

**DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DELLE MALATTIE
AUTOIMMUNITARIE**

INTRODUZIONE

Le malattie con meccanismo patogenetico di tipo immunologico sono quelle nelle quali si verifica il mancato controllo fisiologico immunitario nei confronti di antigeni “not self” oppure nella regolazione della tolleranza immunologica verso antigeni self. Esse sono rappresentate dalle Malattie da ipersensibilità e dalle Malattie autoimmunitarie. In generale le malattie autoimmunitarie riconoscono quale meccanismo patogenetico l’alterazione dei meccanismi che, su base genetica e/o di interazione macromolecolare, normalmente regolano:

- tolleranza immunitaria
- corretta presentazione e riconoscimento degli antigeni
- modulazione della risposta immune

L’autoimmunità è, quindi, il risultato dell’alterazione o della carenza dei meccanismi che sono fisiologicamente responsabili della tolleranza verso il self ed in essa sono chiaramente riscontrabili alterazioni delle risposte immunitarie con produzione di autoanticorpi, formazione di immunocomplessi e/o comparsa di cellule linfoidi attivate che reagiscono con costituenti “self” dell’organismo.

Un individuo in condizioni di “tolleranza immunologica“ è incapace di sviluppare risposte immunitarie nei confronti di un determinato antigene. In condizioni di alterata “tolleranza immunitaria” questo fenomeno tende, invece, a verificarsi. Sono stati descritti meccanismi di tolleranza immunologica Centrale e Periferica:

La tolleranza centrale riguarda i meccanismi di delezione clonale delle popolazioni linfocitarie B e T durante la loro maturazione negli organi linfoidi centrali (midollo osseo, timo). Nel timo, le cellule T che esprimono recettori ad alta affinità per gli antigeni omologhi sono selezionate negativamente e nella gran parte dei casi, eliminate per apoptosi. Un meccanismo simile controlla la maturazione dei cloni linfocitari B nel midollo osseo.

La tolleranza periferica si riferisce ai meccanismi che portano alla delezione di quei cloni che sono sfuggiti alla tolleranza centrale. Essa agisce attraverso diversi meccanismi:

- delezione clonale mediante attivazione della morte cellulare indotta (Fas –FasL)
- anergia clonale da disattivazione funzionale dei cloni linfocitari (B7.1 B7.2-CD28)
- soppressione periferica dei linfociti Th1 da parte dei linfociti Th2 (CD4⁺) per mezzo delle citochine da essi prodotte (IL4, IL10, TGF-beta)

MECCANISMI PATOGENETICI

Molteplici fattori interagiscono nello sviluppo delle malattie autoimmunitarie, tra i quali quelli: immunologici, genetici, infettivi, ormonali.

Il meccanismo patogenetico di tipo immunologico consiste nel mancato controllo fisiologico immunitario della regolazione della tolleranza immunologica nei confronti degli antigeni self.

Dati sperimentali indicano che i meccanismi più importanti sono quelli che alterano la tolleranza periferica, rappresentati da:

- alterazione dell'anergia clonale
- mancata attivazione dell'apoptosi
- mancata soppressione delle cellule T
- mimetismo molecolare
- attivazione linfocitaria policlonale
- rilascio di antigeni sequestrati
- esposizione di epitopi self o criptici "spreading epitopes"

Il meccanismo di innesco delle malattie autoimmunitarie può essere il risultato della convergenza di più di uno dei meccanismi appena enunciati, la progressione delle malattie autoimmunitarie sarebbe dovuta principalmente all'ultimo.

L'effetto prodotto dall'alterazione patogenetica, media la comparsa e la manifestazione dei sintomi clinici e può essere ricondotto alla: sintesi di anticorpi contro antigeni tissutali o cellulari; formazione di immunocomplessi; comparsa di linfociti autoreattivi.

La produzione di autoanticorpi specifici capaci di legare recettori e/o molecole della superficie e della matrice cellulare, dipende dalla crossreazione tra antigeni self e antigeni not self e provoca effetti biologici agonisti od antagonisti. Si possono classificare in questo ambito: Anemia emolitica autoimmune, Porpora trombocitopenica, Sindrome di Goodpasture, Pemfigo, Febbre reumatica, Morbo di Graves, Miastenia gravis. La deposizione degli immunocomplessi a livello tissutale è determinata dalle dimensioni molecolari, dalle possibilità di clearance dell'immunocomplesso, dalle caratteristiche fisico-chimiche dell'antigene e dell'anticorpo e sta alla base di sindromi quali Glomerulonefrite poststreptococcica, Poliarterite nodosa, Lupus eritematoso sistemico. La comparsa di Linfociti T autoreattivi citolitici, generalmente, consiste in un'attivazione policlonale di cellule con un limitato repertorio di Ig e TCR. E' un meccanismo molto frequente nelle sindromi autoimmunitarie sistemiche, provoca danno cellulare diretto ed è efficace nella patogenesi di Diabete mellito insulino-dipendente, Artrite reumatoide, Sclerosi multipla.

L'attivazione e la regolazione dei linfociti possono essere innescate, in modo aberrante, da alterati segnali di membrana e da un'alterata produzione di citochine e dei loro recettori (ad es. IL-2 – IL2R).

