore rapidità di esecuzione rispetto alle tecniche routinarie di immunofluorescenza.

Immunodiffusione doppia

Tra i test per l'identificazione delle varie specificità anticorpali, la tecnica di immunodiffusione doppia riveste un ruolo di primo piano: è infatti la metodica classica di routine per la ricerca di anticorpi diretti contro antigeni solubili presenti in estratti nucleari o cellulari e comunemente indicati con il termine ENA (Northway e Tan 1972). Su una piastra di agaroso vengono ricavati opportuni pozzetti posti a distanza prestabilita, nei quali si pongono i campioni di siero in esame. Nel pozzetto centrale viene invece posta la sorgente antigenica rappresentata, a seconda dei casi e degli anticorpi che si intendono evidenziare, da estratto nucleare di timo di coniglio o di vitello, oppure da estratto cellulare di milza umana o cellule Wil-2 (Tan e Kunkel 1966, Clark e al 1968, Mattioli e Reichlin 1971, 1973). La preparazione di tali estratti è particolarmente delicata in quanto deve garantire la presenza di tutti gli antigeni usualmente identificabili. Esistono tuttavia oggi preparazioni commerciali di buona qualità. In caso di presenza di anticorpi

precipitanti (precipitine) nel siero del paziente, è possibile osservare una evidente banda di precipitazione dopo incubazione in camera umida a temperatura ambiente per 24-72 ore. La determinazione della specificità anticorpale è effettuata testando contro la medesima sorgente antigenica sia il siero in esame che sieri di riferimento a specificità nota. Nel caso vi sia identità tra l'anticorpo presente nel siero del paziente e quello di riferimento, le due linee di precipitazione si fondono tra loro. Nel caso di identità differenti, le bande di precipitazione risulteranno diseguali e si incroceranno senza fondersi (Fig. 2).

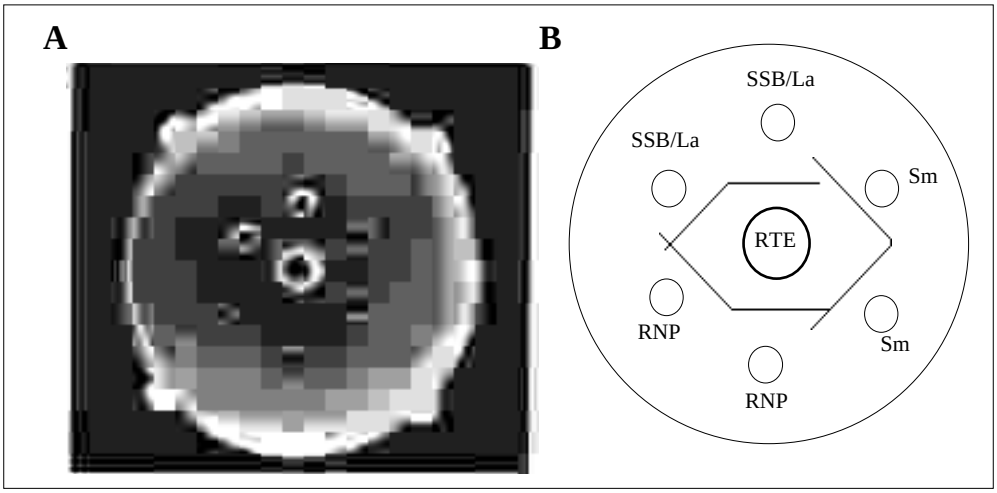


Figura 2. A- Determinazione di anticorpi contro antigeni solubili mediante immuno-diffusione doppia. B- Schema esplicativo: nel pozzetto centrale è stato posto estratto timico di coniglio (RTE), mentre nei pozzetti periferici sono stati posti sieri di pazienti con anticorpi a specificità nota. I sieri con identica specificità danno bande di precipitazione che si incontrano fondendosi tra loro (reazione di identità). Anticorpi diversi danno invece delle bande di precipitazione che non si incontrano o si incrociano senza fondersi (reazione di non identità). E' infine possibile notare tra anticorpi anti-RNP e anti-Sm una reazione di identità parziale; questo indica che solo una parte del complesso antigenico riconosciuto è comune ai due anticorpi (vedi figura 5).

Contro-immunoelettroforesi

E' una tecnica di precipitazione in cui l'antigene, carico negativamente, viene spinto dalla corrente elettrica ad incontrarsi con l'anticorpo. La metodica più usata attualmente è quella descritta da Kurata e Tan (1976) e successivamente modificata da Bunn e collaboratori (1982). La sorgente antigenica ed i sieri in esame sono posti in due file

parallele di pozzetti adiacenti, ricavati in una piastra di agaroso. La piastra viene poi posta in una camera elettroforetica a temperatura e tensione costanti con i pozzetti contenenti i sieri rivolti verso l'anodo. Dopo una corsa elettroforetica di 45' gli antigeni, carichi negativamente, migrano verso l'anodo; per un fenomeno di endoosmosi, gli anticorpi migrano invece verso il catodo, precipitando quando incontrano l'antigene. Le linee di precipitazione in alcuni casi si rendono evidenti subito, ma di solito si attendono 24 ore prima della lettura definitiva. E' quindi possibile essicare l'agaroso e rendere evidenti le linee di precipitazione mediante colorazione con Coomassie blu allo 0.1%. Anche in questo caso, come già descritto per l'immunodiffusione doppia, l'identificazione dei vari autoanticorpi avviene per confronto con le linee di precipitazione prodotte da anticorpi di riferimento a specificità nota (Bernstein e al 1982, McCarthy e al 1984) (Fig 3). La controimmunoelettroforesi è un poco più sensibile della immunodiffusione doppia, di più facile lettura e permette la conservazione del tracciato elettroforetico dopo essicazione del gel. Nonostante la tecnica sia più complessa, ormai molti laboratori hanno abbandonato la immunodiffusione doppia sciegliendo la controimmunoelettroforesi come metodo elettivo per la determinazione degli anticorpi anti-ENA.

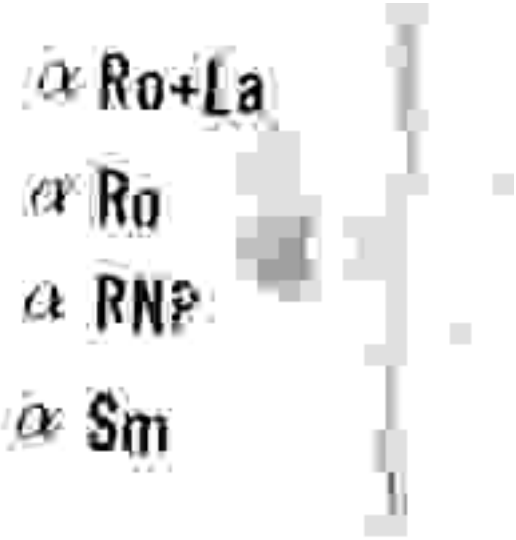


Figura 3. Determinazione di anticorpi contro antigeni solubili (ENA) mediante controimmunoelettroforesi. L'antigene (estratto splenico di primate) è posto nel pozzetto lineare superiore, mentre i pozzetti circolari contengono i diversi sieri da testare. Anche con questa metodica la specificità anticorpale viene definita mediante reazioni di identità, non identità o identità parziale con sieri di riferimento a specificità nota.

