

# La ricerca degli autoanticorpi nelle malattie autoimmuni sistemiche del bambino

A cura della Commissione di Immunologia della SIAIP

Silvana Martino<sup>1</sup>, Carlo Capristo<sup>2</sup>, Fabio Cardinale<sup>3</sup> (coordinatore), Michele Fiore<sup>4</sup>, Baldassarre Martire<sup>5</sup>, Viviana Moschese<sup>6</sup>, Annarosa Soresina<sup>7</sup>



Parole chiave: malattie autoimmuni, autoanticorpi, anticorpi antinucleo

## Abstract

Le malattie autoimmuni sono in aumento nella popolazione generale, sia per un effettivo incremento in prevalenza sia per un miglioramento degli strumenti diagnostici, nell'ambito dei quali il laboratorio gioca un ruolo fondamentale. La ricerca degli autoanticorpi è parte integrante dei criteri sia classificativi che di remissione di molte malattie autoimmuni. È tuttavia da ricordare che, nonostante rivestano una indubbia utilità, questi test non risultano di per sé diagnostici, e che i risultati vanno sempre integrati con le rimanenti informazioni di ordine anamnestico, clinico e strumentale. La determinazione degli autoanticorpi va, quindi, eseguita soltanto in caso di forte sospetto di malattia autoimmune, e non come screening per pazienti privi di segni clinici suggestivi, in quanto una bassa positività è di frequente riscontro in soggetti non affetti da malattie autoimmuni o anche in individui sani.

## Malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni si distinguono in forme organo-specifiche ed in forme sistemiche. Le malattie autoimmuni organo-specifiche sono mediate da meccanismi immunopatologici che portano alla progressiva distruzione di un bersaglio tissutale attraverso autoanticorpi diretti verso uno o pochi antigeni peculiari di quel bersaglio, mentre il resto dell'organismo non è direttamente coinvolto dal processo autoimmune. Le malattie

autoimmuni non organo-specifiche o sistemiche sono scatenate dal riconoscimento immunologico di strutture molecolari e cellulari self non organo-specifiche e sono caratterizzate da lesioni infiammatorie diffuse a numerosi organi ed apparati.

La grande maggioranza delle malattie autoimmuni è accompagnata dalla presenza di autoanticorpi, i quali rappresentano, quindi, marcatori fondamentali per la diagnosi (e a volte per la prognosi).

<sup>1</sup> Ospedale Regina Margherita, Università di Torino; <sup>2</sup> Dipartimento di Pediatria, Seconda Università di Napoli; <sup>3</sup> Struttura Complessa di Medicina e Pneumo-Allergoimmunologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Policlinico-Giovanni XXIII", Bari; <sup>4</sup> Pediatra di Libera Scelta, Consigliere Nazionale FIMP, Genova; <sup>5</sup> Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Policlinico-Giovanni XXIII", Bari; <sup>6</sup> Policlinico Tor Vergata, Università Tor Vergata, Roma; <sup>7</sup> Clinica Pediatrica, Università di Brescia

Con la collaborazione di Maria Ceci

A seconda delle caratteristiche funzionali, gli autoanticorpi possono essere considerati:

- **marcatori patogenetici** perché correlano con la malattia e con il suo andamento clinico e sono in grado di indurre in vivo e in vitro le alterazioni tipiche
- **marcatori non patogenetici** perché non sono in grado di provocare la malattia e possono essere presenti in soggetti sani, molti dei quali non svilupperanno mai malattie autoimmuni
- **epifenomeni** perché appaiono in modo transitorio e si producono in seguito alla liberazione di autoantigeni (traumi chirurgici, necrosi o flogosi).