ALTERAZIONI LINFOCITARIE NELL'AUTOIMMUNITA'

Mancata delezione clonale e differenziazione maturativa e funzionale dei linfociti reattivi verso il self

Stimolazione da parte di antigeni cross-reattivi o da attivatori policlonali di linfociti self-reattivi

Alterazione dei meccanismi di regolazione (segnali di membrana - citochine)

CROSS-REAZIONE TRA ANTIGENI (self e not-self)

Produzione di autoanticorpi specifici per uno o pochi antigeni tra loro correlati =

Alterazioni organo o tessuto specifiche

ATTIVAZIONE POLICLONALE DEI LINFOCITI

Produzione di vari tipi di autoanticorpi stimolata dalla risposta policlonale =

Alterazioni prevalentemente sistemiche

ATTIVAZIONE e REGOLAZIONE DEI LINFOCITI

Aberrante attivazione dei linfociti B

Produzione alterata di Citochine

CARATTERISTICHE DEI LINFOCITI AUTOREATTIVI

Analisi dei geni variabili per TCR e Ig

L'autoimmunità non è dovuta ad un repertorio genetico specifico di Ig o TCR e non è associabile ad un particolare polimorfismo dei geni V (variabili)

Linfociti B e T autoreattivi esprimono gli stessi geni per i recettori degli antigeni come i linfociti normali fanno per gli antigeni estranei

Nei singoli individui i linfociti autoreattivi appartengono a pochi cloni od esprimono un set ristretto di geni V

Altrettanto importanti sono i meccanismi patogenetici di "Processing" quali: rilascio di antigeni sequestrati, presenza di autoantigeni, antigeni eterofili crossreagenti, inappropriata presentazione degli antigeni.

I fattori genetici sono riconducibili ai meccanismi che presiedono alla selezione timica, alla regolazione genetica della differenziazione e della proliferazione linfocitaria, alla presenza di particolari aplotipi ed alla regolazione dell'espressione di particolari alleli che codificano per alcune sequenze aminoacidiche della tasca delle molecole MHC. Tali conformazioni polipeptidiche facilitano il riconoscimento e la presentazione di antigeni "autoimmunogeni" ai linfociti T CD4⁺, come nel caso della Spondilite anchilosante. Per altro, l'incompleta o l'inefficace presentazione degli antigeni in MHC II rende inefficiente la delezione clonale di popolazioni potenzialmente autoreattive. Sono state descritte le associazioni tra HLA-DR3, HLA-DR4 e IDDM; HLA-B27 e Spondilite anchilosante; HLA-DR4 ed Artrite reumatoide.

Altrettanto significativi sono i dati che indicano un ruolo patogenetico di particolari genotipi MHC I e non MHC (C4, C2, TNF- α , LT) L'espressione di un particolare gene HLA è uno dei

vari fattori che contribuiscono alla patogenesi delle malattie autoimmunitarie. Linkage disequilibrium della regione probabilmente svolge un ruolo complessivamente più importante.

FATTORI GENETICI NELL'AUTOIMMUNITA'

Ruolo dei geni MHC II

IDDM (HLA-DR3, HLA DR-4)

Artrite reumatoide (HLA DR-4)

Ruolo dei geni MHC I

HLA-A, HLA-B

Ruolo dei geni non MHC

C4, C2, TNF alfa, LT

L'espressione di un particolare gene HLA è uno dei vari fattori che contribuiscono alla patogenesi delle malattie autoimmunitarie

Il linkage disequilibrium della regione probabilmente svolge un ruolo complessivamente più importante (aplotipo esteso)

FATTORI GENETICI nell'AUTOIMMUNITA'

Particolari Alleli codificano per alcune sequenze aminoacidiche della tasca delle molecole MHC che facilitano il riconoscimento e la presentazione di antigeni autoimmunitari ai linfociti T CD4⁺ (Spondilite anchilosante, IDDM)
Incompleta presentazione degli antigeni in MHC II rende inefficiente la delezione clonale di popolazioni potenzialmente autoreattive

Un ruolo importante nell'autoimmunità è svolto dagli agenti microbici che determinano l'attivazione della risposta immunitaria:

- per cross reattività, quale si verifica tra Virus Coxackie e l'enzima glutamico decarbossilasi a livello delle insule pancreatiche
- nel corso della reazione flogistica, per sovraregolazione di molecole costimolatrici, in associazione o meno all'esposizione di antigeni criptici;
- per attivazione linfocitaria policlonale da superantigeni.

Altrettanto significativi sono i fattori ambientali ed individuali, legati al sesso.

PATOGENESI DELLE MALATTIE AUTOIMMUNITARIE

Meccanismi Genetici
- selezione timica
- alplotipi e regolazione di MHC II
- regolazione genetica della differenziazione e proliferazione linfocitaria (TCR)
Meccanismi Regolatori
- effetto biologico delle citochine Th1 (IL-2, IFN-g)
- controregolazione Th1-Th2
Meccanismi di "Processing"
- rilascio di antigeni sequestrati
- presenza di autoantigeni
- antigeni eterofili cross-reagenti
- inappropriata presentazione di antigeni

CLASSIFICAZIONE delle MALATTIE AUTOIMMUNITARIE NELL'UOMO

Dal punto di vista clinico-diagnostico, possiamo attualmente suddividere le malattie autoimmunitarie in due grandi raggruppamenti: Sistemiche ed Organo specifiche.

Nelle malattie del collagene non organo specifiche, la risposta autoimmune non è diretta verso organi o verso antigeni specie-specifici, ma verso antigeni diffusamente distribuiti come il DNA, le ribonucleoproteine, gli antigeni mitocondriali.

Il LES è una malattia cronica mediata da anticorpi in grado di colpire vari organi e apparati. Può esordire a qualsiasi età, colpisce prevalentemente il sesso femminile. Le principali manifestazioni cliniche sono: artrite e/o artralgie, febbre, perdita di peso, pericardite, pleurite, eritema a farfalla, sindrome nefrosica.

L'Artrite reumatoide è una malattia infiammatoria cronica che colpisce prevalentemente donne in età compresa tra 45-50 anni. Si manifesta principalmente con artrite delle piccole articolazioni in modo simmetrico con alterazioni radiologiche e presenza di noduli reumatoidi.

La Sindrome di Sjögren è una patologia cronica caratterizzata da infiltrato linfocitario delle ghiandole esocrine, in modo particolare di quelle salivari e lacrimali. Non è nota la prevalenza della sindrome di Sjögren nella popolazione generale anche se la sintomatologia è estremamente comune negli anziani e risente di altre cause (farmaci, sarcoidosi e neoplasie). I sintomi principali sono: cheratocongiuntivite secca, xerostomia e connettivite sistemica.

