

# L'approccio laboratoristico alla malattia autoimmune

**Elisabetta Tonolli**

Microbiologia e Virologia

Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata

Verona

# Malattia autoimmune

Influenza genetica

Fattori ambientali

**Perdita della tolleranza ad autoantigeni**

**Autoanticorpi**

# Malattia autoimmune

## Screening

- VES PCR
- Emocromo
- Profilo proteico
- C3, C4
- **ANA ENA**
- **Anti-citrullina, FR**
- **Anti-cardiolipina**
- **ANCA**



# Anticorpi anti-nucleo (ANA)

sospetto di malattia autoimmune sistemica  
test di screening

- **Immunofluorescenza indiretta (IFI)**

substrato cellule HEp-2 (linee cellulari epiteliali di carcinoma laringeo umano)

- Immunoenzimatica
- Chemiluminescenza

.....

# ANA – IFI HEp-2

**elevata sensibilità**

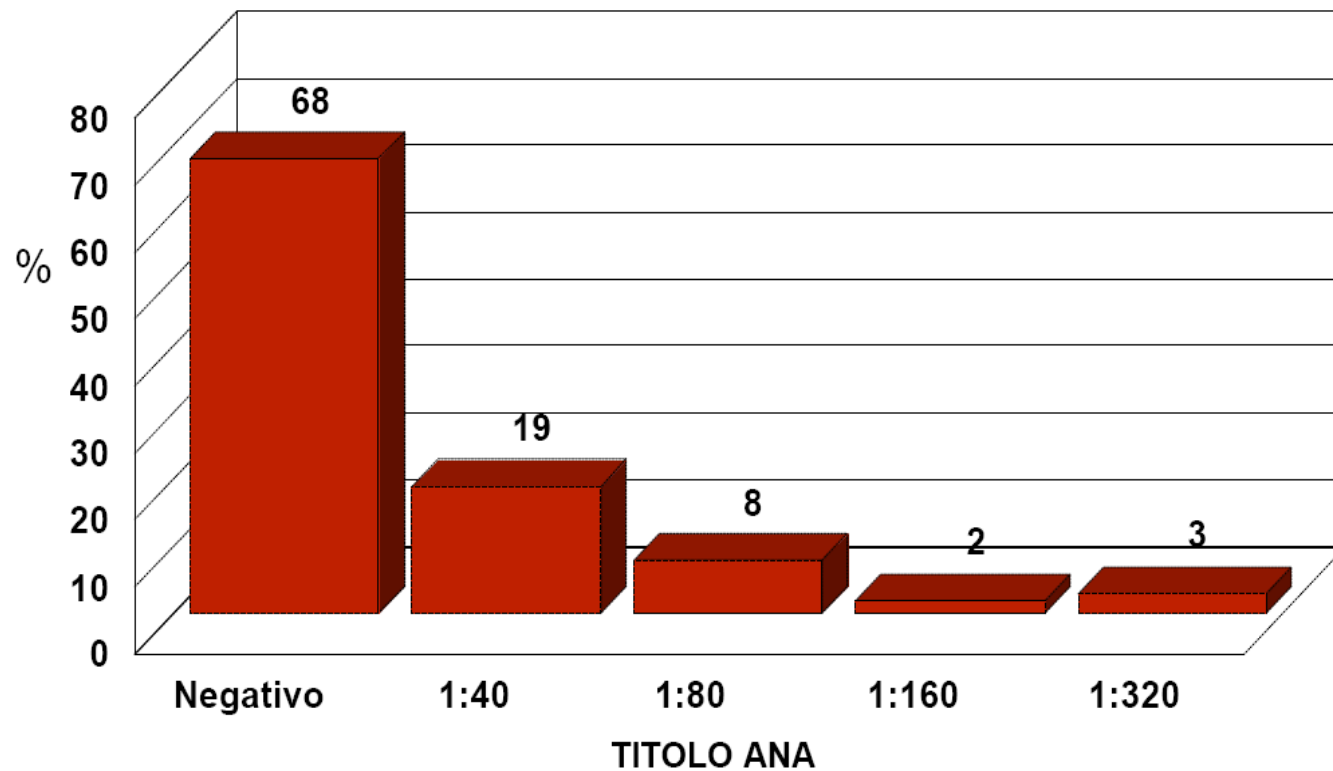
**bassa specificità**

positivi in

- pazienti
  - malattie virali, neoplasie, terapia
- soggetti sani
  - ♀ età > 40 aa, anziani, parenti di pazienti con patologia autoimmune

## Range of Antinuclear Antibodies in "Healthy" Individuals

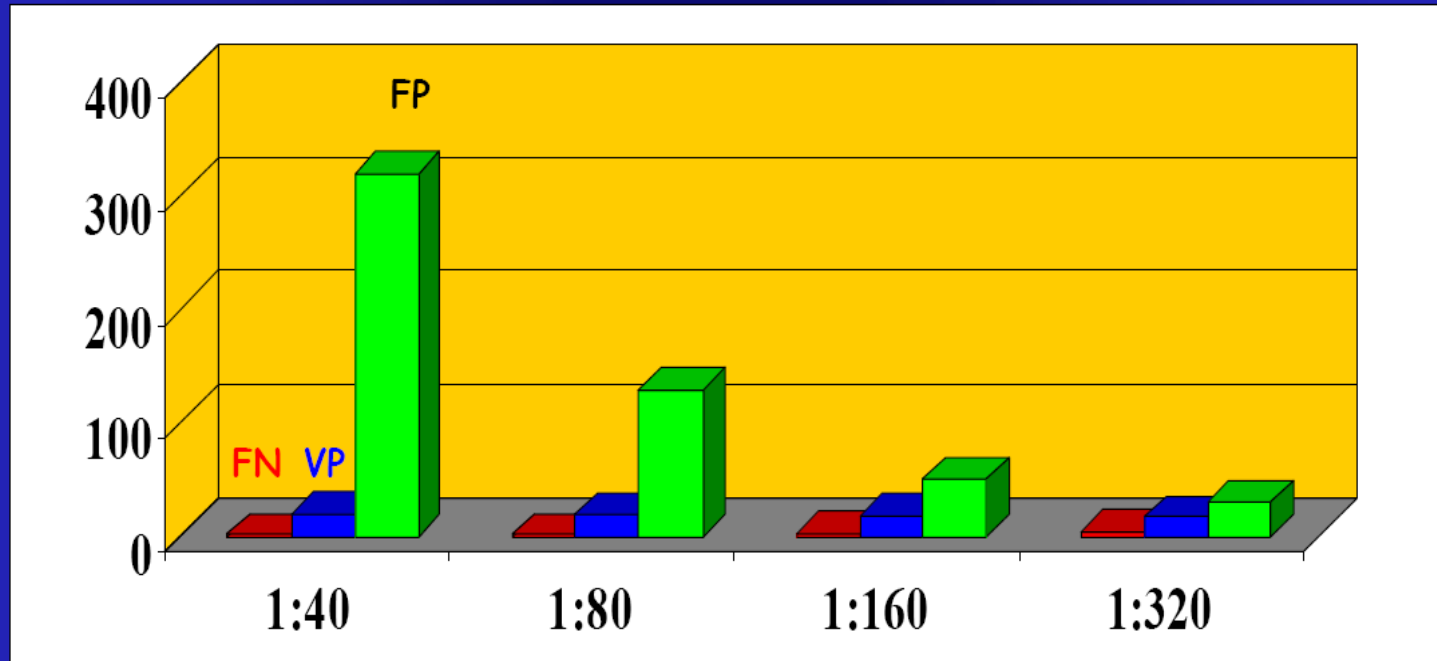
(Tan EM, et al. Arthritis Rheum 1997; 40:1601-11)



# ANA Titolo

**1:40** Basso valore predittivo positivo

**1:160** Alto valore predittivo positivo



# ANA - IFI

- Identifica pazienti con autoanticorpi
- **Associa pattern - autoanticorpo - patologia**
- Aiuta a monitorare il paziente durante il trattamento
- Elimina pazienti negativi



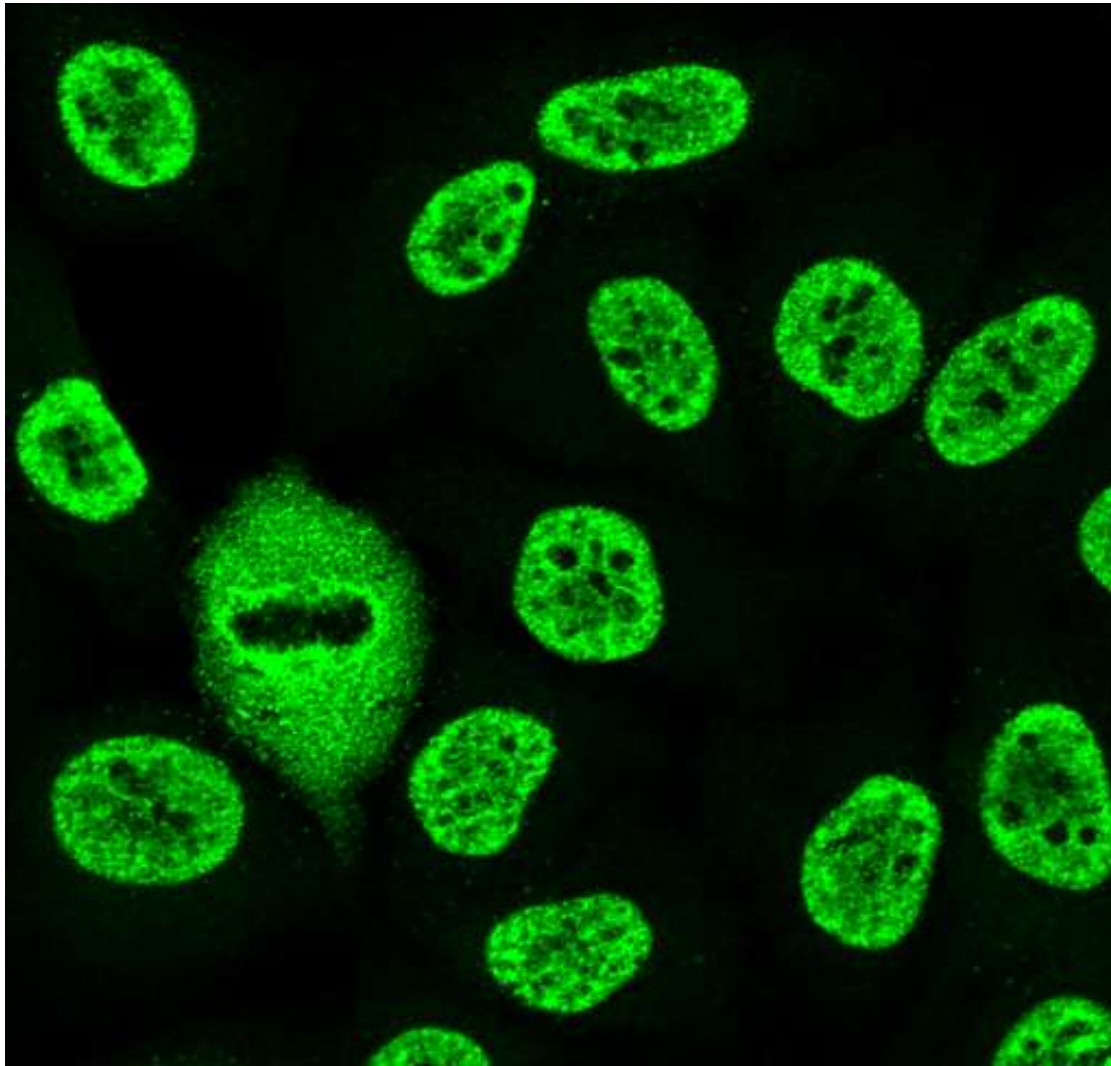
## Pattern ANA in relazione alla diagnosi e agli autoantigeni riconosciuti