### Anticorpi antinucleo

Gli anticorpi antinucleo (ANA) rappresentano una vasta ed eterogenea popolazione anticorpale, soprattutto di classe IgG, diretta verso diversi componenti del nucleo cellulare (DNA, proteine ribonucleari, istoni, centromero). Sono considerati anticorpi non patogenetici e, quindi, fra le varie caratteristiche, includono quella di essere presenti in una certa quota di soggetti sani senza che questi sviluppino mai una malattia evidente a livello clinico<sup>1</sup>. È per questo motivo che gli ANA devono essere richiesti ed eseguiti solo in presenza di un consistente sospetto clinico di malattia autoimmune sistemica e non come screening di soggetti senza segni clinici, in quanto una bassa reattività ANA può essere rilevata in molti pazienti non reumatici (pazienti affetti da tubercolosi, endocardite batterica, da infezione da virus di Epstein-Barr, da neoplasia), in soggetti sani o in corso di trattamento con vari farmaci (procainamide, idralazina, isoniazide,

L'immunofluorescenza indiretta (IFI) è la tecnica più comunemente usata per la determinazione degli anticorpi anti-nucleo per le caratteristiche di sensibilità, facilità di esecuzione e basso costo.

penicillamina anticonvulsivanti, diltiazem, clorpromazina, metildopa)<sup>2</sup>.

Si ritiene, pertanto, che il solo metodo di immunofluorescenza rappresenti il gold standard per gli ANA test. Per l'esecuzione della tecnica IFI, come substrato, si raccomanda l'impiego di cellule epiteliali da carcinoma laringeo umano (HEPp-2), in cui siano garantite l'espressione e l'integrità degli antigeni clinicamente significativi.

Il risultato degli ANA va interpretato come positività o negatività rispetto alla diluizione di screening utilizzata. Il titolo anticorpale riporta l'ultima diluizione in cui il campione rimane positivo.

- Titoli inferiori a 1:40 vanno considerati negativi.
- Titoli superiori a 1:40 e inferiori a 1:160 vanno considerati bassi positivi; in assenza di sintomi specifici, il paziente deve essere sottoposto a monitoraggio nel tempo e non ad ulteriore approfondimento diagnostico.
- Titoli superiori a 1:160 sono da considerarsi positivi ed i pazienti vanno sottoposti ad approfondimento diagnostico, dal momento che è probabile siano affetti da malattia autoimmune<sup>2</sup>.

Anticorpi antinucleo a titolo di 1:40 sono presenti raramente in soggetti malati, e sono presenti in circa il 32% dei soggetti sani (alta sensibilità, bassa specificità).

Elevati titoli di autoanticorpi (> 1:160) sono presenti in molti soggetti malati, ma solo nel 5% dei soggetti sani (bassa sensibilità, alta specificità).

L'intensità dell'immunofluorescenza può essere anche espressa con una scala quantitativa di valori crescenti da + a ++++. Il pattern di fluorescenza, che indica la disposizione degli autoanticorpi evidenziati mediante un antisiero coniugato con fluoresceina sulla superficie del nucleo, viene distinto in: omogeneo, periferico, granulare (*speckled*), centromerico, nucleolare, pleomorfo, puntiforme. Mediante il pattern di fluorescenza è possibile indirizzarsi sul tipo di specificità autoanticorpale, che potrà essere identificato, in fasi successive, con altre metodiche. Unica associazione stretta tra tipologia del pattern e specificità anticorpale è rappresentata dagli anticorpi anti-centromero.

La determinazione degli anticorpi antinucleo può essere fatta anche con metodi immunoenzimatici in fase solida (ELISA). Tali test sono in grado di rilevare la presenza di autoanticorpi rivolti verso i principali autoantigeni, ma non presentano una sensibilità clinica del 100% e non sempre sono correlati con il metodo IFI. Può essere fatta la determinazione degli ANA in

**Tab. I. INSERIRE DIDASCALIA.**

Epatite autoimmune	Rappresentano uno dei criteri diagnostici
Lupus eritematoso sistemico	Rappresentano uno dei criteri diagnostici. Non sono altrettanto utili ai fini prognostici o di monitoraggio della malattia.
Lupus indotto da farmaci	Sono presenti nel 95% dei pazienti
Connettivite mista	Sono presenti nel 100% dei pazienti
Sindrome di Sjogren	Sono presenti nell'80-90% dei pazienti
Sclerodermia sistemica	Sono presenti nel 70-80% dei pazienti
Dermatomiosite	Sono presenti nel 10-50% dei pazienti
Artrite idiopatica giovanile	Sono presenti nell'80-90% dei pazienti con forma mono-pauciarticolare

ELISA come prima indagine di screening, ma i risultati positivi debbono essere confermati in IFI con specificazione del pattern e del titolo. I risultati discordanti (positivi in Elisa e negativi in IFI) devono essere considerati falsi positivi a meno che non vengano rilevati anticorpi anti SSA e Jo-1.