La Sclerodermia comprende un insieme eterogeneo di condizioni cliniche accomunate da un insieme di lesioni cutanee sclerotiche. In base al grado e al tipo di interessamento cutaneo possiamo distinguere una forma localizzata e una forma sistemica: la prima colpisce prevalentemente la cute, la seconda determina anche un coinvolgimento di organi interni.

La Sclerosi multipla è una malattia del Sistema Nervoso Centrale nella quale é alterata l'integrità dello strato protettivo di mielina sulle ramificazioni degli oligodendrociti. La lesione tipica è definita "placca" ed è costituita da un'area di sostanza bianca in cui la mielina e gli oligodendrociti sono assenti, ciò rallenta e impedisce la conduzione dello stimolo nervoso. Nella fase iniziale i sintomi clinici sono molto sfumati e la diagnosi viene posta su base strumentale (RMN) e laboratoristica (analisi elettroforetica delle proteine liquorali).

La sindrome di Reiter si manifesta come artrite, uretrite e congiuntivite in individui sieronegativi, geneticamente (HLA B27) predisposti, in seguito ad infezioni batteriche o virali clinicamente inapparenti.

Nelle malattie tessuto od organo specifiche, la risposta autoimmune ha come bersaglio tessuti e organi ben determinati:

- a) Sistema endocrino (Tiroidite di Hashimoto, Morbo di Graves, Morbo di Addison)
- b) Sistema gastrointestinale (Cirrosi biliare primitiva, Colite ulcerosa, Gastrite atrofica)
- c) Sistema emopoietico (Anemia emolitica autoimmune)

La Tiroidite di Hashimoto è una malattia che colpisce prevalentemente le donne. La causa scatenante non è stata ancora chiarita; il gozzo è il risultante dell'infiltrato linfocitario ghiandolare costituito principalmente da linfociti T CD4-CD8 e da linfociti B che si possono organizzare in follicoli.

Il Morbo di Graves è una tireotossicosi con presenza di anticorpi (LATS) che stimolano il recettore del TSH e presenza di autoanticorpi contro la tireoglobulina e i microsomi tiroidei, questi ultimi riflettono il grave danno delle cellule tiroidee. La malattia si accompagna ad esoftalmo, mixedema pretibiale e i segni clinici dell'ipertiroidismo.

L'IDDM è una malattia multifattoriale in cui la componente autoimmunitaria gioca un ruolo più importante. La distruzione delle cellule B è dovuta all'azione degli autoanticorpi organo specifici; le insule sono tipicamente infiltrate da linfociti T autoreattivi.

Più del 75% dei casi di Morbo di Addison sono dovuti ad adrenalite autoimmune, con infiltrazione linfocitaria, che come molte altre endocrinopatie autoimmuni è più frequente nel sesso femminile e raggiunge il massimo di incidenza tra i 40 e 50 anni.

Due grandi tipi di gastrite riconoscono un meccanismo patogenetico immunitario: il tipo A (autoimmunitario), tipo B (associato ad infezione da *Helicobacter pylori*). La gastrite autoimmunitaria è associata con altre malattie autoimmunitarie in pazienti appartenenti a particolari gruppi familiari. La stragrande maggioranza di pazienti con anemia perniciosa produce anticorpi contro le cellule parietali gastriche oltre che anticorpi contro il fattore

intrinseco, entrambi sono diagnostici nel caso della gastrite autoimmune. Gli autoanticorpi bloccano il ciclo proliferativo cellulare e, questo meccanismo, è alla base dell'atrofia della mucosa.

La malattia celiaca è una condizione in cui, in conseguenza dell'assunzione del glutine, il soggetto sviluppa caratteristiche lesioni della mucosa digiunale, caratterizzata da elevati infiltrati linfocitari, specie di linfociti T con recettori gamma-delta ($\gamma\delta$). Il meccanismo patogenetico è quindi autoimmunitario, innescato dalla presenza del glutine a livello intestinale.

La malattia di Crohn è una colite ulcerativa cronica con possibile interessamento di tutto il tratto intestinale, il cui meccanismo patogenetico è dovuto, in presenza di fattori genetici predisponenti, alla reazione autoimmunitaria nei confronti della mucosa intestinale.

L'epatite cronica è, per definizione, una lesione epatica che dura da almeno 6 mesi, distinguibile in persistente e attiva. L'epatite cronica attiva (CAH) è caratterizzata da infiltrati mononucleari negli spazi portali che si estende al parenchima producendo necrosi ed eventualmente, dando luogo a cirrosi. L'eziologia è varia (HBV, HCV, alcool, farmaci) ma nella maggior parte dei casi il meccanismo patogenetico, post epatitico, è su base autoimmunitaria. Nei soggetti geneticamente predisposti (HLA A1, B8, DR3) sono riscontrati, accanto ai segni biochimici del danno epatocellulare, elevati titoli anticorpali anti muscolo liscio (ASMA) il cui antigene bersaglio è l'actina ed antimicrosomi epatici e renali (LKM) il cui antigene bersaglio sono gli isoenzimi dei citocromi.

La cirrosi biliare primitiva è una malattia multiorgano i cui segni clinici sono l'ittero e la colestasi a prognosi infausta. I pazienti, asintomatici per lungo periodo, presentano elevati titoli di anticorpi anti mitocondriali e caratteristiche lesioni istologiche da infiltrazione linfocitaria periduttale.

L'anemia emolitica autoimmune, idiopatica o secondaria, è legata alla presenza di autoanticorpi anti-globulo rosso. Si distinguono due tipi di anticorpi le IgG reattive "a caldo" e le IgM reattive "a freddo". Entrambi possono essere messe in evidenza con il test di Coombs diretto o indiretto la cui positività rappresenta un buon indice diagnostico.

