



**Università degli Studi di Urbino “Carlo Bò”**

**Facoltà di Scienze e Tecnologie**

**Corso di Laurea Magistrale in**

**Biologia Molecolare, Sanitaria e della Nutrizione LM-6**

**TESI DI LAUREA SPERIMENTALE**

**AFFIDABILITÀ DEL METODO ELISA COME TEST  
ALTERNATIVO AL METODO DI  
IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA NELLA  
DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTINUCLEO**

**Relatore: Chiar.ma Prof.ssa  
Serafina Battistelli**

**Tesi di Laurea di:  
Costa Federica**

**Co-Relatore: Chiar.ma Dott.ssa  
Cinzia Mei**

**Anno Accademico 2011-2012**

# Indice

<b>Introduzione</b>	1
1. Il sistema immunitario	3
1.1 Tolleranza immunologia	3
1.2 Meccanismi di autoimmunità	8
2. Patologie Autoimmuni	12
2.1 Principali esempi di patologie autoimmuni organo specifiche	13
2.1.1 Tiroidite di Hashimoto	13
2.1.2 Morbo di Basedow Graves	15
2.2 Principali esempi di patologie organo sistemiche	16
2.2.1 Lupus Eritematoso Sistemico LES	16
2.2.2 Artrite Reumatoide	18
3. Autoanticorpi	21
3.1 Classificazione	21
3.2 Principali tecniche di rilevazioni degli autoanticorpi	23
3.2.1 Immunofluorescenza	24
3.2.2 Tecniche immunoenzimatiche EIA	28
3.3 Tipologie di autoanticorpi	32
3.3.1 Anticorpi Antifosfolipidi	33
3.3.2 Fattore Reumatoide	34
3.3.3 Anticorpi Anti-citrullina	35
3.3.4 Anticorpi anti-Dna	36
3.3.5 Anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili ENA	39
3.3.6 Anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili ANCA	40
3.4 Anticorpi anti-nucleo ANA	41

4. Scopo	53
5. Materiali e metodi	55
5.1 Accettazione dei campioni	55
5.2 Ricerca degli anticorpi anti-nucleo in campioni di siero umano	56
5.2.1 Test di Immunofluorescenza indiretta IFI	56
5.2.2 Test immunoenzimatico ELISA : ANA <i>screen</i>	60
6. Risultati	70
6.1 Analisi statistica	70
6.2 Confronto IFI/ELISA	71
7. Discussione	76
8. Prospettive future	90
<b>Bibliografia</b>	92
<b>Ringraziamenti</b>	99

## **Abbreviazioni**

ACR - American College of Rheumatology

ANA - Anticorpi-Antinucleo

ANCA - Anticorpi Anti-citoplasma dei Granulociti Neutrofili

ANTI-CCP - Anticorpi Anti-citrullina

APS - Anticorpi Anti-fosfolipidi

AR - Artrite Reumatoide

ARA - American Rheumatism Association

CDC - Central for Diseases Control

DM – Dermatomiosite

EIA - Enzyme-Immunoassays

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ENA - Anticorpi Anti-Antigeni Nucleari Estraibili

FR - Fattore Reumatoide

IF - Immunofluorescenza

IFI - Immunofluorescenza Indiretta

LES - Lupus Eritematoso Sistemico

LPS - Linfociti ad Attivatori Policlonali

MAIS - Malattie Autoimmuni Sistemiche

MCTD - Malattia Mista del Connettivo

MRA - Patologie Reumatiche Autoimmuni

NK - Cellule Natural Killer

OD - Densità Ottica

PM - Polimiosite

SS - Sindrome di Sjogren

SSc - Sclerosi Sistemica

SSP - Sclerosi Sistemica Progressiva

TPO - Anticorpi Anti Tireoperossidasi

# Introduzione

La crescente rilevanza acquisita negli ultimi anni dalle patologie autoimmuni, nel campo dell'immunologia, ha reso necessario il continuo studio e sviluppo di nuove metodologie diagnostiche e di nuovi test.

In particolar modo, hanno acquisito estrema importanza la rilevazione e la determinazione di una particolare classe di autoanticorpi, appartenenti alla classe di immunoglobuline IgG, definiti ANA. La ricerca degli ANA rappresenta infatti la prima indagine di laboratorio che viene effettuata nell'approccio diagnostico della malattie autoimmuni sistemiche (MAIS), nonostante non si sia ancora ben chiarito il ruolo di quest'ultimi nella patogenesi della malattia.

La presenza di questi autoanticorpi è caratteristica infatti di alcune patologie autoimmuni sistemiche, quali il Lupus eritematoso sistemica (LES), la sclerosi sistemica (SSc), la sindrome di Sjogren (SS), la malattia mista del connettivo (MCTD), e la polimiosite/dermatomiosite (PM/DM), costituendo per queste un test di primo livello con l'unico limite di non avere l'assoluta specificità in quanto possono ritrovarsi anche in soggetti che presentano infiammazioni croniche, neoplasie e infezioni.

Attualmente, il metodo maggiormente utilizzato per la determinazione degli ANA nel siero del paziente è rappresentato dall'immunofluorescenza indiretta (IFI) eseguita su un monostrato di cellule che derivano da carcinoma laringeo umano (HEp-2).

L'immunofluorescenza indiretta ci permette di rilevare la presenza di un antigene o di un anticorpo a conoscenza non nota la cui controparte nota, ossia quella che ha disposizione il laboratorista o il ricercatore, è legata ad un marcatore. Tale marcatore, chiamato fluorocromo, è un colorante che assorbendo onde ad alta frequenza (ultravioletto) emette luce nel visibile .

In particolar modo il fluorocromo più utilizzato è l'isocianato di fluoresceina (o semplicemente fluoresceina) che emette un'intensa colorazione verde-mela, rilevabile al microscopio a fluorescenza.

Questa metodica rappresenta il gold standard per la ricerca degli ANA sia per le sue caratteristiche di elevata sensibilità, facilità di esecuzione e riproducibilità sia per l'elevata affidabilità diagnostica.

Tra i vantaggi principali di questo metodo ritroviamo la capacità di poter analizzare un numero elevato di campioni e di poter anche individuare uno spettro abbastanza ampio di autoanticorpi diretti contro sia antigeni noti ma anche contro antigeni ancora non del tutto chiari. Uno dei principali svantaggi dell'IFI risulta invece essere legato alla lettura del risultato che richiede una particolare esperienza da parte dell'operatore.

Recentemente sono state introdotte nuove tecniche nella determinazione degli ANA, in particolar modo tecniche immunoenzimatiche (ELISA) basate sull'utilizzo della reazione antigene-anticorpo e che si differenziano a seconda del componente che si vuole rilevare: ELISA diretto quando andiamo a determinare la presenza dell'antigene e ELISA indiretto quando andiamo a determinare la presenza di anticorpi contro gli antigeni.

I vantaggi delle tecniche ELISA consistono principalmente nel fatto che, essendo eseguite con tecniche automatizzate e computerizzate, permettono un'elevata affidabilità, riproducibilità e facilità nella lettura del risultato.

L'elevato costo legato alla maggiore automatizzazione del procedimento rappresenta, invece, uno dei fattori critici.

L'obiettivo di questo studio è quindi quello di valutare, nella ricerca degli ANA, l'affidabilità del test ELISA, evidenziarne le principali caratteristiche e metterne in luce aspetti positivi e negativi rispetto al maggiormente diffuso metodo IFI.

# 1. Il Sistema Immunitario

## 1.1 Tolleranza immunologica

Con il termine “immunità” ci riferiamo a quella condizione grazie alla quale il nostro organismo è in grado di proteggerci dalle malattie e in particolar modo dalle malattie infettive. Le cellule e le molecole responsabili di questa protezione compongono il cosiddetto sistema immunitario, e la risposta che sono in grado di generare viene definita risposta immunitaria.

La funzione fisiologica del sistema immunitario è quella di difendere l'organismo contro gli agenti infettivi, nonostante risposte immunitarie possano essere provocate anche da sostanze estranee di natura non infettiva.

L'immunità può essere di due tipi: l'immunità innata o naturale e l'immunità specifica o acquisita.

L'immunità innata consiste in tutti quei meccanismi che sono in grado di reagire in tempo rapido contro i microbi, rappresentando così la prima linea di difesa contro le infezioni. I componenti principali dell'immunità innata sono le barriere chimico/fisico dell'organismo (epiteli), le cellule ad attività fagocitica (neutrofili e macrofagi), le cellule natural killer (NK), numerose proteine (citochine).

Quando invece l'esposizione agli antigeni mette in atto meccanismi molto più complessi, che si sviluppano molto più lentamente e che si basano sull'attivazione dei linfociti, parliamo di immunità specifica o acquisita<sup>1</sup>. I componenti dell'immunità specifica sono i linfociti, i quali in seguito al contatto diretto con la sostanza patogena vengono attivati e stimolano la produzione di anticorpi.

---

<sup>1</sup>Il termine specifico si riferisce al fatto che l'immunità acquisita ha la capacità di distinguere molecole anche molto simili tra loro; il termine acquisita sottolinea il fatto che, in seguito a ripetute esposizioni ad uno stesso antigene, il nostro sistema immunitario ha la capacità di generare una risposta sempre più potente.

Le sostanze estranee che sono in grado di determinare risposte immunitarie specifiche vengono definite antigeni ai quali gli anticorpi si legano in maniera altamente specifica.

Le risposte immunitarie specifiche sono mediate da diversi componenti del sistema immunitario; in particolar modo dagli anticorpi, che sono prodotti dai linfociti B, e sono responsabili dell'immunità umorale mentre i linfociti T sono responsabili dell'immunità cellulare.

Tutte le risposte immunitarie specifiche che vengono attuate contro antigeni estranei, sia quelle umorali che quelle cellulari, presentano caratteristiche ben precise tra le quali: la specificità (le risposte immunitarie sono specifiche per determinati antigeni), memoria (l'esposizione del sistema immunitario ad un determinato antigene potenzia la risposta ad ogni successiva riesposizione), specializzazione, auto-limitazione e non reattività verso il self.

Una delle caratteristiche più importanti del sistema immunitario è la capacità di riconoscere, rispondere ed eliminare antigeni estranei all'organismo, quindi non-self, senza tuttavia riconoscere e danneggiare i costituenti antigenici propri dell'organismo stesso e quindi self [Abbas et al.,2002]. Un sistema immunitario ben funzionante, infatti, ha la capacità di distinguere tra antigeni self e antigeni non self così da rispondere solo agli antigeni esogeni; ciò significa che esso ha dovuto sviluppare una sorta di tolleranza alle strutture cellulari e tissutali del nostro organismo.

La tolleranza immunologica viene quindi definita come stato di non responsività ad un antigene, indotto da una precedente esposizione a quello stesso antigene [ibidem].

Infatti, vediamo che quando il linfocita specifico viene a contatto con un antigene si possono verificare tre diverse situazioni: 1- i linfociti attivandosi, attivano di conseguenza la risposta immunitaria; 2- i linfociti vengono o inattivati o addirittura eliminati originando in questo modo il fenomeno della tolleranza; 3- l'antigene viene ignorato, non inducendo così nessun tipo di risposta immunitaria. Forme diverse di uno stesso antigene possono indurre una risposta immunitaria o tolleranza o possono non evocare nessuna risposta.



La tolleranza immunologica è un concetto importante per molte ragioni; in particolare, vediamo che individui normali sviluppano una tolleranza al self, sono quindi tolleranti ai loro stessi antigeni.

In tutti gli individui i differenti cloni di linfociti immaturi, ognuno dei quali deriva da un singolo precursore, ed ognuno dei quali è in grado di riconoscere un preciso antigene, possono esprimere recettori sia per antigeni estranei sia per gli antigeni autologhi. In ciascuno di noi esistono moltissimi antigeni self potenzialmente immunologici, molti dei quali, nonostante siano in grado di reagire con i linfociti dell'organismo, normalmente non danno origine ad una risposta immunitaria.

Questo fenomeno si verifica grazie alla presenza della tolleranza al self.

La tolleranza al self dei linfociti T e B è un fenomeno immunologico specifico che si origina dal riconoscimento degli antigeni da parte di linfociti specifici. A tale proposito importante fu l'esperimento fatto negli anni '50 da P. Medawar<sup>2</sup> che non solo permise di dimostrare che la tolleranza è un fenomeno specifico ma permise anche di capire che l'esposizione dei linfociti immaturi ad antigeni estranei, soprattutto durante lo sviluppo embrionale, induceva una tolleranza nei loro confronti [ibidem].

La tolleranza verso gli antigeni autologhi o tolleranza al self viene garantita da diversi meccanismi che hanno lo scopo di prevenire sia la maturazione che lo sviluppo dei linfociti potenzialmente reattivi.

La tolleranza verso il self può essere centrale o periferica.

La tolleranza centrale viene indotta negli organi linfoidei primari (timo e midollo osseo) quando i linfociti immaturi, durante la loro fase di maturazione, incontrano antigeni self presenti ad elevata concentrazione. I cloni linfocitari specifici per gli antigeni self vengono così uccisi o più propriamente deleti attraverso un meccanismo di selezione negativa; la tolleranza centrale rappresenta

---

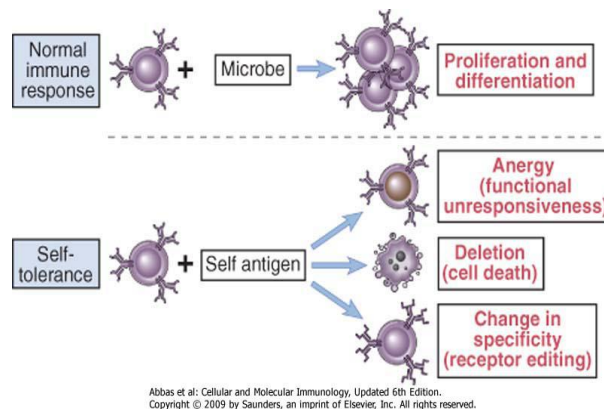
<sup>2</sup> Medawar dimostrò che la tolleranza è un fenomeno immunologico specifico grazie ad un esperimento condotto su topi. Egli mise in evidenza che un topo adulto di ceppo A rigetta un trapianto di cute da un topo di ceppo B, diverso dall'animale di ceppo A. Se il topo di ceppo A viene inoculato alla nascita con linfociti provenienti da animali di ceppo B, queste cellule non vengono rigettate (perché l'animale neonato è immunodeficiente), anzi alcune di queste sopravviverà indefinitamente nel ricevente.

il principale meccanismo di eliminazione dei linfociti autoreattivi, e della discriminazione self/non self.

La tolleranza periferica si verifica quando linfociti maturi riconoscono antigeni self nei tessuti periferici e rappresenta il meccanismo più importante per il mantenimento della non responsività verso gli antigeni self presenti nei tessuti periferici e non negli organi linfoidi primari [Abbas et al., 2002].

Sono diversi i meccanismi alla base della tolleranza linfocitaria:

- Morte cellulare apoptotica chiamata anche delezione clonale;
- Inattivazione funzionale della cellula o anergia clonale;
- Soppressione dell'attivazione e delle funzioni linfocitarie grazie a linfociti regolatori;



**Figura 1. Meccanismi alla base della tolleranza immunologica**

Alcuni antigeni autologhi invece vengono semplicemente ignorati dal sistema immunitario (ignoranza clonale) tanto che non sono in grado di produrre nessun tipo di risposta.

La tolleranza centrale viene mantenuta principalmente dal meccanismo di delezione clonale mentre tutti e tre i meccanismi contribuiscono all'istaurarsi della tolleranza periferica.

Alterazioni nell'induzione o nel mantenimento della tolleranza al self si traducono quindi nello sviluppo di risposte immunitarie dirette contro antigeni

autologhi, che nella maggior parte dei casi provocano lo sviluppo di quelle che vengono comunemente chiamate malattie autoimmuni.

L'interesse nei riguardi dei fenomeni autoimmunitari risale agli inizi del '900, quando l'immunologo Paul Ehrlich coniò l'espressione "*horror autotoxicus*" per definire tutte quelle reazioni dannose ("tossiche") che sono dirette contro i costituenti autologhi dell'organismo stesso.

Questo concetto venne ampliato, circa cinquant'anni dopo, dall'immunologo Burnet, il quale propose la teoria della selezione clonale secondo la quale i cloni di linfociti in grado di reagire contro antigeni propri dell'organismo dovevano essere eliminati nel corso dello sviluppo embrionale, in quanto nel periodo post natale sarebbero stati potenzialmente auto aggressivi [Pontieri, 2007].

In realtà, è stato dimostrato che la presenza di autoanticorpi circolanti non è necessariamente correlata con l'insorgenza della patologia autoimmune; numerosi studi hanno messo in evidenza che in soggetti normali ci sia l'esistenza di cellule T in grado di riconoscere antigeni self e linfociti B che sintetizzano piccole quantità di autoanticorpi, soprattutto della classe IgM, diretti contro diversi auto antigeni come ad esempio DNA, membrane cellulari, proteine sieriche.

È ormai opinione comune che questi autoanticorpi fisiologici non svolgano nessun ruolo nella patogenesi delle malattie autoimmuni; a differenza degli autoanticorpi che si riscontrano in quest'ultime (prevalentemente ad alto titolo e della classe IgG), essi sono autoanticorpi a basso titolo appartenenti alla classe delle IgM.

Questi sono in grado di determinare una condizione, asintomatica, del tutto differente dalla condizione patologica che viene definita autoreattività fisiologica.

Pertanto non tutte le reazioni immunologiche sono causa di malattia: alcune svolgono un importante ruolo fisiologico e, a volte, sono addirittura essenziali al normale funzionamento dell'organismo.

## 1.2 Meccanismi di autoimmunità

Quando parliamo di autoimmunità indichiamo tutti quei fenomeni o reazioni che, in modo del tutto anomalo, un organismo attiva contro i suoi stessi componenti antigenici.

L'autoimmunità è una causa importante di malattia nell'uomo (si stima che circa l'1-2 % della popolazione statunitense ne sia colpita) e il termine viene spesso utilizzato in modo improprio per riferirsi alle malattie in cui una risposta immunitaria si accompagna ad un danno tissutale, anche se risulta essere molto difficile stabilire se la risposta immunitaria ad un antigene self sia responsabile della patogenesi della malattia.

Gli auto antigeni sono anticorpi appartenenti alla classe delle immunoglobuline IgG riconosciuti da linfociti T autoreattivi che determinano l'attivazione di un processo flogistico che può culminare nella distruzione tissutale.

Questi autoanticorpi diretti contro epitopi<sup>3</sup> contrastanti infatti sono in grado di determinare due condizioni patologiche contrastanti

- Una reazione immunopatogena di tipo V o stimolatoria mediata da anticorpi antirecettore, che, come dice il termine stesso, hanno la capacità di indurre un effetto stimolante. Il nostro autoanticorpo, interagendo con il recettore, mima l'azione fisiologica del normale ligando attivando così l'azione svolta dal ligando. Questo è il caso del morbo di Graves, Basedow causato dalla produzione di autoanticorpi diretti contro i recettori per il TSH della tiroide. Questi hanno la caratteristica di esercitare la stessa azione fisiologica espletata dal TSH, stimolano sia la tiroide stessa ad un'iperproduzione di ormoni tiroidei T3 e T4 (ipertiroidismo) sia tutte le funzioni generali della ghiandola stessa determinandone un'iperplasia (gozzo).

---

<sup>3</sup> Porzione dell'antigene alla quale si lega in modo specifico l'anticorpo

- Una reazione immunopatogena di tipo VII (inibizione antirecettore). In questo caso, si ha un'inibizione del recettore che provoca un blocco funzionale del recettore stesso con la conseguenza che il ligando non riesce più a legarsi ed ad espletare la sua funzione fisiologica.

Questo è il caso della miastenia gravis, causata da autoanticorpi antirecettore per l'acetilcolina e del diabete mellito insulino-resistente, causato anche esso da autoanticorpi antirecettore per l'insulina.

Non sappiamo di preciso quali siano gli eventi che danno origine ad una risposta immunitaria contro il self.

I fattori responsabili dell'autoimmunità sono molteplici e strettamente connessi tra loro; è stato visto uno stretto legame tra insorgenza di immunità ed infezione, oppure dieta o stato ormonale.

La principale causa di autoimmunità sembra derivare da una disfunzione o da una "rottura" di tutti quei meccanismi che normalmente sono alla base del mantenimento della tolleranza al self.

La perdita della tolleranza al self può derivare principalmente da diversi fattori; tra i principali ricordiamo:

1. **Riduzione e perdita della tolleranza centrale:** anche se quest'ipotesi non è stata dimostrata sperimentalmente, spesso si ipotizza che l'autoimmunità sia dovuta al fatto che negli organi linfoidei primari non vengono presentati nessun tipo di auto antigeni e quindi i linfociti sopravvivono;
2. **Riduzione o perdita della tolleranza periferica per anergia clonale:** diversi studi sperimentali hanno permesso di dimostrare che una alterata espressione di molecole costimolatorie a livello dei tessuti periferici provoca la rottura dello stato di anergia dei linfociti T e la comparsa di reazioni autoimmunitarie a carico dei tessuti;
3. **Riduzione o perdita della tolleranza periferica per inattivazione dell'apoptosi:** è stato dimostrato che un blocco della morte cellulare

apoptotica può portare allo sviluppo dell'autoimmunità; questo sembra essere dovuto a difetti genetici a carico del gene Fas (recettore che si trova sulla superficie cellulare) e del suo ligando (fas ligando) che interagendo determinano apoptosi.