*La positività degli anticorpi antinucleo va, comunque, sempre interpretata nell'ambito di un preciso contesto clinico.*

*La determinazione degli ANA è, quindi, utile ai fini diagnostici, nelle malattie riportate nella Tabella I <sup>3-6</sup>.*

### **Anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili**

Gli anticorpi anti-antigene nucleare estraibile (ENA) sono anticorpi responsabili di una positività di tipo punteggiato (non centromerico) all'ANA test e sono diretti verso antigeni solubili, facilmente estraibili dal nucleo in soluzioni saline.

**La determinazione degli anticorpi antinucleo può essere fatta anche con metodi immunoenzimatici in fase solida (ELISA), ma tali test non presentano una sensibilità clinica del 100% e non sempre sono correlati con il metodo IFI.**

*Non si consiglia la determinazione degli ENA come prima indagine nella diagnosi delle malattie autoimmuni; essa è raccomandata solo in caso di positività degli ANA o, in caso di negatività, in presenza di segni clinici altamente suggestivi di malattia autoimmune sistemica (specialmente sclerosi sistemica e dermato/polimiosite) <sup>2</sup>. È consigliata come prima indagine la determinazione con metodo immunoenzimatico in fase solida (ENA screening); se lo screening ENA risulta positivo si procederà alla determinazione delle singole specificità anticorpali.*

Le singole specificità anticorpali degli anti ENA sono associate a condizioni cliniche differenti, riportate in Tabella II <sup>7-9</sup>:

### **Anticorpi anti-DNA**

Gli anticorpi anti-DNA nativo a doppia elica (double-stranded DNA, dsDNA) sono altamente specifici per il LES, con una sensibilità variabile dal 50 al 70%.

*Costituiscono il decimo criterio classificativo di LES secondo l'American College of Rheumatology (ACR) <sup>10</sup>. La ricerca di anti-dsDNA è, quindi, indicata in caso di sospetto clinico di LES ovvero in caso di positività degli ANA IFI ad un titolo uguale o superiore a 1:160 <sup>2</sup>.*

Il monitoraggio del titolo di questi autoanticorpi, nelle diverse fasi della malattia lupica, ha una precisa finalità clinica in quanto aumenta nelle fasi attive di malattia e scompare o si riduce di molto nelle fasi di remissione.

In fase diagnostica è consigliata la ricerca degli autoanticorpi anti-dsDNA con il metodo radioimmunologico (tecnica di Farr) o il metodo IFI su *Crithidia luciliae* per la elevata specificità. Una positività con metodo immunoenzimatico come primo screening va riconfermata con il metodo IFI <sup>2</sup>.

**Tab. II. INSERIRE DIDASCALIA.**

Anti-Sm	Alta specificità (99%), ma bassa sensibilità (15-30%) per il LES
Anti-U1 RNP	Alta sensibilità (95-100%) e alta specificità (100%) per la connettivite mista bassa sensibilità per il LES (30-40%)
Anti-SSA/Ro	Bassa specificità, sensibilità (60-70%) per la Sindrome di Sjogren; sensibilità (30-40%) per il LES. Nel sospetto di un LES con ANA test negativo, il dosaggio di questi autoanticorpi è il passaggio successivo; alti titoli in ELISA, soprattutto anti Ro52, sono un fattore di rischio per lupus neonatale
Anti SSB/La	Sensibilità (60-70%) e bassa specificità per la sindrome di Sjogren; bassa sensibilità per il LES
Anti-centromero	Bassa sensibilità (7%) e intermedia specificità per la sclerosi sistemica giovanile; alta specificità per la sindrome di CREST e il fenomeno di Raynaud nella sclerodermia
Anti topoisomerasi I (anti Scler-70)	Bassa sensibilità (35%) e alta specificità (99%) per la sclerosi sistemica giovanile
Anti-Jo-1	Bassa sensibilità (20-40%) e alta specificità (98%) per la polimiosite/dermatomiosite