La glomerulonefrite membranosa si presenta a tutte le età, soprattutto nei giovani adulti con aplotipo HLA-DR3. Le lesioni caratteristiche sono rappresentate dall'ispessimento della membrana glomerulare, senza proliferazione cellulare. Il meccanismo patogenetico è legato al deposito di immunocomplessi, contro antigeni ignoti od indotti da farmaci, sulla membrana del glomerulo.

L'associazione di glomerulonefrite e pneumopatia emorragica è definita Sindrome di Goodpasture. In questi pazienti, maschi con aplotipo HLA-DR2, la sindrome è associata alla presenza di anticorpi anti-GBM (membrana glomerulare).

Alcune altre forme di nefropatie con vasculite e nella Granulomatosi di Wegener sono sostenute dall'azione patogenetica di anticorpi anti neutrofili. Essi possono essere distinti in cANCA, reattive contro la serina proteasi 3 dei neutrofili, danno una positività granulare del citoplasma e sono specifici della G. di Wegener e pANCA reattivi contro la mieloperossidasi ed altri enzimi citoplasmatici che manifestano una reattività perinucleare, suggestivi della poliarterite microscopica.

Spesso l'evoluitività delle lesioni è tale che una malattia autoimmune che inizialmente si presenta con segni clinici di lesione organo o tessuto specifica, può evolvere come malattia sistemica, così come le malattie "sistemiche" possono presentare fasi evolutive con spiccati segni di lesione d'organo.

Organo specifiche

Da danno cellulare diretto (AEI, Goodpasture, IDDM, Hashimoto, CAH, Crohn)

Da autoanticorpi stimolanti (Graves)

Da autoanticorpi inibitori (Miastenia gravis)

Sistemiche

Da linfociti autoreattivi (SLE, Sclerosi multipla, Artrite reumatoide, Sclerodermia, S. di Sjögren, S. di Reiter)

MALATTIE CAUSATE DA ANTICORPI

MALATTIE DA IMMUNOCOMPLESSI

MALATTIE DA ANTICORPI ANTI ANTIGENI CELLULARI O TISSUTALI

MECCANISMI PATOGENETICI

- Lisi cellulare mediata da Complemento
- Reclutamento ed attivazione di cellule infiammatorie
- Fagocitosi delle cellule con anticorpi adesi
- Lisi da linfociti NK delle cellule con anticorpi adesi
- Alterazione strutturale e funzionale di cellule o molecole

MALATTIE DA IMMUNOCOMPLESSI

FATTORI CHE NE DETERMINANO LA DEPOSIZIONE TISSUTALE

- dimensioni molecolari
- clearance dell'immunocomplesso
- caratteristiche fisico-chimiche di antigeni ed anticorpi
- fattori anatomici ed emodinamici
- produzione locale di citochine e mediatori vasoattivi

LESIONI DA IMMUNOCOMPLESSI

- necrosi
- infiltrati granulocitari

SLE - POLIARTERITE NODOSA - GLOMERULONEFRITE PostStreptococcica

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

METODOLOGIE

Le principali indagini di laboratorio che possono orientare o confermare la diagnosi clinica di malattia su base autoimmunitaria sono rappresentate dalla ricerca degli autoanticorpi specifici. Gli autoanticorpi possono assumere significato di marcatori di malattia con importanza patogenetica oltre che diagnostica. Ovvero possono costituire un semplice epifenomeno di scarsa utilità diagnostica. Alcuni autoanticorpi possono essere indicati per la diagnosi di malattie autoimmuni o di loro varianti cliniche. Numerosi variabili metodologiche (tipi di substrati, qualità degli antisieri, natura degli antigeni, dettagli tecnici) difficilmente standardizzabili possono essere causa di differenze significative nei risultati analitici interlaboratori ed anche intralaboratorio. Un criterio discriminante è rappresentato dal titolo degli autoanticorpi: valori più elevati si riscontrano nelle fasi acute delle malattie specificamente correlate alla presenza di particolari autoanticorpi, mentre valori più bassi possono ritrovarsi in varie affezioni a patogenesi immunologica e non.

In conclusione gli autoanticorpi possono costituire:

- la documentazione di un meccanismo immunologico alterato
- intervenire, condizionandoli, alcuni aspetti clinici ed evolutivi
- rappresentare un epifenomeno di scarso o nessun significato patogenetico.

Nei soggetti normali una comparsa transitoria di autoanticorpi circolanti può intervenire in condizioni fisiopatologiche diverse (processi infettivi o cronici, neoplasie ecc..) sia pure a basso titolo. La presenza costante e persistente di autoanticorpi, invece, può essere considerata espressione di evoluzione autoimmunitaria di una malattia pregressa, di una fase preclinica asintomatica, di una malattia autoimmune.

Le metodologie utilizzate in laboratorio per la valutazione degli autoanticorpi sono basate sulla specificità della reazione dell'autoanticorpo, eventualmente presente nel siero da

esaminare, e l'antigene specifico presente su tessuti o cellule oppure adeso sul fondo di pozzetti di piastre microtiter. Nel primo caso la reazione verrà evidenziata, dopo l'aggiunta di un coniugato fluoresceinato, come un'intensa colorazione verde-mela al microscopio a fluorescenza. Il preparato viene osservato abitualmente con un ingrandimento 400x. Nel caso di antigeni purificati e adesi alle piastre microtiter, la reazione verrà eseguita con procedura in immunoenzimatica e la lettura della variazione colorimetrica sarà effettuata con un densitometro, riportando le O.D. dei campioni sulla curva standard ed ottenendo, quindi, la concentrazione dell'analita presente in ciascun campione esaminato.

Il vantaggio dell'impiego delle metodologie in immunofluorescenza è rappresentato dalla possibilità di poter analizzare con modalità di screening un numero elevato di campioni, di poter valutare contemporaneamente, utilizzando i rispettivi substrati, la presenza di differenti autoanticorpi, di presentare un buon rapporto costo/beneficio. Lo svantaggio è legato alla lettura del risultato affidata all'esperienza ed al giudizio dell'operatore.