Diagnosi	Homogeneous or fine grainy nuclear	Speckled nuclear	Centromere Kinetochores	Nuclear patterns	Cytoplasmic pattern	ANA Negative
SLE	dsDNA(h) Nucleosomes(h) Ku(g)	Sm / U1RNP(cs) SSA(Ro)/SSB(La) (fs) hn RNPsl(cs)	rare	Nucleolin (h) ASE-1 (h)	P-proteins (d) SSA-56 (d)	SSA (Ro)
Systemic sclerosis Raynaud's syndrome	Topoisomerase I (g) RNA polimerase II, III Ku(g)	U1RNP (cs) U2RNP (cs)	CENP-A,B,C	PM/scl (h) Th/to (h) Fibrillarin (cl) RNA polimerase I (p) NOR-90 (p)	Rare	SSA (Ro)
Poly/dermatomyositis	Ku (g)	Mi-2 (fs) SSA(Ro)-52 U1RNP(cs)	rare	PM/scl (h)	SRP (d) Jo-1 (fs)	Jo-1
Sjögren's syndrome	rare	SSA(Ro) (fs) SSB(La) (fs)	CENP-A,B,C	Nucleolin (h)	SSA-56 (d)	SSA (Ro)
Mixed connective tissue disease	rare	U1RNP (cs) hnRNPs(l) SSA(Ro) (fs)	rare	rare	rare	rare
APS	*	*	rare	B23	rare	Anti-cardiolipin Lupus anticoagulant

\* depends on primary disease, mostly SLE

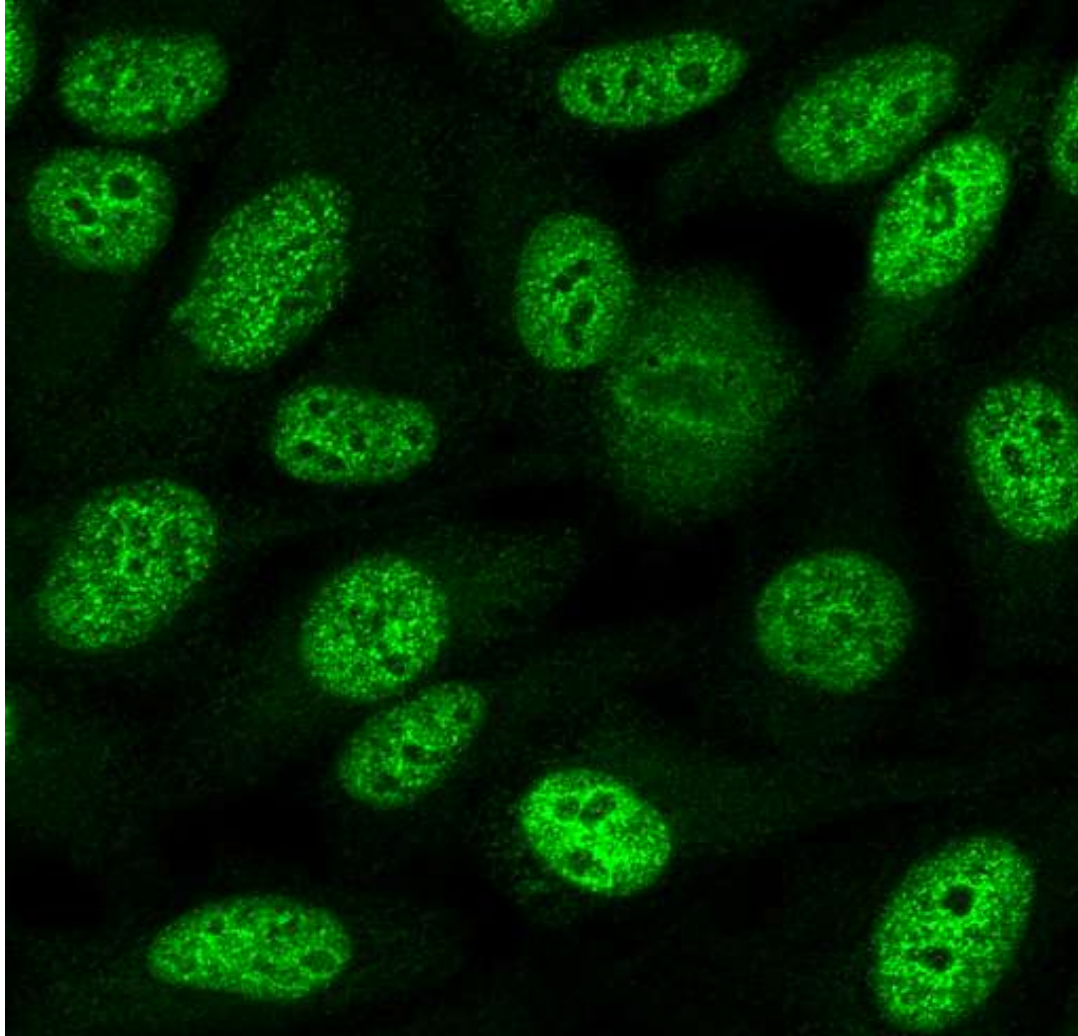
cl, clumpy; cs, coarse; d, diffuse; fs, fine speckled; g, grainy; h, homogeneous; l, large; p, punctate

## ANA (IFI HEp-2): Positivo 1/2560 pattern punteggiato



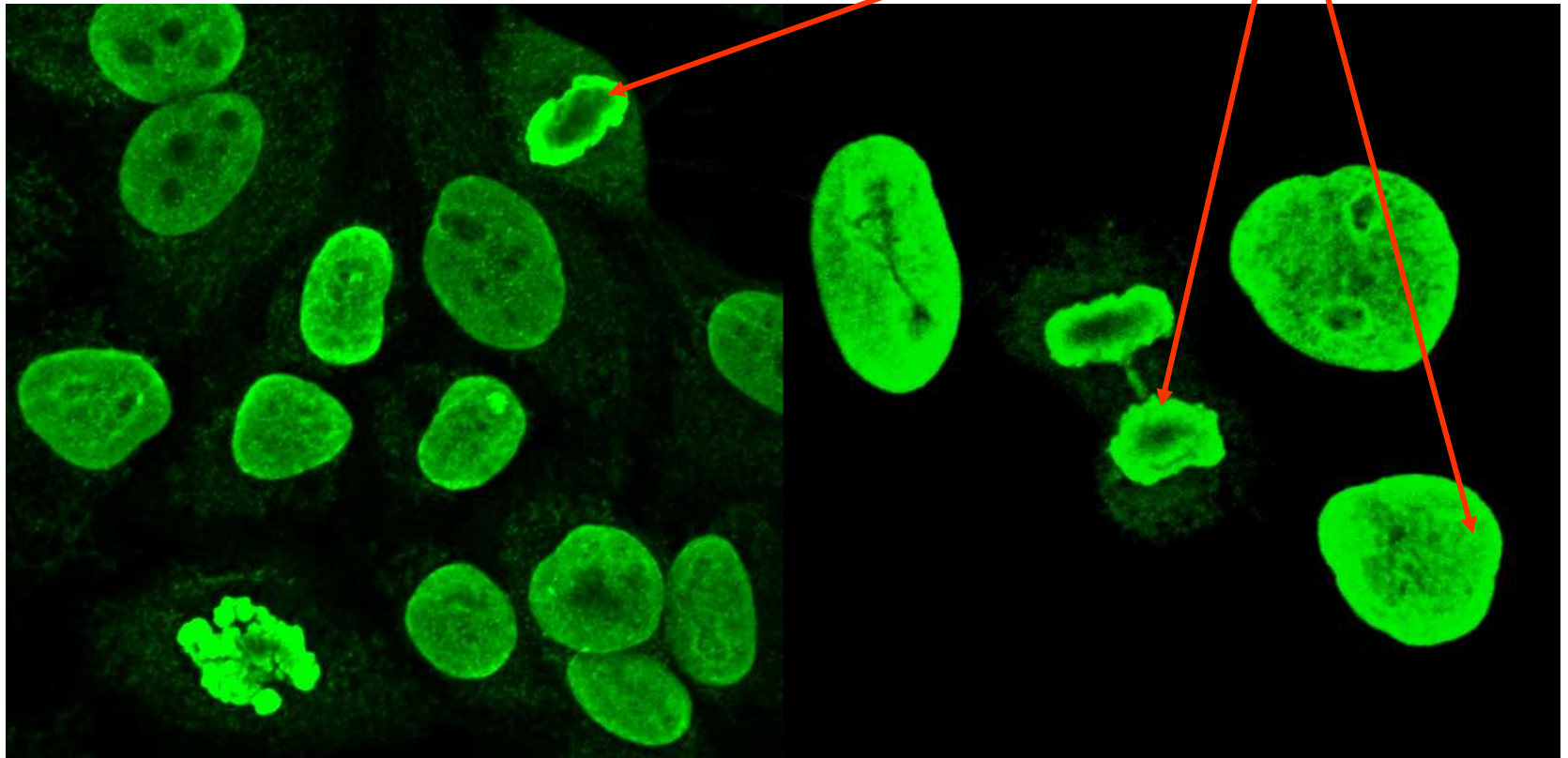
HEp-2 pattern of Sm and/or U1-snRNP antibodies. Both patterns are identical since the target molecule complex is the same.