Emoagglutinazione passiva

E' utilizzata per la determinazione di anticorpi anti-DNA (Inami e al 1973) e soprattutto di alcuni anticorpi solubili quali anti-nRNP e anti-Sm (Inami e al 1975, Tan e Peebles 1976). L'antigene può essere legato, per covalenza o non, alla superficie di un eritrocita (o ad una particella di latex), usando svariate tecniche. Il siero contenente anticorpi contro l'antigene legato all'eritrocita agglutinerà i globuli rossi. Il titolo dell'anticorpo presente nel siero è espresso come la maggior diluizione del siero capace di agglutinazione. Gli anticorpi di classe IgG di maggiore avidità e quelli IgM sono i più efficaci reagenti in questo test. E' un test efficace per la determinazione quantitativa degli anticorpi, ma non tutti gli antigeni solubili possono essere stabilmente fissati sugli eritrociti mantenendo intatte le loro proprietà antigeniche. Al momento attuale sono presenti in commercio test in emoagglutinazione passiva per gli anticorpi anti Sm, nRNP e SSB.

Metodi immunoenzimatici (ELISA)

Si tratta di tecniche sensibili, rapide e che permettono una valutazione quantitativa degli anticorpi. La tecnica ELISA prevede che l'antigene, precedentemente purificato, venga fatto aderire sul fondo di pozzetti in micropiastre di polistirene (Malvano e al 1982, Rubin e al 1983, Maddison e al 1985). Vengono quindi saturati i siti liberi utilizzando proteine inerti (ad esempio albumina bovina o siero fetale di vitello). Dopo due o più lavaggi si provvede a depositare in ciascun pozzetto i sieri in esame opportunamente diluiti. Seguono una incubazione variabile a seconda degli antigeni utilizzati ed ulteriori lavaggi. Per evidenziare l'eventuale presenza di anticorpi legati all'antigene, si utilizza un metodo immunoenzimatico che prevede l'aggiunta di un anticorpo anti immunoglobuline umane coniugato con un enzima (fosfatasi alcalina, perossidasi), e quindi di un sistema rivelatore in grado di sviluppare una reazione colorimetrica tempo dipendente, proporzionale alla quantità di anticorpo presente. Dopo il bloccaggio della reazione, i risultati si leggono tramite spettrofotometro a lunghezza d'onda variabile a seconda del sistema immunoenzimatico utilizzato. Questa metodica viene usata per il dosaggio di anticorpi diretti contro singoli antigeni nucleari estraibili purificati (Venables e al 1983, Maddison e al 1985, Smeenk e al 1985, Harley e al 1986, Montecucco e al 1989a, Astaldi-Ricotti 1989), di anticorpi anti-fosfolipidi (Gharavi e al 1987, Montecucco e al 1987) e anticorpi anti-dsDNA (Malvano e al 1982, Rubin e al 1983). La determinazione di questi ultimi anticorpi con metodo ELISA non è da tutti ritenuta completamente affidabile in quanto il DNA adsorbito sulla piastra potrebbe andare incontro a parziale denaturazione provocando la contemporanea misurazione di eventuali anticorpi anti DNA a singola elica (ssDNA), che sono molto più frequenti degli anti dsDNA e rivestono uno scarso significato clinico (Koffler e al 1966). Anche per lo studio di alcuni anticorpi anti-ENA

esistono perplessità legate soprattutto alla necessità di ottenere e mantenere integro l'antigene altamente purificato. Sono attualmente presenti sul mercato test ELISA per lo screening degli ANA, in luogo del classico test in immunofluorescenza indiretta, nonchè kit per la determinazione di anticorpi anti-ENA, anti-dsDNA,anti-DNP e anti-cardiolipina.

Metodi radioimmunologici (RIA)

Questa metodica richiede la marcatura dell'antigene con sostanza radioattiva, usualmente ^{3}H o ^{125}I e la successiva incubazione con il siero del paziente. Successivamente il complesso antigene marcato-anticorpo viene fatto precipitare con metodi chimici o fisici e quindi quantizzato. Questo metodo è solitamente utilizzato per la determinazione di anticorpi anti dsDNA (Nakamura e al 1985). Una delle metodiche più utilizzate è il Farr test (Aarden e al 1976, Nakamura e al 1985), che prevede la precipitazione in solfato d'ammonio del DNA ricavato da colture cellulari marcate con ^{3}H-Timidina o con I^{125}-iodocitidina. Oltre al solfato d'ammonio possono essere utilizzati, per la separazione fra i complessi antigene-anticorpo ed il DNA marcato residuo, il PEG (Ikebe e al 1983) o filtri di nitrocellulosa (Ginsberg e Keiser 1973).

Altre metodiche

Due nuove metodiche hanno rivoluzionato negli anni '80 l'approccio alla caratterizzazione degli antigeni cellulari: si tratta dell'immunoprecipitazione (Kessler 1975, Lerner e Steitz 1979, Lerner e al 1981) e dell'immunoblotting (Towbin e al 1979, Elkon e Jankowski 1985). Entrambe queste metodiche sono tuttora utilizzate ad esclusivi fini di ricerca e non trovano applicazioni cliniche routinarie nella determinazione degli autoanticorpi antinucleari. Con la prima metodica vengono immunoprecipitati dei complessi ribonucleoproteici marcati, mettendo a contatto il lisato di cellule in coltura in trasformazione attiva premarcate con ^{35}S-Metionina (che si incorpora nella proteina) o con ^{32}P (che si incorpora negli acidi nucleici) con il siero in esame. In presenza di autoanticorpi si formano immunocomplessi che vengono precipitati tramite legame con la proteina A dello stafilococco. L'antigene precipitato, sia esso una proteina o un acido ribonucleico, viene quindi analizzato tramite elettroforesi su gel di poliacrilamide e il peso molecolare viene identificato dopo autoradiografia. Questa tecnica presenta l'inconveniente che i complessi ribonucleoproteici precipitati possono contenere anche proteine non antigeniche che rendono difficile l'esatta determinazione della proteina che espone gli epitopi immunoreattivi all'interno del complesso ribonucleoproteico. Particolarmente utile potrebbe risultare l'immunoprecipitazione per la determinazione

di anticorpi rivolti contro enzimi nucleari o citoplasmatici (Astaldi-Ricotti e al 1987). In questi casi la scomparsa dell'attività enzimatica nel surnatante può facilmente confermare l'avvenuta immunoprecipitazione dell'enzima complessato all'autoanticorpo. Un ulteriore passo nell'identificazione precisa dell'antigene responsabile dello sviluppo di autoanticorpi è stato fatto con l'utilizzo dell'immunoblotting. Questa tecnica consiste nel trasferimento di macromolecole da un gel ad un substrato solido ed è stato introdotto da Southern nel 1975 per trasferire il DNA da un gel di agaroso a nitrocellulosa (Southern blotting). La metodica è stata in seguito applicata anche alle proteine (Western blotting) (Towbin e al). Tramite questa procedura è possibile trasferire su nitrocellulosa proteine di un estratto cellulare separate elettroforeticamente, sulla base del loro peso molecolare, in gel di poliacrilamide. L'immunoblotting prevede successivamente che la striscia di nitrocellulosa venga testata con il siero del paziente in esame. Gli eventuali autoanticorpi presenti nel siero del paziente si legheranno quindi ai rispettivi antigeni e potranno essere visualizzati da un sistema rivelatore costituito da un anticorpo anti immunoglobuline umane marcato con perossidasi o radiomarcato. Il peso molecolare dell'antigene proteico riconosciuto da ciascun anticorpo viene quindi determinato sulla base di proteine di riferimento a peso molecolare noto (Fig. 4).

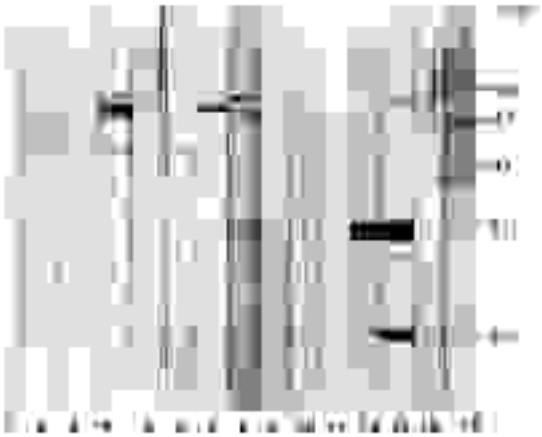


Figura 4. Determinazione di anticorpi diretti contro antigeni nucleari mediante immunoblotting. Con questa tecnica è possibile distinguere gli antigeni riconosciuti dai diversi anticorpi sulla base del peso molecolare espresso in Kilodalton (Kd).