4. **Attivazione policlonale dei linfociti:** per quanto riguarda questo fattore vediamo che abbiamo prove sperimentali effettuate solo sui topi. In questo caso si ha la produzione di autoanticorpi contro diversi auto antigeni in seguito all'esposizione dei linfociti ad attivatori policlonali (LPS); animali inoculati con LPS sviluppano autoanticorpi.
5. **Comunanza di epitopi tra auto antigeni ed antigeni estranei:** quando si attiva una risposta policlonale verso antigeni microbici che presentano epitopi presenti anche in alcune molecole dell'organismo si ha una reazione che può culminare in autoaggressività; le cellule aggrediscono sia l'organismo ospite che le molecole self presentanti gli stessi target.

Recentemente, in seguito allo sviluppo di nuove sperimentazioni, si è reso possibile identificare i principali geni che possono predisporre all'insorgenza delle patologie autoimmuni ma tuttavia non siamo ancora in grado di definire precisamente quali siano gli eventi che diano origine ad una risposta immunitaria contro il self [Abbas et al.,2002].

Uno dei fattori predominanti nello sviluppo delle patologie autoimmuni è rappresentato dai fattori genetici; tra i geni coinvolti nello sviluppo dell'autoimmunità alcuni hanno infatti la capacità di agire direttamente sulle cellule del sistema immune alterando la reattività dell'ospite [Pontieri 2005].

Ancora non è ben noto se stessi tipi di geni possano o meno contribuire allo sviluppo di diverse patologie autoimmuni ma tra tutti i geni, l'associazione con i geni MHC, in particolare di classe II, risulta essere la più forte. Infatti, individui che presentano un determinato gene HLA possono avere una maggiore probabilità

di sviluppare patologie autoimmuni (l'associazione più forte è quella che si ha tra spondilite anchilosante, patologia infiammatoria, e l'allele di classe I HLA-B27).

Anche le infezioni batteriche e virali possono contribuire al manifestarsi o all'aggravarsi delle patologie autoimmuni; infatti le patologie autoimmuni sono spesso precedute da infezioni; quest'ultime possono favorire lo sviluppo dell'autoimmunità attraverso diversi meccanismi in particolar modo attraverso il meccanismo di cross-reattività [Abbas et al., 2002].

Un esempio di cross reattività è quello tra proteine streptococciche ed antigeni cardiaci; il batterio avendo determinanti antigenici a livello del tessuto cardiaco può provocare una risposta anticorpale non solo diretta verso il batterio ma anche contro il tessuto miocardico stesso.

Altri fattori che possono contribuire allo sviluppo delle patologie autoimmuni sono rappresentati da alterazioni anatomiche dei tessuti, come ad esempio l'infiammazione, traumi o disfunzioni ormonali. (influenza, ormoni sessuali o altri fattori correlati al sesso).

## 2. Patologie Autoimmuni

Abbiamo visto come l'alterazione dei meccanismi di tolleranza immunologica determini l'insorgenza delle patologie autoimmuni le quali, da un punto di vista clinico-diagnostico, sono classificabili in due gruppi principali, organo specifiche e sistemiche, in base sia alla localizzazione della malattia stessa che in base alle differenze patofisiologiche.

- **Organo specifiche:** le malattie autoimmuni organi specifiche provocano il danneggiamento di un solo organo dal momento che la risposta immunitaria è diretta prevalentemente, anche se non esclusivamente, verso una o più molecole (auto antigeni), che sono espresse esclusivamente dalle cellule di un determinato organo portando così al danneggiamento dell'organo stesso.

La risposta autoimmune ha come principale bersaglio tessuti ed organi specifici come ad esempio il Sistema Endocrino (tiroidite di Hashimoto, Morbo di Graves e Morbo di Addison dove gli autoanticorpi sono diretti verso antigeni delle cellule tiroidee e diabete mellito dove invece sono diretti verso antigeni delle cellule b del pancreas), e il sistema gastrointestinale (cirrosi biliare primitiva, colite ulcerosa) [Pontieri, 2007].

- **Non organo specifiche o Sistemiche (MAIS),** nelle quali sono invece coinvolti più organi; ciò si verifica perché il bersaglio molecolare del sistema immunitario o è un costituente comune a molte cellule dell'organismo o perché fa parte di tessuti ampiamente presenti all'interno dell'organismo, quali ad es. il muscolo ed il connettivo. In questo caso infatti la risposta autoimmune non è diretta contro antigeni specie-specifici ma verso antigeni che sono diffusamente



distribuiti nel nostro organismo come ad esempio il DNA, le ribonucleoproteine, gli antigeni mitocondriali. Nel lupus erimatoso sistemico (LES), per esempio, l'autoanticorpo maggiormente presente è diretto verso il DNA.

Tra le MAIS vengono classificate anche le patologie reumatiche autoimmuni (MRA) in cui è possibile rilevare due aspetti caratteristici che sono: il coinvolgimento dell'apparato muscolo scheletrico, ed è per questo motivo che vengono classificate tra le malattie reumatiche, e la patogenesi autoimmune. Esempi di MRA sono il Lupus, Artrite Reumatoide, Sclerodermia [ibidem].

## **2.1 Principali esempi di patologie autoimmuni organo-specifiche**

### ***2.1.1 Tiroidite di Hashimoto***

La tiroidite di Hashimoto è una malattia che si caratterizza per una cronica infiammazione linfocitaria che porta, nella maggior parte dei casi, ad una progressiva e irreversibile perdita della funzionalità dell'organo stesso. È la più frequente delle patologie tiroidee e colpisce principalmente le donne (3,5% casi su 1000 abitanti contro gli 0,8% di casine 1000 abitanti negli uomini).

Alla base della patogenesi sembra esserci un processo infiammatorio di tipo autoimmune che porterebbe alla distruzione dei follicoli; in questo caso è chiamata in causa sia l'immunità cellulo-mediata che l'immunità umorale.

Le principali cellule coinvolte sono cellule dell'infiammazione come i linfociti T (in particolare gli helper) e i linfociti B i quali vengo diretti contro le stesse cellule tiroidee producendo citochine infiammatorie che cronicizzano il processo infiammatorio autoimmune [Bizzarro, 2006].

I fattori di rischio implicati in questa patologia sono diversi e sono rappresentati principalmente da fattori genetici (è stata dimostrata un' associazione significativa tra tiroidite di Hashimoto e alcuni antigeni di istocompatibilità del

tipo HLA), età, sesso, gravidanza, sostanze contenenti iodio (il meccanismo non è ancora del tutto chiaro ma sembrerebbe essere dovuto al fatto che queste sostanze aumentando il grado di iodazione della tireoglobulina aumentino anche la sua antigenicità), irradiazioni e citochine.

Da un punto di vista clinico la tiroidite di Hashimoto si presenta frequentemente con la comparsa del gozzo, che normalmente avviene in modo graduale ma che non provoca particolari danni al paziente. All'inizio della malattia alcuni pazienti possono manifestare una fase momentanea caratterizzata da una condizione di ipertiroidismo in cui si possono osservare anticorpi in circolo che agiscono sul recettore del TSH della tiroide stimolandolo; in questo caso il paziente ha sintomi tipici dell'ipertiroidismo come tachicardia, nervosismo e disturbi del sonno [Monaco, 2008].

Normalmente però la tiroide di Hashimoto nella sua manifestazione classica consta di tre fasi principali: 1- eutiroidismo (dove abbiamo una normale produzione di ormoni tiroidei), 2- ipotiroidismo subclinico, 3- ipotiroidismo conclamato.

Il soggetto in questo caso manifesta sia i classici sintomi dell'ipotiroidismo (come ad esempio sonnolenza, aumento di peso, umore depresso, stitichezza ) che sintomi tipici della malattia autoimmune tra i quali ricordiamo: dolore muscolare, disturbi della pelle, debolezza generale [ibidem].

La diagnosi di questa patologia viene effettuata, oltre dagli elementi anamnestico-obiettivo, dal dosaggio degli anticorpi antitiroide circolanti, TPO, che risultano essere positivi nel quasi il 90% dei casi [Bizzarro, 2006]. Importante è anche un esame ecografico che permette di evidenziare eventuali anomalie anatomiche.

### ***2.1.2 Morbo di Basedow Graves***

Il morbo di Basedow Graves è una malattia autoimmune dovuta alla produzione di autoanticorpi contro il recettore del TSH che stimolano i tireociti a produrre elevate quantità di ormoni tiroidei causando così ipertiroidismo. Le persone più colpite sono le donne di età compresa tra i 20 e i 40 anni. Le principali manifestazioni cliniche sono gozzo, ipertiroidismo, oftalmopatia e dermatopatia mentre tra i principali sintomi ricordiamo eruzione cutanea rossastra, insonnia, ipertermia, esoftalmo e nelle donne alterazione del ciclo mestruale [Monaco,2008].

Il trattamento di questa patologia è finalizzato a ridurre i valori circolanti degli ormoni tiroidei T3 e T4 con delle sostanze ad azione antitiroidea come ad esempio il metimazolo, anche se oggi giorno una delle terapie più utilizzate è quella che prevede la somministrazione dello iodio radioattivo I-131. Quando invece la tiroide risulta essere di grosse dimensioni, se presenta dei noduli o se vi sono lesioni o danni a organi adiacenti si può ricorrere alla terapia chirurgica.

Un adeguata terapia, comunque, consente ai pazienti di migliorare notevolmente le loro condizioni cliniche e il loro stile di vita [ibidem].



**Figura 2. Esoftalmo**

## 2.2 Principali esempi di malattie organo sistemiche

Tra le principali malattie autoimmuni sistemiche troviamo:

### 2.2.1 *LES o Lupus Erimatoso Sistemico*

Il LES è una malattia autoimmune cronica, con fasi di remissione e di riacutizzazione, che può colpire diversi organi e tessuti del corpo. Il LES è una patologia rara che colpisce prevalentemente le donne con un'incidenza di 1 su 7000 donne nella fascia di età compresa fra i 20 e 60 anni; l'incidenza della malattia è ancora più elevata nella razza nera [Pontieri, 2005].

È una patologia molto complessa, difficile da diagnosticare e dall'eziologia ancora sconosciuta; vediamo infatti come non esista una singola causa in grado di determinare l'insorgenza di tale patologia. I principali fattori di rischio in grado di causare l'insorgenza della malattia sono: fattori genetici, fattori ambientali e fattori ormonali che, combinandosi insieme, scatenano la malattia. Nei pazienti con lupus si riscontrano numerosi autoanticorpi, prodotti dal sistema immunitario e diretti contro gli stessi antigeni del nostro corpo, tra i cui più frequenti troviamo gli anticorpi anti-nucleo, in particolare rivolti contro il DNA, ma anche contro ribonucleoproteine, istoni ed antigeni nucleari. Questi sono in genere presenti molti anni prima della diagnosi di LES, e normalmente tendono ad avere progressivo accumulo prima dell'inizio della malattia, quando i pazienti sono ancora asintomatici [Arbuckle et al., 2003].

I complessi immuni, che si vengono a formare da questi autoanticorpi e dai loro rispettivi antigeni sono responsabili delle principali manifestazioni cliniche del lupus, che sono: segni dermatologici (eritema a farfalla, alopecia), artralgia (dolore localizzato soprattutto a livello delle piccole articolazioni come mani e piedi), anemia, malattie infiammatorie a livello del cuore come ad esempio pericardite, miocardite, alterazioni a livello renale come ematuria e proteinuria che portano alla nefrite lupica, cefalea, disturbi dell'umore, convulsioni e ansia [Abbas et al, 2000].

I test sierologici maggiormente utilizzati per la diagnosi del lupus sono la rilevazione degli anticorpi antinucleo (ANA), in particolare quelli diretti contro il DNA a doppia elica (anti-dsDNA) e a singola elica (anti-ssDNA) [Kavanaugh, 2000, Bennucci et al., 2005] e la rilevazione degli anticorpi contro gli antigeni nucleari estraibili (ENA) attraverso il metodo di immunofluorescenza indiretta [Bizzarro, 2006, Bennucci et al., 2005].

Altri test diagnostici effettuati sono i test di funzionalità epatica e renale, esame emocromocitometrico e valutazione dei livelli delle proteine del complemento.

L'ARA (*American Rheumatism Association*) ha stilato una lista di 11 criteri diagnostici per l'identificazione del lupus eritematoso sistemico [Egnerr, 2000]; per porre una diagnosi devono essere soddisfatti almeno 4 dei 11 criteri qui riportati: rash a farfalla, rash discoide, fotosensibilità, ulcere orali, artrite, disordini renali, disordini neurologici, disordini ematologici, disordini immunologici titolazione anormale anticorpi antinucleo.

La terapia del lupus ha lo scopo di trattare la patologia durante la fase attiva, prevenire eventuali fasi di riacutizzazione e di cercare di limitare i danni a tessuti e organi e visto che la maggior parte dei sintomi è determinata dallo stato infiammatorio, ridurre anche l'infiammazione. Vengono infatti normalmente utilizzati farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS), che permettono anche una riduzione del dolore, farmaci corticosteroidi e farmaci immunosoppressori.

La patologia può essere controllata ma non completamente rimossa.



**Figura 3. Eritema a farfalla**

### 2.2.2 *Artrite reumatoide*

L'artrite reumatoide è una grave patologia infiammatoria e autoimmunitaria dovuta ad una reazione del sistema immunitario verso elementi dell'organismo stesso che colpisce le articolazioni e l'osso stesso. È una patologia relativamente comune, le donne sono i soggetti più colpiti e vediamo che l'insorgenza della patologia avviene generalmente in età adulta (il 70% dei casi compare per lo più tra i 35 e 50 anni) anche se ci sono casi molto precoci (artrite reumatoide infantile) e al contrario anche casi di insorgenza tardiva.

Ancora non si conosce con esattezza l'esatta causa dello sviluppo dell'artrite reumatoide; abbiamo un'influenza genetica (associazione con antigeni del complesso MCH-II: è, in realtà, presente una sequenza genica all'interno dell'HLA DR4 e DR1, responsabile della suscettibilità alla malattia) ma sicuramente alla base di tale patologia abbiamo una disfunzione del sistema immunitario. La reazione principale è infatti l'attivazione dei linfociti T a cui fa seguito una reazione a cascata che porta alla produzione di sostanze infiammatorie. I tessuti articolari, a partire dalla sinovia<sup>2</sup> per poi arrivare direttamente all'osso stesso vengono progressivamente erosi, causando deformità e instabilità dell'articolazione stessa.

Inizialmente vengono colpite le piccole articolazioni come quelle delle mani, dei piedi, dei polsi, gomiti e caviglie. Si manifesta in modo molto soggettivo anche se ci sono segni e sintomi comuni a tutti i soggetti. Rigidità mattutina, che normalmente tende a diminuire dopo un ora dal risveglio in seguito al movimento dell'articolazione, e gonfiore risultano essere le principali manifestazioni dell'infiammazione. Le articolazioni si presentano arrossate, calde, dolenti e tumefatte e nelle fasi più avanzate oltre ai comuni sintomi possono comparire anche noduli reumatoidi sottocutanei, pleurite, osteoporosi e anemia. Tra le manifestazioni extra-articolari dell'artrite reumatoide (AR), il coinvolgimento dell'apparato cardiovascolare ed in particolare la cardiopatia ischemica (*coronary artery disease*, CAD), rappresenta, per la sua severità prognostica, una delle principali cause di morte. Esiste infatti una diretta

correlazione tra comparsa di lesioni vasculitiche e AR [Seriolo et al., 2003]. Al primo evento trombotico vari fattori di rischio sono spesso presenti nel paziente trombotico quali il fumo, l'alcool, immobilità, ipertensione arteriosa, ed il processo infiammatorio cronico stesso che accompagna il decorso della malattia. Tutti questi potenziali fattori di rischio possono spiegare il più alto rischio di prematura aterosclerosi nei pazienti con AR [ibidem].

È importante una diagnosi precoce della malattia perché è nei primi periodi di insorgenza della malattia che si verificano la maggior parte dei danni e irreversibili. La diagnosi si basa sia sull'osservazione clinica del paziente ma in alcuni casi, soprattutto quando la patologia è ancora agli esordi, può essere difficoltosa [Bizzarro,2006].

Solitamente per porre diagnosi di Artrite Reumatoide si fa riferimento ai criteri diagnostici stipulati dall'ARA: rigidità mattutina, artrite di tre o più articolazioni, artrite alle articolazioni delle mani, artrite simmetrica, noduli reumatoidi, fattore reumatoide sierico, segni radiografici. Se almeno 4 di questi parametri sono soddisfatti la diagnosi di artrite reumatoide è altamente probabile.

Possono essere eseguiti, a sostegno dell'esame obiettivo, anche esami di laboratorio tra i quali VES, PCR, emocromo, ANA, FR (fattore reumatoide, anticorpo), e per la diagnosi differenziale risulta essere utile anche l'analisi del liquido sinoviale.

Negli ultimi anni di sta affermando l'uso degli anticorpi anti peptide ciclico citrullinato (ANTI-CCP) nella diagnosi di artrite reumatoide essendo stata dimostrata una loro maggiore specificità rispetto al fattore reumatoide (FR) [Marrone et al., 2007].

La terapia è finalizzata principalmente a ridurre il dolore e a cercare di impedire la progressione delle lesioni articolari. Proprio per questi scopi vengo utilizzati sia farmaci antiinfiammatori non steroidei come i FANS ma anche antinfiammatori come i corticosteroidi che potrebbero rallentare la malattia.

Possono essere utilizzati anche farmaci immunosoppressori, e nelle forme più aggressive e in particolar modo in quelle forme dove non si ha una risposta al

trattamento immunosopressorio vengono utilizzati i farmaci biologici che hanno la capacità di agire in modo più specifico e selettivo.



**Figura 4. Tipica manifestazione clinica dell'artrite reumatoide**



## 3. Autoanticorpi

### 3.1 Classificazione

La grande maggioranza delle patologie autoimmuni è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi, i quali rappresentano i marcatori fondamentali per la diagnosi e in alcuni casi anche per la prognosi.

In particolare un autoanticorpo è un immunoglobulina il cui bersaglio antigenico non è un agente esterno patogeno (batterio, virus, parassiti), o non patogeno (allergeni), ma uno o più sostanze proprie dell'organismo stesso; possiamo quindi definirlo come un anticorpo diretto contro il self [Kumar, 2009].

Gli autoanticorpi sono in genere della classe IgG e IgM e a seconda delle loro caratteristiche funzionali possono essere considerati:

**Marcatori patogenetici:** rappresentano quella classe di autoanticorpi che correlano direttamente con la malattia e con il suo andamento e sono in grado di determinare sia in vivo che in vitro le alterazioni tipiche e presentano determinate caratteristiche:

- a) sono in grado di indurre le alterazioni tipiche della malattia in modelli sperimentali che mimano la malattia nell'uomo,
- b) se vengono accidentalmente trasmessi per via trans-placentare riproducono nel feto gli effetti che producono nella madre affetta dalla malattia autoimmune,
- c) presentano un titolo che correla in modo significativo con il grado delle alterazioni tipiche della malattia,
- d) la loro presenza nel siero di soggetti sani precede di poco la comparsa della malattia clinicamente evidente [Martino et al., 2010].

Un esempio di autoanticorpo patogenetico è l'anti-recettore del TSH: è infatti la sua presenza a determinare gli effetti del morbo di Basedow-Graves, poiché attiva il recettore del TSH, in modo costante e non regolabile, portando la tiroide a secernere il proprio ormone in quantità eccessive.

Altri esempi sono rappresentati dall'anti-Achr (recettore per l'acetilcolina), anti-fattore intrinseco, Anti-sostanza intercellulare dell'epidermide, Anti-insulina e Anti-recettore dell'insulina, Anti-recettore del ACTH e Anti-recettore di FSH/LH.

**Marcatori non patogenetici:** sono quel tipo di autoanticorpi che non sono in grado di provocare la malattia e possono essere presenti anche in soggetti sani, molti dei quali non svilupperanno mai la malattia. A differenza dei marcatori patogenetici

- a) non sono in grado di indurre le alterazioni tipiche della malattia in modelli sperimentali che mimano la malattia nell'uomo,
- b) se vengono accidentalmente trasmessi per via trans-placentare non inducono nel feto la malattia da cui è affetta la madre,
- c) il loro titolo anticorpale è indipendente dall'andamento clinico della malattia,
- d) possono essere presenti in una certa quota di soggetti sani (ad es. in familiari non affetti di pazienti con malattie autoimmuni od in soggetti anziani) senza che questi sviluppino mai una malattia evidente a livello clinico o subclinico [ibidem].