I vantaggi delle metodologie in immunoenzimatica sono rappresentati dalla possibilità che vengano eseguite con analizzatori automatizzati e computerizzati, che consentono una elevata affidabilità, riproducibilità ed accuratezza, dalla lettura dei campioni in riferimento alla curva di calibrazione e dal risultato analitico espresso in unità di misura accettate a livello internazionale. Il maggior svantaggio è rappresentato dal costo mediamente elevato.

Gli autoanticorpi anti-nucleo (ANA) costituiscono un gruppo assai ampio di anticorpi rivolti verso differenti antigeni del nucleo cellulare. Per quanto riguarda la ricerca degli ANA, l'immunofluorescenza indiretta, su cinetoplasti di flagellati (*Trypanosoma cruzi*, *Crithidia luciliae*), o su cellule Hep-2, risulta più specifica e sensibile delle metodiche radioimmunologiche. Tra l'altro consentono di individuare anticorpi anti-dsDNA fissanti il complemento, di notevole utilità nella valutazione della fase di attivazione del LES (vi è una stretta correlazione tra questi anticorpi e presenza di nefropatia lupica). Mediante immunofluorescenza indiretta, usando come substrati sezioni criostatiche di tessuti (di ratto o di primati) oppure cellule da colture in vitro stabilizzate, si possono osservare quattro differenti aspetti:

- a) omogeneo, prodotto da anticorpi rivolti verso il complesso DNA-proteina
- b) punteggiato, prodotto essenzialmente dagli ENA;
- c) nucleolare, indotto da anticorpi anti-nucleolari;
- d) periferico, correlabile alla presenza di anticorpi anti-DNA.

Gli anticorpi anti-DNA, appartenenti generalmente alle classi IgG o IgM, si distinguono in:

- anticorpi anti-DNA nativo, a doppia elica (ds-DNA), che rappresentano markers specifici di LES in fase attiva (essi risultano positivi nel 90-95% di casi di LES in fase di acuzie o in fase di recidiva);
- anticorpi anti-DNA denaturato, a singola elica (ss-DNA) presenti non soltanto nel LES ma anche in altre connettiviti;

Esistono poi anticorpi anti istoni (H2B, H2A, H3, H4) che si ritrovano in particolare nel LES indotto da farmaci.

Gli anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (anti-ENA) costituiscono i markers sierologici di diverse connettiviti. I principali anti-ENA sono i seguenti:

- anticorpi anti-RNP, o anti-U1 ribonucleoproteine, che rappresentano markers della connettivite mista, pur potendosi ritrovare nel LES e meno frequentemente nell'artrite reumatoide, nella sindrome di Sjögren e nella sclerodermia;
- anticorpi anti-SM, rivolti contro piccole strutture nucleari, assai specifici per il LES, anche se si ritrovano soltanto in 1/3 circa dei casi di quest'affezione.
- anticorpi anti-RO (anti-SS-a) rivolti verso antigeni citoplasmatici, che si ritrovano frequentemente nella sindrome di Sjögren, ma anche in alcuni casi di LES, soprattutto nel Lupus neonatale, probabilmente per passaggio transplacentare da madri sempre positive per anti-RO.
- anticorpi-anti-La (anti-La o anti-SS-b) diretti contro antigeni citoplasmatici e nucleari, abbastanza specifici per la sindrome di Sjögren.
- anticorpi anti-PCNA, rivolti contro un antigene esclusivamente presente nei nuclei di cellule in fase di attiva proliferazione, rilevabili quasi esclusivamente nel LES.
- anticorpi anti-RANA, che si ritrovano in quasi il 90% dei casi di artrite reumatoide, rivolti verso un antigene nucleare, presente su linee linfoblastoidi infettate col virus di Epstein-Barr.
- anti centromero.
- anti-Scl-70, abbastanza specifici per la sclerodermia, rivolti verso proteine nucleari non istoniche.
- anticorpi anti-Ku ed anti PM1, diretti contro le proteine che si legano alle terminazioni libere del DNA, il cui reperto è molto frequente nelle sindromi da sovrapposizione polimiosite/ sclerodermia.

- anticorpi anti-Mi 1 ed anti Mi2, diretti contro due proteine di diverso peso molecolare, riscontrabili spesso nella dermatomiosite e nelle sindromi di sovrapposizione.
- anticorpi anti-Ma, presenti in una modesta percentuale di casi di LES (20% circa dei casi) che sembra svolgano un ruolo importante nel determinare la nefropatia lupica.
- anticorpi anti-JO-1 rivolti verso una proteina anodica nucleare e citoplasmatica, di frequente riscontro nella polimiosite, soprattutto nelle forme recidivanti e con fibrosi polmonare.
- anticorpi anti-antigeni nucleolari (RNA e RNA nucleolari) si ritrovano nel 30-40% dei casi di sclerodermia.

Nel LES ed in altre connettiviti si riscontrano, inoltre, anticorpi rivolti verso antigeni di membrana (anti-enzima, anti-linfociti T e B, anti-piastrine, ecc..). Particolare importanza diagnostica sembrano avere gli anticorpi anti-LAMP, ad alta specificità diagnostica nelle fasi attive di malattia (si ritrovano quasi nel 100% dei casi), diretti verso antigeni di membrana di vari elementi cellulari.

Gli anticorpi anti-mitochondriali (AMA), che si mettono in evidenza con tecniche di immunofluorescenza indiretta e di fissazione del complemento, rappresentano un gruppo eterogeneo, per cui si distinguono almeno 6 diversi tipi di AMA:

- M1, diretti contro la cardiolipina, caratteristici della lue.
- M2, rivolti contro un antigene della membrana mitocondriale interna ricco in ATP-asi, caratteristici della cirrosi biliare primitiva e di altre epatopatie.
- M3, diretti contro antigeni della membrana mitocondriale privi di ATPasi, che si riscontrano nello pseudo-LES da farmaci (fenopirazone, venocuran ecc..)
- M4, rivolti contro antigeni della membrana mitocondriale interna, spesso riscontrati nelle epatopatie croniche.
- M5, diretti contro antigeni mitocondriali interni ricchi in cardiolipina, riscontrabili spesso nel LES ed in altre connettiviti, oltre che nelle anemie emolitiche autoimmuni.
- M6, non-organo e non specie specifici, ritrovati in alcuni casi di epatiti da ipronoazide.