ANA (IFI HEp-2): Positivo 1/1280 pattern punteggiato



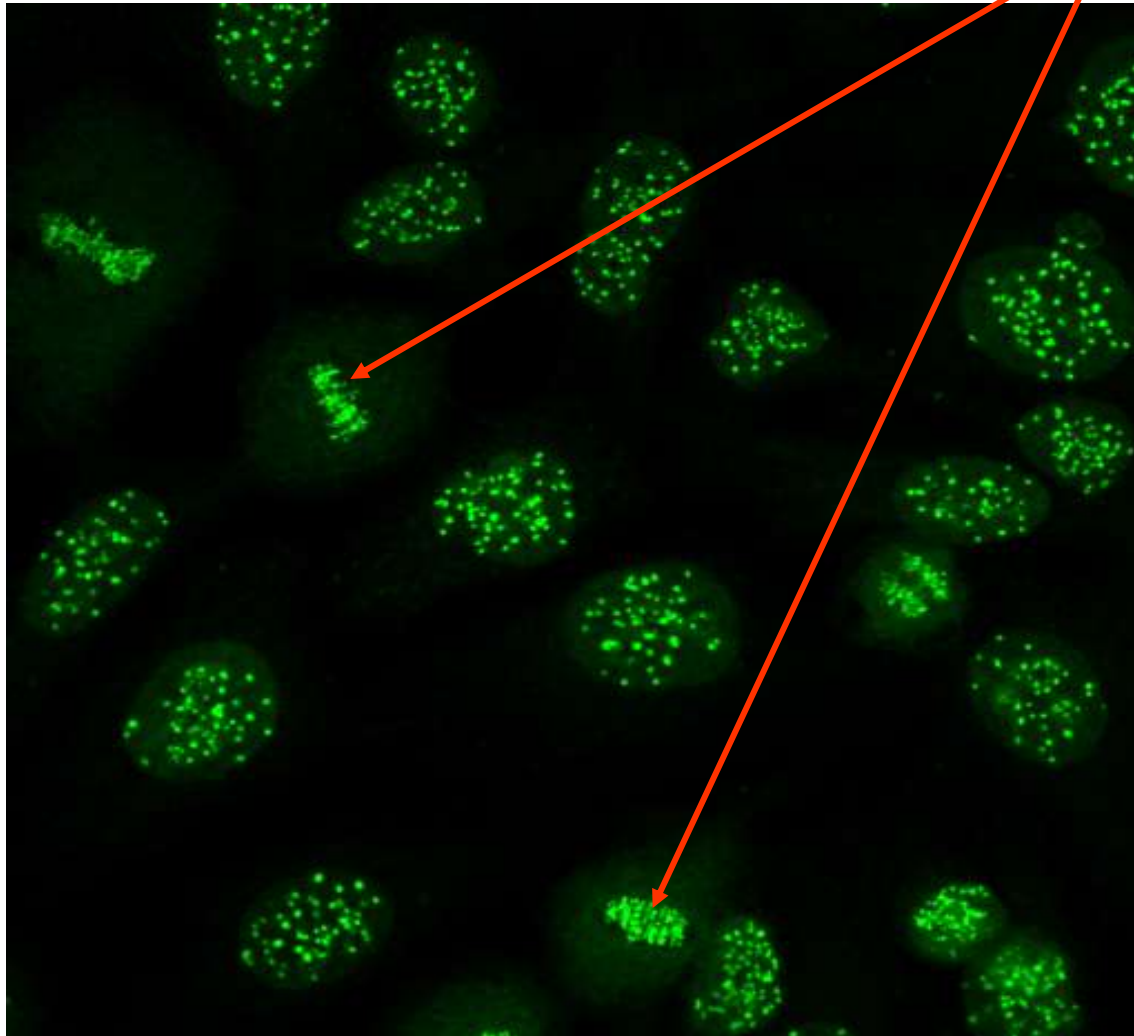
Typical speckled pattern of SSA/Ro.

# ANA (IFI HEp-2): Positivo 1/5120 pattern omogeneo



Nuclear homogeneous pattern. The right side shows same pattern at a higher magnification.

**ANA (IFI HEp-2): Positivo 1/640 pattern centromerico**



Centromere pattern.



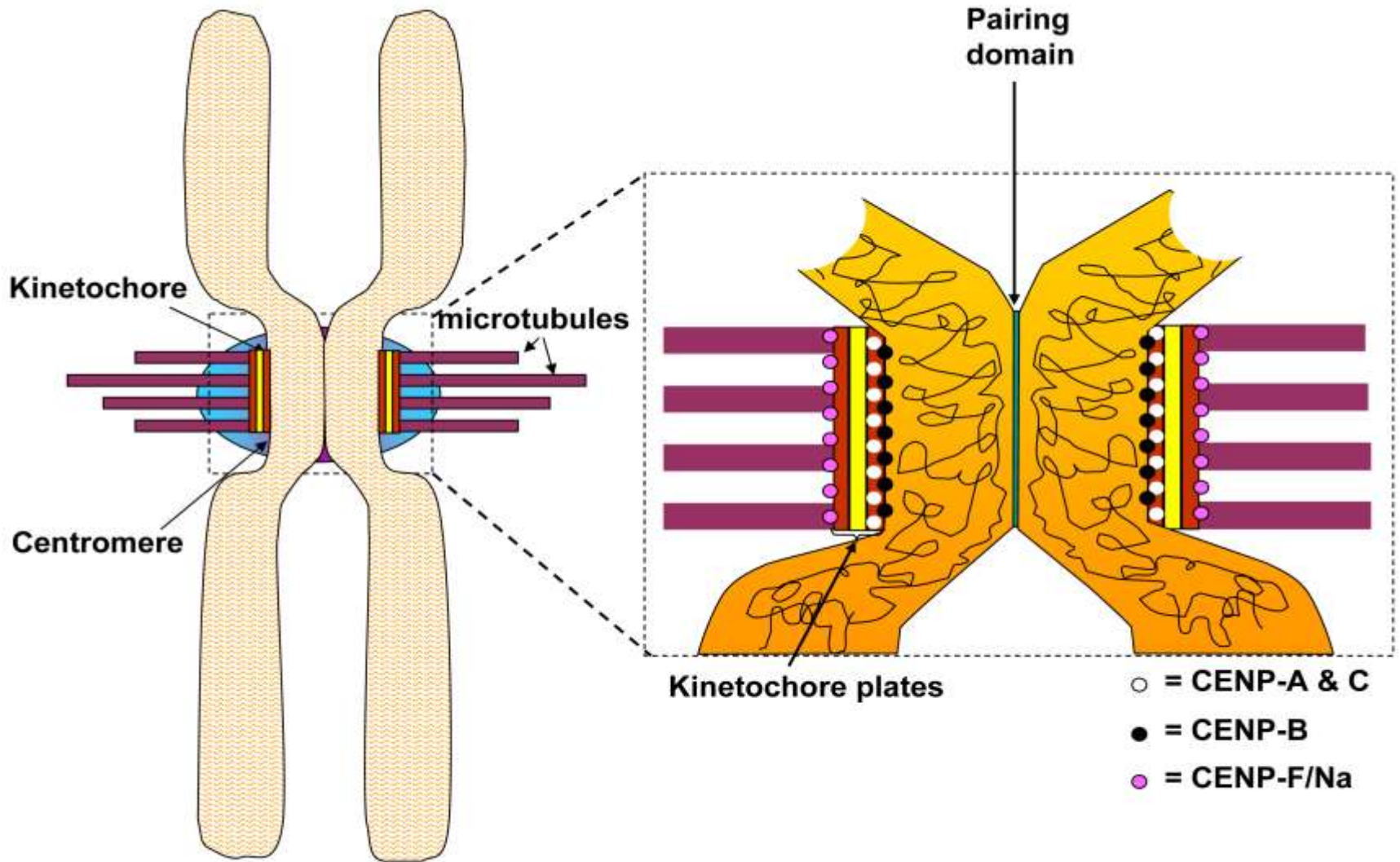
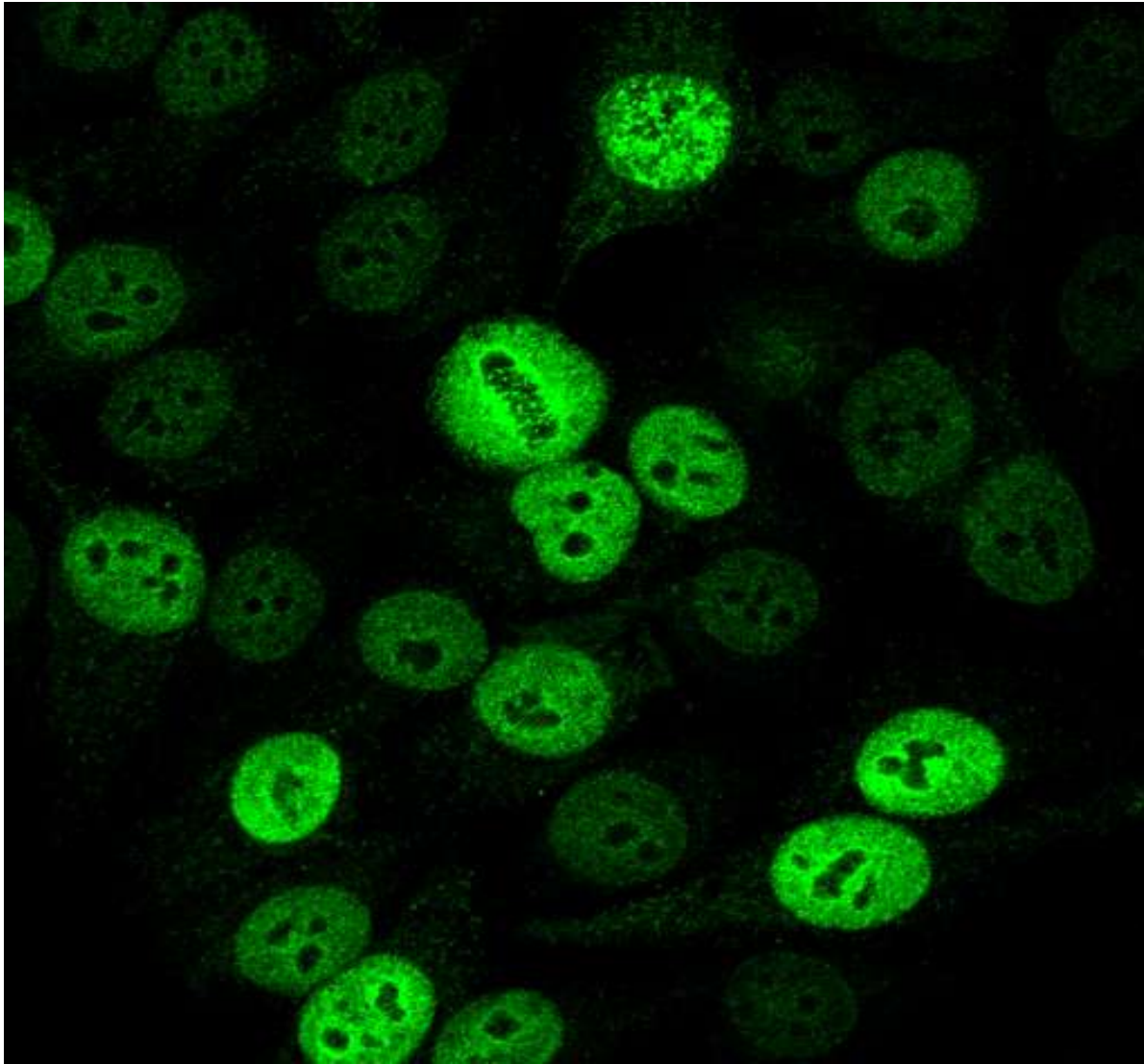