Gli autoanticorpi non patogenetici con significato di marcatori di malattia sono molti, a differenza di quelli patogenetici, e ricordiamo: Anti-tireoglobulina (Tg), Anti-perossidasi (TPO), Antimicrosomi tiroidei, Anti-cellule parietali gastriche (PCA), Anti- $H^+K^+$ -ATPasi, Anti-cellule  $\beta$  dell'isole di Langerhans (ICA), Anti-cellule steroideo-secernenti di surrene, ovaio o testicolo, Anti-nucleari

(ANA: gruppo di autoanticorpi con diverse specificità), Anti-ENA (antigeni nucleari estraibili: gruppo di autoanticorpi), Anti-mitocondri e Fattori reumatoidi.

**Epifenomeni:** rappresentano quella classe di autoanticorpi che appaiono in modo transitorio e si producono in seguito alla liberazione degli auto antigeni e presentano le seguenti caratteristiche

- a) sono per lo più transitori e possono formarsi anche in corso di malattie non autoimmuni come conseguenza di danni ai tessuti,
- b) non sono marcatori di specifiche malattie ed il loro titolo anticorpale è indipendente dall'andamento clinico della malattia in cui compaiono,
- c) possono essere presenti in una certa quota di soggetti sani (ad es. in soggetti anziani).

Fra i più noti di questa classe di autoanticorpi si possono ricordare anti muscolatura liscia e anti muscolo cardiaco (nel post-infarto miocardico) [ibidem].

In particolare gli autoanticorpi sono espressi nei confronti degli autoantigeni, che sono costituenti normalmente ritrovabili :

3. nel **nucleo**
4. nel **citoplasma** di tutte le cellule,
5. nel **citoplasma di granulociti neutrofili**.

### **3.2 Principali tecniche di rilevazione degli autoanticorpi**

La diagnosi delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS) viene posta secondo criteri clinici e immunologici; tra quest'ultimi un ruolo fondamentale

hanno gli anticorpi antinucleo (ANA) la cui ricerca rappresenta la prima indagine di laboratorio nell'approccio diagnostico delle MAIS [Tonutti et al., 2007].

Le tecniche per la ricerca degli autoanticorpi nel siero umano a scopo diagnostico sono svariate e il loro progressivo sviluppo nell'arco del tempo ne ha permesso una maggiore sensibilità e specificità. Tra i principali metodi ricordiamo:

Metodi immunochimici: consentono una determinazione qualitativa dell'autoanticorpo (presenza o assenza) come:

- Immunofluorescenza indiretta (IFI)
- Emoagglutinazione passiva (EAP)
- Controimmunolettroforesi (CIE)
- Immunoblotting
- Western Blotting

Metodi immunometrici che permettono la determinazione quantitativa delle concentrazioni anticorpali come:

- Saggio immunoenzimatico (ELISA) e sue varianti
- Saggio radioimmunologico (RIA) e sue varianti
- Saggio immunofluorescente (FIA) e sue varianti
- Saggio immunochemiluminescente (CLIA) e sue varianti

Al giorno d'oggi, le tecniche più comuni utilizzate dai laboratori analisi per la determinazione degli autoanticorpi, in particolar modo per gli ANA, sono rappresentate principalmente dall'immunofluorescenza indiretta e dalle tecniche immunoenzimatiche del tipo ELISA [Kumar et al., 2009].

### ***3.2.1 Immunofluorescenza***

L'immunofluorescenza è una tecnica di indagine che viene utilizzata per cercare e identificare anticorpi sierici o antigeni caratteristici di una malattia in un

prelievo umorale (sangue) o tissutale e i sistemi di fluorescenza sono stati largamente utilizzati vista la loro facile utilizzazione.

La tecnica viene effettuata mediante l'utilizzo di anticorpi, diretti contro gli antigeni specifici di cui noi vogliamo ricercarne la presenza e marcati con una sostanza fluorescente (fluoro cromo). I fluoro cromi sono particolari sostanze che se vengono colpiti da un fascio di luce ad una particolare lunghezza d'onda, hanno la capacità di emettere luce ad una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella assorbita; grazie a questo metodo siamo in grado di rendere visibili gli eventuali immunocomplessi antigene-anticorpo che si sono venuti a formare. Il legame della molecola con il tracciante però non deve influire sull'immissione della fluorescenza.

I principali fluoro cromi utilizzati sono l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) e l'isotiocianato di tetrametilrodamina (TRITC).

Generalmente la metodica dell'immunofluorescenza prevede che inizialmente il reagente venga depositato sul prelievo eseguito sul paziente. Segue poi il lavaggio del vetrino che permette di eliminare tutte le sostanze che non si sono legate. Infatti, se il campione prelevato non contiene l'antigene non si osserverà nessun tipo di reazione, in caso contrario invece si potrà osservare la fluorescenza, la cui forma e localizzazione (bastoncelli, piccole macchie ecc...) dipendono dalla struttura dell'antigene rilevato [Greidinger et al., 2003].

A seconda dal tipo di fluoro cromo che noi utilizziamo nell'analisi osserveremo che la fluorescenza del preparato è diversa; normalmente la fluorescenza osservata, grazie all'utilizzo di un microscopio a fluorescenza che legge ad una lunghezza d'onda di 500 nm, è giallo-verde quando utilizziamo l'isotiocianato di fluoresceina mentre è arancio-rossa quando invece utilizziamo isotiocianato di tetrametilrodamina.

Attualmente la tecnica di immunofluorescenza viene praticata secondo due modalità differenti, una diretta e l'altra indiretta.

La tecnica di immunofluorescenza diretta viene utilizzata principalmente quando vogliamo ricercare un antigene ignoto (batterio, cellula...) il quale, dopo essere stato fissato al vetrino o pozzetto attraverso specifiche metodiche, viene

messo a contatto con i presunti anticorpi specifici i quali sono stati marcati con la sostanza fluorescenza, la fluorescina.

A questo punto lasciamo a contatto, per il tempo necessario, l'antigene e l'anticorpo in modo tale da avere una interazione tra le due molecole che porterà alla formazione del complesso antigene-anticorpo; successivamente laviamo accuratamente il vetrino in modo da eliminare gli eventuali antigeni che non si sono legati.

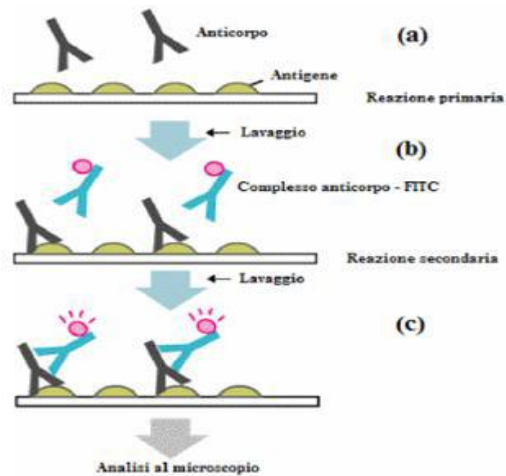
Infine analizziamo il tessuto attraverso un microscopio a fluorescenza e se notiamo la presenza di corpuscoli brillanti (verdi fluorescenti) significa che il siero contenente gli anticorpi fluorescenti è specifico per quell'antigene; in questo caso siamo quindi in presenza di un risultato positivo.

Nella tecnica indiretta, come possiamo vedere nella figura sotto, il siero del paziente viene opportunamente diluito; la diluizione iniziale del campione da analizzare è fondamentale per ottenere la massima specificità del test senza diminuirne la sensibilità e dipende dal tipo di anticorpo ricercato e dalla specificità del metodo.

A questo punto il campione viene fatto reagire con il substrato specifico fissato nel pozzetto per ricercare gli autoanticorpi specifici.

La scelta del substrato adeso al vetrino può essere rappresentata da cellule o sezioni di tessuto e determinerà la tipologia di anticorpo da rilevare.

Vediamo che se all'interno del siero sono presenti autoanticorpi questi riconosceranno gli antigeni presenti sul vetrino e si legheranno ad essi (reazione primaria tra l'anticorpo da riconoscere, anticorpo primario, e l'antigene) portando alla formazione di un immunocomplesso primario. Dopo questa prima fase di incubazione effettuiamo opportuni lavaggi che consentono l'eliminazione di tutti gli anticorpi che non si sono legati. Successivamente avremo una reazione secondaria tra il complesso ottenuto ed un anticorpo marcato con fluoro cromo (anticorpo secondario) e laviamo nuovamente. A questo punto leggiamo il preparato al microscopio e se noteremo la fluorescenza significa che l'anticorpo ricercato è specifico per l'antigene a noi noto.



**Figura 5. Applicazione della tecnica di immunofluorescenza indiretta**

La tecnica di immunofluorescenza indiretta presenta diversi vantaggi e svantaggi; tra i principali vantaggi ricordiamo:

- Buona sensibilità e specificità di reazione
- Semplicità e rapidità di esecuzione
- Permette di indagare contemporaneamente la presenza di autoanticorpi rivolti contro diversi tipi di antigeni
- È di facile riproducibilità
- Ha un costo contenuto

Mentre tra gli svantaggi ricordiamo:

- È una tecnica estremamente soggettiva, in quanto l'interpretazione dei risultati è condizionata da numerosi fattori tra i quali l'abilità e l'esperienza dell'operatore e il tipo di microscopio
- Le variabili metodologiche richiedono di ottimizzare la standardizzazione;

- Alcuni antigeni nucleari solubili in soluzione possono essere facilmente perduti durante le operazioni di lavaggio
- Non consente l'identificazione delle specificità anticorpali

### ***3.2.2 Tecniche immunoenzimatiche***

I metodi immunometrici e in particolare le tecniche immunoenzimatiche sono tecniche che nel corso degli ultimi anni hanno preso sempre più sviluppo tanto che vengono utilizzate in alternativa, in aggiunta e in sostituzione dell'immunofluorescenza indiretta.

Le tecniche immunoenzimatiche (*Enzyme-immunoassays: E.I.A.* ) sono metodi analitici utilizzate per identificare e/o quantificare antigeni, o anticorpi presenti in fluidi biologici.

Si basano sulla capacità di legame tra una sostanza, definita antigene (Ag) e un anticorpo (Ab) in grado di riconoscere in modo selettivo la struttura antigenica. L'interazione tra antigene e anticorpo è dinamica e reversibile ed è dovuta alla combinazione di diversi fattori che partecipano a questi legami; si instaurano interazioni di tipo attrattivo come forze di *Van der Waals*, legami ad idrogeno, interazioni dipolari.

La metodica prevede l'immobilizzazione di un anticorpo o di un antigene ad una fase solida e di un ligante o di un ligando marcato con un enzima che tra i più utilizzati, ricordiamo la  $\beta$ -galattosidasi, la perossidasi e la fosfatasi alcalina, in quanto presentano una attività catalitica molto elevata e l'attività enzimatica stessa viene utilizzata come amplificatore della reazione.

In questo caso è estremamente importante che l'enzima agisca su un substrato che alla fine della reazione deve risultare colorato per poi poter essere letto attraverso uno spettrofotometro con un elevato coefficiente di assorbanza (intorno ai 900-1000) [Greidinger et al., 2003].



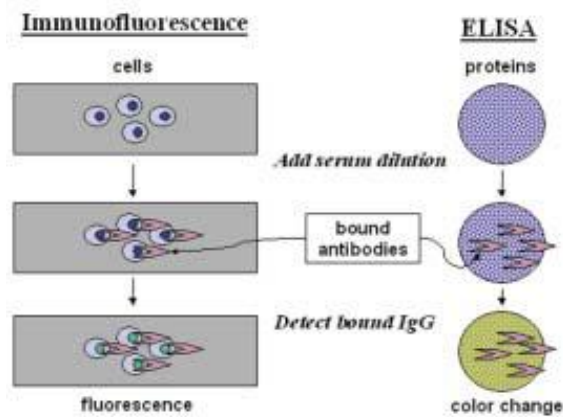


Figura 6. Diagramma della tecnica di immunofluorescenza e ELISA

L'EIA può essere di due tipi:

- EIA omogeneo: l'interazione antigene anticorpo modula l'attività dell'enzima; se l'enzima è legato all'anticorpo questo risulta essere inattivo mentre se l'anticorpo riconosce l'antigene quest'ultimo si stacca dall'enzima al quale era legato, questo si attiva colorando il substrato. In questo metodo la reazione avviene immediatamente e più è alta la concentrazione dell'antigene più è elevata l'attività enzimatica. Un esempio di EIA omogeneo è rappresentato dall'EMIT utilizzato principalmente per la ricerca di droghe dove se non c'è la droga l'anticorpo legato all'enzima non scinde il substrato, mentre se la droga è presente l'anticorpo si lega alla droga stessa liberando l'enzima che potrà così agire sul substrato.
- EIA eterogeneo: l'interazione antigene-anticorpo avviene in fase solida e non si assiste ad una modifica dell'attività dell'enzima che viene utilizzato come tracciante cosicché l'enzima rimane sempre attivo. Il metodo più utilizzato è il metodo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) che viene principalmente utilizzato per

determinare la presenza e la concentrazione di un antigene o di un anticorpo nel campione da testare.

Per misurare la concentrazione dell'antigene si utilizzano principalmente due tecniche ELISA: diretto o a "sandwich" e l'ELISA competitivo, mentre per misurare la concentrazione di anticorpo si utilizza principalmente l' ELISA indiretto.

Il saggio diretto o a sandwich può essere idealmente schematizzato in tre fasi:

- a. Nei pozzetti di una specifica piastra viene fissato al substrato, che può essere nitrato di cellulosa o PVC, un anticorpo monoclonale specifico per l'antigene che vogliamo ricercare. Il fondo del pozzetto viene saturato con l'anticorpo che aderisce al fondo dei pozzetti e inseguito viene effettuato, grazie ad una soluzione tampone, un lavaggio per eliminare l'eccesso di anticorpo;
- b. Aggiungiamo, in forma sierica, il campione biologico del quale vogliamo verificare o meno la presenza dell'antigene che può essere ad esempio un virus. Dopo un determinato arco di tempo se l'anticorpo ha trovato il suo epitopo specifico, lo lega formando così il complesso antigene-anticorpo. Per evitare che rimangano eccessive tracce di antigene il sistema viene lavato abbondantemente;
- c. Nell'ultima fase si provvede all'inserimento di un anticorpo monoclonale, questa volta però coniugato con un enzima, tipicamente fosfatasi alcalina e per ossidasi e successivamente viene effettuato un lavaggio. L'anticorpo secondario, che deve essere selettivamente specifico contro il determinato antigene, si legherà all'antigene se questo è presente e l'eccesso viene eliminato con un successivo lavaggio. Se all'interno del siero non è presente

l'antigene specifico per l'anticorpo, l'anticorpo secondario (e l'enzima ad esso coniugato) verrà eliminato grazie al lavaggio.

Successivamente alle tre fasi, aggiungiamo un liquido che, a contatto con l'enzima, determina una variazione del colore (solitamente la colorazione risulta essere gialla) osservabile al microscopio o, in alcuni casi, anche ad occhio nudo.

Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che vogliamo ricercare e l'intensità della colorazione è misurabile attraverso uno spettrofotometro. In questa tecnica l'attività enzimatica misurata sarà direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente.

Il test elisa a "SANDWICH" è un test veloce, accurato e permette anche di determinare la quantità assoluta dell'antigene nel campione analizzato se utilizziamo come standard un antigene purificato. Il fatto di non poter utilizzare tutte le tipologie di anticorpi rappresenta invece un limite di questa metodica.

Nel metodo COMPETITIVO viene fatta reagire una quantità nota di antigene marcato con un enzima e una quantità ignota dallo stesso antigene libero, con uno specifico anticorpo legato ad una fase solida. Sul sito di legame dell'anticorpo si crea una competizione tra antigene marcato e antigene non marcato. A questo punto, dopo aver effettuato un lavaggio con una specifica soluzione tampone, viene aggiunto il substrato e si misura l'attività enzimatica.

Normalmente l'attività enzimatica misurata è proporzionale alla frazione di antigene marcato presente nella miscela.

Nel test ELISA indiretto, invece, inizialmente ricopriamo il pozzetto della piastra con l'antigene specifico dell'anticorpo che vogliamo ricercare e in seguito effettuiamo un lavaggio per eliminare l'eccesso.

Successivamente si aggiunge il siero del campione, che si pensi contenga gli anticorpi specifici per quel determinato antigene legato (adsorbito) al pozzetto e si effettua un ulteriore lavaggio per eliminare l'eccesso.

Si aggiunge un secondo tipo di anticorpo, marcato con un enzima, che legherà il complesso antigene (adsorbito) anticorpo (del campione) se nel campione sono presenti gli anticorpi. Viene effettuato un lavaggio per eliminare

eventuali anticorpi non legati al complesso e infine viene aggiunto il substrato dell'enzima con cui è stato marcato l'anticorpo.

Se nel pozzetto si verifica un cambiamento di colore, dovuto dall'azione dell'enzima sul substrato, significa che nel campione è presente l'anticorpo che stavamo ricercando. L'attività enzimatica misurata sarà proporzionale alla quantità di anticorpo specifico presenti nel siero originale.

Le caratteristiche dell'ELISA indiretto sono quelle di essere un metodo veloce, accurato e che permette la rilevazione sia della presenza degli anticorpi contro l'antigene immobilizzato al pozzetto sia della quantità degli anticorpi presenti. Il limite principale invece sta nel dover utilizzare antigeni purificati.

È un saggio molto utilizzato in diagnostica ad esempio alcuni test per evidenziare la presenza nel sangue di anticorpi anti HIV utilizzano l'ELISA indiretto.

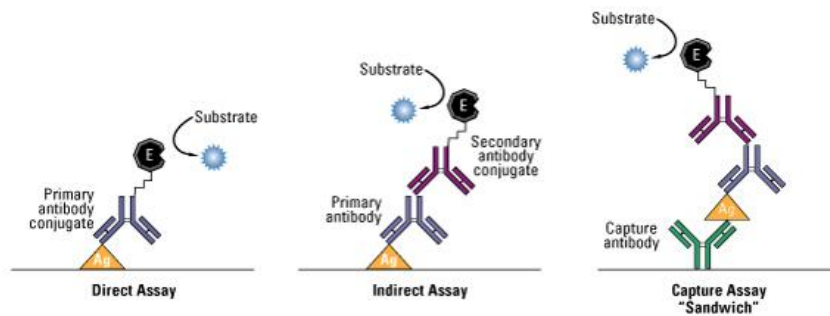


Figura 7. Metodi immunoenzimatici

### 3.3 Tipologie di autoanticorpi

Abbiamo visto che gli autoanticorpi in base alle loro caratteristiche funzionali si possono classificare in marcatori patogenetici, non patogenetici ed epifenomeni. In base alla loro presenza nelle diverse patologie autoimmuni e in base alle loro diverse tecniche di determinazione gli autoanticorpi possono essere così classificati:

- Anticorpi antifosfolipidi
- Fattore reumatoide
- Anticorpi anticitrullina
- Anticorpi antinucleo (ANA)
- Anticorpi anti-DNA
- Anticorpi anti antigeni nucleari estraibili (ENA)

### ***3.3.1 Anticorpi antifosfolipidi***

Gli anticorpi antifosfolipidi (aPS) sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro i diversi componenti del gruppo anionico (molecole cariche negativamente) dei fosfolipidi come la cardiolipina, la fosfatidilserina e l'acido fosfatidico.

Vediamo come i fosfolipidi siano molecole di fondamentale importanza nel nostro organismo, infatti sono i principali costituenti delle membrane cellulari ma rappresentano anche delle molecole fondamentali nel processo di coagulazione del sangue.

Gli aPS vengono classificati [Khanh T Ho et al., 2003], in base al loro metodo di determinazione in:

- Anticorpi anticardiolipina (aCL)
- Anti beta2- glicoproteina I (anti  $\beta$  GPI)
- Lupus anticoagulante (LAC)

Vediamo che i primi due tipi di autoanticorpi vengono determinati con test immunologici (TEST ELISA) che hanno lo scopo di andare a valutare la reattività ai fosfolipidi, per quanto riguarda gli aCL e la reattività alle proteine leganti i

fosfolipidi (ad esempio beta2GPI, protrombina) per quanto riguarda gli anti-β2 GPI.

Il LAC, invece, viene determinato mediante un test coagulativo, nel quale si va a valutare la sua capacità di determinare un allungamento dei tempi della coagulazione [Martino et al., 2010].

Studi hanno dimostrato che la presenza di anticorpi antifosfolipidi è utile nel sospetto clinico di LES e come siano particolarmente associati alla sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) primaria o secondaria ad altre patologie autoimmuni [Bizzarro,2006].

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi è caratterizzata principalmente da trombosi vascolari e/o poliabortività e dalla positività al LAC riscontrabile in due o più occasioni a distanza di almeno 6 settimane e dalla positività, ad alto e medio titolo, per gli anticorpi anticardiolipina IgG o IgM riscontrabile in due o più occasioni a distanza di almeno 6 settimane.

### ***3.3.2 Fattore reumatoide***

Il fattore reumatoide è un autoanticorpo diretto contro i tessuti propri di un organismo, in particolar modo diretto contro la porzione Fc<sub>4</sub> delle IgG. Questo forma, con il proprio antigene, un complesso immune che circola nel sangue stimolando il rilascio dei mediatori dell'infiammazione da parte dei tessuti, innescando importanti reazioni flogistiche anche a livello articolare.