Gli AMA costituiscono una famiglia di anticorpi che riconoscono diversi determinati antigenici di macromolecole lipoproteiche non dotate di funzioni enzimatiche associata alla ATPsi delle membrane mitocondriali.

Mediante IFI gli AMA risultano positivi in oltre il 95% dei pazienti con cirrosi biliare primitiva, raramente risultano positivi in pazienti con Epatite cronica attiva, Cirrosi criptogenetica, Connettivite mista, Sifilide, Miocardite. Questo dato analitico va, comunque,

interpretato in associazione ai valori elevati di colestasi, che distinguono la cirrosi biliare primitiva da ostruzioni biliari intra ed extraepatiche.

Gli Anticorpi anti-fosfolipidi rivolti contro molecole fosfolipidiche (normali costituenti di molte membrane biologiche, citoplasmatiche e nucleari), si ritrovano in varie affezioni morbose. I più frequentemente dosati sono gli anticorpi anti-cardiolipina (anti-CDL) di classe IgG o IgM, che si repertano in oltre il 90% dei casi di LES, nella miastenia grave, nelle epatiti croniche, nella sindrome di Behcet, oltre che in varie malattie neurologiche ed in alcune malattie infettive (lue, lebbra, malaria, tubercolosi, morbillo) ed autoimmuni (artrite reumatoide, sindrome di Sjögren). Deve essere ricordato che la cardiolipina è stata impiegata in passato per la diagnosi sierologica della lue; gli anticorpi anti-CDL erano responsabili delle false positività delle reazioni sierologiche per la lue, spesso riscontrate nel LES (in circa la metà dei casi) e in altre affezioni; questi anticorpi venivano in passato definiti impropriamente “anti-coagulanti lupici”. Negli ultimi anni è stata definita la “sindrome di anticorpi anti-fosfolipidi“, caratterizzata da fenomeni trombotici, aborti ricorrenti, piastrinopenia, ipertensione polmonare e manifestazioni neurologiche varie.

Anticorpi anti-tiroidei

Si distinguono vari autoanticorpi:

- anticorpi anti-tireoglobulina, rilevabili con tecniche di immunofluorescenza indiretta (su substrati di tiroide umana o di primati) o con altre (RIA, Immunoenzimatica) in gran parte dei casi di Tiroidite di Hashimoto e di Mixedema primitivo, oltre che in pochi casi di Morbo di Basedow;
- anticorpi anti-antigene microsomiale, rilevabile con le stesse tecniche, considerati markers molto sensibili delle tireopatie autoimmuni (spesso sono associati alla presenza di anticorpi anti-tireoglobulina, ma si possono ritrovare anche isolati);
- anticorpi anti-secondo-antigene della colloide (Anti CA2), che all'immunofluorescenza danno una colorazione omogenea della colloide;
- anticorpi leganti il recettore per il TSH, di tipo stimolante (LATS = long acting thyroid stimulator), caratteristici del morbo di Basedow ma rilevabili anche, sia pure a bassi titoli, in altre tireopatie autoimmuni, ovvero di tipo inibente, riscontrabili in vari casi di ipotiroidismo. Per quanto concerne le metodiche di rilevazione, vengono utilizzate tecniche di immunofluorescenza indiretta (aspetto di tipo flocculare per gli anticorpi anti-tireoglobulina, di tipo citoplasmatico per gli anticorpi anti microsomiali, di tipo omogeneo

per gli anticorpi anti CA2). Assieme alle metodiche EIA, anche quelle RIA vengono spesso impiegate per la ricerca di anticorpi anti-tireoglobulina e anti-microsomiali.

Anticorpi anti-cellule parietali gastriche, anti-fattore intrinseco ed anti-cellule producenti gastrina.

- Sono autoanticorpi organo-specifici, ma non specie specifici, che assumono una particolare importanza nella diagnostica delle gastriti atrofiche. Per la loro dimostrazione si usano essenzialmente tecniche di immunofluorescenza indiretta utilizzando come substrato stomaco umano o di primati. Gli anticorpi anti-cellule parietali gastriche (APCA), generalmente di classe IgG (più raramente IgA o IgM), spesso fissanti il complemento, sono diretti contro una lipoproteina associata alle membrane lisce della frazione microsomiale delle cellule parietali. Essi si ritrovano nella grande totalità dei casi di gastrite atrofiche del fondo; sono rilevabili comunque, anche in altre malattie autoimmuni (Tiroidite autoimmune, Diabete giovanile di tipo I, Cirrosi biliare primitiva), oltre che in una certa percentuale di soggetti sani di età avanzata. Gli anticorpi anti fattore intrinseco, che si riscontrano nella quasi totalità dei casi di anemia perniziosa sono distinguibili in due tipi:

Tipo I, di classe IgG (raramente IgA) e di tipo bloccante, diretti contro un determinante antigenico posto in corrispondenza del sito di combinazione del fattore intrinseco con la vitamina B12

Tipo II, di classe IgG (meno frequente IgA o IgM), di tipo precipitante, rivolti contro un determinante antigenico diverso e in grado di legarsi direttamente al fattore intrinseco isolato o al complesso fattore intrinseco-vitamina B12.