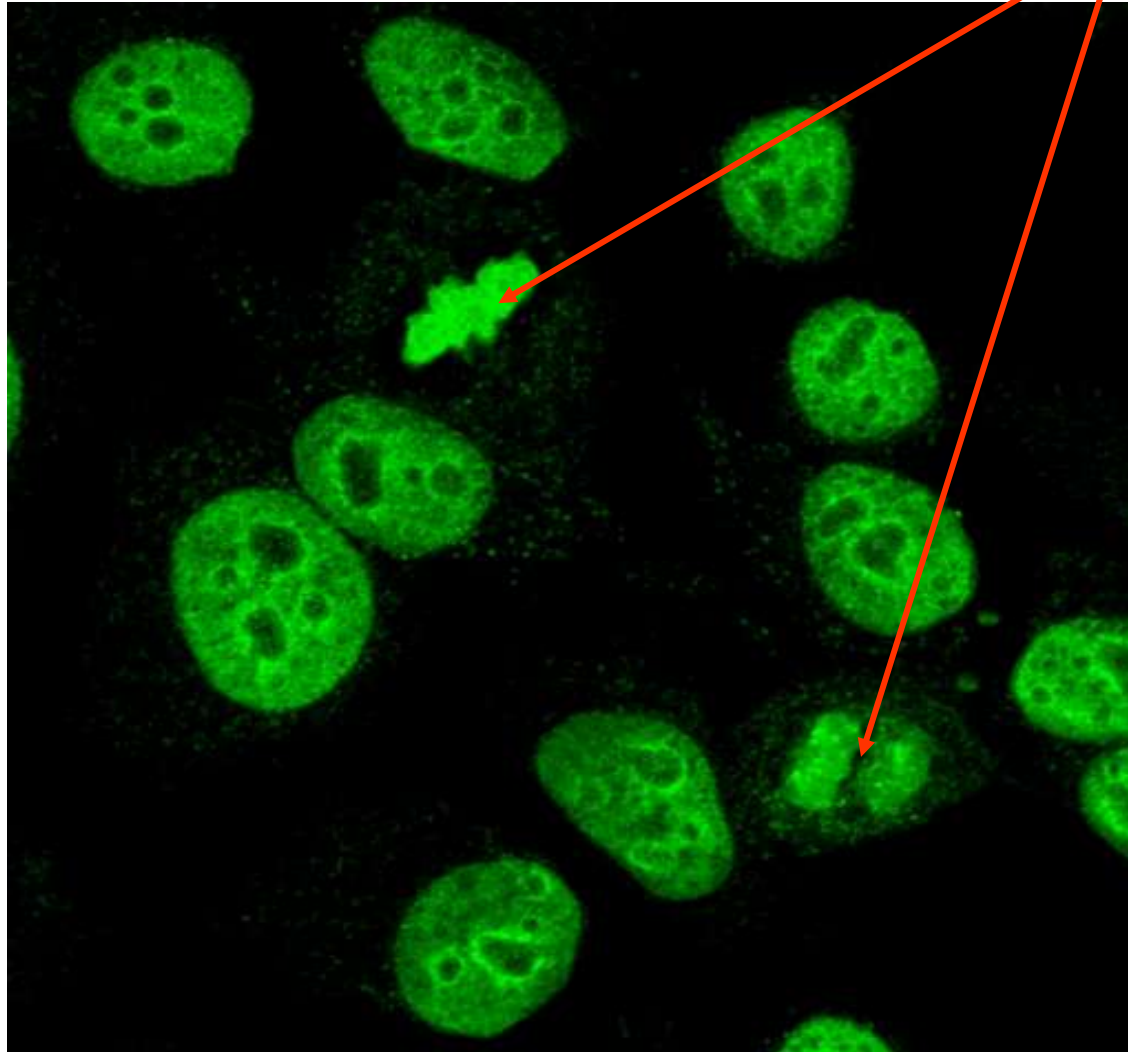
Diagram showing the location of the centromere proteins. The location of CENP-D is not clearly defined.

# ANA (IFI HEp-2): Positivo 1/2560 pattern PCNA



Fine speckled PCNA pattern showing variable staining of interphase nuclei.

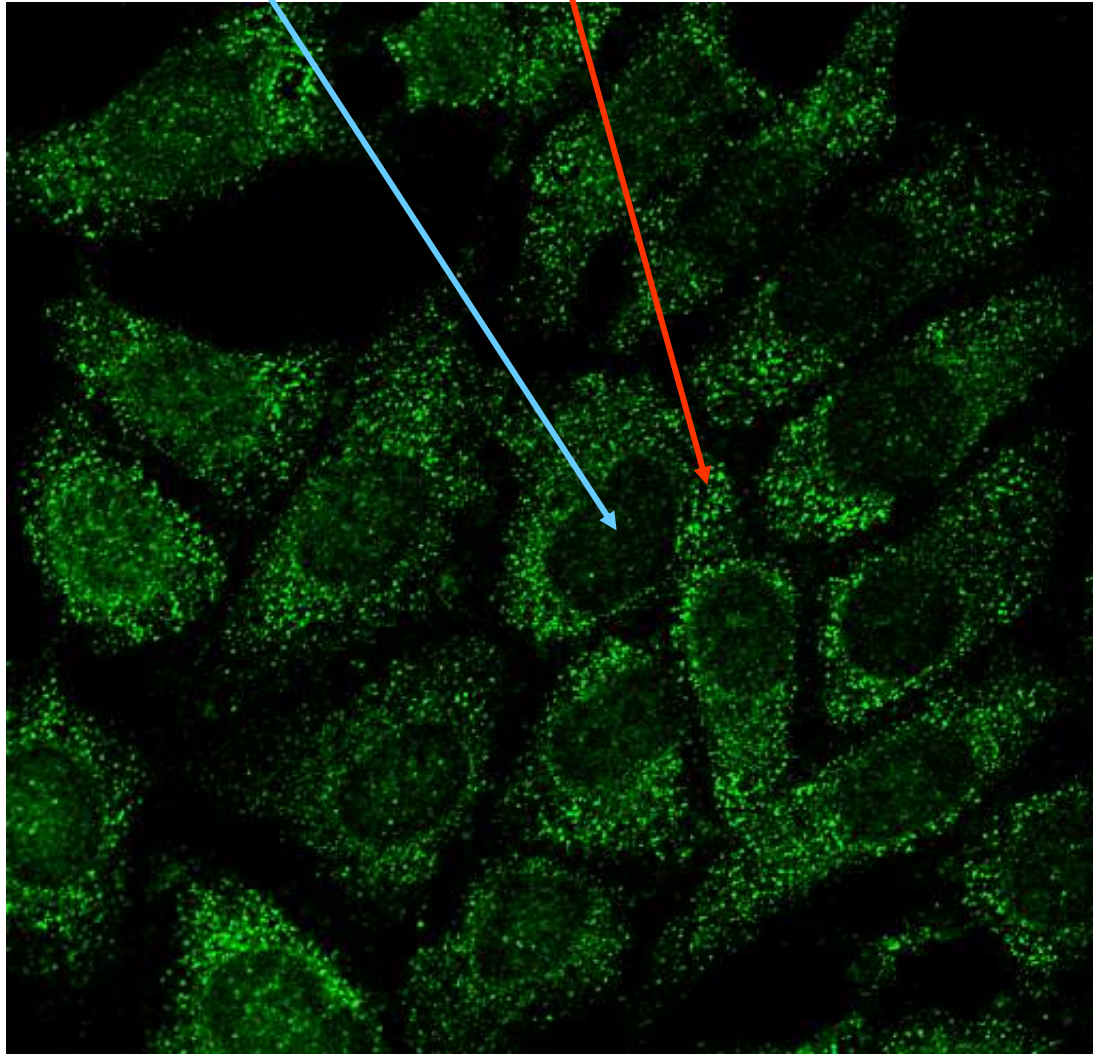
ANA (IFI HEp-2): Positivo 1/1280 pattern omogeneo



Sci-70 staining with no nucleolar staining.