L' impiego di queste tecnologie ha consentito di caratterizzare numerosi autoantigeni rivelandone talvolta una notevole complessità strutturale e mettendo in evidenza , in altre occasioni, analogie strutturali e funzionali tra antigeni riconosciuti da anticorpi diversi. Un esempio classico ci è fornito dagli anticorpi anti Sm e anti RNP che possono riconoscere numerose proteine di diverso peso molecolare presenti in un unico complesso ribonucleoproteico (Habets e al 1985) (Fig. 5 e 6).

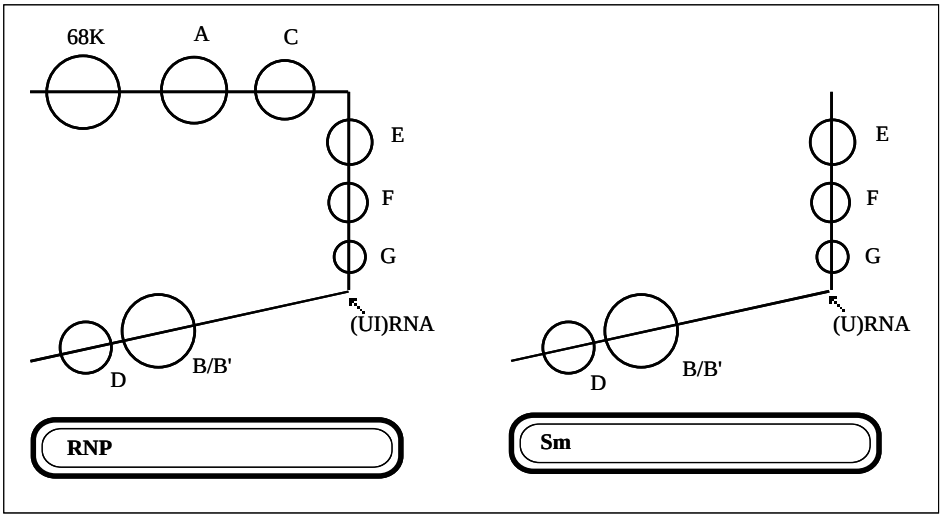


Figura 5. Rappresentazione schematica del complesso antigenico riconosciuto dagli anticorpi anti-RNP e anti-Sm desunta da studi di immunoblotting e immunoprecipitazione. Il filamento rappresenta l'RNA, mentre i cerchi vuoti rappresentano singoli polipeptidi a diverso peso molecolare. Come si può notare, molti dei polipeptidi presenti nel complesso ribonucleoproteico possono essere riconosciuti da entrambi gli anticorpi. Questo spiega la reazione di identità parziale fra i due anticorpi evidenziabile in immunodiffusione ed in controimmunoelettroforesi.

Figura 6. Analisi mediante immunoblotting del complesso antigenico riconosciuto da 3 diversi sieri a specificità anti-Sm contrassegnati dalle lettere D,E,F. I sieri D ed E riconoscono diversi peptidi del compleso Sm, mentre il siero F riconosce in pratica solo l'antigene B/B' di 28 Kd. I campioni contraddistinti con le lettere A, B, C sono sieri anti-Sm negativi utilizzati come controlli.

Classificazione e significato clinico

Con la progressiva caratterizzazione della struttura molecolare dei diversi antigeni riconosciuti dai vari autoanticorpi è apparso via via più chiaro che le connettiviti autoimmuni possono essere distinte sulla base di differenti profili autoanticorpali. La maggior parte di questi anticorpi sono diretti contro antigeni propriamente nucleari (nucleoplasma e matrice nucleare), mentre altri sono rivolti contro strutture prevalentemente citoplasmatiche.
Nei paragrafi successivi verranno brevemente presi in considerazione gli autoanticorpi più importanti nella pratica clinica fornendo anche alcune considerazioni pratiche sull'interpretazione dei diversi test comunemente impiegati per la loro determinazione.

Anticorpi anti nucleo (ANA test)

Con questo termine si definiscono tutti quegli autoanticorpi diretti contro una qualsivoglia struttura nucleare, evidenziabili mediante un test in immunofluorescenza indiretta (ANA test). Come si evince dalla tabella 1 la positività per gli ANA non si limita

Patologia Reumatica		**Soggetti normali**	
LES	98	<60 anni	0-3
Connettivite mista	100	>60 anni	3-20
Sclerodermia (PSS)	80	Consanguinei di LES	30
Sindrome di Sjögren	70		
Dermato-polimiosite	30		
Artrite reumatoide	35		
Artrite giovanile	30		
Altri reumatismi	0-3		
Altre patologie		**Farmaci**	
Epatite cronica attiva	60	Procainamide	60
Epatite lupoide	100	Isoniazide	25
Rettocolite ulcerosa	75	Idralazina	30
Miastenia grave	35		25
Sclerosi multipla	30	Clorpromazina	80
Leucemie	25	D-Penicillamina	10
Pneumoconiosi	25	Levo-Dopa	50
Fibrosi polmonare primitiva	40	Alfa-metil-dopa	

Tabella 1. ANA test: percentuali indicative di positività in diverse condizioni patologiche e fisiologiche.

al LES od a patologie disimmuni di interesse reumatologico ma è di frequente riscontro anche in numerose altre condizioni autoimmuni, infettive o neoplastiche (Peltier 1977, Morgan e Hughes 1985, McCarthy 1985, 1986). Anche alcuni farmaci possono dare positività a volte molto intense (Weinstein 1980), così come non sono rari risultati positivi nei soggetti anziani anche in assenza di patologie evidenti (Holborow 1978, Moulias e al 1984) e in gravidanza (Farnam e al 1984). A fini diagnostici, è importante non solo la positività all'ANA test ma anche la determinazione del titolo anticorpale (McCarthy 1986) e del pattern di fluorescenza (Peltier 1977, Morgan e Hughes 1985). Quest'ultimo è legato alla distribuzione dell'antigene all'interno del nucleo; il che equivale a dire che anticorpi diretti contro antigeni a diversa localizzazione danno pattern di fluorescenza diversi (Tan 1981). Utilizzando le cellule HEp-2 uno dei pattern più frequentemente osservabili è quello omogeneo, vale a dire una fluorescenza globale del nucleo in interfase e dei cromosomi in mitosi. Questo tipo di fluorescenza è generalmente dovuto alla presenza di anticorpi anti-desossiribonucleoproteina, anti-istoni, anti-dsDNA (McCarthy 1986). Di solito si osserva in alto titolo nel LES e nel lupus da farmaci. Il pattern periferico, invece, è primariamente dovuto ad anticorpi anti dsDNA e, meno comunemente, ad anticorpi contro desossiribonucleoproteine. E' caratterizzato da un anello di fluorescenza alla periferia del nucleo. Questo pattern va differenziato da quello perinucleare dovuto ad anticorpi diretti contro proteine del citoscheletro, in particolare le lamine nucleari, presenti in special modo in alcune epatiti autoimmuni (Lassoued e al 1988). Tra i pattern punteggiati si possono distinguere quelli a granuli fini (fine speckled) e a granuli grossolani (coarse speckled). La fluorescenza è evidenziabile nei nuclei delle cellule in interfase mentre le mitosi risultano negative. Il pattern punteggiato è di riscontro frequente in diverse condizioni morbose e, a basso titolo ($\leq$ 1:80), ha scarso significato diagnostico. Una fluorescenza di tipo punteggiato ad alto titolo è invece spesso associata a connettiviti sistemiche risultando solitamente dovuta ad anticorpi diretti contro antigeni nucleari estraibili. La fluorescenza dei soli nucleoli è ascrivibile nella maggior parte dei casi alla presenza di anticorpi anti-RNA nucleolare od altri antigeni particolarmente associati alla sclerodermia. Su cellule HEp-2, anche alcuni antigeni riconosciuti da anticorpi presenti nella dermato-polimiosite o sindromi overlap hanno localizzazione nucleolare (Reichlin e al 1986). Una fluorescenza finemente granulare dei nuclei delle cellule HEp-2 e presente anche in mitosi viene definita come "granulia diffusa". Questo quadro è solitamente ascrivibile ad anticorpi anti-Scl70, tipici della sclerodermia, che danno spesso una concomitante fluorescenza nucleolare. Un discorso a parte merita un particolare pattern punteggiato a grossi granuli presente anche nelle cellule in mitosi, dovuto ad anticorpi anti-centromero. In conclusione, l'ANA test è un utile esame di screening per le connettiviti autoimmuni, ma la semplice positività degli ANA non può essere considerata diagnostica per queste affezioni. Per ottenere indicazioni più precise l'indagine andrà estesa alla identificazione delle singole specificità autoanticorpali (Tabella 2).