Esistono Fr di tipo IgM, IgG, IgA, IgE, ma il Fr di tipo IgM è quello più ricercato in laboratorio. Esistono diversi metodi di determinazione:

1. Test al lattice (RA test positivo per diluizione  $\geq 1:40$ )
2. Metodo nefelometrico con valori espressi in unità internazionali
3. Metodo ELISA, che risulta essere il metodo più sensibile e più specifico e anche in grado di riconoscere FR di tutti gli isotopi.

La determinazione del fattore reumatoide deve essere effettuata in tutti quei soggetti nei quali si ha rilievo clinico di artrite tenendo presente che un esito positivo non indica necessariamente la presenza di artrite reumatoide e che, viceversa, un esito negativo non la esclude; si riscontra infatti nell'85% degli adulti con artrite reumatoide ma solo nel 5-10% dei bambini con artrite giovanile, pertanto non può essere utilizzato come test di screening per questa patologia.

È presente anche nel 5% della popolazione sana e anche in altre malattie reumatiche, quali LES (10-30%), sclerodermia (25-45%) e la sua determinazione può risultare positiva anche in malattie infettive come tubercolosi, epatite, malattie virali [Martino et al., 2010]

### ***3.3.3 Anticorpi anticitrullina***

Si tratta di autoanticorpi diretti contro il peptide citrullinico ciclico (CCP) la cui produzione avviene nel tessuto sinoviale infiammato [Habash-Bseiso et al., 2005].

La loro determinazione avviene mediante tecniche immunoenzimatiche ELISA. Vengono utilizzati per la diagnosi di artrite reumatoide e sono test altamente specifici (89-98%) e sensibili (41-86%) per la diagnosi di artrite reumatoide dell'adulto, mentre soltanto pochi bambini con artrite idiopatica giovanile (FR positivo) presentano anticorpi anti CCP [Bizzarro, 2006].

Grazie a questo test è possibile selezionare le persone che soffrono di artrite reumatoide, addirittura quando ancora non si sono evidenziate lesioni articolari. Sono estremamente importanti nella diagnosi precoce, importante per impostare una terapia aggressiva già dalle fasi iniziali e permettere così il miglioramento della prognosi a lungo termine [Marrone et al., 2007].

### ***3.3.4 Anticorpi anti-DNA***

Gli anticorpi rivolti contro il DNA possono reagire con diversi determinanti antigenici rappresentati dalle catene del desossiribosio, dei nucleosidi, delle basi presenti sulla singola elica (ss DNA), sulla doppia elica (ds DNA o n DNA) o su entrambi i tipi di DNA. Numerosi studi hanno dimostrato che gli autoanticorpi anti-DNA nativo a doppia elica sono altamente specifici per LES e presenti nei soggetti affetti con prevalenza variabile tra il 40 e l'80% così da costituire una dei criteri classificativi del LES [Villalta et al., 2002].

Gli anticorpi anti ss-DNA risultano invece essere più aspecifici e possono comparire molto più frequentemente in numerose altre malattie autoimmuni [Tozzoli et al., 2002].

La loro ricerca è quindi consigliata in caso di sospetto clinico di LES e in caso di positività degli ANA in IFI. Benché sia rara la presenza degli anti-dsDNA in caso di ANA negatività, si consiglia comunque la determinazione degli autoanticorpi anti ds-DNA qualora sussista un forte sospetto diagnostico di LES.

Il monitoraggio del titolo di questi autoanticorpi, ha una specifica finalità clinica in quanto aumenta nelle fasi attive della malattia e scompare o comunque si riduce di molto nelle fasi di remissione; un innalzamento della concentrazione degli autoanticorpi può precedere la riacutizzazione della malattia di alcune settimane [Tozzoli et al., 2002].

Vista la notevole importanza del dosaggio degli anticorpi anti-ssDNA si sono sviluppate numerose e diverse tecniche che ne permettono la loro quantificazione: tra queste abbiamo la tecniche di radiobinding (tra cui la tecnica originale di Farr), immunofluorescenza indiretta (IFI) su *Crithidia luciliae* e il test immunoenzimatico ELISA [Kavanaugh, 2000].

Vediamo che il test di Farr rappresenta il metodo di elezione per la diagnosi di LES anche se l'utilizzo di radioisotopi ne limita il suo stesso utilizzo [Keren et al., 2002 - Kumar, 2009].

Una alternativa è rappresentata dall'IFI che risulta essere una tecnica altamente specifica, con una buona sensibilità, una relativa accuratezza e permette



di rilevare la presenza delle varie classi di autoanticorpi ma non consente un loro determinazione quantitativa accurata.

Questo test è basato su una reazione che avviene sul DNA mitocondriale a doppia elica contenuto nel cinetoplasto (grosso mitocondrio dove è concentrato l'n-DNA) di un microrganismo non patogeno per l'uomo (*Crithidia luciliae*) [Keren et al., 2003 - Kumar, 2009].

In questo caso i campioni del paziente sono incubati con substrato antigene per consentire lo specifico legame degli autoanticorpi all'nDNA del cinetoplasto. Se sono presenti anticorpi anti-nDNA, si verrà a formare un complesso stabile antigene-anticorpo. Dopo il lavaggio per rimuovere anticorpi non specifici, il substrato viene incubato con un reagente anticorpo anti-umano coniugato con fluoresceina [Peene et al., 2001].

Quando i risultati sono positivi, avviene la formazione di un complesso stabile composto dall'anticorpo fluorescente legato all'anticorpo anti-nDNA umano che è legato all'antigene nDNA. Tale complesso può essere visualizzato con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza e noteremo che nei campioni positivi, il cinetoplasto o il nucleo mostreranno una brillante fluorescenza verde mela all'interno degli organismi della *Crithidia luciliae*, mentre se il campione è negativo per nDNA, il cinetoplasto non mostrerà alcuna fluorescenza [ibidem].



**Figura 8. *Crithidia luciliae*, anticorpi anti-DNA**

Le tecniche EIA sono automatizzabili, sono quantitative e sensibili, possono però rilevare anticorpi a bassa avidità di incerto valore clinico.

Uno dei sistemi EIA, utilizzato per la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA prevede l'utilizzo di pozzetti rivestiti di DNA plasmidico a doppio

filamento in cui vengono incubati i campioni in esame con una diluizione di 1:10, i controlli positivi, i controlli negativi e gli standard per la curva di calibrazione.

Al termine dell'incubazione i pozzetti vengono lavati e gli viene aggiunto un anticorpo anti IgG umane con  $\beta$ -galattosidasi e sottoposti nuovamente a incubazione.

Dopo l'incubazione e il successivo lavaggio del pozzetto, che consente di allontanare il coniugato che non si è legato in modo specifico, viene aggiunto il substrato (derivato di  $\beta$ -D-galattoside) e dopo circa 30' di reazione, questa viene arrestata aggiungendo una soluzione stoppante costituita da carbonato di sodio [Peene et al., 2001].

La misurazione della fluorescenza nella miscela viene effettuata in OD, maggiore sarà la misura maggiore sarà la quantità di IgG anti-dsDNA presenti nel campione.

I risultati vengono così confrontati con la risposta dei campioni, utilizzati per la curva di calibrazione, ed espressi in IU/ml [Tozzoli et al., 2002]

I limiti inferiore e superiore del test sono rispettivamente 0,5 e 400 IU/ml; studi hanno rilevato tre fasce di valori:

1. < 10 IU/ml = valori negativi
2. 10-15 IU/ml = valori dubbi che devono essere sottoposti a controllo
3. 15 IU/ml = valori positivi

Normalmente per la ricerca di questa classe di autoanticorpi, soprattutto in fase diagnostica iniziale, è preferibile l'utilizzo del metodo IFI su *Crrithidia luciliae* con una diluizione del siero di 1:10 in quanto ha un'elevata specificità.

Le metodiche EIA possono essere comunque utilizzate per la determinazione degli anti-dsDNA purché i risultati positivi vengano successivamente confermati con la tecnica IF e sono principalmente utili nella loro determinazione quantitativa importante sia nella fase di monitoraggio che nella fase di decorso della terapia [Tozzoli et al., 2002].

### 3.3.5 Anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili ENA

Questa classe di autoanticorpi è stata associata a numerose patologie autoimmuni e sembrano anche avere un ruolo importante nella diagnosi e nella prognosi di queste. Sono responsabili di una positività di tipo punteggiato (non centromerico) all'ANA test e sono diretti contro antigeni solubili, facilmente estraibili dal nucleo in soluzione saline. Normalmente non si consiglia la determinazione degli ENA come prima indagine nella diagnosi delle patologie autoimmuni; viene effettuata in caso di positività degli ANA o, in caso di negatività, quando il soggetto presenta segni clinici altamente suggestivi di malattia sistemica autoimmune [Hoffman, 2002].

Come prima indagine viene effettuato un ENA screening, attraverso un metodo immunenzimatico in fase solida; se questo risulterà essere positivo verranno determinate le singole specificità anticorpali che sono associate a condizioni cliniche differenti. Come è riportato nella tabella sotto.

Anti-Sm	Alta specificità (99%), ma bassa sensibilità per il LES
Anti-U1 RNP	Alta sensibilità (95-100%) e alta specificità per la connettivite mista ma 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
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	Bassa sensibilità (35%) e alta specificità (99%) per la sclerosi (anti Scler-70) sistemica giovanile
Anti-Jo-1	Bassa sensibilità (20-40%) e alta specificità (98%) per la polimiosite/dermatomiosite

**Tabella 1. Singole specificità anticorpali associate a differenti condizioni cliniche**

Normalmente gli anticorpi anti-ENA sono presenti già al momento della diagnosi della patologia autoimmune e non subiscono un incremento di positività per cui non è utile ripetere la ricerca di questi autoanticorpi più volte.

Questo è invece consigliato solo quando il quadro clinico del paziente subisce delle modificazioni per valutare la presenza di eventuali associazioni di diverse patologie autoimmuni.

I metodi analitici che permettono la rilevazione degli anti-ENA presentano differenti caratteristiche di sensibilità e specificità, nessuno di essi è da solo in grado di garantire un'assoluta affidabilità; infatti una possibile negatività degli anti-ENA, in presenza di un eventuale elevato titolo di ANA, deve essere ricontrollata e riconfermata attraverso l'utilizzo di due tecniche diverse [Bizzarro, 2001].

Esiste una correlazione tra la positività degli ANA e la presenza anti-ENA che è condizionata dal titolo degli ANA; in particolar modo la probabilità di ottenere un risultato positivo nella ricerca degli anti-ENA aumenta con l'aumentare del titolo ANA. In caso di una positività ANA ad una diluizione di 1:320 solo circa il 16% dei pazienti presenta una positività anche agli ENA; la percentuale di positività agli anti-ENA supera quasi il 50% solo per concentrazioni uguali o superiori 1:1280 quindi per concentrazioni inferiori a 1:160 la ricerca degli anti-ENA non dovrebbe essere effettuata [Van Venrooij et al., 1991]. Solo nel caso in cui abbiamo una positività citoplasmatica granulare è necessario effettuare una ricerca degli anti-ENA per escludere la presenza di un anticorpo Anti-Jo-1 [Tozzoli et al., 2002].

### ***3.3.6 Anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili ANCA***

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili ANCA rappresentano un tipo di autoanticorpi, principalmente del tipo IgG, diretti contro antigeni situati nel citoplasma dei granulociti neutrofili. Sono considerati un utile marker sierologico per la diagnosi e il monitoraggio di tre patologie principali che sono:

granulomatosi di Wegener, la poliangiite microscopica e sindrome di Churg-Strauss [Sebastiani, 2009].

In base alla disposizione che assumono legandosi al loro antigene bersaglio gli ANCA si possono dividere in due classi: C-ANCA e P-ANCA.

I C-ANCA presentano una colorazione citoplasmatica granulare mentre i P-ANCA presentano una colorazione perinucleare e/o nucleare [Martino et al., 2010].

La metodica maggiormente utilizzata nella determinazione di questi autoanticorpi è l'IFI, alla quale viene spesso associata il test immunoenzimatico ELISA come test di conferma antigene specifico.

### **3.4 Anticorpi Anti Nucleo ANA**

Gli autoanticorpi antiantigeni nucleari (ANA) rappresentano una grande famiglia di autoanticorpi diretti contro i costituenti fondamentali della cellula la cui rilevazione è di grande importanza nella diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS) [Kern et al., 2000 - Kumar et al., 2009]. Sono autoanticorpi appartenenti a tutte le classi di immunoglobuline, ma in particolar modo appartengono alle IgG rivolte principalmente contro gli acidi nucleici e le varie proteine nucleari.

La loro presenza rappresenta una caratteristica peculiare delle malattie autoimmuni non organo specifiche quali LES, artrite reumatoide (AR), sclerodermia, connettivite mista (MCDT), sindrome di Sjogren (SS), panartrite nodosa, eritema nodoso, dermatomiosite (DM), polimiosite (PM), sclerosi sistemica progressiva (SSP) [Voigt et al., 2012].

Costituiscono il test di primo livello per la diagnosi di tali patologie, anche se va sottolineata la non assoluta specificità per le stesse in quanto possono essere presenti, anche se con una minor prevalenza e a bassi titoli, in pazienti con condizioni patologiche diverse come la cirrosi biliare primitiva (PBC), l'epatite

cronica attiva, infezioni, infiammazione e neoplasie [Fenger et al., 2004 - Voigt et al., 2012].

Sono considerati anticorpi non patogenetici e, quindi, tra le varie caratteristiche, includono quella di essere presenti in una certa quota di soggetti sani (anziani, donne gravide, bambini) senza che questi sviluppino mai la malattia [Wananukul et al., 2005].

È proprio per questo motivo, che la ricerca degli ANA deve essere richiesta ed eseguita solo quando il paziente mostra la presenza di evidenti segni clinici che fanno presupporre la presenza di una malattia autoimmune sistemica [Ulvestad et al., 2000]. Il test relativo alla loro determinazione è stato definito “ANA test”.

La presenza degli anticorpi antinucleo venne dimostrata per la prima volta, grazie alle tecniche di immunofluorescenza, nel 1957 [Bradwell et al., 1995]; da questa data sono stati notevoli i progressi e gli sviluppi che si sono condotti sul test ANA [Menegari et al., 2012]. L’ANA test risulta, infatti, essere uno dei test più comuni al mondo e uno dei test più utilizzati nei laboratori di analisi.

Nel 1948 Hargraves, Richmond and Morton dimostrarono la presenza di cellule anomale nel midollo osseo di un paziente affetto da una sindrome di LES acuta. Chiamarono tali cellule “cellule LE” e le descrissero come frammenti maturi polimorfonucleari di leucociti [Kumar, 2009]. Il test per la determinazione delle cellule LE, mostrò tuttavia alcuni svantaggi. Il più significativo era quello di essere di difficile esecuzione e poco sensibile, tanto da non essere oggi giorno più utilizzato [Keren, 2003].

Nel 1950, Coons e Kaplan [Bradwell et al., 1995 - Kavanaugh et al., 2000 - Fritzler, 2011] descrissero l’uso di un anticorpo marcato con fluorescina per l’identificazione di antigeni presenti nel tessuto mentre nel 1951 Lee, Michael e Vural [Bradwell et al., 1995] mostrarono che il fenomeno delle cellule LE era causato da una gamma globulina che probabilmente era un anticorpo.

Nel 1957 Holborow, Weir e Johnson [ibidem] mostrarono, attraverso l’utilizzo di un anticorpo marcato con fluoresceina, che il siero di pazienti positivi alle cellule LE presentava degli anticorpi che producevano una fluorescenza omogenea nucleare nei tessuti umani.

Nel 1961 Beck [ibidem] mostrò l'esistenza di diversi patterns nucleari; grazie all'utilizzo di una sezione di fegato di ratto infatti dimostrò che i nuclei presenti in sieri di pazienti affetti da diversi tipi di patologie reumatiche mostravano diverse colorazioni (omogenea, nucleare, maculata). Inoltre mostrò come l'estrazione delle cellule era in grado di provocare un'alterazione dei patterns. Proprio per questo motivo negli anni successivi divenne sempre più frequente l'uso di cellule umane che permise una enorme espansione nel numero di patterns riconoscibili [Kavanaugh et al., 2000 - Keren, 2002]. Negli ultimi anni la scoperta di nuovi patterns ha avuto un rallentamento, causato non solo dal numero di patterns riconoscibili ma anche dall'utilizzo di tecniche più specifiche come ad esempio l'immunoprecipitazione, immunoblotting e il test immunoenzimatico ELISA [Bradwell et al., 1995].

Acidi Nucleici	dsDNA, ssDNA, proteine istoniche
Proteine non istoniche RNA	ENA, centromero, PCNA/ciclina
Antigeni del nucleolo	RNA e ribonucleoproteine nucleari
Antigeni nucleari poco definiti	

**Tabella 2. Antigeni con cui reagiscono gli ANA**

Oggi giorno la tecnica più utilizzata nella determinazione degli ANA è l'immunofluorescenza indiretta (IFI) [Aghajani, 2007 - Melegari et al., 2012], per le sue caratteristiche di sensibilità, facilità di esecuzione e basso costo. In passato nella tecnica IFI venivano utilizzati, come substrato, sezioni di fegato e rene di ratto ma nel corso degli ultimi dieci anni il loro uso è stato sostituito da linee cellulari neoplastiche (HEp-2) ottenute da carcinoma laringeo umano [Bradwell et al., 1995 - Kavanaugh, 2000].

Le cellule HEp-2 presentano numerosi vantaggi rispetto ai tessuti murini [Hoffman, 2002]:

- sono un substrato più sensibile e quindi permettono l'identificazione di un numero maggiore di patterns;

- essendo cellule di derivazione umana presentano una maggiore specificità rispetto ai tessuti animali;
- la presenza di una popolazione cellulare omogenea in monostrato assicura che tutti nuclei siano visibili;
- hanno la capacità di esprimere antigeni presenti in tutte le fasi del ciclo cellulare;
- permettono una buona visualizzazione di tutte le strutture cellulari;
- permettono l'identificazione di anticorpi ristretti per antigeni peculiari alla specie umana;
- la distribuzione degli antigeni è uniforme.

Le cellule HEp-2 si presentano infatti con grandi nuclei, i preparati su i vetrini contengono un considerevole numero di cellule in divisione e quindi utili per evidenziare antigeni diversamente espressi nelle diverse fasi del ciclo cellulare permettendo così il riconoscimento di più di 30 differenti patterns [ibidem].

I diversi patterns possono inoltre dipendere dall'utilizzo ottimale di certi fissativi perché alcuni degli antigeni, come ad esempio SS-A, possono essere facilmente denaturati; proprio per questo è necessario porre estrema attenzione durante la fase di preparazione delle cellule o durante la selezione dei prodotti da utilizzare [Keren, 2002].

L'elevato livello di cellule mitotiche trovate nelle cellule HEp-2 può inoltre essere un aiuto per la determinazione di patterns omogenei rispetto a patterns granulari.

Il fatto di utilizzare un substrato non specifico nell'esecuzione del test potrebbe rappresentare uno svantaggio, tuttavia l'ampia specificità che mostrano le cellule HEp-2 risulta essere ideale nei test di screening [Bradwell et al., 1995].

La determinazione degli autoanticorpi di classe IgG con il metodo di immunofluorescenza indiretta, su cellule HEp-2 risulta quindi essere la prima indagine da effettuare nella diagnostica delle malattie autoimmuni; il test ANA in IFI è l'esame dotato di maggiore sensibilità mentre la sua specificità è bassa, è



relativamente poco costoso e di facile esecuzione. Tutte queste caratteristiche fanno sì che l'IFI rappresenti il gold standard per gli ANA test.

La determinazione degli ANA è di notevole importanza nella diagnosi di LES e di altre malattie reumatiche [Habash-Bseiso, 2005]. L'ANA test non è attualmente utile per la diagnosi di polimiosite/dermatomiosite viste le relative sensibilità (61%) e specificità (63%); infatti un risultato negativo dovrebbe essere confermato attraverso ulteriori analisi specifiche autoanticorpali.

Uguualmente, l'ANA test non è utile ne per la diagnosi di SSj (bassa sensibilità 48% e specificità 52%) ne per la diagnosi di artrite reumatoide e artrite reumatoide giovanile.

Il patterns di fluorescenza, che indica la disposizione degli autoanticorpi, viene distinto in: omogeneo, periferico, granulare, centromerico, nucleolare, pleomorfo, puntiforme [Keren, 2002 - Habash-Bseiso 2005 - Kumar, 2009]. Attraverso il patterns di fluorescenza è possibile indirizzarsi sul tipo di specificità autoanticorpale.

Sono noti diversi quadri fluoroscopici di ANA per i quali è dimostrata un associazione con patologie autoimmuni ma al momento dei circa 40 tipi di quadri fluoroscopici solo circa la metà sono realmente associati a quadri clinici; proprio per questo non è consigliabile individuare l'autoanticorpo specifico in tutti i casi di positività degli ANA [Tozzoli, 2002].