Gli anticorpi anti cellule producenti gastrina, esclusivamente di classe IgG e fissanti il complemento, sono presenti in quasi tutti i casi di gastrite atrofica dell'antro. Oltre ai test specifici, precedentemente elencati per la valutazione e l'identificazione di una malattia autoimmunitaria, vengono associate anche altre indagini di laboratorio utili per confermare il sospetto diagnostico e per monitorare l'evolutività della malattia e la risposta terapeutica. Questo avviene perché gli autoanticorpi sono sufficienti a definire la presenza reale di una malattia autoimmune. La diffusione dei test per la determinazione degli autoanticorpi ha aumentato la probabilità di incontrare pazienti con positività anche significativa in assenza di manifestazioni cliniche. Questa situazione è particolarmente frequente per gli autoanticorpi non organo specifici. Si tratta probabilmente di condizioni prodromiche a malattie conclamate, che tuttavia possono manifestarsi con una inerzia temporale anche molto lunga.

In assenza di segni clinici o di alterazioni dei parametri bioumorali di flogosi sistemica, non è possibile porre diagnosi di malattie autoimmunitarie e non è lecito nemmeno iniziare una terapia specifica. L'unico suggerimento è quello di un monitoraggio frequente dei soggetti, al fine di attivare un trattamento efficace nel momento in cui compaiono i segni di malattia. Analogamente, sia in termini diagnostici che di monitoraggio delle malattie autoimmuni, la ricerca degli autoanticorpi deve essere affiancata alla determinazione di altri parametri bioumorali aspecifici, (VES, Proteine di fase acuta) o dei livelli sierici del complemento.

Gli anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA) reagiscono con differenti antigeni della muscolatura liscia (microfilamenti, microtubuli, filamenti intermedi) che costituiscono il citoscheletro cellulare. Gli ASMA, non specie specifici, sono quasi esclusivamente IgG, più raramente IgM, possono essere messi in evidenza con tecniche di immunofluorescenza indiretta ovvero, più recentemente, con tecniche immunoenzimatiche o fluorimetriche. Gli anticorpi anti-G actina sono specifici per l'epatite cronica attiva; gli anticorpi anti-microtubulina e gli anticorpi anti-filamenti intermedi si riscontrano, invece, in numerose condizioni patologiche (epatiti acute, malattie virali e micoplasmatiche acute). La metodica più diffusa, come detto precedentemente, è l'IFI su sezioni criostatiche di stomaco di ratto. L'antigene è rappresentato dall'actomiosina del muscolo liscio. Questi anticorpi sono presenti a basso titolo nel 20-30% dei soggetti normali e in molte forme infettive a genesi virale, in particolare le epatiti acute; ad alto titolo (1:80 o superiore) si riscontrano nell'epatite cronica attiva a spiccata componente infiammatoria e immunologica (70% dei casi), in genere non associata a marcatori di infezione virale B.

Tra le indagini di laboratorio di seconda istanza, che possono ulteriormente consentire il corretto inquadramento diagnostico del paziente ed un migliore follow-up terapeutico, vanno indicate: il dosaggio delle gammaglobuline nel siero, il dosaggio della complementemia e degli Immunocomplessi, la valutazione della produzione e del rilascio in circolo delle Citochine.

La fase acuta della malattia autoimmunitaria è accompagnata da un aumento dei valori sierici delle Ig, specie delle IgG, dalla diminuzione dei livelli di C3 e C4, spesso dalla comparsa di Immunocomplessi circolanti (CIC).

LINEE GUIDA

Un grande miglioramento della diagnostica di laboratorio, oltre a quello certamente correlato con la disponibilità di nuove e sempre più affidabili metodologie analitiche, è legato alla

definizione di precisi, ma sempre modulabili, algoritmi diagnostici e di follow-up terapeutico. Nel caso delle malattie autoimmunitarie possono essere definite differenti flow-chart: una per la valutazione di soggetti nei quali i sintomi clinici sono sfumati e la diagnosi solo sospettata tra altre possibilità cliniche; una per quei soggetti nei quali i sintomi clinici e l'anamnesi forniscono la quasi certezza di malattia autoimmunitaria sistemica o d'organo; una terza per il follow-up terapeutico e la valutazione della prognosi.

In base alla nostra esperienza ed a valutazioni di opportunità economica, nei soggetti nei quali la diagnosi non può essere posta con certezza, sul piano clinico, sembra opportuno eseguire la determinazione in immunofluorescenza degli ANA su cellule Hep-2, degli anticorpi anti ds-DNA su *Crithidia luciliae* ed in immunoenzimatica, degli ENA come screening. Nei soggetti nei quali la probabilità diagnostica è elevata ed i segni clinici orientano verso patologie definite, è opportuno eseguire la determinazione di autoanticorpi che rivestono chiara natura diagnostica, ad es. anti-Tg ed anti-TPO nelle tiroidite. Nel follow-up terapeutico e nel monitoraggio del paziente è necessario seguire le variazioni del titolo autoanticorpale e degli altri parametri di laboratorio (CIC, Fattore Reumatoide, Crioglobuline).

La negatività di tutti i tests, evidentemente, fa escludere la diagnosi di malattia autoimmunitaria, soprattutto quella di LES in fase attiva, ancora di più, se eventuali positività a bassi titoli (< 1:40) in immunofluorescenza scompaiono a titoli più elevati. La positività degli ANA in immunofluorescenza deve indurre ad eseguire la determinazione dei titoli anticorpali verso i singoli antigeni nucleari estraibili. Pattern specifici e chiari di positività agli ANA possono indicare quali antigeni debbano essere ricercati. In particolare in presenza di un pattern nucleolare, finemente o grossolanamente granulare degli ANA in immunofluorescenza, lo screening con gli ENA dovrebbe risultare positivo ed indurre a ricercare il titolo anticorpale contro singoli antigeni.

Pattern Omogeneo: Risulta dirimente il titolo anticorpale che mostri valori $\leq 1:80$ nelle collagenopatie, $>1:80$ nel LES subclinico ed in quello indotto da farmaci; nel LES conclamato risultano positivi anche gli anticorpi anti-DNA. La stessa valutazione può essere fatta con un pattern di positività di tipo "periferico".

Pattern grossolanamente Granulare: se il titolo è $\geq 1:160$ si impone la determinazione degli ENA, che va fatta anche nel caso di positività di tipo finemente granulare e nucleolare.