ANTIGENE	SEDE	STRUTTURA / FUNZIONE	RIF. BIBLIOG.
dsDNA	nucleo (cromosomi)	DNA a doppia elica	(140;141)
ssDNA	nucleo	DNA a singola elica	(139)
Z-DNA	nucleo	DNA a doppia elica levogira	(6)
rRNA,tRNA RNA nucleol.	nucleo,nucleoli citoplasma	RNA ribosomiale, RNA transfer RNA nucleolare 4, 5, 6.	(14;22;67)
Istoni	nucleo (cromosomi)	Proteine istoniche H1,H2A,H2B,H3,H4 Complessi istonici H2A-H2B, H3-H4	(22;67;147)
DNP	nucleo (cromosomi)	desossiribonucleoproteina complesso nucleosomico DNA-istoni	(67)
Sm*	nucleo	Sn-ribonucleoproteina; proteine di 28, 29, 16, 13 Kd complessate con U RNA	(19;35;49 76;159)
RNP* (U1 RNP)	nucleo	Sn-ribonucleoproteina correlata all'Sm; proteine di 68, 33, 22 Kd, complessate con U1 RNA. Partecipa allo "splicing" del pre-mRNA	(35;76; 114;161)
SSA/Ro*	nucleo citoplasma	Sn-ribonucleoproteina; proteine di 52 e 60 Kd complessate con Y1/Y5 RNA.	(12;55 78;160)
SSB/La*	nucleo	Sn-ribonucleoproteina; fosfoproteina di 48 Kd complessata con RNA trascritti da RNA polimerasi III	(55;75; 117;123)
Jo-1*	citoplasma	Istidil tRNA sintetasi (55-60 Kd)	(87;111;125)
PL-7*	citoplasma	Treonil tRNA sintetasi (80 Kd)	(88)
PL-12*	citoplasma	Alanil tRNA sintetasi (110 Kd)	(22)
Scl 70*	nucleo nucleolo	Proteina di 70 Kd prodotto di degradazione della DNA topoisomerasi I (100 Kd)	(30;92; 136)
Centromero	nucleo (cromosomi)	Proteine di 17, 80, 140 Kd del cinetocoro	(31;106)
PCNA*/ ciclina	nucleo nucleolo	Proteina di 36 Kd ausiliaria della DNA-polimerasi δ	(20;113;116)
KU*	nucleo	Proteine di 66 e 86 Kd leganti il DNA.	(38;99)
Lamine	perinucleare	Proteine strutturali di 60, 68 e 74 Kd costituenti il rivestimento interno della membrana nucleare. Legano i cromosomi in interfase.	(73;152)

Tabella 2. Principali antigeni intracellulari riconosciuti da specifici autoanticorpi nelle connettiviti. * Antigeni solubili (ENA).

Anticorpi anticentromero

Si tratta dell'unica specificità anticorpale antinucleare sicuramente identificabile sulla sola base del pattern di fluorescenza dell'ANA test. Il quadro fluoroscopico caratteristico (a grossi granuli con mitosi intensamente positive) è osservabile solamente utilizzando come substrato cellule HEp-2; substrati diversi, quali fegato e rene di ratto, danno infatti fluorescenze punteggiate aspecifiche o addirittura risultati negativi. Questi autoanticorpi, selettivamente diretti contro una o più proteine presenti nei centromeri di ogni cromosoma, si associano caratteristicamente alla sclerodermia e, più precisamente, alla sua variante CREST (calcinosi, Raynaud, esofagopatia, sclerodattilia, teleangectasie). Sono infatti riscontrabili in circa il 70% delle forme CREST e nel 15-20% delle sclerodermie diffuse (Moroi e al 1980, Fritzler e Kinsella 1980, Tan e al 1980, Steen e al 1984). Più raramente si possono evidenziare nella cirrosi biliare primitiva (Makinen e al 1983), specie se associata a sindrome CREST, e nella malattia di Raynaud idiopatica (Kallemberg e al 1982, Sarkozi e al 1987). In questi ultimi casi si assiste non di rado ad una successiva evoluzione in senso sclerodermico. Tutto questo fa sì che la determinazione degli anti-centromero entri a buon diritto a far parte degli accertamenti di routine per la definizione di una sclerodermia o di un fenomeno di Raynaud isolato.

Anticorpi anti-DNP (Cellule LE)

La positività della ricerca delle cellule LE è indice della presenza di anticorpi anti-desossiribonucleoproteina (DNP) che è costituita dal complesso DNA-istoni. Come già ricordato questi anticorpi danno anche una positività di tipo omogeneo all'ANA test. Positività delle cellule LE può riscontrarsi non solo nel LES ma anche in altre condizioni quali l'artrite reumatoide (4-5% dei casi), l'epatite cronica autoimmune (epatite lupoide) e il lupus da farmaci. Non vi è dubbio tuttavia che il riscontro di cellule LE rimanga ancor oggi un più che valido argomento diagnostico a favore del LES, tanto da essere incluso nei criteri diagnostici dell'American Rheumatism Association (ARA) per questa malattia (Tan e al 1982). In considerazione della notevole perdita di tempo connessa con l'allestimento e la lettura dei preparati, la ricerca delle cellule LE non può considerarsi metodica di screening ma va limitata a casi con ANA test positivo e fondato sospetto clinico di LES o lupus da farmaci.
Test immunoenzimatici per la determinazione degli anticorpi anti-DNP sono oggi reperibili anche commercialmente. Il significato clinico da attribuire alla positività di tali test non è tuttavia ancora del tutto stabilito.