Tra i quadri ANA con significato per la clinica i più frequenti sono:

- **Pattern omogeneo** (DNA, DNP, istoni): fluorescenza omogenea diffusa a tutto il nucleo con colorazione dei cromosomi delle cellule in mitosi. Il patterns omogeneo è tipico della presenza di anticorpi anti-DNA, anti-istoni. Per quanto riguarda la rilevanza clinica vediamo che gli anticorpi anti-DNA sono chiaramente implicati nella diagnosi del LES e sono presenti nel circa il 70% dei pazienti con LES in fase attiva; infatti la loro presenza è uno dei principali criteri di classificazione del lupus; molto raramente si verificano in pazienti con

lupus indotto da farmaci, con artrite reumatoide o in pazienti con sindrome di Sjoregen primaria.

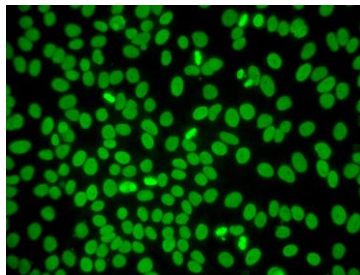


Figura 9. Pattern omogeneo<sup>4</sup>

- **Pattern granulare o speckled** (RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La): fluorescenza dei nuclei finemente (fine speckled) o grossolanamente (coarse speckled) granulare evidente e cromosomi delle cellule in mitosi negativi.

Questo patterns, in particolare il fine speckled, è associato con la presenza di anticorpi contro SSA e antigeni SSB. La presenza di anticorpi SS-A/Ro si ritrova nella maggior parte in pazienti affetti da sindrome di Sjogren e si verifica anche nel 24-60% di pazienti affetti da LES.

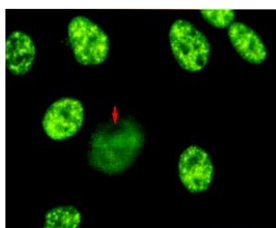


Figura 10. Pattern coarse speckled<sup>5</sup>

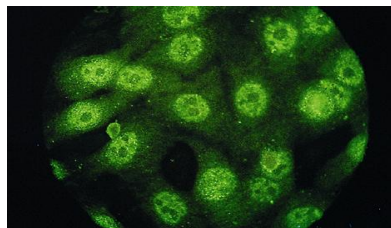


Figura 11. Pattern fine speckled<sup>6</sup>

---

<sup>4</sup> Immagine presa dal manuale Atlante di microscopia in immunofluorescenza per la diagnosi di patologie autoimmuni (1995), Pozzoli R.

<sup>5</sup> Immagine presa dal manuale Atlante di microscopia in immunofluorescenza per la diagnosi di patologie autoimmuni (1995), Pozzoli R.

<sup>6</sup> ibidem

- **Pattern periferico** (DNA, DNP, istoni): fluorescenza marcata dello strato submembranale cromatinico nucleare, con cromosomi delle cellule in mitosi anche essi fluorescenti.
- **Pattern nucleolare** : fluorescenza dei soli nuclei che può essere o compatta o a frammenti; più in particolare una fluorescenza granulare dei nucleoli sembra essere dovuta ad autoanticorpi anti-RNA polimerasi che sono presenti in pazienti affetti da sclerosi sistemica umana.

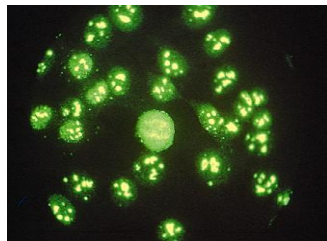


Figura 12. Pattern nucleolare<sup>7</sup>

- **Pattern centromerico**: fluorescenza puntiforme dei nuclei e dei centromeri dei cromosomi delle cellule in mitosi che in alcune fasi assume un aspetto quasi filamentoso. La presenza di questo pattern è tipica di soggetti che presentano sindrome di CREST, fenomeno di Raynaud.

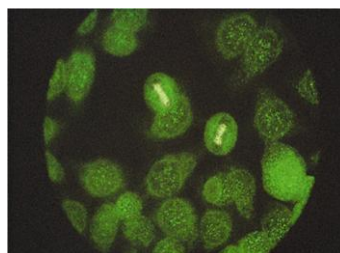


Figura 13. Pattern centromerico<sup>8</sup>

Vediamo che i quadri di fluorescenza nucleolare e del centromero sono meno frequenti rispetto ai precedenti, mentre per quanto riguarda i quadri di

---

<sup>7</sup> ibidem

<sup>8</sup> ibidem

fluorescenza citoplasmatica sono associati a patologie poco frequenti e sono rappresentati principalmente dalla fluorescenza granulare (RNA sintetasi), dalla fluorescenza mitocondriale, dalla fluorescenza ribosomiale, dalla fluorescenza del citoscheletro, dalla fluorescenza dell'apparato del Golgi e dei lisosomi [Tozzoli, 2002 - Kumar, 2009].

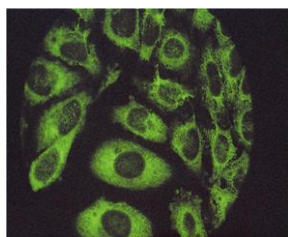


Figura 14. Fluorescenza granulare<sup>9</sup>

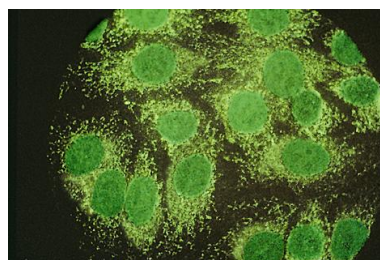


Figura 15. Fluorescenza mitocondriale citoplasmatica<sup>10</sup>

Un siero viene considerato positivo quando la fluorescenza osservata è significativa e l'intensità dell'immunofluorescenza può essere valutata in modi differenti: in accordo con le linee guida fornite dal Central for Disease Control (CDC) di Atlanta con una scala qualitativa ordinale di valori crescenti da + a ++++ o negativo [Peene, 2001 - Tozzoli et al, 2002].

Questo metodo presenta le caratteristiche di essere rapido e a basso costo.

Più correttamente e più frequentemente la concentrazione anticorpale viene espressa in titoli; questo metodo permette di differenziare in modo più accurato i titoli bassi dai titoli alti.

In questo caso viene effettuata una valutazione semi-quantitativa ottenuta grazie ad una serie di diluizioni del siero in esame. L'utilizzo delle diluizioni rappresenta però un possibile fattore di imprecisione e inaccuratezza; problema che viene risolto grazie all'impiego di calibratori tarati sul materiale standard di riferimento (WHO-IRP 66/233) e all'espressione della concentrazione in Unità Internazionale (UI/mL) [Feltkamp, 1996].

Grazie ad organismi preposti alla standardizzazione, infatti dal 1982 sono stati prodotti sieri di riferimenti necessari per la standardizzazione e la verifica

---

<sup>9</sup> ibidem

<sup>10</sup> ibidem

della qualità dei diversi preparati commerciale di cellule HEp-2 e per i diversi tipi di fluorescenza nucleare nel ANA test.

La diluizione iniziale del campione raccomandata è 1:40 (pari a circa 5 UI/mL) e un titolo uguale o superiore a 1: 160 (20 UI/mL) è da considerare positivo [Tozzoli et al, 2002].

È importante sottolineare il fatto che anticorpi antinucleo a basso titolo (1: 40 – 1: 80) non hanno nessun significato clinico [Feltkamp, 1996 - Tozzoli et al., 2002] poiché possono essere presenti nei soggetti sani, in particolare nelle donne gravide, nell'anziano e nelle donne sopra i 40 anni.

Si tratta nella maggior parte dei casi di autoanticorpi naturali a bassa avidità, reattivi verso antigeni microbici che presentano un repertorio antigenico simile a quello degli autoanticorpi presenti nelle patologie autoimmuni sistemiche.

Al contrario , gli autoanticorpi che sono presenti nel siero di pazienti affetti da MAIS sono in genere un miscela di autoanticorpi di diverse isoforme: autoanticorpi polireattivi della classe IgM e autoanticorpi patogenetici della classe IgG e IgA [Tozzoli et al, 2001].

Poiché i metodi di laboratorio non sono ancora in grado di differenziare questi due tipi di autoanticorpi la diagnosi differenziale viene effettuata necessariamente in base alla storia clinica del paziente, alla sintomatologia clinica e in base al livello di autoanticorpi presenti nel siero del paziente. La positività a questi anticorpi alle basse diluizioni è raramente presente in soggetti affetti da MAIS, ma in circa il 32% dei soggetti sani; questo valore presenta alta sensibilità e bassa specificità dell'ANA test [Kavanaugh, 2000 - Bizzarro, 2001].

Elevati titoli di autoanticorpi (> 1:160) sono presenti invece in molti soggetti malati, ma solo ne 15% dei soggetti sani; questo valore soglia presenta invece bassa sensibilità ed alta specificità.

Poiché anche il 20% circa dei soggetti con malattia reumatica autoimmune, soprattutto in fase iniziale, può avere anticorpi antinucleo ad un titolo inferiore a 1: 160, è chiaro che non esiste un'unica diluizione che sia in grado di distinguere i soggetti sani da quelli malati, proprio per questo motivo i titoli compresi tra 1:40 e

1:160 sono considerati [Bizzarro, 2001 - Tozzoli, 2002] come livelli decisionali che impongono una analisi differenziale e in particolar modo:

- Titoli inferiori a 1: 40 (5 UI/mL) sono da considerare negativi;
- Titoli > 1:40 e <1:160 (tra 5 e 20 UI/mL) vanno considerati bassi positivi; in assenza di particolari sintomi specifici di malattia autoimmune questi valori devono essere controllati nel tempo, senza che il paziente venga sottoposto ad ulteriori accertamenti diagnostici;
- Titoli  $\geq$  1: 160 sono considerati positivi

Nei soggetti positivi all'ANA è necessario eseguire una indagine più approfondita per studiare l'effettiva presenza di anticorpi specifici diretti contro le strutture nucleari in grado di determinare la patologia: a questo scopo si effettua la ricerca degli anticorpi anti DNA nativo e degli anticorpi anti ENA [Tozzoli et al, 2000 – Bizzarro, 2001].

Esiste infatti una correlazione tra il pattern ANA e la presenza di anticorpi anti-DNA e/o ENA e le diverse patologie autoimmuni [Bizzarro, 2001 - Martino et al., 2010].

La definizione del pattern risulta essere molto importante e utile per il laboratorio in quanto nella maggior parte dei casi condiziona la scelta di un test di secondo livello. Per esempio, in presenza di una fluorescenza citoplasmatica è utile utilizzare il metodo Western Blot che permette di determinare la presenza o l'assenza di determinati autoanticorpi mentre quando siamo in presenza di un pattern anti-centromero l'esecuzione di un test anti - ENA non è essenziale poiché la specificità anticorpale è facilmente visibile dal tipico aspetto morfologico in IFI [Keren, 2002]. Quest'ultima ricerca è costituita dall'analisi di un pool di autoanticorpi che risultano più specifici degli ANA per la diagnosi di malattie autoimmunitarie.

Per la determinazione degli anticorpi antinucleari, quindi, un utile approccio metodologico dovrebbe essere l'applicazione in serie dei seguenti punti:

- Determinazione della presenza o assenza degli ANA attraverso l'utilizzo dell'IFI su HEp-2 per la caratterizzazione del pattern fluoroscopio e dell'eventuale titolazione
- Caratterizzazione della specificità autoanticorpale (anti-ENA) limitandosi ai casi positivi allo screening ANA in IFI e/o ai casi in cui abbiamo un forte sospetto clinico di LES, lupus neonatale, PM/DM, MMTC utilizzando almeno due tecniche a diversa sensibilità come ad esempio immunodiffusione, immunoblot, microarray ecc...

La decisione di eseguire un test di secondo livello in presenza di positività ANA a basso titolo deve essere sempre basata su un sospetto di malattia reumatica autoimmune [Habash-Bseiso, 2005].

La variazione dei titoli ANA non correlano con l'andamento clinico/biologico della malattia, anche a causa dell'elevata imprecisione analitica correlata all'uso delle diluizioni tuttavia variazioni consistenti del titolo possono accompagnare fasi di evoluzione o di remissione della malattia.

Gli anti-ENA invece, una volta presenti, tendono a rimanere per sempre e nonostante la malattia sia in fase di remissione questi non scompaiono, mentre il livello degli anticorpi anti-DNA correla con l'andamento clinico della malattia e la loro determinazione è obbligatoria nel monitoraggio di pazienti affetti da LES [Egner, 2000]. Vediamo che nella fase diagnostica (iniziale negatività o positività a basso titolo, in pazienti con segni clinici) può essere importante determinare gli ANA in modo ripetitivo, mentre in pazienti con malattia autoimmune sistemica clinicamente definita è sufficiente il controllo del titolo ANA una volta all'anno a meno che non si verifichi una modificazione del quadro clinico.

Il metodo dell'immunofluorescenza indiretta presenta, nonostante i recenti sviluppi nella standardizzazione del metodo come ad esempio l'automatizzazione della procedura analitica e il riconoscimento dei quadri fluoroscopio attraverso sistemi esperti, ancora notevoli limiti [Voigt, 2012].

Proprio per questo negli ultimi anni le principali aziende biomediche hanno cercato di produrre metodi immunoenzimatici su fase solida (ELISA) come metodi alternativi all'immunofluorescenza indiretta [Gniewek, 1997].

Tali test, che impiegano l'utilizzo di miscele di antigeni nucleari estrattivi e/o ricombinati non sono però in grado di individuare tutte le specificità anticorpali che invece sono rilevate con la metodica IF, e non presentano una sensibilità clinica del 100%.

Infatti, la determinazione degli ANA con la metodica ELISA potrebbe essere effettuata semplicemente come prima analisi di screening e in caso di risultato negativo bisognerebbe chiarire verso quale tipo di antigene è stato condotto il test, visto che una negatività al test EIA non equivale ad una negatività verso tutti gli antigeni nucleari mentre i risultati positivi devono essere riconfermati in IFI per poter specificare il patterns e il titolo [Dellavance et al., 2009 - Copple et al., 2011].

I risultati discordanti, ossia positivi in EIA e negativi in IFI devono essere invece considerati falsi positivi.



## 4. Scopo

Per circa 40 anni (1957- 1997), i metodi immunologici hanno rappresentato le principali tecniche per la diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni [Tozzoli, 2006]. Da allora numerose tecnologie sono state proposte ed utilizzate nella pratica clinica: metodi immunochimici (IFI, IB), che hanno consentito la ricerca qualitativa, definendo la presenza o l'assenza degli autoanticorpi nel siero del paziente, e i metodi immunometrici (RIA, ELISA) che hanno invece permesso la misurazione quantitativa delle concentrazioni anticorpali.

Dato che la produzione di autoanticorpi specifici rappresenta un marcatore caratteristico della malattia autoimmune, l'impiego di metodi per la loro rilevazione si è progressivamente imposto nella pratica clinica come strumento diagnostico decisamente più efficace anche per la classificazione di questo tipo di patologie [Tozzoli, 2006 - Meroni et al., 2010]

Gli anticorpi antinucleo ANA sono autoanticorpi diretti contro i costituenti fondamentali della cellula e il test relativo alla loro rilevazione è stato definito ANA test.

La determinazione degli ANA è di grande importanza nella diagnosi di primo livello della patologie autoimmuni sistemiche come LES, artrite reumatoide, connettiviti.

Al giorno d'oggi il metodo di elezione per la loro determinazione è l'immunofluorescenza indiretta (IFI) eseguita su un substrato di cellule HEp-2 [Fritze, 2011].

Poiché l'IFI è una metodica manuale che richiede tempo e che deve essere effettuata da personale specializzato, numerose aziende biomediche e farmaceutiche stanno cercando di produrre metodi alternativi all'IFI nella determinazione degli ANA.

Particolare importanza stanno acquisendo, infatti, le tecniche immunoenzimatiche del tipo ELISA eseguite su fase solida.

Considerando queste premesse, l'obiettivo di questo studio è quello di valutare le caratteristiche di un test immunoenzimatico ELISA e di compararlo alla tecnica di immunofluorescenza indiretta.

In particolar modo si è valutata l'affidabilità diagnostica di uno specifico kit immunoenzimatico, fornito dalla casa farmaceutica Alifax, per la ricerca degli ANA e si è voluto verificare il suo possibile utilizzo in alternativa al metodo IFI cercando di capire e dimostrare se la metodica ELISA risulta essere affidabile, sensibile e specifica tanto da essere utilizzata come test alternativo all'IFI.

La tecnologia IFI è quella che viene attualmente utilizzata dal Laboratorio Bio Lab per la sua rapidità di esecuzione, buona sensibilità, buona specificità e basso costo. Essendo però una metodica manuale, a differenza della tecnica ELISA, l'esperienza e l'abilità dell'operatore sono di grande importanza e risultano essere parametri decisivi nelle procedure di esecuzione del test; in particolar modo l'interpretazione dei dati è altamente soggettiva.

È necessario quindi che l'operatore sia non soltanto in grado di determinare la presenza o assenza degli anticorpi antinucleo nel siero del paziente ma anche a che diluizione il siero risulta positivo e che tipo di pattern presenta.

Questo, come vedremo in seguito in modo più approfondito, è un limite dell'IFI; limite che invece non presenta la tecnica ELISA in quanto, essendo un tecnica automatizzata, non necessita di operatori altamente specializzati nell'esecuzione del test e nella lettura del risultato ma semplicemente di tecnici in grado di capire e saper gestire il processo svolto dalla macchina stessa.

Valutando le risposte ottenute da entrambi gli strumenti si è cercato così di mettere in luce vantaggi e svantaggi di una metodica rispetto all'altra cercando di valutare in modo particolare l'affidabilità diagnostica del kit utilizzato nel test ELISA.

## **5. Materiali e metodi**

### **5.1 Accettazione dei campioni**

La ricerca degli anticorpi antinucleo nel siero è stata effettuata su prelievi di sangue effettuati su i pazienti che ne facevano richiesta, presso il laboratorio Bio Lab in un periodo di tempo compreso da Settembre 2012 a Gennaio 2013.

In seguito all'accettazione, ogni campione di sangue è stato sottoposto a centrifugazione per separare il plasma dalle cellule sanguigne.

Ogni siero è stato così sottoposto all'analisi in immunofluorescenza diretta, metodo di determinazione utilizzato principalmente dal laboratorio stesso, e successivamente refertato il risultato.

La metodica immunoenzimatica ELISA, invece, non essendo il metodo utilizzato dal laboratorio per la determinazione degli ANA ma essendo un metodo ancora in fase di studio, non è stata effettuata quotidianamente ma solo quando era presente un numero adeguato di campioni da utilizzare.

Proprio per questo motivo, il siero di pazienti che non venivano analizzati nello stesso giorno veniva posto in apposite provette, etichettate con Nome e Codice di riferimento del paziente e inseguito congelato ad una temperatura di -20°C per evitare alterazioni del siero stesso (principalmente emolisi).

Prima di eseguire il test i campioni dovevano tuttavia essere riportati a temperatura ambiente e agitati brevemente per rendere più omogeneo il siero.

## 5.2 Ricerca degli anticorpi antinucleo in campioni di siero umano

### 5.2.1 Test di immunofluorescenza indiretta IFI

Il kit utilizzato per questo tipo di test è “ANA Kit (cellule HEp-2)” della ditta Astraformedic.

Secondo la ditta produttrice questo test presenta:

- Sensibilità relativa<sup>11</sup> > del 95%, ottenuta valutando sieri di riferimento titolati, provenienti da aziende accreditate, positivi per la presenza di ANA e diluiti serialmente.
- Specificità<sup>12</sup> > del 95%, ottenuta mediante uno studio effettuato su campioni umani provenienti da donatori e individui sani
- Riproducibilità, una serie di campioni negativi, borderline e positivi sono stati utilizzati per le prove di variabilità intra ed inter assay. I campioni positivi hanno mostrato il titolo atteso mentre i campioni positivi sono risultati negativi.

I reattivi presenti all'interno del kit sono stati conservati secondo le indicazioni fornite dal produttore; conservati ad una temperatura compresa tra i +2 e +8°C e utilizzati entro la data di scadenza indicata sulla confezione del kit.

In particolar modo la soluzione di lavaggio diluita può essere conservata per massimo 10 giorni ad una temperatura sempre compresa tra i +2 e i +8°C mentre tutti gli altri reattivi possono essere utilizzati ripetutamente se conservati in modo adeguato.

---

<sup>11</sup> La sensibilità di un test è la sua capacità di identificare correttamente i soggetti positivi al test. In termini di probabilità, è la probabilità che un individuo malato risulti positivo al test.