ANA (IFI HEp-2): **Negativo**; Positivo 1/1280 pattern citoplasmatico



Fine cytoplasmic speckling, autoantibodies to Jo-1.

# Anti-antigeni nucleari estraibili (ENA)

Sm

Sm/RNP

SSA/Ro

SSB/La

Scl-70

Jo-1

Metodi: **EIA**, Immunoblot, ...

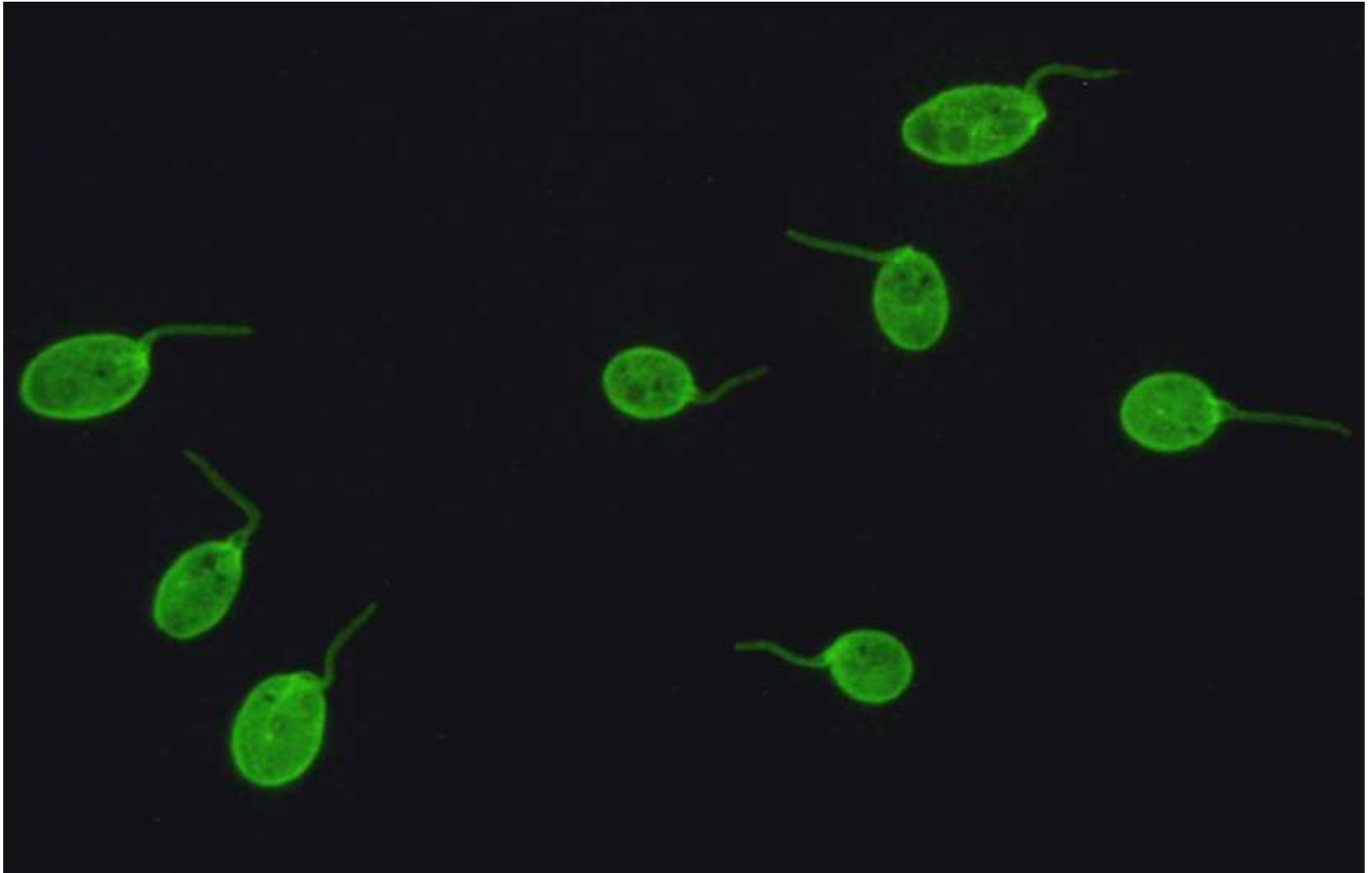
# Anticorpi anti-DNA nativo (nDNA)

- Autoantigene in SLE
  - Specificità 90%
  - Sensibilità 70% in pazienti con SLE attivo
    - » Titolo correla con attività della malattia
- Metodi di dosaggio
  - Tecnica di Farr metodo radioimmunologico (test di riferimento)
  - IFI su *Crithidia luciliae*
  - EIA

# Anticorpi anti-DNA nativo (nDNA) test IFI

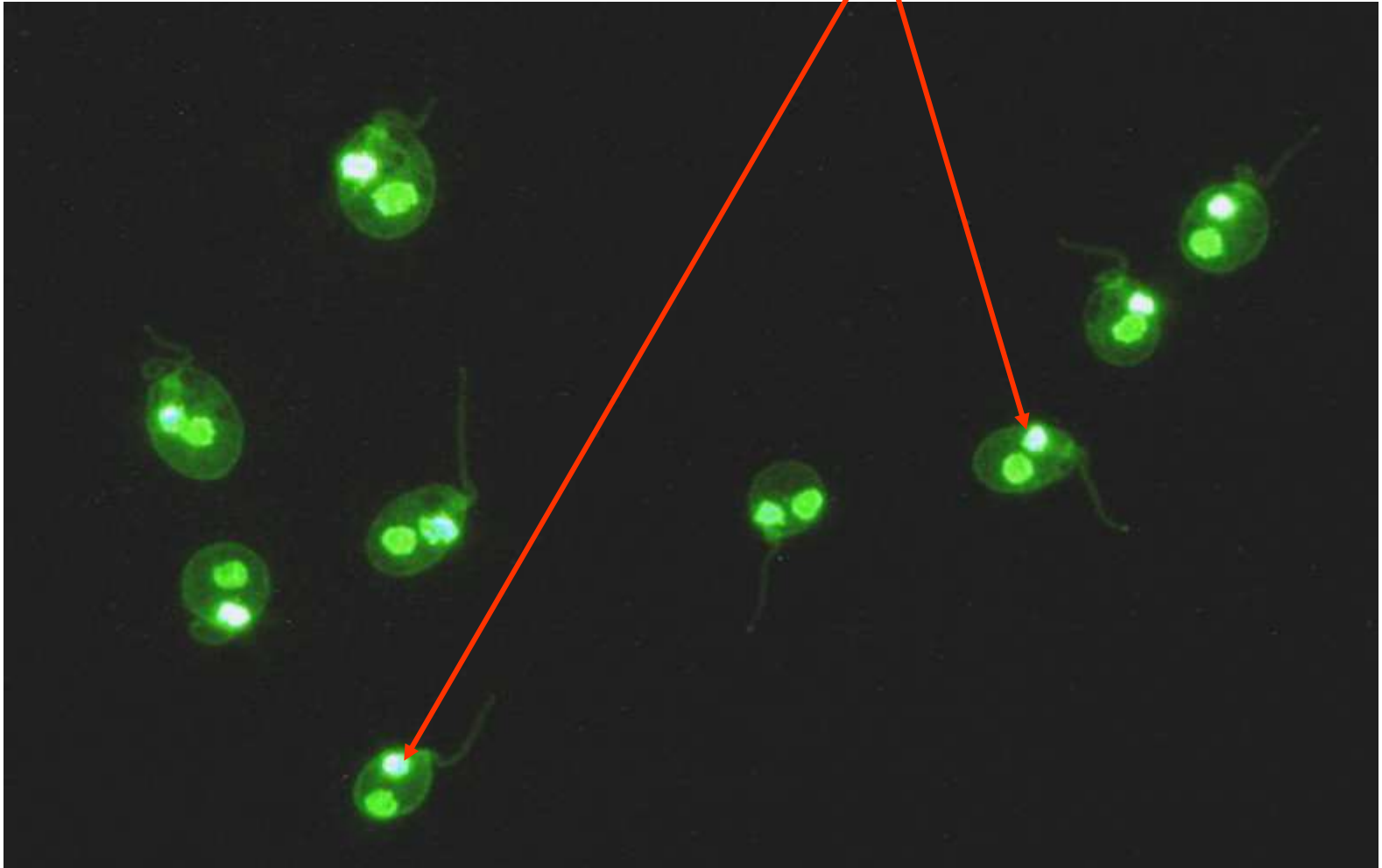
- Substrato: ***Crithidia luciliae***  
protozoo monoflagellato con un mitocondrio gigante (cinetoplasto) che contiene alta concentrazione dsDNA
- Metodo semiquantitativo
- Risultato positivo titolo > 1:160 suggestivo per LES in fase attiva
- Test **altamente specifico**
- Evidenza **anticorpi a media e alta avidità**

**nDNA (IFI *Crithidia luciliae*): Negativo**



Negative sample on *Crithidia luciliae* showing no discernible staining of the nucleus and kinetoplast.

nDNA (IFI *Crithidia luciliae*): **Positivo 1/160**



*Crithidia luciliae* showing staining of dsDNA in the kinetoplast and more faintly, in the nucleus.