Anticorpi anti-DNA

Circa il 50% dei pazienti con LES presenta in circolo autoanticorpi diretti contro DNA a doppia elica (dsDNA) rilevabili attraverso test specifici quali l'immunofluorescenza su Crithidia Luciliae o il Farr test (McCarthy 1986, Tan e al 1988). All'ANA test questi anticorpi, come si è detto, danno in genere una intensa positività di tipo periferico e/o omogeneo; è quindi pratica inutilmente costosa il richiedere la loro determinazione in pazienti ANA negativi. Il riscontro di anticorpi anti dsDNA con queste tecniche è raro al di fuori del LES e costituisce un buon criterio diagnostico a favore di questa patologia (Tan e al 1982). Inoltre, il monitoraggio del titolo anticorpale nelle diverse fasi della malattia ha una precisa finalità clinica in quanto gli anti dsDNA sono elevati nelle fasi di acuzie e scompaiono o si riducono grandemente in remissione. Il riscontro di un brusco aumento di questi anticorpi è quindi segno prognostico sfavorevole nel LES, indicando una acutizzazione in atto o imminente con un'alta probabilità di interessamento renale (Tan 1982). Alcuni autori hanno riscontrato nell'eluato di glomeruli renali di pazienti con nefrite lupica, la presenza di immunocomplessi DNA- anticorpi anti-DNA, annettendo a tali anticorpi un ruolo patogenetico importante nel danno renale in corso di LES (Agnello e al 1973, Bretjens e al 1977). Anticorpi anti DNA a singola elica (ssDNA) o diretti contro polinucleotidi conformati a doppia elica levogira (Z-DNA) sono spesso presenti nel LES ma anche in numerose altre patologie autoimmuni o presunte tali (Allinquant e al 1984, Stollar 1986) e non rivestono quindi particolare interesse diagnostico.

Anticorpi anti-istoni

Gli anticorpi diretti contro le proteine istoniche danno in genere una fluorescenza di tipo omogeneo all'ANA test. Essi sono presenti in oltre la metà dei casi di LES ma non sufficientemente specifici per fornire indicazioni diagnostiche di rilievo (Fritzler e Tan 1978, Tan e al 1988). Si possono infatti frequentemente riscontrare in altre malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide con ANA test positivo, epatiti croniche, pemfigo, connettiviti indifferenziate etc. (Kubokawa e Ishikawa 1982 , Bernstein e al 1985). La patologia più caratteristicamente associata ad anticorpi anti-istoni, con positività in più dell' 80% dei casi, è senza dubbio il lupus da farmaci, in particolare da procainamide (Fritzler e Tan 1978). Nel lupus da procainamide gli anticorpi sono di classe IgG e sembrano particolarmente diretti contro il complesso H2A-H2B (Rubin e al 1985). Nel LES e nell'artrite reumatoide gli anticorpi sono invece diretti contro tutte le principali classi di proteine istoniche. Nei pazienti in trattamento con procainamide, il riscontro di anticorpi IgG anti H2A-H2B sembrerebbe costituire un segno precoce di sviluppo di sindrome lupica indotta (Rubin e al 1986).
Anticorpi contro antigeni solubili (ENA)

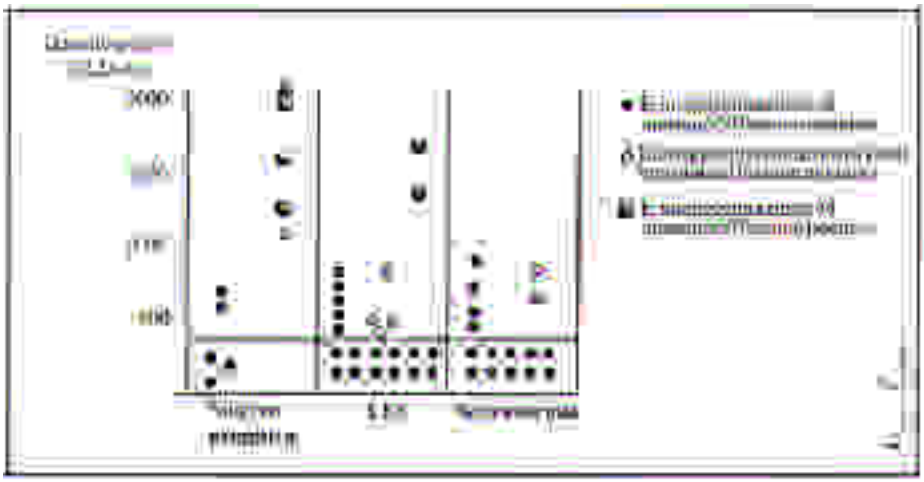
Anticorpi contro antigeni solubili (ENA)

Molti degli anticorpi responsabili della positività di tipo punteggiato (non centromero) all'ANA test sono diretti contro antigeni solubili facilmente estraibili dal nucleo in soluzione salina (extractable nuclear antigens, ENA) (Tan 1981). Il termine ENA è però generico e poco indicativo, raggruppando una gran varietà di antigeni presenti in un unico estratto cellulare ma molto diversi tra loro sia per struttura che per funzione (vedi tabella 2). I termini convenzionalmente utilizzati per identificare i diversi sistemi antigenici hanno le origini più varie (iniziali della patologia o di pazienti, peso molecolare etc.) ed al momento attuale si tende a mantenere in uso tale terminologia anche qualora l'antigene sia stato perfettamente identificato come ad esempio nel caso di Scl70 (topoisomerasi I) (Shero e al 1986) e Jo-1 (istidil tRNA sintetasi) (Mathews e Bernstein 1983). Anche sul piano clinico il termine anticorpi anti ENA ha scarso significato. E' invece importante poter individuare le singole specificità anticorpali perché ciascuna di queste possiede un suo proprio rilievo clinico legato alla diversa frequenza nelle varie connettivi e/o alla caratteristica associazione con particolari patologie (tabella 3).
Benché in genere questi anticorpi diano un pattern punteggiato all'ANA test, è possibile, in alcuni casi, riscontrarli anche in pazienti con ANA test negativo specie quando l'esame venga effettuato su fegato di ratto o comunque su sezioni tissutali (Mimori e al 1981, Harmon e al 1984). In altri termini, la negatività per l'ANA test non esclude, in presenza di un quadro clinico suggestivo, la possibilità di rintracciare alcuni anticorpi contro antigeni solubili quali soprattutto SSA/Ro e Jo-1 che hanno una prevalente localizzazione citoplasmatica (McCarthy 1986). In particolare, l'anti-SSA/Ro è presente in circa la metà dei casi (2% del totale) di LES con ANA test negativo (Maddison e al 1981, Reichlin 1982). Si tratta in genere di pazienti con malattia ad andamento torpido ed interessamento prevalentemente cutaneo (Tosokos e al 1987). L'anti-SSA/Ro è stato anche implicato nel LES neonatale (Franco e al 1981) e potrebbe svolgere un ruolo patogenetico nel blocco cardiaco atrio-ventricolare congenito che si sviluppa in neonati da madri anti-SSA/Ro positive (Scott e al 1983, Lee e al 1987). I metodi classici di indagine nella pratica clinica sono tuttora l'immunodiffusione doppia e la controimmunoeletroforesi (Nakamura e al 1985). La determinazione dei principali anticorpi viene effettuata utilizzando come antigene un estratto nucleare di timo di coniglio o di vitello. Per la ricerca degli anti-SSA/Ro, tuttavia, è necessario eseguire l'esame anche su estratti cellulari di milza umana o di cellule Wil-2. La frequenza dei singoli anticorpi nelle diverse patologie e le conseguenti indicazioni cliniche riportate in tabella 3 si riferiscono a studi condotti con immunodiffusione doppia o controimmunoelettroforesi e non possono essere estese a risultati ottenuti con metodiche diverse, quali ad esempio i più moderni metodi immunoenzimatici. Benché esistano già da alcuni anni kit commerciali per la determinazione di alcuni anticorpi anti ENA con metodo immunoenzimatico, il valore clinico da attribuire ai risultati di questi test non è ancora del tutto definito. In generale, i metodi immunoenzimatici in fase solida sembrano offrire una maggiore sensibilità a scapito tuttavia della specificità dell'esame (Maddison e al 1985, Harley e al 1986, Montecucco e al 1989a). A titolo di esempio si potrebbe citare il caso