<sup>12</sup> La specificità di un test è la sua capacità di identificare correttamente gli individui sani. In termini di probabilità, è la probabilità che un individuo sano risulti negativo al test

I componenti utilizzati nella procedura e le rispettive composizioni sono:

- Vetrino substrato: vetrini contenenti pozzetti con substrato HEp-2
- Controllo positivo: flacone contenente siero umano positivo per la presenza di ANA omogeneo, diluito in tampone stabilizzante e contenente sodio azide allo 0,09%. Il controllo è tarato sullo standard di riferimento del Center Disease Control di Atlanta (CDC)
- Controllo negativo: flacone contenente siero umano negativo per la presenza di autoanticorpi, diluito in tampone stabilizzante, contenente sodio azide allo 0.09%
- Coniugato FITC anti IgG umane: flacone contenente antisiero anti IgG umane coniugato con fluoresceina in tampone stabilizzante
- Tampone di lavaggio/diluyente campioni: soluzione tampone contenente fosfato salino concentrato 20x
- Mezzo di montaggio: costituito da glicerolo tamponato; Varie sostanze chimiche possono essere aggiunte al liquido di montaggio (DABCO, PPD, NPG) per migliorarne la ritenzione della luce fluorescente.
- Colorante di contrasto: soluzione concentrata contenente Blue di Evans
- Vetrini copri oggetto
- Strisce di carta assorbente

Prima dell'uso l'azienda produttrice raccomanda di condizionare tutti i reattivi del kit per almeno 30 minuti a temperatura ambiente e diluire la soluzione tampone lavaggio/diluyente campioni con acqua distillata o deionizzata ad una concentrazione 1:20.

Per ottenere risultati corretti è necessario che la procedura venga eseguita correttamente nelle sue fasi.

## **Preparazione del campione**

Il campione raccomandato per questo tipo di analisi è il siero, ottenuto in seguito a centrifugazione per circa 15 minuti a 7000 giri del sangue contenuto nella provetta; sieri fortemente emolizzati o lipemici possono aumentare il grado di colorazione aspecifica sul substrato. È importante che il siero non abbia subito contaminazioni microbiche, per la possibile presenza di enzimi proteolitici che potrebbero provocare danneggiamento del substrato.

I campioni, se non vengono utilizzati immediatamente, possono essere conservati ad una temperatura di  $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ , mentre in caso di conservazione prolungata è consigliato il congelamento del siero ad una temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$ ; è importante però evitare il congelamento/scongelo ripetuto del campione che potrebbe provocare perdita dell'attività anticorpale.

Il siero campione che deve essere sotto posto alla determinazione degli ANA deve essere opportunamente diluito con una concentrazione di 1:40 utilizzando l'apposito diluente campione.

## **Procedura di screening**

La metodica prevede inizialmente di portare a temperatura ambiente (tra  $18-30^{\circ}\text{C}$ ), almeno 30 minuti prima dell'esecuzione del test, il numero necessario di vetrini.

È quindi necessario contrassegnare i vetrini con l'ID del paziente, evitando di toccare l'interno dei pozzetti contenenti il substrato fissato, e riporli nella camera umida precedentemente preparata.

A questo punto sono stati depositati circa  $35\mu\text{l}$  di controllo positivo, di controllo negativo e campione diluito nei rispettivi pozzetti; chiusa la camera umida e incubato per 30 minuti ( $\pm 5$ ) a temperatura ambiente (tempi di incubazione più lunghi non aumentano la specificità della reazione, ma al contrario favoriscono legami aspecifici; inoltre è importante non muovere la camera umida durante il periodo d'incubazione).

Terminato il tempo di incubazione si è proceduto con il lavaggio dei vetrini, mediante l'apposito tampone di lavaggio ( in questa fase è importante utilizzare una spruzzetta evitando di dirigere il getto direttamente sui pozzetti), sono stati così posizionati su un rack porta vetrini e immersi completamente in una vaschetta riempita con la soluzione di lavaggio per circa 10 minuti.

Al termine del lavaggio sono stati tamponati i bordi del vetrino per eliminare l'eccesso di tampone, estraendo i vetrini uno alla volta, ed evitando così di far seccare il substrato; è stato quindi asciugato il vetrino intorno al pozzetto senza cercare di toccare l'interno dello stesso.

I vetrini sono stati così ridisposti nella camera umida e su ciascun pozzetto sono stati posti 35µl di antisiero coniugato con FITC e nuovamente incubati per circa 30 minuti.

È stata ripetuta l'operazione di lavaggio precedentemente descritta; durante quest'operazione si può eseguire una procedura di contro colorazione facoltativa che consiste nell'aggiungere alla vaschetta contenente il tampone di lavaggio, 3-4 gocce di Evans'Blue ogni 150ml di tampone, per circa 5 minuti.

Terminato il lavaggio è stato nuovamente eliminato l'eccesso di tampone e infine sono state applicate 3-4 gocce di liquido di montaggio per ciascun vetrino e ricoperto con l'apposito vetrino copri oggetto esercitando una leggera pressione per evitare la formazione di eventuali bolle d'aria.

A questo punto i vetrini sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza in ambiente al buio.

I campioni che sono risultati positivi allo screening iniziale sono stati ulteriormente diluiti in diluente campione fino a che non si sono presentati ancora positivi.

Per una corretta interpretazione dei dati è necessario che all'interno di ogni singola seduta vengano inseriti un controllo positivo e un controllo negativo. Il controllo negativo non deve mai presentare alcuna fluorescenza mentre il controllo positivo deve presentare una fluorescenza pari a 2 o maggiore e permette di verificare se tutte le procedure che prevede la metodica sono state eseguite correttamente.

Per una corretta lettura dei vetrini e quindi per l'interpretazione corretta dei vari patterns si consiglia la visione ad un ingrandimento 100x o superiori; infatti, è stato visto come l'intensità della fluorescenza possa essere fortemente condizionata da variabili che dipendono dal microscopio stesso.

La sorgente luminosa può generare considerevoli differenze nella sensibilità della tecnica; una sorgente luminosa non adeguata può portare infatti ad una non corretta interpretazione del titolo.

Anche l'utilizzo di obiettivi a diverso ingrandimento porta a valutazioni molto diverse dello stesso campo fluoroscopio. Obiettivi a più forte ingrandimento concentrano la luce; la stessa quantità di luce illumina un campo più piccolo e perciò l'aumento dell'intensità della luce si traduce in un aumento dell'intensità della fluorescenza.

È necessario quindi che per la definizione del titolo dei campioni in esame venga utilizzato sempre lo stesso obiettivo.

Inoltre una lunga esposizione del vetrino alla luce riduce la fluorescenza; essendo la fluoresceina una sostanza sensibile alla luce è necessario che la lettura dei vetrini venga effettuata al termine dell'esecuzione della metodica

### ***5.2.2 Test immunoenzimatico ELISA: ANA SCREEN***

La determinazione degli anticorpi antinucleo ANA effettuata attraverso il metodo immunoenzimatico è stata effettuata grazie ad un kit "ANA screen" fornito dalla casa farmaceutica Alifax. È un test non invasivo immunoenzimatico che fornisce un'analisi semiquantitativa della presenza di ANA nel siero di un paziente.

La sensibilità analitica dell'ANAscreen è intorno allo 0.2

Tutti componenti del kit devono essere conservati ad una temperatura compresa tra +2 e +8°C, come indica la casa produttrice sulla confezione, e dopo l'apertura sono stabili per circa 2 mesi.



I componenti utilizzati nella procedura e le rispettive composizioni sono:

- Micropiastra Sensibilizzata: Microstrip rivestite con dsDNA, RNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1 e CENP-B, conservate in appositi sacchetti sigillati in presenza di essiccante;
- Soluzione di lavaggio concentrata: soluzione concentrata 10x;
- Diluente campioni;
- Coniugato: contenete anticorpo IgG marcato con l'enzima HRP (Horseradish-Peroxidase, Perossidasi del Rafano);
- Substrato: soluzione in tampone citrato di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e perossido d'idrogeno
- Stop Solution: soluzione bloccante contenente acido solforico 0,25M
- Calibratore:
- Controllo negativo

Lo strumento utilizzato per questo tipo di analisi è il Tek 4, uno strumento completamente automatizzato dedicato all'esecuzione di test su micro piastra con la capacità di processare fino a 6 metodiche in linea.

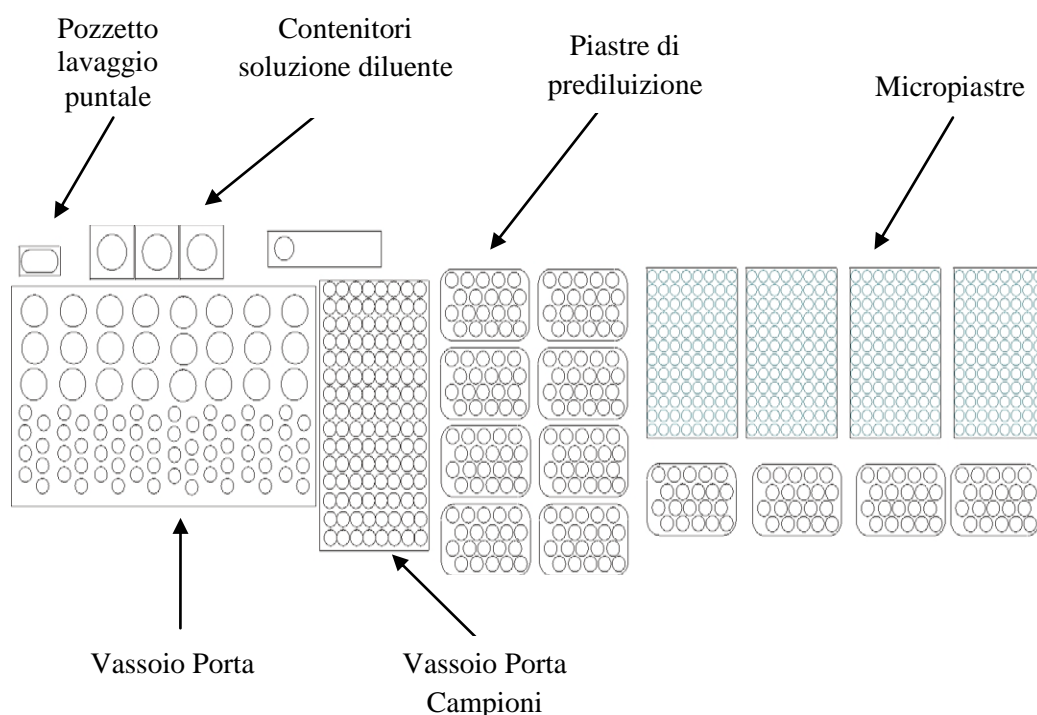


**Figura 16. Tek**

Esso è composto da:

- Struttura dello strumento con coperchio di protezione
- Elettronica di comando e controllo

- Sistema idraulico di aspirazione e dispensazione
- Braccio meccanico con puntale teflonato con sensore di liquido
- Lettore ottico
- Carrelli mobili porta micro piastre
- Piano di lavoro su cui sono presenti: un pozzetto di lavaggio, i vassoi per reagenti di diverse metodiche, un cestello porta campioni, le piastre di prediluzione ed infine le sei micropiastre di reazione



**Figura 17. Rappresentazione grafica del piano di lavoro del Tek 4**

Inoltre lo strumento è composto da:

- Wash Buffer 1: tanica contenente la “soluzione 1” per il lavaggio delle micro piastre
- Wash Buffer 2: tanica contenete la “soluzione 2” per il lavaggio delle micropiastre
- Wash: tanica contenente la soluzione utilizzata sia per il lavaggio del puntale, sia come soluzione di spinta per l’avvinamento
- Waste: tanica per lo scarico

È importante che nella realizzazione di queste soluzioni venga utilizzata solo acqua distillata per evitare possibili mal funzionamenti dello strumento.

Prima di procedere all'analisi è necessario che tutti i componenti del kit siano portati a temperatura ambiente (18-25°C) e che vengano opportunamente miscelati senza provocare la formazione di schiuma che potrebbe interferire nell'analisi.

È quindi necessario preparare la soluzione di lavaggio diluendo la soluzione di lavaggio concentrata 10x (1+9) con acqua distillata o deionizzata (per esempio: 8ml di diluizione concentrata con 72 ml di acqua distillata); questa soluzione è stabile per circa 30 giorni ad una temperatura compresa tra i +2 e +8°C. In caso di formazione di microcristalli all'interno della soluzione concentrata è necessario rimuoverli con un riscaldamento della soluzione stessa a circa 37°C.

È, inoltre importante non utilizzare sieri emolizzati, lipemici o contaminati e prima del loro utilizzo devono essere agitati in modo tale da garantire l'omogeneità del liquido e che il substrato, contenuto nel kit, non sia esposto alla luce.

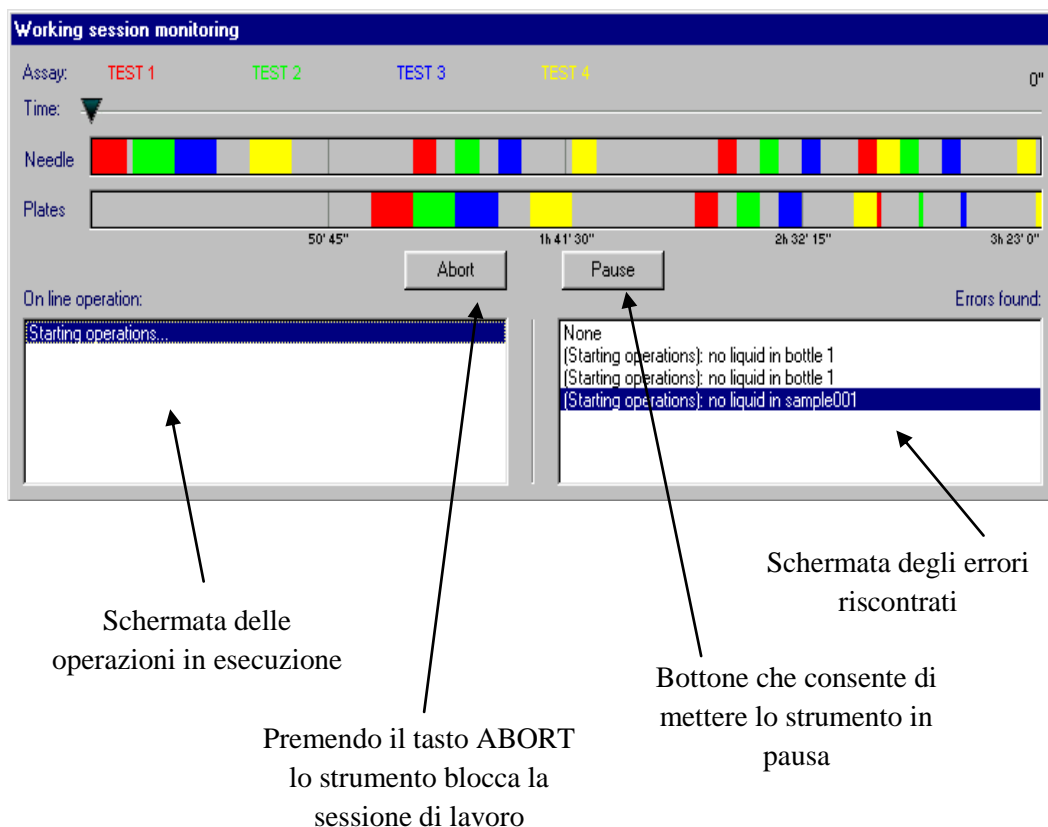
Dopo aver impostato l'opportuna metodica, in questo caso "ANA screen", caricato lo strumento con i rispettivi reagenti, campioni da analizzare e micro piastre vengono effettuati tutti i test di controllo dello strumento stesso (test del braccio diluitore, test della pompa diluitore, test della valvole diluitore, test delle piastra, test del lettore ecc..).

Se i test risultano essere tutti passati si può così procedere all'avvio dell'analisi.

Il funzionamento del macchinario viene schematizzato, come mostrato in figura sotto, da due barre orizzontali (strisce) corrispondenti ai due movimenti che il tek può svolgere contemporaneamente: quello del puntale e quello delle piastre.

Queste strisce sono riempite da barre colorate (un colore diverso per ogni metodica selezionata), che rappresentano le varie operazioni in cui si suddivide un'analisi nella sessione di lavoro.

Durante il processo di analisi una freccia nera abbinata ad una freccia trasversale, scorre orizzontalmente lungo le due barre, indicando con il passare del tempo quali operazioni sono attualmente in fase di esecuzione.



**Figura 18. Rappresentazione grafica della schermata di lavoro del Tek 4**

Il primo passaggio della metodica ANAscreen consiste nel diluire il campione in esame con una diluizione di 1+100 v/v ( per esempio: 10µl di siero del paziente + 1ml di soluzione diluente).

Successivamente sono stati dispensati 100µl di calibratore (Ca), controllo negativo (N), e di campione diluito e immessi nei rispettivi pozzetti della piastra la quale è stata successivamente incubata per un tempo di 60 minuti ad una temperatura compresa tra i +18 e +25°C.

Quindi i pozzetti sono stati lavati per tre volte utilizzando 300µl di soluzione di lavaggio.

A tutti i pozzetti sono stati successivamente aggiunti 100µl di coniugato enzimatico, coperti con il rispettivo copri piastra fornito ed incubati per 30 minuti ad una temperatura compresa tra i +18 e +25°C.

Finito il tempo di incubazione è stato effettuato un ulteriore lavaggio con 300µl di soluzione di lavaggio, che consente di eliminare l'eccesso di coniugato non legato, e successivamente sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100 µl di substrato.

I pozzetti sono stati così incubati per un tempo di 15 minuti (al riparo dalla luce) ad una temperatura compresa tra i +18 e i +25°C.

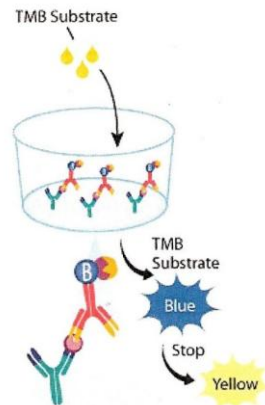
Durante questo periodo l'enzima HRP catalizza la reazione che converte il substrato incolore contenente 3,3',5,5' tetrametilbenzina in un prodotto di colorazione blu secondo la reazione riportata in figura sotto.



**Figura 19. Reazione catalizzata dall'enzima HRP**

In presenza degli ANA viene quindi generata una colorazione blu di diversa gradazione.

Successivamente è stata bloccata la reazione enzimatica aggiungendo ad ogni pozzetto 100µl di soluzione bloccante e agitando delicatamente la piastra: i pozzetti dei campioni positivi assumeranno così una colorazione gialla la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'anticorpo nel campione.



**Figura 20. Colorazione generata dalla reazione HRP sul substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB**

Le assorbanze sono state poi rilevate mediante uno spettrofotometro a 450nm.

Il test risulta valido se:

- La media della densità ottica (OD) del calibratore è  $\geq 7$
- La media della densità ottica (OD) del controllo negativo è  $\leq 3$

Se i criteri di qualità qui sopra riportati non sono soddisfatti è necessario ripetere il test, assicurandosi che tutte le procedure di analisi come tempo di incubazione, temperatura, diluizione del campione, siano eseguite correttamente.

Dopo aver controllato che le assorbanze del calibratore ( $\geq 0.7 \leq 3.0$ ) e del controllo negativo ( $\geq 0.0 \leq 0.3$ ) rientrino nei valori per i quali il test viene considerato valido, si valuta l'indice di legame (ratio).

I campioni con un indice di legame (BI)  $\geq 1$  sono considerati positivi mentre i campioni con un BI  $\leq 1$  sono considerati negativi. I campioni che presentano un assorbanza nell'intervallo compreso tra 0.900 e 1.100 vengono invece considerati dubbi (zona grigia).

<b>ANAscreen</b>	<b>BI</b>
<b>Positivo</b>	$\geq 1$
<b>Negativo</b>	$\leq 1$

**Tabella 3. Valori di riferimento**

I risultati vengono interpretati qualitativamente calcolando un valore di cut-off o semi-quantitativamente calcolando l'indice di legame di ogni campione sulla base del cut-off<sup>13</sup> determinato.

Per il calcolo del cut-off il software del Tek utilizza due controlli e tre fattori costanti secondo la formula seguente:

$$\mathbf{OD\ Cut-off} = (a * C1) + (b * C2) + c$$

Dove **a**, **b**, e **c** sono delle costanti mentre **C1** e **C2** sono le OD dei due controlli; inoltre il software permette di impostare la condizione di positività del campione.

Una volta ottenuto il cut-off, il programma applica tale valore alla formula seguente per ogni campione n

$$\mathbf{RAPPORTO} \text{ del campione n} = \mathbf{OD} \text{ campione n} / \mathbf{OD} \text{ Cut-off}$$

e si confronta il valore del rapporto ottenuto con l'intervallo di equivocità impostato per quella metodica.

---

<sup>13</sup> Per i test semi-quantitativi come il test ELISA risulta essere importante la determinazione e la scelta del cut-off. Il cut-off o anche valore critico, rappresenta il limite di separazione tra "positività" e "negatività" del test. Questo generalmente corrisponde alla separazione ammalato/sano. Influisce in modo particolare sulla sensibilità e specificità del test.