# Anticorpi anti-DNA nativo (nDNA) test EIA

- Rileva anche anticorpi a bassa avidità
  - presenti in patologie diverse dal LES
- Più sensibile rispetto al test IFI
- Meno specifico rispetto al test IFI
- Test quantitativo
  - Calibratore WHO/ISP Wo/80
- Monitoraggio del LES

# Fattore Reumatoide (RF) e anticorpi anti-citrullina (CCP)

- **RF** anticorpi anti-Fc IgG
  - Prevalentemente IgM
- **Anti-CCP** anticorpi anti-peptide citrullinato ciclico



# Fattore Reumatoide condizioni associate

<u>Malattie reumatiche</u>	%
Artrite reumatoide	75
Sindrome di Sjögren	70
LES	30
Sclerodermia	20
Polimiosite	20
Connettivite mista	25
Artrite cronica giovanile	15

<u>Altre</u>	
Crioglobulinemia	70
M. di Waldenström	30
Plasmocitoma	30
Epatopatie croniche	25
Fibrosi polm. prim.	25
Sarcoidosi	10
Silicosi	5
Trapianto renale	5

<u>Malattie infettive</u>	%
Endocardite batt.sub	40
Epatite virale	25
Lebbra	25
Tubercolosi	15
Sifilide	10
Brucellosi	5
Mononucleosi	5
Salmonellosi	5
Malaria	5
Influenza	5
Leishmaniosi	5

<b>Soggetti sani</b>	<b>&lt;5</b>
<b>Soggetti &gt; 60 anni</b>	<b>15</b>

# RF e Artrite Reumatoide (RA)

Sensibilità diagnostica: 75-80%

Specificità diagnostica: 80%

Valore Predittivo Positivo aumenta se:

- alto titolo
- positività confermata in dosaggi successivi

# Anticorpi anti-CCP e RA

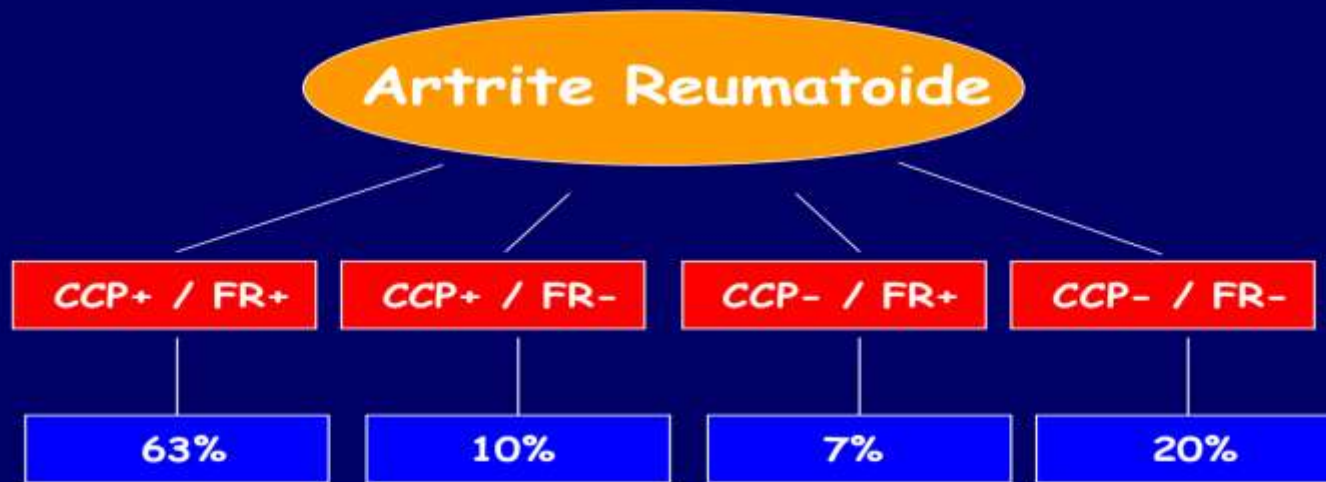
- Sensibilità diagnostica: 80%
- Specificità diagnostica: 97%
- Valore Predittivo Positivo aumenta per alte concentrazioni
- Presenza all'esordio fattore prognostico sfavorevole
- Contemporanea positività RF e anti-CCP

Valore Predittivo Positivo ~ 100%

- Non utili per il monitoraggio della terapia
- Utili nella diagnosi differenziale tra RA e altre patologie RF positive

# Anti-CCP e RF: confronto

## PREVALENZA DI CCP E FR NELL'AR



(Bizzaro N, v Venrooij WJ, Riv Med Lab 2002)

# **Marcatori immunologici nella diagnosi di RA RF-IgM + anti-CCP**

- **RF-IgM**
  - Scopo diagnostico
  - Scopo prognostico
  - Non per monitorare la terapia
  - Isotipi IgG e IgA per ricerca
- **Anti-CCP**
  - Scopo diagnostico
  - Diagnosi differenziale
  - Scopo prognostico

# Anticorpi anti-fosfolipidi

- **Anticorpi IgG, IgM anti-cardiolipina (aCL)**
- **Anticorpi IgG, IgM anti- $\beta$ 2 glicoproteina I (anti- $\beta$ 2GPI) (cofattore)**

## Lupus anticoagulants

Immunoglobuline che prolungano i test di coagulazione fosfolipidi dipendenti

# aCL e associazioni cliniche

- **Sindrome da anticorpi anti fosfolipidi (APS) 80-90%**
  - Alti titoli IgG e IgM (>40 GPL o MPL) sono associati a trombosi e aborti
- **SLE 12-30%**
- Parenti di primo grado dei pazienti SLE/APS
- Malattie infettive (epatite, malaria..) a titoli bassi e transitorie
- Controlli giovani sani 1-5%
- Altre malattie autoimmuni

# anti- $\beta$ 2GPI e associazioni cliniche

- **Sindrome da anticorpi anti fosfolipidi (APS) 98%**
  - 3-10% dei pazienti sono solo anti- $\beta$ 2GPI positivi
  - Più sensibili degli aCL in diagnosi APS
- **SLE 11-39%**
- Malattie infettive (epatite, malaria..)



# Sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS)

## 1 criterio clinico + 1 criterio laboratorio

### Criteri clinici

- **Trombosi vascolare**
  - trombosi arteriose venose
- **Complicanze gravidiche**
  - 1 o più feti normali morti dopo 10° sett
  - 1 o più nati pretermine (prima della 34° settimana) morfologicamente normali
  - 3 o più aborti consecutivi

### Criteri di laboratorio

- **aCL IgG e/o IgM** positivi in 2 o più occasioni a titolo medio alto (>40 GPL o MPL) a distanza di almeno 12 settimane
- **anti-β2GPI IgG o IgM** positivi in 2 o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane
- **Lupus anticoagulant (LA)** presente in 2 o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane

International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome

*J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306

# Anticorpi anti - citoplasma neutrofili (ANCA)

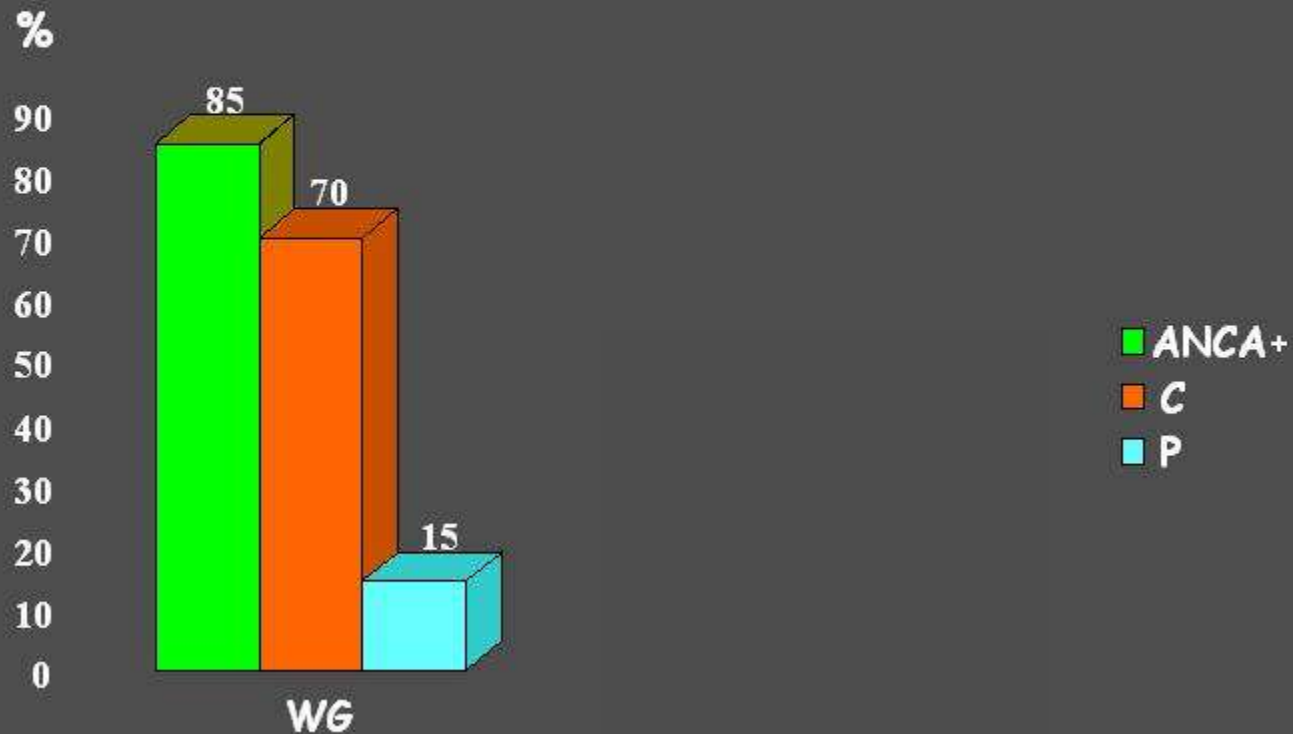
- IFI
  - Pattern c-ANCA citoplasmatico granulare
  - Pattern p-ANCA nucleare/perinucleare
  - Pattern atipico
- EIA
  - PR3 proteinasi 3 (granuli azzurrofilari)
  - MPO mieloperossidasi (granuli azzurrofilari)