Alcune positività degli ANA in immunofluorescenza sono suggestive di particolari malattie:

- "a lamine" suggerisce la diagnosi di Epatite attiva
- anti-fuso mitotico suggerisce anticorpi anti cellule in replicazione

- anti-centriolo sono specifici della Sclerosi sistemica progressiva
- anti-centromero sono specifici della sindrome CREST (calcinosi, Raynaud, esofagite, sclerodermia, telangiectasie)
- “maculato” suggerisce Cirrosi biliare primitiva, Epatite cronica attiva.

Esistono profili “ANA” nelle malattie autoimmunitarie sistemiche, con positività frequentemente elevata di autoanticorpi contro specifici epitopi antigenici. Si riscontrano, infatti, con più alta frequenza anticorpi anti DNA denaturato (a singola elica) rispetto a quelli anti DNA nativo, che si osserva meglio nel cinetoplasto di *Crithidia*. Anticorpi anti-Sm sono rappresentati da quelli specifici contro gli epitopi proteici *B'* da 29 kDa, *B* da 28, *D* da 16, *E* da 13, rispettivamente delle subunità snRNSs U1, U2, U4-U6. Gli anticorpi anti-RNP riconoscono gli antigeni proteici complessati con U1 snRNA, parte integrante degli spliceosoma. SS-A/Ro riconoscono epitopi proteici 60 e 52 kDa complessati con RNA Y1-Y5. SS-B/La l'antigene fosfoproteico di 48kDa complessato con Y1 sullo RNA trascritto da Polimerasi III. RNP ribosomiale riconosce fosfoproteine di diverso peso molecolare associate con i ribosomi. HSP90 la Heat shock protein da 90 kDa. La Cardiolipina riconosce gran parte fosfolipidi anionici. Gli anticorpi anti Scl-70 riconoscono la proteina nativa da 100 kDa, ed il suo prodotto maturo da 70 kDa, della DNA topoisomerasi I. Gli anticorpi anti-centromero riconoscono le proteine del cinetocore.

Dai dati della letteratura si può riassumere che:

- Pazienti affetti da LES hanno molti tipi di ANA, ma gli anti DNA-ds e gli anti Sm hanno grande valenza diagnostica
- ANA anti-istoni sono presenti nel Lupus indotto da farmaci.
- ANA ed anti-RNP sono presenti nelle MCTD (Connettiviti miste)
- ANA ed anti-centromero sono associati alla CREST
- ANA assieme ad SS-A/Ro sono presenti nelle vasculiti e nelle nefropatie gravi
- ANA con SS-B/La sono presenti in corso di SLE e nella Sindrome di Sjögren
- ANA con anti-PM ed Scl-70 sono presenti nella sindrome “sovrapposta” (SLE, Polimiosite, Artrite reumatoide)
- ANA con anti Jo-1 sono peculiari della fibrosi polmonare con polimiosite.

La determinazione con metodica immunoenzimatica degli autoanticorpi anti antigeni nucleari estraibili od anti antigeni tessuto-organo specifici, è validata non soltanto dalla specificità dell'antigene utilizzato nel test, ma anche dalla sensibilità analitica delle metodologie basate sull'immunoenzimatica. In questi casi, infatti, si raggiunge un elevato valore predittivo del

risultato analitico che viene espresso, per variazioni continue, sulla base della curva di calibrazione del test eseguita con standard a concentrazione nota. Un ulteriore miglioramento analitico e, quindi, diagnostico, è rappresentato dalla commercializzazione di tests che utilizzano epitopi antigenici purificati, con procedure analitiche o clonati e fatti esprimere in vettori biologici, per assicurarne la produzione qualitativamente stabile ed ottimale. L'interpretazione corretta del risultato analitico di tests immunoenzimatici per il dosaggio di autoanticorpi, presuppone la definizione di valori di riferimento e di cut-off di positività per il singolo analita, che consentano di dare significatività predittiva al dato di laboratorio in termini di utilità clinica.

L'algoritmo diagnostico delle malattie autoimmunitarie sistemiche e d'organo è, dunque, basato sulla esecuzione iniziale delle indagini analitiche con metodiche in immunofluorescenza e, successivamente, sulla determinazione della concentrazione sierica degli autoanticorpi specifici. Ad esempio, se è ancora plausibile che in presenza di una diagnosi di tiroidite linfocitaria venga eseguita la determinazione degli "anticorpi antitiroide" in immunofluorescenza, si impone la determinazione delle concentrazioni sieriche, in immunoenzimatica, degli autoanticorpi anti-tireoglobulina ed anti-perossidasi. Allo stesso modo, in casi di malattia celiaca, l'intervento del laboratorio non può esaurirsi nella determinazione degli anticorpi anti-endomisio ed anti-gliadina in immunofluorescenza, ma deve prevedere il dosaggio immunoenzimatico degli anticorpi anti-transglutaminasi. Tali indagini, non soltanto sono indicative del meccanismo patogenetico alla base della malattia e della sua evoluzione, ma sono necessarie per il monitoraggio dell'efficacia terapeutica e la definizione della prognosi.

BIBLIOGRAFIA

Hang L, Nakamura RM. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases.

Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 34 (3): 275-311, 1997

Feldmann M, Brennan FM, Maini R. Role of cytokines in autoimmune diseases. pp-185-194

In “ Human Cytokines: their role in diseases and therapy” Aggarwal BB, Puri RK (eds.), Blackwell, Houston, USA, 1995

Oehling AK, Lopez JGH (eds.) “Progress in Allergy and Clinical Immunology” vol. 4. Hogrefe & Huber Publ., Seattle, 1997

Diseases caused by humoral and cell-mediated immunereactions. pp.354-375 In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, WB Saunders, Philadelphia (1991), vedi Ed. Italiana, Piccin.

Niles JL. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in the classification of vasculitis. Annu. Rev. Med., 47:303-313, 1996

Shapiro SS. The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. Annu. Rev. Med.,47:533-52, 1996