### Anticorpi anti citoplasma dei neutrofili

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA), autoanticorpi diretti verso costituenti citoplasmatici dei granulociti neutrofili, sono considerati un utile marker sierologico per la diagnosi e il monitoraggio delle vasculiti primarie sistemiche, quali in particolare la granulomatosi di Wegener (GW), la poliangioite microscopica (PAM) e la sindrome di Churg-Strauss (SCS) <sup>11-13</sup>. Per la determinazione di questi autoanticorpi si usa la metodica IFI alla quale si associa il test di conferma in ELISA antigene specifico. La combinazione dei due test aumenta la specificità fino a raggiungere quasi il 100% per la diagnosi di vasculiti sistemiche primitive.

Si riconoscono due pattern fluoroscopici:

- **C-ANCA:** colorazione citoplasmatica granulare diffusa. Questo pattern è associato nel 90-95% dei casi alla presenza di autoanticorpi specifici per la PR3-ANCA. Sono frequenti nei pazienti con GW.
- **P-ANCA:** colorazione perinucleare e/o nucleare causata nell'80% circa dei casi dalla presenza di MPO-ANCA. Sono frequenti nei pazienti con PAM e SCS, malattie croniche intestinali e colangite sclerosante.

La determinazione di questi autoanticorpi non trova indicazione per altre forme di vasculite di maggiore frequenza in età pediatrica quali la sindrome di Schonlein-Henoch o la malattia di Kawasaki.

### Anticorpi antifosfolipidi

Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) sono un gruppo di autoanticorpi diretti contro i diversi componenti del

gruppo anionico dei fosfolipidi quali la cardiolipina, la fosfatidilserina e l'acido fosfatidico. I fosfolipidi sono molecole presenti ovunque nell'organismo, ma rivestono un ruolo importante particolarmente nella coagulazione del sangue. Gli aPL includono:

- anticorpi anticardiolipina (aCL)
- anti beta2-glicoproteina I (anti- $\beta_2$  GPI)
- lupus anticoagulante (LAC).

La suddivisione in questi tre sottogruppi di anticorpi è basata sul metodo di determinazione, poiché i primi due sono test immunologici che misurano rispettivamente la reattività ai fosfolipidi per gli aCL e alle proteine leganti i fosfolipidi per gli anti- $\beta_2$  GPI. Il LAC è, invece, determinato mediante un test coagulativo, nel quale si valuta la sua capacità di determinare un allungamento dei tempi di coagulazione <sup>14</sup>.

La presenza di anticorpi aPL è utile nel sospetto clinico di LES perché costituisce uno dei criteri classificativi <sup>10</sup>. Tali autoanticorpi sono strettamente associati alla sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) <sup>15</sup> primaria o secondaria ad altre patologie autoimmuni (in partico-

**Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono considerati un utile marker sierologico per la diagnosi e il monitoraggio delle vasculiti primarie sistemiche.**

lare il LES). In età pediatrica la forma primitiva di APS è rara.

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi è caratterizzata da trombosi e/o poliabortività e dalla positività degli aPL (positività di LAC in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane o positività degli aCL o anti beta2-glicoproteina I, presenti a titolo elevato e in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane)<sup>16</sup>.

### Fattore reumatoide

Il fattore reumatoide (FR) è un anticorpo diretto contro la porzione Fc delle IgG. Esistono FR di tipo IgM, IgG, IgA, IgE, ma il FR di tipo IgM è quello abitualmente ricercato in laboratorio<sup>17</sup>. Esistono vari metodi di determinazione:

- test al lattice (RA test positivo per diluizione  $\geq 1:40$ )
- test di agglutinazione di emazie di montone (reazione di Waaler-Rose positiva per diluizioni  $> 1:64$ )
- metodo nefelometrico con valori espressi in Unità Internazionali
- metodo ELISA

Il test in ELISA è più sensibile e specifico e riconosce FR di tutti gli isotipi.