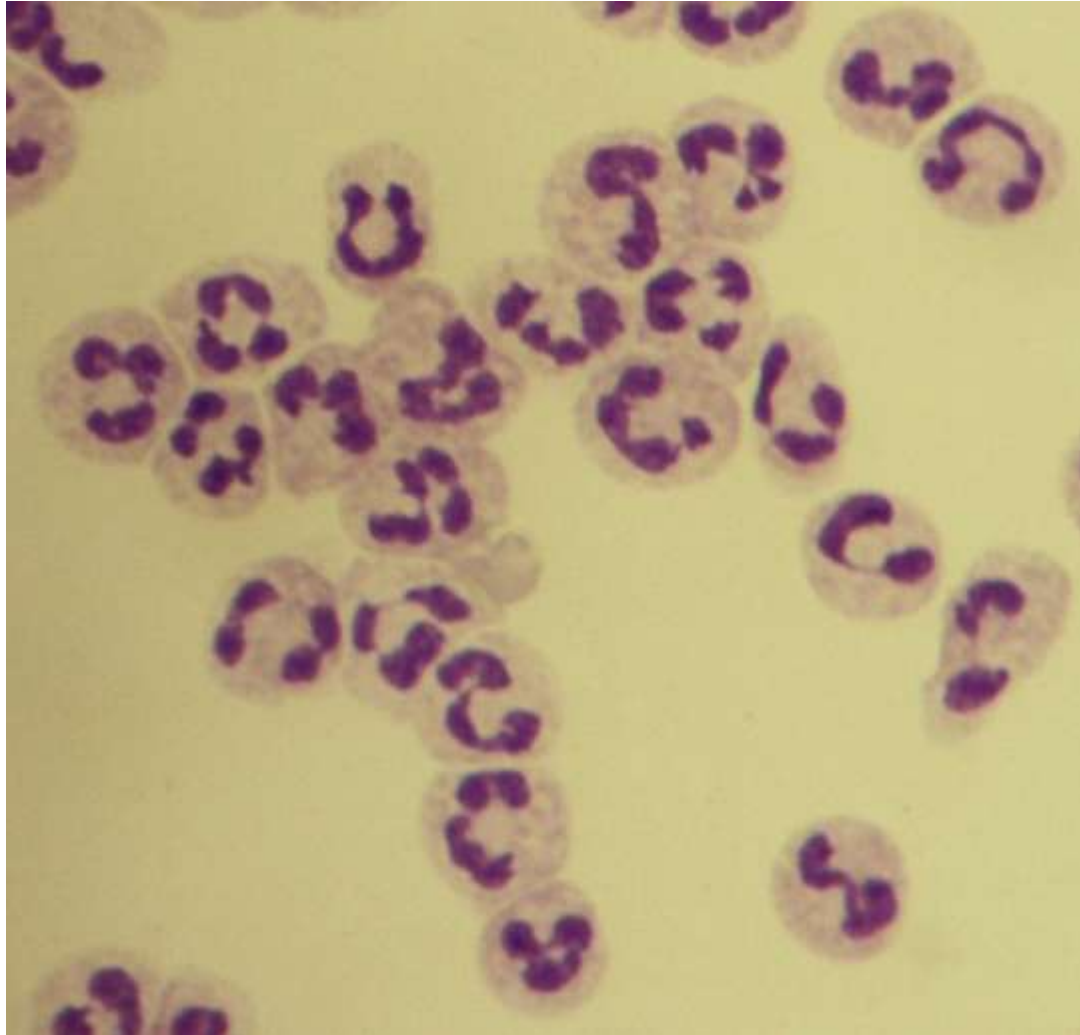
## MALATTIE ANCA -ASSOCIATE

	ANCA positività (%)	antigene bersaglio
<b>Vasculiti sistemiche</b>		
1. Granulomatosi di Wegener	C-ANCA > (85-90%) P-ANCA >	PR3 (80-90%) MPO (10-20%)
2. Poliangiite microscopica	C-ANCA > (80-85%) P-ANCA >	PR3 (20%) MPO (80%)
3. Sindrome di Churg Strauss	P-ANCA > (50%) C-ANCA >	PR3 (30-40%) MPO (60-70%)
4. Poliarterite nodosa classica	P-ANCA (10%)	MPO (90%)
<b>Glomerulonefrite necrosante pauci-immune idiopatica</b>		
	C-ANCA > (80%) P-ANCA >	PR3 (20%) MPO (80%)
<b>Malattie reumatiche</b>		
1. Artrite reumatoide	GS-ANA, P-ANCA, ANCA atipici (30% ?)	LF, sconosciuto
2. Lupus Eritematoso Sistemico	P-ANCA (< 20%)	LF, ELA, MPO
<b>Malattie infiammatorie intestinali croniche</b>		
1. Colite ulcerosa	P-ANCA (50-80%)	sconosciuto
2. Morbo di Crohn	P-ANCA (< 10%)	sconosciuto
<b>Altre malattie</b>		
1. Epatite cronica autoimmune	P-ANCA	sconosciuto
2. Infezioni	ANCA ?	sconosciuto

PR3 = proteinasi 3 ; MPO = mieloperossidasi ; LF = lattoferrina ; ELA = elastasi

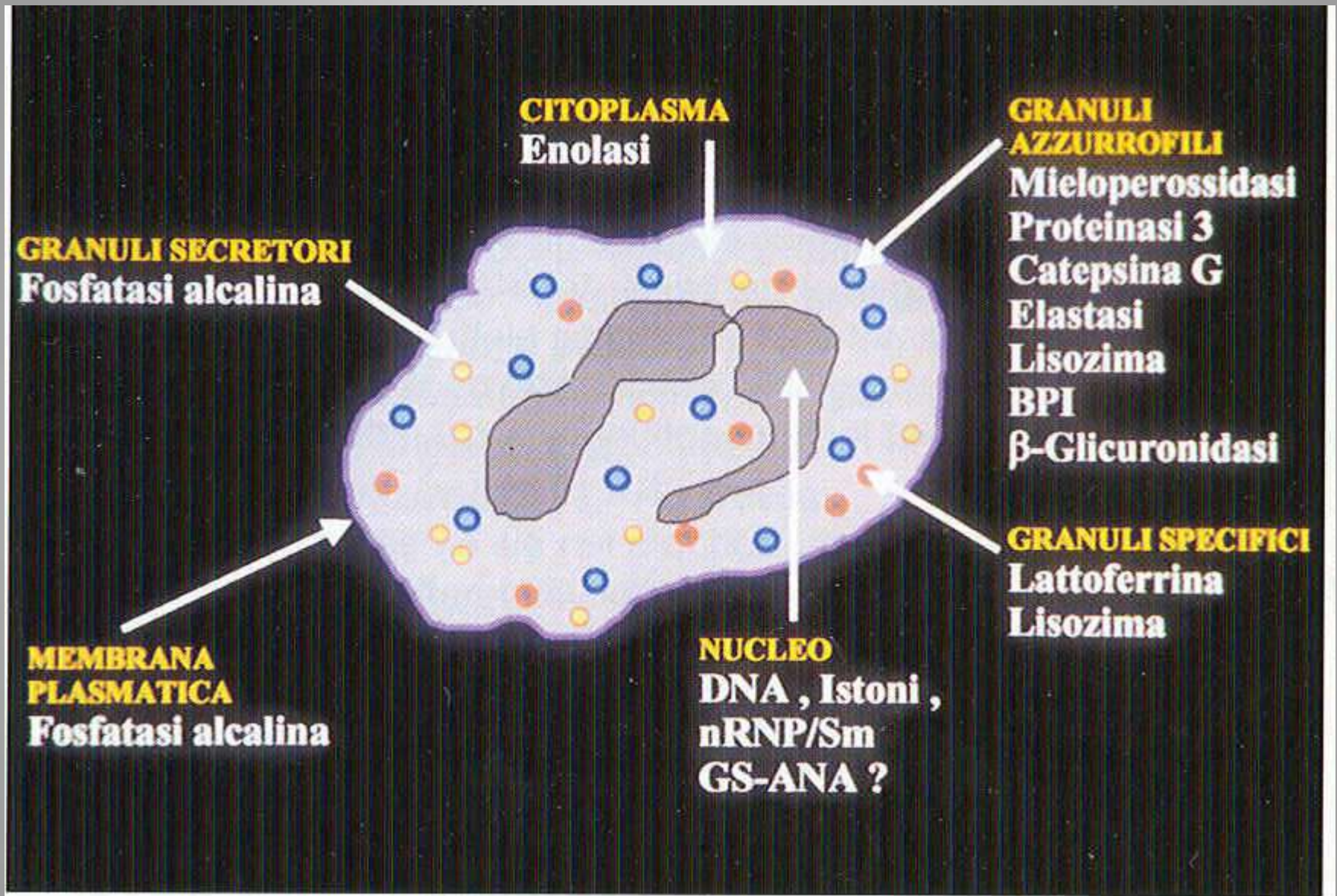
## PREVALENZA DEGLI ANCA NELLA GRANULOMATOSI DI WEGENER