Anticorpo	Frequenza	Implicazioni cliniche	Rif.bibliografico
anti Sm	LES 20%	specifico più frequente nella razza negra; associato a nefrite ?	134, 142 58, 71
anti RNP	MCTD 100% LES 35% Altre 5%	necessario per la diagnosi Raynaud,miosite,"swollen fingers"	93, 135 142 18
anti SSA/Ro	Sjögren 60% LES 35% Altre 10%	 LES "ANA negativo" lupus cutaneo cronico lupus neonatale blocco A-V congenito	93, 142 81, 121 154 37 74, 132 58
anti SSB/La	Sjögren 40% LES 15%	associato ad anti SSA/Ro associazione negativa con nefrite?	80, 101 80
anti Scl70	Sclerodermia 25%	specifico, sclerodermia diffusa	30
anti Jo-1	polimiosite 30%	specifico, fibrosi polmonare	17
anti PM-Scl	polimiosite 10%	overlap polimiosite/sclerodermia	120, 122
anti PCNA	LES 5%	specifico	41, 100
anti Ku	LES 10%	overlap polimiosite/sclerodermia	93, 98, 119, 142

degli anticorpi anti-Sm che sono praticamente patognomonici per il LES quando evidenziati mediante immunodiffusione ma sono riscontrabili anche in altre patologie, inclusa l'artrite reumatoide, se rilevati con metodo immunoenzimatico (Maddison e al 1985). Considerazioni simili si possono fare per altri anticorpi quali anti-Dcl70 (Geisler e Hoier-Madsen 1985) e SSB/La (Harley e al 1986). Quest'ultimo anticorpo, confinato per solito a casi di sindrome di Siogren primitiva e a rari casi di LES quando indagato mediante immunodiffusione, è stato recentemente indagato con metodo immunoenzimatico nel nostro laboratorio dopo estrazione e purificazione dell'antigene da cellule HeLa (Montecucco e al 1989a). Questo metodo è risultato assai più sensibili dell'immunodiffusione ma ha perso in specificità per la sindrome di Sjogren mostrando risultati positivi anche nel 30-40% dei casi di LES e sclerodermia e nel 10-15% dei casi di artrite reumatoide e malattia di Raynaud. La diversa sensibilità delle diverse metodiche usualmente impiegate per la determinazione degli anticorpi anti-SSB/La è ben

evidenziata dalla Figura 7 nella quale vengono confrontati i risultati ottenuti nel nostro laboratorio utilizzando immunodiffusione doppia, emoagglutinazione ed ELISA su sieri di pazienti affetti da sindrome di Sjogren primitiva, lupus eritematosos sistemico e sclerosi sistemica progressiva (sclerodermia).



Anticorpi anti-fosfolipidi (falsa VDRL, lupus anticoagulante, anti-cardiolipina)

Tra gli anticorpi diretti contro antigeni non strettamente nucleari ma comunque importanti nelle connettiviti vanno annoverati gli anticorpi anti-fosfolipidi. Questi anticorpi sono rivolti contro i gruppi fosfodiesterici di fosfolipidi a carica negativa e presentano talvolta una cross-reattività con il DNA, anch'esso provvisto di gruppi fosfodeisterici (Koike e al 1982). Recenti studi hanno tuttavia dimostrato abbastanza chiaramente che l'autoimmunità anti-DNA e quella antifosfolipidica nell'uomo sono dovute a due ben distinte e diverse famiglie di anticorpi (Harris e al 1985, Edberg e Taylor 1986). Nel LES è nota da tempo la presenza di anticorpi diretti contro fosfolipidi a carica negativa, come la cardiolipina, e responsabili della falsa positività per la

reazione di Wasserman e la VDRL. Questa condizione è facilmente distinguibile dall'infezione luetica per la costante negatività dei test treponemici specifici quali TPHA e FTA. Una falsa positività serologica per la lue, vale a dire VDRL positiva con TPHA e FTA negativi, è documentabile nel 15-20% dei casi di LES ed è ritenuta sufficientemente specifica da rientrare tra i criteri diagnostici della malattia (tabella 4) (Tan e al 1982). Fin dalla metà degli anni '50 era stato notato che gli anticorpi responsabili della falsa positività per la lue potevano associarsi ad un allungamento, non corretto dall'aggiunta di plasma normale, di alcuni test della coagulazione (Johansson e Lassus 1955). In altre parole questi anticorpi possono fungere da anticoagulante circolante bloccando con ogni probabilità i fosfolipidi presenti nel complesso attivatore delle protrombina. Il fenomeno in questione prende il nome di anticoagulante tipo lupus o "lupus anticoagulant". I test maggiormente influenzati dalla presenza del lupus anticoagulant" sono il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), il tempo di coagulazione con caolino (KCT), il "Russuel viper venom time" (RVVT) ed il test di inibizione della tromboplastina tissutale diluita (TTI) (Barbui e al 1987). L'anormalità di questi test, legata al lupus anticoagulant, è più frequente della falsa positività della VDRL ed anche meno specifica per il LES, potendo essere riscontrata in varie altre patologie autoimmuni di interesse reumatologico e non. In ogni caso, pur determinando un allungamento dei test di coagulazione in vitro, il lupus anticoagulant non si associa quasi mai a turbe emorragiche bensì, paradossalmente, a manifestazioni tromboemboliche spesso gravi e ripetute. L'importanza clinica del lupus anticoagulant non risiede quindi nella sua specificità per il LES, ma è principalmente legata ad un aumentato rischio (circa il 30% dei casi) di trombosi venose o arteriose e di aborti ripetuti dovuti probabilmente a trombosi placentari (Derksen e Kater 1985, Montecucco e al 1989b). Negli ultimi anni sono stati messi a punto metodi immunoenzimatici e radioimmunologici in fase solida per il dosaggio degli anticorpi anticardiolipina (Harris e al 1983, Gharavi e al 1987). Tali anticorpi si associano anche al di fuori del LES a fenomeni tromboembolici e ad aborti ripetuti nonché a manifestazioni neurologiche centrali, livedo reticularis e necrosi cutanee, piastrinopenia e positività per il test di Coombs (Hughes e al 1986, Caporali e al 1988). I vantaggi del dosaggio degli anticorpi anticardiolipina rispetto alla ricerca del lupus anticoagulant risiedono nella maggiore riproducibilità dei risultati, nella possibilità di offrire dosaggi quantitativi e soprattutto di monitorare il livello anticorpale anche durante il trattamento anticoagulante. In ogni caso, il dosaggio degli anticorpi anticardiolipina e la ricerca del lupus anticoagulant andrebbero sempre associati tra loro, data la non assoluta sovrapponibilità dei due test (Derksen e al 1988, Montecucco e al 1989b).