Ne segue che se si è impostata la condizione di positività  
NEGATIVO/DUBBIO/POSITIVO

- Se il rapporto è  $>$  dell'intervallo di equivocità il campione è  
POSITIVO
- Se il rapporto è  $<$  dell'intervallo di equivocità il campione è  
NEGATIVO
- Se il rapporto è compreso nell'intervallo di equivocità il campione è  
DUBBIO

Se invece si è impostata la condizione di positività  
POSITIVO/DUBBIO/NEGATIVO

- Se il rapporto è  $>$  dell'intervallo di equivocità il campione è  
NEGATIVO
- Se il rapporto è  $<$  dell'intervallo di equivocità il campione è  
POSITIVO
- Se il rapporto è compreso nell'intervallo di equivocità il campione è  
DUBBIO

Per esempio:  $\text{CutOff} = 0.25 * \text{OD Controllo Positivo}$

La formula è:  $\text{Cutoff} = 0.25 * \text{Controllo Positivo (C1)} + 0 * \text{Controllo Negativo (C2)} + 0$

**Determinazione del cut-off:**

$$\text{ODcalibratore} \times \text{fattore} = \text{ODcut-off}$$

**Esempio:**

ODcalibratore = 0.994

Fattore = 0.5

ODcut-off =  $0.994 \times 0.5 = \mathbf{0.497}$



Il fattore che viene utilizzato per il calcolo è riportato nel certificato di qualità del kit e può variare da lotto a lotto.

Per calcolare l'indice di legame (Binding Index) invece si può utilizzare la rispettiva formula:

$$\mathbf{BI = OD_{sample} / OD\ cut-off}$$

**Esempio:**

$$OD_{cut-off} = 0,497$$

$$OD_{campione} = 1.873$$

$$BI = 1.873 / 0.497 = \mathbf{3.7}$$

## 6. Risultati

### 6.1 Analisi statistica

I dati ottenuti dall'analisi dei campioni sono stati poi analizzati per eseguire un' analisi statistica; purtroppo, visto il numero non così elevato di campioni (52) e dal momento che le due tecniche, esprimono i risultati in maniera differente, per effettuare il confronto tra le due tecniche in esame mi sono servita dei seguenti metodi statistici:

- Test di McNemar: è un test non parametrico che viene impiegato per confrontare due metodi qualitativi (generalmente un metodo di riferimento e un metodo nuovo) allo scopo di verificare l'esistenza di differenze in dati dicotomici, positivi o negativo, prima o dopo un certo trattamento.
- Indice di concordanza Kappa di Cohen: è un indice che consente di calcolare il grado di accordo tra due test. In particolar modo permette di verificare la concordanza reale tra i due test, escludendo cioè quella dovuta al caso.

I valori che il K di Cohen può assumere sono riportati in tabella 2

<b>Kappa</b>	<b>Concordanza</b>
< 0.1	Nulla
0.01-0.20	Scarsa
0.21-0.40	Modesta
0.41-0.60	Moderata
0.61-0.80	Sostanziale
0.81-1.00	Eccellente

Tabella 4. Valori del indice di concordanza K

Tutte le analisi sono state eseguite con un livello di significatività alfa = 0.05

## 6.2 Confronto IFI/EIA

Nel grafico seguente è visualizzato il confronto tra le due tecniche. Per ogni test eseguito si poteva avere un risultato negativo, o positivo e, nel caso dell'elisa, anche dubbio.

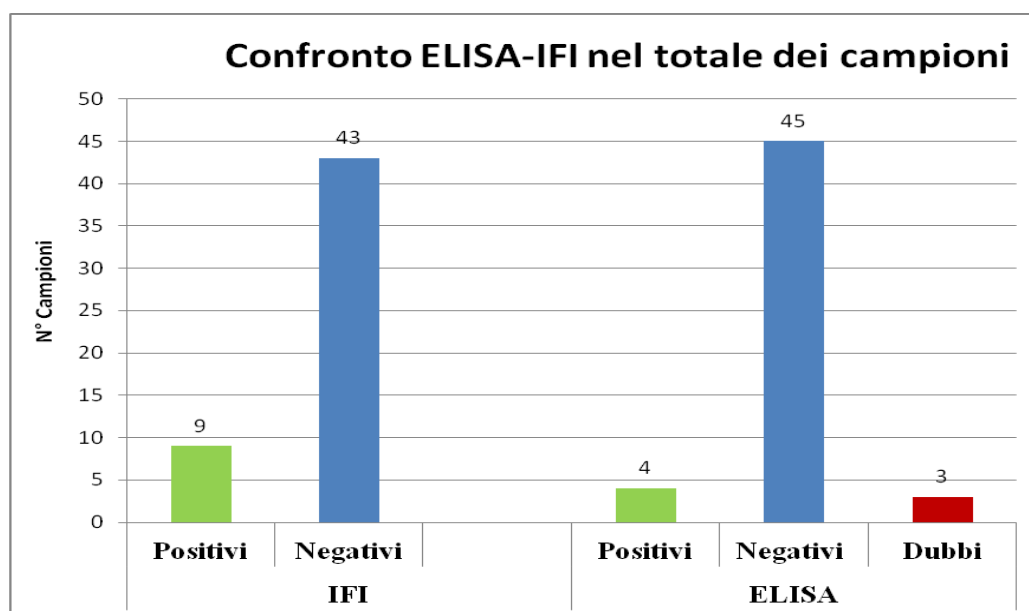


Figura 21. Campioni totali

Nell'analisi statistica i 3 campioni che sono risultati Dubbi in ELISA non sono stati presi in considerazione, dal momento in cui il test IFI non produce risultati dubbi. Quindi dei 52 campioni totali in esame 49 di questi hanno presentato una concordanza o una non concordanza tra le due metodiche.

I dati in tabella 5 e in figura 21, riportano i risultati ottenuti dai 49 campioni.

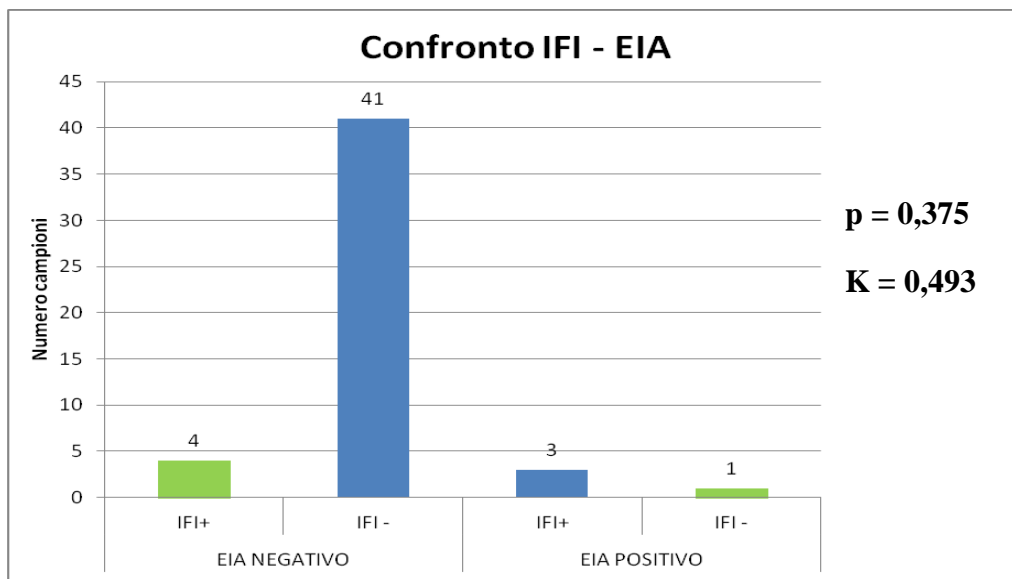
		<b>EIA</b>		TOTALE
		Negativo	Positivo	
<b>IFI</b>	Negativo	41	1	42
	Positivo	4	3	7
TOTALE		45	4	49

	Valori non concordanti tra le metodiche
	Valori concordanti tra le metodiche

**Tabella 5. Risultati dal confronto tra le metodiche EIA e IFI**

L'analisi statistica del test McNemar ha prodotto un risultato di  $p = 0.375$ , che non è significativo. Nel nostro studio il fatto che il test di McNemar non abbia significatività è positivo, in quanto testimonia il fatto che le due metodiche siano concordanti. Più precisamente possiamo dire che la concordanza tra le due metodiche è statisticamente significativa (rimane comunque presente il rischio della produzione di falsi negativi).

L'indice di concordanza Kappa di Cohen ha mostrato una concordanza che invece non è molto significativa tra le due metodiche EIA e IFI, pari ad una  $Kappa = 0.493$ , corrispondente a una concordanza modesta, come possiamo vedere in tabella 2. Possiamo quindi dire che il risultato ottenuto dall'indice di concordanza K non è molto elevato, questo viene giustificato dal limitato numero di campioni e dal fatto che i risultati positivi sono molto pochi.



**Figura 22. Confronto tra le metodiche EIA e IFI**

Il fatto che le due metodiche non abbiano un livello di concordanza eccellente lo possiamo notare anche dalle figure 23 e 24 riportate sotto.

In questo caso, tenendo conto anche dei 3 casi dubbi, abbiamo messo in evidenza come su tutti i 52 campioni analizzati 8 abbiano mostrato risultati discordanti tra le 2 metodiche. Dobbiamo innanzitutto tenere presente che la metodica IFI non è in grado di produrre dei risultati dubbi, e che la percentuale di positivi su tutti i campioni discordanti è del 75%, a differenza della tecnica ELISA che ha un 12.5% di campioni positivi. Per quanto riguarda la percentuale di campioni negativi invece l'IFI ha una percentuale pari al 25% a differenza del 50% prodotto dal test ELISA. Questo è forse uno dei dati più significativi in quanto mostra in modo abbastanza chiaro come il test ELISA possa produrre dei risultati che siano considerati come dei falsi negativi. Nel nostro studio, dal momento che non eravamo a conoscenza delle condizioni cliniche del paziente, non abbiamo potuto verificare con esattezza se si trattava realmente di un risultato negativo o se si erano verificati errori nella procedura di esecuzione del test. I 3 casi dubbi ottenuti con il test ELISA, con la tecnica IFI sono risultati: 2 positivi e 1 negativo. In particolar modo vediamo che i 2 campioni positivi in IFI ad una diluizione rispettiva di 1:80 e 1:160 sono risultati dubbi in ELISA con un indice di

assorbanza di 0.988 per il primo e 1.066 per il secondo mentre il campione negativo ha mostrato un indice di assorbanza di 0.923.

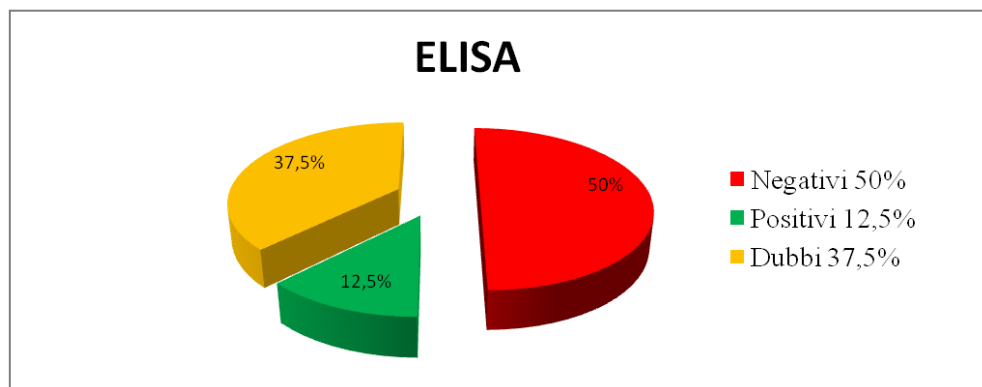


Figura 23. Percentuale di campioni discordanti in ELISA

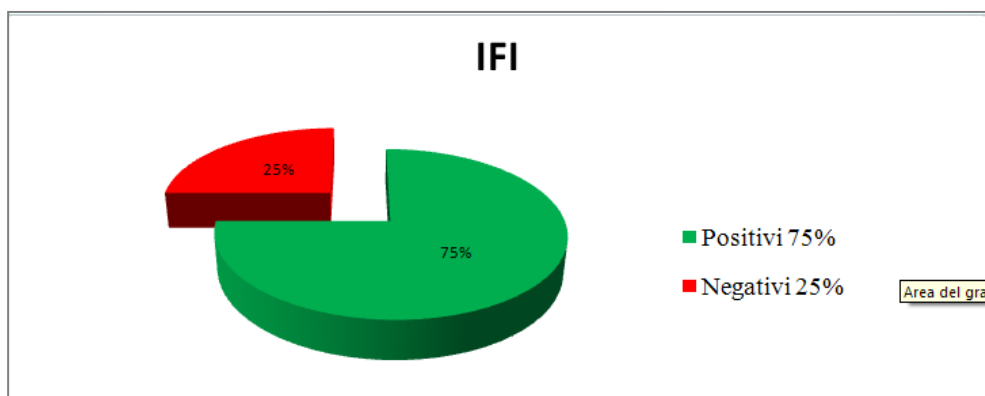


Figura 24. Percentuale di campioni discordanti in IFI

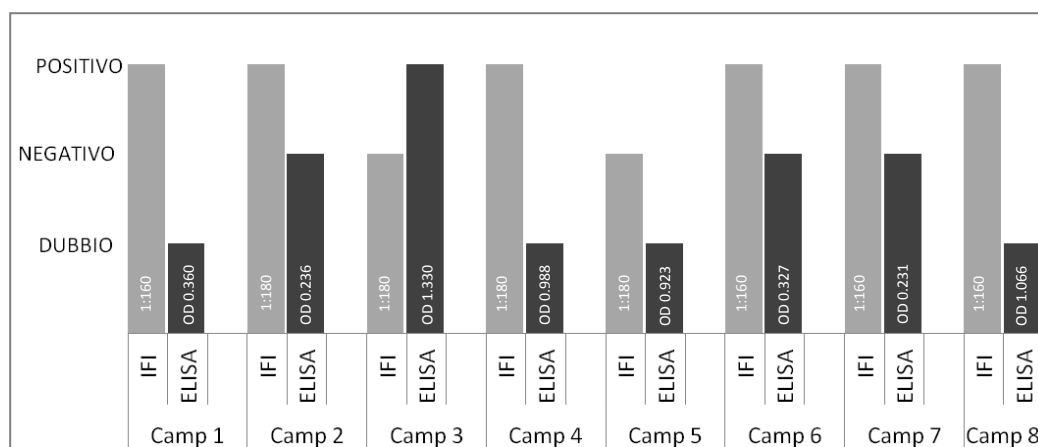
Più importante è sottolineare invece come alcuni degli 8 campioni abbiano generato dei risultati totalmente discordanti tra di essi. Come possiamo vedere dalla tabella 4 alcuni campioni risultati positivi ad una diluizione di 1:160 in IFI (quindi un positività piuttosto significativa) siano invece risultati negativi con la tecnica ELISA ad un indice di assorbanza pari a 0.360. Considerando il fatto che il cut-off, ossia il fattore discriminante tra positivo e negativo nel nostro test ELISA è pari ad 1 e l' intervallo di equivalenza è compreso tra 0.900 e 1.100, possiamo capire come un OD di 0.360 indichi un risultato assolutamente negativo, risultato che invece veniva fortemente positivo in IFI. Qui potremmo trovarci di fronte alla produzione di falsi negativi da parte della metodica ELISA. La

produzione di falsi negativi, come vedremo in seguito, è un fattore fortemente penalizzante per le tecnica ELISA in quanto potrebbe portare ad esiti errati.

### CAMPIONI DISCORDANTI

IFI	ELISA
1 diluizione 1:160	0 assorbanza (OD) 0.360
1 diluizione 1:80	0 assorbanza (OD) 0.236
0 diluizione 1:80	1 assorbanza (OD) 1.330
1 diluizione 1:80	2 assorbanza (OD) 0.988
0 diluizione 1:80	2 assorbanza (OD) 0.923
1 diluizione 1:160	0 assorbanza (OD) 0.327
1 diluizione 1:160	0 assorbanza (OD) 0.231
1 diluizione 1:160	2 assorbanza (OD) 1.066

**Tabella 6. Campioni discordanti ottenuti dalle due metodiche**



**Figura 25. Rappresentazione grafica dei campioni discordanti**

## 7. Discussione

Gli autoanticorpi anti-nucleo (ANA) hanno acquisito un ruolo di notevole importanza nell'ambito dell'immunologia clinica e la loro valutazione rappresenta l'esame più utilizzato nella fase di approccio diagnostico delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS).

La determinazione degli autoanticorpi diretti contro il nucleo e le componenti citoplasmatiche della cellula (ANA) è fondamentale nella diagnosi di alcune patologie autoimmuni quali sclerosi sistemica progressiva, sindrome di Sjogren, dermatopolimiosite e connettivite mista [Voigt, 2012], e risulta inoltre essere un parametro cruciale per la diagnosi e il monitoraggio del lupus eritematoso sistemico, tanto da costituire uno dei criteri internazionali proposti dall'American College of Rheumatology (ACR) per la classificazione della malattia [Bizzarro, 2005].

La rivelazione degli ANA può anche essere una componente essenziale nella diagnosi di alcune patologie autoimmuni di tipo non reumatico; infatti una positività ANA a basso titolo (diluizione di 1:80) si può anche facilmente ritrovare in alcune condizioni patologiche come epatite, malattie renali, infezioni virali e neoplasie. Tuttavia, anticorpi antinucleo a basso titolo (1:40 – 1:80) possono essere presenti anche in soggetti sani (soprattutto in soggetti anziani), nelle donne gravide e nelle donne sopra i 40 anni. Da questo possiamo capire come la sensibilità dell'ANA test vari notevolmente da una malattia clinica ad un'altra. Per esempio il test ANA risulta positivo in circa il 95% dei pazienti affetti da LES mentre è positivo solo per un 50% di pazienti affetti da dermatomiosite e polimiosite [Gniewek, 1997].

Attualmente la metodica di elezione per la ricerca degli ANA è l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su un monostrato di cellule in linea continua derivanti da carcinoma laringeo umano (HEp-2), tuttavia, a causa dell'incremento della positività della popolazione alle patologie autoimmuni, risulta necessario lo studio di nuove metodologie, che permettano di poter analizzare un più vasto



numero di campioni in modo più veloce e più economico rispetto alle metodiche tradizionali [Meroni, 2010]. Numerose infatti sono le industrie biomediche che, in seguito alla recente dichiarazione dell'American College of Rheumatology che afferma come la tecnica di immunofluorescenza debba essere considerata il metodo standard di screening per gli ANA, hanno sviluppato tecnologie in grado di migliorare significativamente l'automatizzazione della procedura, non solo per la preparazione del substrato ma anche per la lettura al microscopio.

Nuovi metodi, soprattutto saggi immunoenzimatici EIA o saggi multiplex su fase solida a flusso citometrico, stanno progressivamente cercando di sostituire la classica metodica di immunofluorescenza. Comunque, tutte le metodiche presentano vantaggi e svantaggi che devono essere presi attentamente in considerazione da un laboratorio analisi prima di decidere quale metodica risulta essere migliore nella determinazione degli ANA.

La nostra ricerca si è quindi concentrata sul confronto tra le due principali e più comuni metodiche utilizzate nella determinazione degli ANA: il metodo di immunofluorescenza indiretta, attualmente utilizzato dal Bio Lab, e quello immunoenzimatico su fase solida ELISA.

Lo scopo di tale confronto è quello di stabilire se la nuova tecnica EIA presenta caratteristiche e parametri idonei per sostituire la tradizionale tecnica di immunofluorescenza indiretta.

Queste due metodiche sono state paragonate tra loro su medesimi campioni di siero in modo da poter verificare una sovrapposibilità e una concordanza dei risultati tra le due; oltre che ai dati statistici ottenuti dall'analisi dei campioni, durante l'esecuzione di entrambe le metodiche è stato infatti possibile valutare in modo preciso e accurato tutti i parametri, sia positivi che negativi, che influiscono rispettivamente sulle due metodiche.

Le differenze a livello di esecuzione e di procedure, sono notevoli e condizionano, in modo più o meno rilevante, la scelta del metodo da adottare da parte del laboratorio anche in base alle proprie esigenze.

Un metodo ideale dovrebbe, infatti, essere in grado di soddisfare i seguenti requisiti: sensibilità e specificità clinica, precisione e accuratezza, facilità di

esecuzione, limitato impiego di tecnologia, facile reperibilità e riproducibilità e costo contenuto; oggi giorno tutta via è difficile trovare un metodo che sia in grado di soddisfare tutti queste caratteristiche contemporaneamente.

Detto questo, vediamo che quando viene eseguita in un laboratorio competente l'immunofluorescenza risulta essere un metodo altamente sensibile nella determinazione degli anticorpi antinucleo; in comparazione con altri test immunologici sono diversi i vantaggi che questa metodica include. Buona sensibilità e specificità di reazione, semplicità e rapidità di esecuzione, costo contenuto e la caratteristica di poter indagare contemporaneamente la presenza di autoanticorpi rivolti contro antigeni biochimicamente distinti permettono all'IFI di essere la tecnica di riferimento per la diagnosi di laboratorio delle patologie autoimmuni, a tutt'oggi la più utilizzata per le indagini di primo livello.

È inoltre una metodica in grado di determinare più di 100 autoanticorpi. Il metodo ha una buona sensibilità per determinate patologie autoimmuni, come il lupus (85%), malattie del tessuto connettivo (100%), e lupus indotto da droghe (100%).