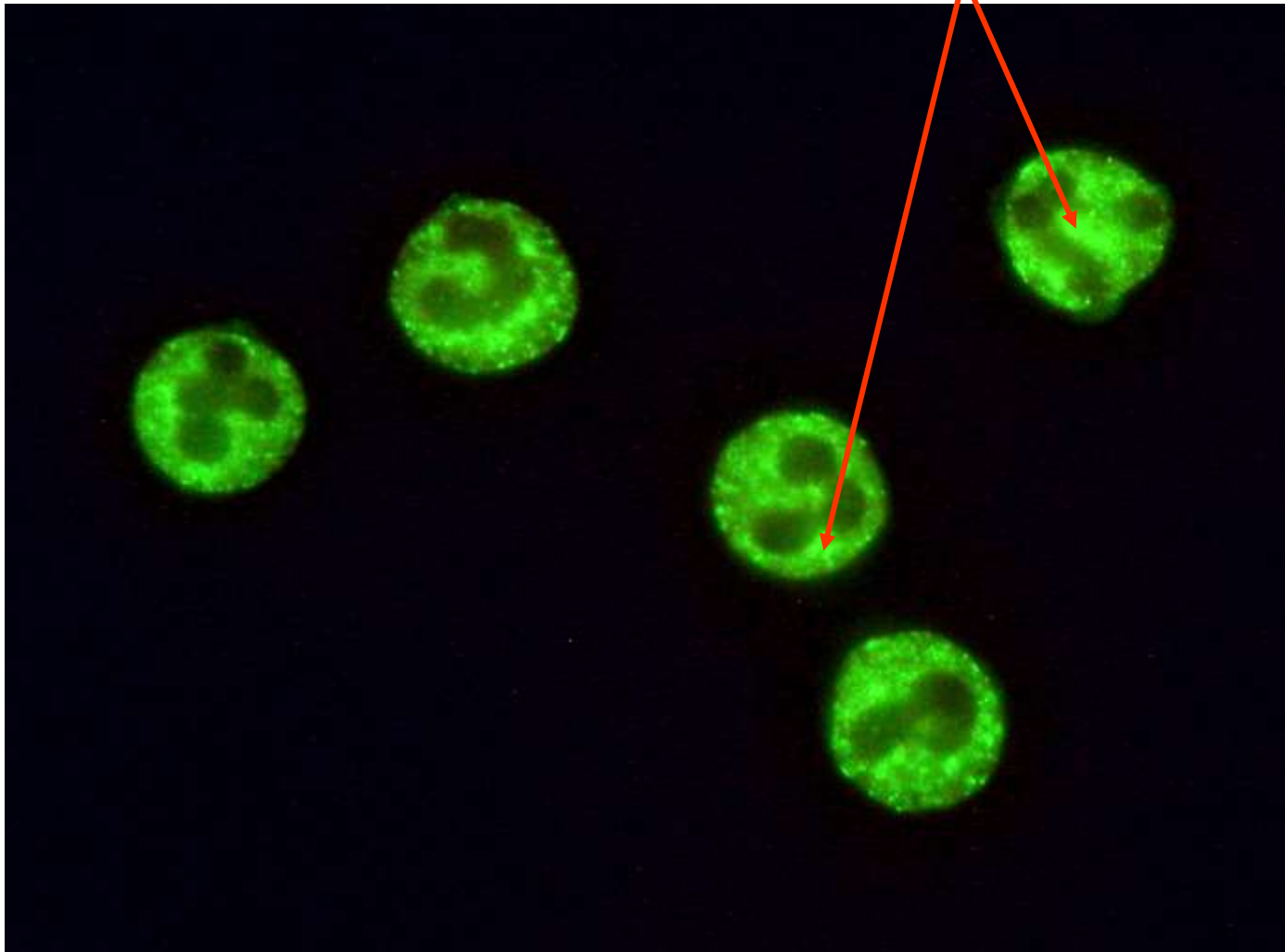
Highly purified neutrophils isolated from peripheral blood. Neutrophils are stained using the Giemsa (Ramonowski) staining method. The image was taken at 40X magnification.





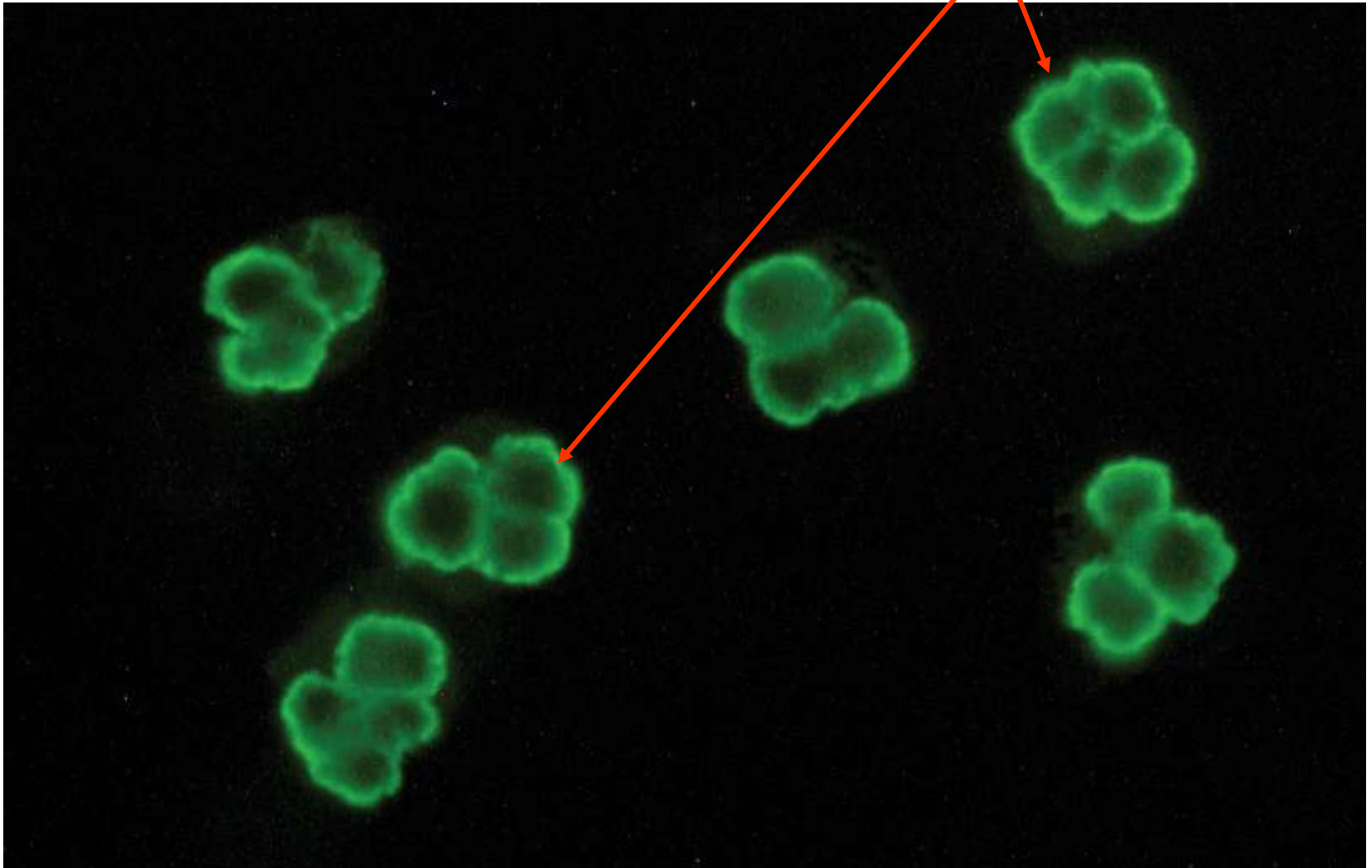
Contenuto dei granuli e strutture subcellulari dei neutrofili

# ANCA (IFI granulociti): Pattern C-ANCA



Ethanol-fixed neutrophils stained with anti-PR3 antibodies, producing the characteristic C-ANCA pattern of cytoplasmic granular fluorescence with central interlobular accentuation.

# ANCA (IFI granulociti): Pattern P-ANCA



Ethanol-fixed neutrophils stained with anti-MPO antibodies, producing the characteristic P-ANCA pattern of perinuclear fluorescence with nuclear extension.



# Inflammatory Bowel Disease (IBD)

- ANCA con pattern perinucleare atipico (**P-ANCA atipici**)
- Anticorpi IgG IgA anti-Saccharomyces cerevisiae (**ASCA**)

# P-ANCA atipici

Identificano come epitopo la porzione interna membrana nucleare a livello degli istoni tipo 1

MPO negativo

PR-3 negativo

ANA negativo

- **60-70% pazienti con rettocolite ulcerosa (UC)**
- **20% pazienti con morbo di Crohn**

# ANCA (IFI granulociti): Pattern P-ANCA atipico



Atypical ANCA binding ethanol-fixed neutrophils.

# ASCA

identificano epitopi glicoproteina 200 kDa della parete cellulare di saccaromiceti

- **50-70% pazienti con morbo di Crohn (CD)**
- **50% pazienti con morbo celiaco**
  - alterata permeabilità della mucosa intestinale
- **IgG IgA alto titolo aumentano specificità del test**

# **IBD: P-ANCA + ASCA**

## **Rettocolite ulcerosa**

**pANCA positivo/ASCA negativo:**

- Sensibilità 56%
- Specificità 92%
- Valore predittivo positivo 95%

## **Morbo di Crohn**

**pANCA negativo/ASCA positivo:**

- Sensibilità 44%
- Specificità 98%
- Valore predittivo positivo 88%

# Autoanticorpi – rilevanza clinica considerazioni

sensibilità diagnostica - specificità diagnostica

- alta specificità, bassa sensibilità (Sm – SLE)
- alta sensibilità, bassa specificità (Ro/SSA – sindrome di Sjögren)
- autoanticorpi attivi nella patogenesi (Proteinasi-3 – granulomatosi di Wegner)  
alta specificità e sensibilità alta solo in fase attiva della malattia  
Il titolo correla con attività della malattia
- **autoanticorpi inseriti nei criteri di classificazione della malattia**  
(RF per AR, aCL per APS)

# Malattie autoimmuni - Diagnosi

Sospetto clinico

Richiesta esami appropriati

**Indagini di laboratorio**

**test di 1° livello**

**test di approfondimento**

Valutazione critica dei risultati

## Pattern ANA in relazione alla diagnosi e agli autoantigeni riconosciuti

Diagnosi	Homogeneous or fine grainy nuclear	Speckled nuclear	Centromere Kinetochores	Nuclear patterns	Cytoplasmic pattern	ANA Negative
<b>SLE</b>	dsDNA(h) Nucleosomes(h) Ku(g)	Sm / U1RNP(cs) SSA(Ro)/SSB(La) (fs) hn RNPsl(cs)	rare	Nucleolin (h) ASE-1 (h)	P-proteins (d) SSA-56 (d)	SSA (Ro)
<b>Systemic sclerosis Raynaud's syndrome</b>	Topoisomerase I (g) RNA polimerase II, III Ku(g)	U1RNP (cs) U2RNP (cs)	CENP-A,B,C	PM/scl (h) Th/to (h) Fibrillarin (cl) RNA polimerase I (p) NOR-90 (p)	Rare	SSA (Ro)
<b>Poly/dermatomyositis</b>	Ku (g)	Mi-2 (fs) SSA(Ro)-52 U1RNP(cs)	rare	PM/scl (h)	SRP (d) Jo-1 (fs)	Jo-1
<b>Sjögren's syndrome</b>	rare	SSA(Ro) (fs) SSB(La) (fs)	CENP-A,B,C	Nucleolin (h)	SSA-56 (d)	SSA (Ro)
<b>Mixed connective tissue disease</b>	rare	U1RNP (cs) hnRNPs(l) SSA(Ro) (fs)	rare	rare	rare	rare
<b>APS</b>	*	*	rare	B23	rare	Anti-cardiolipin Lupus anticoagulant

\* depends on primary disease, mostly SLE

cl, clumpy; cs, coarse; d, diffuse; fs, fine speckled; g, grainy; h, homogeneous; l, large; p, punctate