Conclusioni

Prendendo come punto di riferimento i criteri indicati dall'American Rheumatism Association per la diagnosi di Lupus eritematoso sistemico (Tan e al 1982) (Tabella 4), si possono trarre alcune considerazioni pratiche interessanti sul reale peso diagnostico della determinazione degli anticorpi antinucleari in questa patologia. Come appare dalla tabella 4, i tests serologici vengono raggruppati in due livelli: il primo è costituito dalla positività dell'ANA test, il secondo dalla positività di uno o più dei seguenti esami: cellule LE, anti dsDNA, anti Sm e falsa positività per la VDRL. La positività anche di tutti i test di secondo livello costituisce comunque un solo criterio diagnostico aggiuntivo a quello dell'ANA test. E' quindi chiaro che degli 11 criteri elencati in tabella, solo 2 riguardano specifiche indagini sieroimmunologiche. Poiché per una corretta diagnosi di LES occorrono ben 4 criteri, è evidente che qualsiasi riscontro sieroimmunologico è di per sè privo di significato diagnostico in assenza di precisi dati clinici. Gli esami sieroimmunologici sono invece di grande utilità qualora coesistono dati clinici indicativi ma non sufficienti a formulare una diagnosi di certezza. Queste considerazioni valgono ovviamente non solo per il LES ma anche per tutte le altre connettiviti. I più recenti criteri diagnostici proposti per la sindrome di Sjogren (Fox e al 1986) includono, al pari di quelli clinici ed istologici, la positività per gli anticorpi anti-SSA / Ro e SSB / La sottolineandone in particolare l'importanza in tema di diagnostica differenziale con altre patologie disimmuni, quali la sarcoidosi e l'AIDS, o linfoproliferative. I non rari casi di sindrome di Sjogren che si presentano con adenomegalia e linfopatia sistemica hanno un'elevatissima percentuale di positività per gli anticorpi anti SSA / Ro e SSB / La (Longhi e al 1986) e questo costituisce un buon criterio discriminativo nei confronti di alcuni linfomi maligni ed altre malattie linfoproliferative legate ad immunodeficienze per le quali la diagnosi differenziale può risultare difficoltosa anche sul piano istopatologico (Montecucco e al 1986). Tuttavia va ricordato che questi anticorpi possono riscontrarsi anche in altre patologie, in particolare nel LES, e non sono quindi di per sè diagnostici di una sindrome di Sjogren primitiva (McCarthy 1986, Tan e al 1988). Nelle sindromi sclerodermiche la determinazione degli ANA su cellule HEp 2 ha svelato percentuali di positività, vicine al 90%, un tempo inimmaginabili (Tan e al 1988). Il riscontro di anticorpi anti centromero o, di converso, anti Scl70 non è fondamentale per la diagnosi di sclerodermia che resta eminentemente clinica (Masi e al 1980, Le Roy e al 1988), ma può fornire utili indicazioni prognostiche essendo i primi associati a forme più localizzate di malattia caratterizzate da più lunga sopravvivenza (Giordano e al 1986, Barnett e al 1988). D'altro canto la presenza di anticorpi anti centromero in un paziente con fenomeno di Raynaud apparentemente idiopatico costituisce un segnale di probabile evolutività in senso sclerodermico anche se non ne fornisce la certezza (Gerbracht 1985). Nella polimiosite e dermatomiosite, l'eventuale presenza di anticorpi specifici (Jo-1, PM-Scl, PL 7 etc.) (Reichlin e Arnett 1984) è riscontrabile in meno del 50% dei casi (Tan e al 1988). Essa può tuttavia risultare particolarmente utile come marcatore sierologico di malattia nei casi che presentino quadri bioptici ed elettromiografici dubbi. Per quanto riguarda infine il

1. Eritema a farfalla	
2. Eritema discoide	
3. Fotosensibilità	
4. Artriti	presenza di artrite non erosiva a carico di due o più articolazioni periferiche
5. Sierositi	a) pleurite o b) pericardite (documentata con ECG o evidenza di versamento pericardico).
7. Interessamento renale	a) proteinuria persistente maggiore di 0,5 g /die o b) presenza di cilindruria
8. Interess. neurologico	a) Accessi epilettici (in assenza di una causa scatenante) o b) Psicosi (in assenza di causa scatenante)
9. Interess. ematologico	a) Anemia emolitica (con reticolocitosi) o b) Leucopenia (meno di 4000/mm^3 in almeno due occasioni) o c) Linfopenia (meno di 1500/mm^3 in almeno due occasioni) o d) Piastrinopenia (meno di 100000 /mm^3 in assenza di noxae farmacologiche
10.Disordini immunologici	a) Cellule LE positive o b) Anticorpi anti dsDNA o c) Anticorpi anti Sm o d) Falsa positività sierologica per la lue per almeno 6 mesi.
11. Anticorpi anti-nucleo	Un titolo significativo determinato mediante immunofluorescenza o metodo equivalente in qualsiasi momento della malattia in assenza di farmaci in grado di determinare un LES da farmaci.

E' possibile porre diagnosi di LES in presenza di 4 o più di questi 11 criteri.

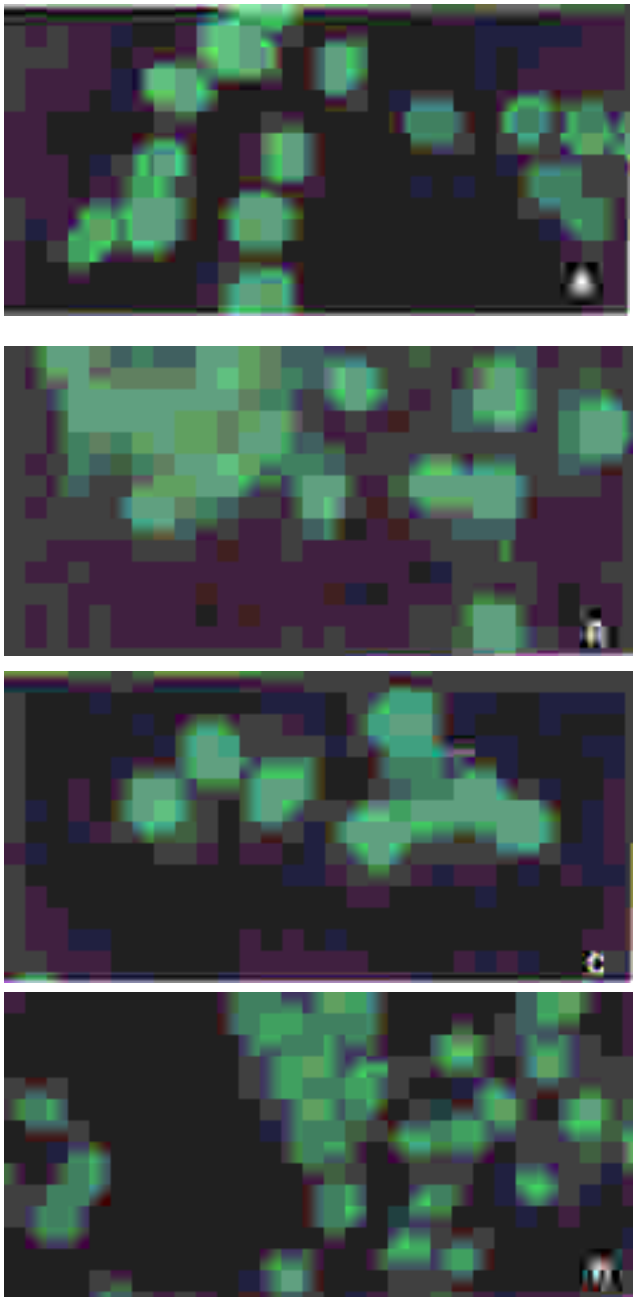
Tabella 4. Criteri per la diagnosi di Lupus eritematoso sistemico secondo l'American Rheumatism Association (ARA) (Tan e al 1982).