Il FR si riscontra nell'85% degli adulti con artrite reumatoide ma solo nel 5-10% dei bambini con artrite idiopatica giovanile (forma poliarticolare FR positiva), pertanto, *non può essere utilizzato come test di screening per l'artrite idiopatica giovanile*. La presenza di FR nell'artrite sia dell'adulto che del bambino ha un significato prognostico importante in quanto si associa ad una malattia più aggressiva a livello articolare.

È da sottolineare che il FR è presente nel 5% della popolazione sana e anche in altre malattie reumatologiche, quali LES (10-30%), sclerodermia (25-45%), crioglobulinemia mista (40-100). La ricerca del FR può risultare positiva anche nel corso di malattie infettive quali endocardite, tubercolosi, sifilide, malattie virali e malattie tumorali<sup>17</sup>.

### Anticorpi anti peptide citrullinato ciclico

Si tratta di anticorpi diretti contro il peptide citrullinato ciclico (CCP) la cui produzione avviene nel tessuto sinoviale infiammato. La determinazione avviene mediante tecniche immunoenzimatiche. Sono altamente specifici (89-98%) e sensibili (41-86%) per l'artrite

reumatoide dell'adulto, mentre soltanto pochi bambini con artrite idiopatica giovanile FR positivo presentano anticorpi anti CCP. La presenza nelle fasi precoci della malattia presenta una possibile correlazione con il danno radiologico e quindi individua una percentuale di pazienti che ha bisogno di un trattamento più aggressivo<sup>17 18</sup>.

### Bibliografia

- 1 Tozzoli R, Bizzaro N, Villata D, et al. *Il laboratorio nelle malattie Reumatiche Autoimmuni*. Bologna: Editrice Esculapio 2007.
- 2 Tozzoli R, Bizzarro N, Tonutti E, et al. *Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases*. Am J Clin Pathol 2002;117:316-24.
- 3 Martini A. *Reumatologia pediatrica*. Torino: UTET 1996.
- 4 Perilloux BC, Shetty AK, Leiva LE, et al. *Antinuclear Antibody (ANA) and ANA profile tests in children with autoimmune disorders: a retrospective study*. Clin Rheumatol 2000;19:200-3.
- 5 Cassidy TJ, Petty ER. *Textbook of Pediatric Rheumatology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 2001.
- 6 McGhee JL, Kickingbird LM, Jarvis JN. *Clinical utility of antinuclear antibody tests in children*. BMC Pediatr 2004;4:13.
- 7 Damoiseaux JG, Tervaert JW. *From ANA to ENA: how to proceed?* Autoimmun Rev 2006;5:10-7.
- 8 Keith MP, Moratz C, Tsokos GC. *Anit-RNP immunity: implication for tissue injury and the pathogenesis of connective tissue disease*. Autoimmun Rev 2007;6:232-6.
- 9 Sanchez-Guerrero J, Lew RA, Fossel AH, et al. *Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti Ro/SS-A, and anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1996;39:1055-61.
- 10 Hochberg M. *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1997;40:1725-34.
- 11 Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW. *What is new with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: diagnostic, pathogenetic and therapeutic implications*. Current Opinion Nephrology Hypertension 1999;8:629-35.
- 12 Guillevin L, Pagnoux C, Guilpain P. *Classification of systemic vasculatides*. Presse Med 2007;36:845-53.

- <sup>13</sup> Segelmark M, Westman K, Wieslander J. *How and why should we detect ANCA?* Clin Exp Rheumatol 2000;18:629-35.
- <sup>14</sup> Poli D, Gensini GF. *Sindrome da anticorpi antifosfolipidi e tromboembolismo venoso: il ruolo della trombofilia congenita.* Ann Ital Med Int 2005;20:218-23.
- <sup>15</sup> Hughes GR. *The anticardiolipin syndrome.* Clin Exp Rheumatol 1985;3:285-6.
- <sup>16</sup> Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS).* J Thromb Haemost 2006;4:295-306.
- Breda L, Nozzi M, De Sanctis S, et al. *Laboratory tests in the diagnosis and follow-up of pediatric rheumatic disease: an update.* Semin Arthritis Rheum 2010;40:53-72.
- Syed RH, Gilliam BE, Moore TL. *Rheumatoid factors and anticyclic citrullinated peptide antibodies in pediatric rheumatology.* Curr Rheumatol Rep 2008;10:156-63.