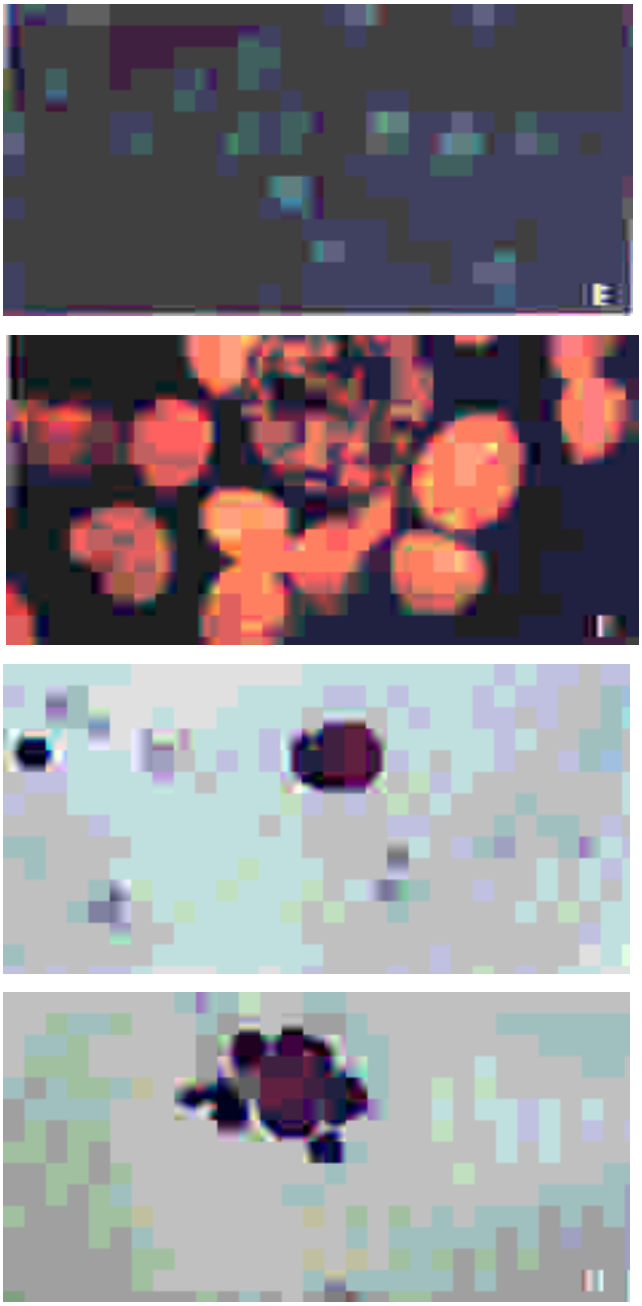
capitolo delle connettiviti indifferenziate od “overlap”, non vi è dubbio che un’intensa positività all’ANA test costituisca un buon criterio di indirizzo diagnostico nei confronti delle numerosissime patologie non autoimmuni potenzialmente implicate nella diagnosi differenziale. La presenza di specifici autoanticorpi potrà fornire, oltre alla pratica certezza di trovarci di fronte ad una connettivite, anche indicazioni sulla probabile evoluzione del quadro verso, ad esempio, un LES (anti dsDNA) o una sclerodermia (anti Scl70) o una sindrome overlap sclerodermia-polimiosite (antiPMScl, anti Ku etc.) e così via. Va ricordato infine che la presenza di anticorpi anti RNP ad alto titolo è condizione necessaria, anche se non sufficiente, per poter porre diagnosi di connettivite mista o sindrome di Sarp (Sharp e al 1972). Gli anticorpi anti RNP sono frequenti anche nel LES, dove però spesso coesistono altri autoanticorpi quali anti dsDNA, anti Sm, falsa VDRL etc. Per la diagnosi di connettivite mista, è quindi importante non solo ricercare gli anti RNP ma anche verificare l’assenza di altri anticorpi tipicamente associati al LES (Tan e al 1988).

In conclusione si può affermare che lo studio degli autoanticorpi antinucleari offre un prezioso ausilio clinico per la diagnosi ed il monitoraggio delle connettiviti sistemiche per molte delle quali è possibile tracciare un definito e spesso caratteristico profilo autoanticorpale (Tab. 5) (Tan e al 1988). In un futuro non lontano, grazie alle sempre nuove acquisizioni sulla struttura e funzione degli autoantigeni coinvolti nelle singole patologie e alla possibilità di ottenere antigeni purificati attraverso tecniche di DNA ricombinante (Caporali e al 1989) è molto probabile che da questi studi possano emergere anche importanti acquisizioni di ordine etio-patogenico (Berstein 1987).

[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]

Tabella 5. Quadro sinottico dei principali autoanticorpi riscontrabili nelle connettiviti sistemichee di comune impiego diagnostico.





Bibliografia

1 Aarden LA, De Groot ER, Feltkamp TEW. Immunology of DNA. IV. Quantitative aspects of the Farr assay. J Immunol Methods 11: 153. 1976.

2 Aarden LA, De Groot ER, Feltkamp TEW. Immunology of DNA.III.Crithidia Luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with immunofluorescent technique. Ann N Y Acad Sci 254:505. 1975.

3 Agnello V, Koffler D, Kunkel HG. Immune complex systems in the nephritis of systemic lupus erythematosus. Kidney Int 3: 90. 1973.

4 Akizuki M, Powers R, Holman HR. A soluble acidic protein of the cell nucleus wich reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. J Clin Invest 59:264. 1977.

5 Alarcon-Segovia D. Antibodies to nuclear and other intracellular antigens in the connective tissue diseases. Clin Rheum Dis 9:161.1983.

6 Allinquant B, Malfoy B, Schuller E et al. Presence of Z-DNA specific antibodies in Crohn's disease, polyradiculoneuritis and amyotrophic lateral sclerosis. Clin Exp Immunol 58: 29. 1984.

7 Asherson GL. Antibodies against nuclear and cytoplasmic cell constituents in systemic lupus erythematosus and other diseases. Br J Exp Pathol. 40:209.1959.

8 Astaldi-Ricotti GCB, Bestagno M, Cerino A et al. Antibodies to hnRNP Core protein A1 in connective tissue diseases. J Cell Biochem 40: 43. 1989.

9 Astaldi-Ricotti GCB, Pazzaglia M, Martelli AM et al. Autoantibodies to purified nuclear proteins related to DNA metabolism during aging and in SLE patients. Immunology 61: 375. 1987.

10 Barbui T, Cortellazzo S, Galli M, Finazzi G. L'anticoagulante tipo lupus. Haematologica 72 (special issue): 213. 1987.

11 Barnett AJ, Miller MH, Littlejohn GO. A survival study of patients with scleroderma diagnosed over 30 years (1953-1983): the value of a simple cutaneous classification in the early stages of the disease. J Rheumatol 15: 276. 1988.

12 Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. Clin Exp Med 167: 1560. 1988.

13 Benson MD, Cohen AS. Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus: detection with horseradish peroxidase conjugated antibody. Ann Inter Med 73: 943. 1970.

14 Bernstein RM, Bunn CC, Hughes GRV, Francoeur AM, Mathews MB. Cellular protein and RNA antigens in autoimmune diseases. Mol Biol Med 2: 105. 1984.

15 Bernstein RM, Bunn CC, Hughes GRV. Identification of antibodies to acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. Ann Rheum Dis 41: 554. 1982.

16 Bernstein RM, Hobbs RM, Lea DJ, Ward DJ, Hughes GRV. Patterns of anti histone antibody specificity in systemic rheumatic diseases. Arthritis Rheum 28: 285. 1985.

17 Bernstein RM, Morgan SH, Chapman J et al. Anti Jo-1 antibody: a marker for myositis with interstitial lung disease. Br Med J 289: 151. 1984.

18 Bernstein RM. New approaches to anticellular antibodies. Curr Med Literat Rheumatol 6: 3. 1987;

19 Billings PB, Hoch SO. Isolation of intact Sm/RNP antigens from rabbit thymus. J Immunol 131: 347. 1983.

20 Bravo R, Rainer F, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. Nature 326: 515. 1987.

21 Bretjens J, Ossi E, Albini B et al. Disseminated immune deposits in lupus erythematosus. Arthritis Rheum 20: 762. 1977.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]
[illegible]
[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] Allison & Wesley 37, 222, 1984.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Indice:

[illegible] Autori [illegible]
[illegible]
[illegible]
Algoritmi [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
Conclusioni [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
Vocabolario [illegible]
Digital Videocassette Physical System [illegible]
VideoCrypt Media II System [illegible]

Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La ß-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*****Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**

34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno ’88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d’abuso (2).*** **Luglio ’88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre ’88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio ’89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M..: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. : ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**

Caleidoscopio
Rivista monografica di Medicina
anno 8, numero 53

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. Fax e Modem (079) 270464

Editore
Medical Systems S.P.A.
Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 808051(7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Fiorella Gaggero

Servizio Abbonamenti
Elisabetta Ricci

Stampa
ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Giugno 1990

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)