Il test fornisce inoltre informazioni che possono risultare rilevanti per i medici e che gli altri test non sono in grado di fornire. Queste informazioni includono l'identificazione del pattern specifico (omogeneo, glomerulare, maculato) e, informazioni riguardo il titolo anticorpale. La rilevazione di titolo e del pattern di fluorescenza è sicuramente un vantaggio importante che la metodica IFI presenta e che permette di fare con un'unica procedura una analisi completa del siero del paziente.

Il titolo degli ANA è un fattore alquanto importante nella determinazione di una positività piuttosto che di una negatività di un campione. La sua valutazione e successiva correlazione al quadro clinico del paziente (assenza o presenza di segni clinici correlabili ad una patologia autoimmune) risulta essere cruciale. Generalmente titoli elevati, come ad esempio positività di un siero alla diluizione di 1:160 o superiore, sono considerati clinicamente più significativi e indicativi della presenza di patologia autoimmune rispetto a bassi titoli che possono essere ritrovati anche in soggetti sani.

Il vantaggio più importante che presenta l'IFI, rispetto alle tecniche EIA, e che le permette di essere una delle metodiche più complete nella determinazione degli autoanticorpi è la sua capacità di fornirci oltre al titolo anticorpale il pattern di fluorescenza che, riflettendo la distribuzione degli auto antigeni bersaglio può darci significative informazioni riguardo la loro natura. Il quadro fluoroscopico che si può osservare in IFI su un substrato di cellule HEp-2 è determinato quindi dalla specificità anticorpale nonché dalla struttura dell'antigene bersaglio che può essere nucleare o citoplasmatica.

I diversi pattern che possiamo ottenere da una analisi in immunofluorescenza indiretta sono strettamente correlati a specifici antigeni e malattie autoimmuni; questa correlazione specifica, tra pattern specifico e patologia, risulta essere estremamente importante nella determinazione e nella diagnosi di una patologia autoimmune in quanto permette di guidare il medico nel riconoscimento della patologia stessa. Si può così dire che il pattern di fluorescenza sia estremamente importante soprattutto in caso di ANA test positivo. Considerando il fatto che un basso titolo di anticorpi antinucleo può essere facilmente riscontrabile anche in soggetti sani<sup>14</sup> (circa il 13% della popolazione sana) soprattutto anziani, donne sopra i 40 anni e donne gravide e considerando il fatto che non tutti gli autoanticorpi sono associati ad una patologia autoimmune ci si aspetterebbe che i soggetti sani e quelli malati che presentano una positività all'ANA test abbiano però, un differente pattern di fluorescenza<sup>15</sup>.

Proprio per questo l'analista di un laboratorio clinico deve essere abile nel riconoscere *patterns* che sono rilevanti da un punto di vista clinico da quelli che

---

<sup>14</sup> A sostegno di questa tesi è importante citare lo studio effettuato da Fernandez et al., [2003] i quali esaminarono la presenza di autoanticorpi nel siero di soggetti sani concludendo che la presenza di questi non è necessariamente correlata all'insorgenza di una patologia, ma che è correlata dall'età, sesso e condizioni cliniche del paziente.

<sup>15</sup> Mariz et al [2011] misero a confronto pattern di pazienti con malattie autoimmuni e pattern di pazienti sani mettendo in evidenza come ad esempio il pattern nucleare omogeneo, il nucleare centromerico e il nucleare a chiazze grossolane (nuclear coarse speckled) siano risultati presenti solo nei campioni di soggetti che presentavano la malattia; questo perché probabilmente questi pattern sono associati a determinate patologie ma al contrario il pattern nucleare maculato finemente (nuclear dense fine speckled pattern) è stato osservato solo nei campioni di soggetti sani

invece si possono osservare con più probabilità in soggetti che apparentemente non presentano una patologia autoimmune.

La lettura dei preparati di fluorescenza risente quindi notevolmente della preparazione dell'operatore e delle sue conoscenze, e questo forse può rappresentare uno dei più grandi svantaggi dell'IFI. Una delle principali difficoltà che si possono incontrare nella lettura di un vetrino è legata soprattutto a quei casi dove siamo in presenza di più pattern di fluorescenza di tipo diverso e che quindi possono essere correlati anche a più patologie autoimmuni.

Nell'immunofluorescenza indiretta è essenziale la scelta del kit da utilizzare; la qualità dei reagenti ma soprattutto la qualità del vetrino risultano essere due principali fattori che possono influenzare un'analisi IFI. Oggi giorno i vetrini di più alta qualità sono quelli che presentano un substrato costituito da linee cellulari di HEP-2 dal momento che i nuclei di queste cellule sono di più semplice lettura e permettono di riconoscere in maniera più i diversi pattern di fluorescenza. Normalmente nel caso di un'analisi rivolta a pochi campioni e non di una grossa routine si consiglia di privilegiare kit che contengono un numero limitato di pozzetti (4 o massimo 6) rispetto a kit con un numero più ampio di pozzetti (10/12). Da non sottovalutare è anche la conservazione e la preparazione dei sieri.

L'IFI è una metodica manuale che richiede quindi una estrema abilità, esperienza e precisione da parte di colui che la svolge; questo forse potrebbe rappresentare uno dei principali limiti o svantaggi della tecnica che potrebbe portare alla determinazione di risultati che non sempre sono corretti. Il personale addetto all'esecuzione della tecnica deve infatti essere inizialmente istruito e affiancato da personale competente prima di eseguire la metodica in modo indipendente. Tuttavia l'utilizzo di controlli positivi e di controlli negativi durante le procedure di preparazione e la corretta esecuzione della sequenza delle varie fasi possono ridurre notevolmente gli errori causati dall'operatore; nonostante questo può avvenire che alcune sedute non soddisfino i parametri di controllo, ad esempio il controllo negativo può assumere una colorazione tipica del controllo positivo, o che il siero di un campione contaminò il pozzetto in cui era stato posto

il siero di un altro soggetto. In tutti questi casi è necessario rigettare la seduta di analisi e ripeterla. Inoltre ciascun laboratorio dovrebbe controllare il proprio metodo utilizzando sieri di riferimento disponibili presso il CDC di Atlanta.

Un'altra problematica correlata all'IFI riguarda la standardizzazione della metodica di esecuzione e della lettura dei preparati; è stato possibile notare infatti che sia all'interno di uno stesso laboratorio ma in modo ancora più evidente in laboratori diversi si ottengono frequentemente risultati diversi.

I problemi della standardizzazione sono legati a diversi fattori:

- Tipo di microscopio utilizzato (luce incidente o trasmessa)
- Tipo di lampada utilizzata (alogeno o a vapori di mercurio)
- Tipo di filtro (l'uso di diversi filtri di barriera modifica sensibilmente l'intensità di fluorescenza visibile e la definizione delle strutture non fluorescenti)
- Tipo di obiettivo
- Variabilità di interpretazione della lettura
- Quantizzazione dei risultati
- Artefatti tecnici

Vediamo che quindi sono diverse le motivazioni che hanno spinto i ricercatori a testare nuovi metodi analitici in grado di poter sostituire l'IFI, tra i quali ricordiamo: la difficoltà di standardizzazione del metodo, la poca sensibilità ad antigeni mal espressi nel nucleo (SS-A, Jo-1), la scarsa adattabilità all'analisi di un numero elevato di campioni e le indagini svolte tra i diversi laboratori hanno dimostrato un'eccessiva variabilità della risposta essendo un test fortemente dipendente dall'abilità dell'operatore.

Più recentemente sono state introdotte così le tecniche immunoenzimatiche EIA che differiscono tra loro principalmente dal tipo di antigene che viene fissato al pozzetto.

Il nostro studio è stato condotto grazie un kit ANA screen fornito dall'industria farmaceutica Alifax che utilizza l'intero nucleo della cellula HEp-2 per esprimere il risultato in termini di Positivo o Negativo in base alla concentrazione degli ANA all'interno del siero. É quindi una tecnica quantitativa, a differenza dell'IFI che invece è una tecnica semiquantitativa, dove il risultato viene espresso in densità ottica (OD).

Apparentemente le tecniche EIA presentano dei vantaggi rispetto all'IFI che possono riassumersi nel fatto che si tratta di tecniche automatizzate, standardizzate, oggettive e adatte alle grandi serie e in grado quindi di uniformare i risultati tra i diversi laboratori.

Al di là della loro più facile esecuzione e della loro automatizzazione, questi metodi al momento non offrono la garanzia di poter individuare tutte le specificità anticorpali possibili. Saggi eseguiti su fase solida come il test EIA presentano un numero notevolmente limitato di antigeni rispetto all'intera cellula HEp-2 e non sono inoltre in grado di fornire informazioni relative al pattern e al titolo che sono invece di notevole importanza per il clinico nella valutazione di una condizione patologica. Tutti i risultati positivi devono essere infatti successivamente sottoposti ad analisi più specifiche, come l'IFI, per poter fornire informazioni più precise riguardo il titolo e il pattern.

Si tratta quindi di una forte limitazione che possiedono le tecniche EIA le quali, rispetto alle tecniche IFI, forniscono un risultato qualitativamente inferiore.

Nonostante questo il test ELISA presenta una buona specificità, che è influenzata principalmente dal tipo di antigene utilizzato nel coating (importante risulta essere il grado di purezza) e dall'affinità che ci sarà tra antigene e anticorpo target, e una buona sensibilità che invece risulta essere influenzata dal: bloccaggio (rapporto segnale raggiunto/fondo), dal lavaggio (rapporto segnale raggiunto/fondo), dall'utilizzo dell'anticorpo secondario e dall'affinità tra antigene e anticorpo. La sensibilità dell'ELISA risulta essere comunque notevolmente inferiore rispetto alla sensibilità dell'IFI; i motivi alla base della loro bassa sensibilità sono essenzialmente legati a due fattori:

- la preparazione di antigeni nucleari, sia estrattivi che ricombinanti, non permette una completa riproducibilità delle molecole nel modo in cui esse sono realmente presenti nel nucleo della cellula,
- non tutti i sistemi antigene/anticorpo sono stati al momento identificati

Essendo una metodica automatizzata vediamo che a differenza dell'IFI non è così fortemente legata alla qualità dell'operatore ma è strettamente correlata alla qualità sia del kit utilizzato che dello strumento.

Una delle principali problematiche collegate alla metodica EIA, consiste infatti nella difficoltà di allestire il kit di analisi e nella scelta dell'antigene che viene posizionato sul fondo del pozzetto; dal momento che la fase solida non contiene numerosi antigeni (alcuni kit forniscono semplicemente un numero di antigeni compreso tra 6 e 15) molto spesso risulta essere necessario effettuare test singoli per ogni anticorpo da indagare. Al giorno d'oggi si possono trovare fasi solide che, in aggiunta agli antigeni specifici, contengono un estratto di cellule HEp-2 consentendo così la rilevazione di una più vasta gamma di anticorpi.

Come in tutte le metodiche automatizzate dobbiamo mettere in evidenza un altro fattore che in qualche modo potrebbe essere svantaggioso nella scelta della metodica ossia il problema collegato al "volume morto". Quando parliamo di volume morto ci riferiamo a quella percentuale di reagente, substrato o di controllo che il sistema automatizzato necessita ma che non viene utilizzato ai fini dell'analisi. Vediamo infatti che tutti i flaconi del kit hanno un volume di reagente che deve essere incrementato di circa il 10%; questa percentuale rappresenta quella parte in più di reagente che il macchinario preleva e che necessita, per effettuare per esempio l'avvinamento dei tubi, ma che vengono persi. A livello pratico quindi se un operatore deve dispensare 100 µl di campione, ha la capacità di poterlo fare in modo preciso e accurato grazie all'utilizzo di una pipetta a volume standard e senza avere un consumo eccessivo di reagente. Nel caso di un meccanismo automatizzato invece lo strumento, se deve dispensare in ogni

pozzetto 100µl di soluzione, ne dovrà pescare un 10% in più che però non viene utilizzato e che quindi andrà perso ad esempio, se è necessario dispensare 100µl di campione in una intera strip della piastra sono effettivamente necessari 800µl, l'ago puntale però ne pescherà 900µl avendo così uno spreco di 100µl.

Questo riduce notevolmente la resa dell'intero kit soprattutto se abbiamo un numero limitato di campioni da analizzare per ogni seduta; molto spesso infatti, il numero di determinazioni che vengono realmente eseguite sono inferiori rispetto a quelle che il kit fornisce.

Vediamo che il volume morto, tipico di questi sistemi automatizzati, dipende non solo dal macchinario stesso ma anche dal tipo di contenitore in cui sono contenuti i reagenti (la bombatura del fondale del contenitore per esempio influenza notevolmente il volume morto); gli strumenti migliori sono quindi quelli che ci garantiscono un volume morto minore e di conseguenza una miglior resa del kit stesso.

Questo è un difetto piuttosto significativo che presenta la tecnica ELISA soprattutto se, come nel nostro studio, non viene utilizzato come metodica di routine per la determinazioni di analisi comuni.

Vediamo inoltre che il sensore di livello, ossia l'ago che permette di dispensare i diversi reagenti, è uno strumento che funziona come un condensatore<sup>16</sup>; in alcuni casi ma soprattutto quando il kit è quasi terminato e quindi i volumi sono notevolmente ridotti, l'ago non è in grado di sentire il volume del liquido, segnalando così nello strumento un errore. Molto spesso però è possibile che, nonostante si sia verificato un segnale d'errore l'ago abbia comunque dispensato in maniera idonea la giusta quantità di liquido. Potrebbe anche avvenire il contrario ossia che l'ago emette il segnale di errore in quanto il nostro campione non è realmente sufficiente per essere introdotto in tutti pozzetti generando così un errore di dispensazione vero e proprio.

---

<sup>16</sup> Un condensatore è un sistema fisico formato da due strati metallici separati da un mezzo interno che nel nostro caso è rappresentato da il liquido del reagente. Essendo il liquido elettrico l'ago è in grado così di rilevare la sua presenza; quando invece si ha un voltaggio elettrico minore, ossia il liquido non è sufficiente, l'ago non sentendolo emette un segnale di errore.



In questo caso vediamo che è necessario l'intervento di un operatore che sia in grado di valutare se la dispensazione è avvenuta in modo corretto o meno e nel caso non fosse stata eseguita correttamente dovrà provvedere a risolvere il problema. In alcuni casi è possibile che l'intera seduta debba essere rigettata. Molto spesso per ovviare a questo problema, alcuni tecnici di laboratorio consigliano di dispensare manualmente il reagente o il campione in modo tale da essere certi del volume che si deve introdurre nel pozzetto. Anche se il sistema è automatizzato vediamo che la presenza dell'operatore è comunque richiesta; rimane quindi la possibilità che esso possa in qualche modo influenzare l'intera analisi, producendo errori sistematici.

Tutte queste problematiche che presenta la tecnica immunoenzimatica si ripercuotono oltre che sulla qualità dei risultati finali anche sul costo della procedura. A livello teorico possiamo infatti dire che, normalmente, un'analisi eseguita in EIA ha un costo relativamente inferiore rispetto ad un'analisi effettuata in IFI, ma se valutiamo le varie variabili e se soprattutto valutiamo la qualità dei risultati ottenuti con le due metodiche possiamo comprendere come il rapporto qualità/prezzo sia notevolmente migliore in una tecnica IFI. Infatti, solo attraverso l'utilizzo di kit di buona qualità e strumenti altamente precisi la tecnica EIA è in grado di fornirci dei risultati affidabili; ovviamente dovendo aumentare la qualità dei prodotti aumenta conseguentemente anche il costo di questi. Nonostante nella maggior parte dei casi la tecnica IFI ottiene risultati comunque migliori.

Il fatto che un ANA screen eseguito con test ELISA non sia in grado di determinare il pattern specifico e il titolo di diluizione di un campione positivo rende assolutamente necessario che tutti i risultati positivi vengano poi riconfermati con un test ANA-IFI su cellule HEp-2 determinando così pattern e titolo. Anche questo è un fattore che incide sia sulla rapidità del tempo di risposta che sul costo dell'analisi.

Un'altra importante limitazione da tenere bene in considerazione nella valutazione del metodo ELISA deriva dal fatto che, in alcuni casi, esso può dare origine a risultati che spesso si presentano o come falsi positivi o, problematica ancora più grave, come dei falsi-negativi. I falsi positivi possono essere causati da

un lavaggio non accurato dello strumento o da una cross reattività degli anticorpi coinvolti, mentre la produzione di falsi-negativi è strettamente correlata alla scarsa sensibilità e specificità del kit che viene utilizzato per l'analisi. Dobbiamo tenere presente che la produzione di falsi-negativi rappresenta un "pericolo" piuttosto importante per un laboratorio nella determinazione di un esame clinico; il soggetto potrebbe, infatti, realmente presentare la malattia ma risultare comunque negativo. La produzione dei falsi negativi invece è fortemente ridotta invece quando si utilizza la tecnica di immunofluorescenza indiretta, normalmente, se le procedure e i controlli vengono rispettati, la tecnica IFI è altamente precisa, nella peggior delle ipotesi può essere alterata la diluizione del livello di positività ma è decisamente raro che si producano falsi negativi.

L'IFI potrebbe al contrario produrre dei falsi-positivi, ma sicuramente la produzione di un falso positivo non è così grave come la produzione di un falso-negativo; infatti in caso di positività ad un ANA screen il soggetto è comunque sotto posto ad accertamenti più specifici permettendo così di capire se la malattia è realmente presente e a che stadio di sviluppo è. Dato che la diagnosi di una patologia non viene effettuata solo in presenza di un esame positivo ma è necessario che siano valutati più parametri è sicuramente preferibile un falso positivo che un falso negativo. Inoltre, oltre al problema del ritardo del trattamento, una diagnosi errata può essere responsabile di un ulteriore costo aggiuntivo dovuto alla ripetizione dei test di conferma e/o a indagini diagnostiche inutili.

Possiamo quindi dire che nella scelta della tecnica e nella sequenza di utilizzo sia importante valutare: le caratteristiche del metodo, il costo dei reagenti, il tempo di risposta, le diverse situazioni cliniche ma anche l'esperienza e l'organizzazione del laboratorio stesso.

Secondo la mia personale esperienza e in base ai risultati ottenuti dal mio studio non esiste al giorno d'oggi un metodo di rilevazione degli anticorpi antinucleo che sia in grado di garantire la massima specificità e sensibilità.

È in ogni caso difficile stabilire quale sia il metodo migliore nella determinazione degli ANA anche dato il fatto che la scelta è strettamente collegata all'esigenze del laboratorio stesso.

Valutando la sensibilità e la specificità dell'IFI e la sua capacità di fornire titolo di diluizione e pattern di fluorescenza possiamo dire che l'IFI risulta essere ancora al giorno d'oggi il gold standard la ricerca degli ANA, come anche sostenuto dall'American College of Rheumatology (ACR). Sicuramente le caratteristiche di automatizzazione, facilità di esecuzione e capacità di adattarsi bene all'analisi di un numero elevato di campioni permettono all'EIA di essere comunque un metodo in via di sviluppo e di perfezionamento.

Nonostante alcuni kit ANA-EIA abbiano mostrato livelli di accuratezza diagnostica analoghi e talvolta superiori a quello del metodo IFI e siano quindi idonei ad essere impiegati come metodi di screening alternativi all'IFI, quello che secondo la mia esperienza influenza in maniera dominante la scelta del metodo è l'obiettivo che ha il laboratorio. Sicuramente un sistema ELISA è consigliabile in quei laboratori o ospedali dove il numero di esami da effettuare è notevole e l'utilizzo del metodo IFI provocherebbe analisi troppo lunghe. In un laboratorio dalle piccole o modeste dimensioni invece, a mio avviso, è preferibile utilizzare direttamente una tecnica di immunofluorescenza indiretta in modo tale da avere direttamente la valutazione del titolo di diluizione e del pattern di fluorescenza in caso di risultato positivo.

È inoltre importante che il laboratorio, prima di inserire nel proprio percorso clinico-diagnostico un tipo di metodo esegua un'attenta valutazione dei vari kit disponibili in commercio, date le loro differenze in termini di specificità e sensibilità.

Risulta difficile affermare in questo caso che la tecnica EIA sia in grado di sostituire completamente la tecnica IFI; probabilmente quello che il mio studio mi ha permesso di capire in modo concreto è che un risultato ottimo, sia in termini di qualità che di precisione, si potrebbe ottenere con l'utilizzo di entrambe le metodiche in modo sequenziale: utilizzare una tecnica ANA-EIA come un test di primo accesso che permetta di effettuare una screening dei campioni e quindi di

discriminare i positivi dai negativi e successivamente il test ANA-IFI come test di conferma dei risultati positivi per l'identificazione del pattern e valutare il titolo di diluizione. Questa potrebbe essere una soluzione molto utile ai laboratoristi anche se sfortunatamente non è sempre possibile applicarla a tutti i laboratori, anche a causa dell'elevato costo dell'analisi che si ripercuoterebbe sul costo finale dell'analisi al paziente.

Sicuramente i laboratori che decidono di utilizzare solo la tecnica IFI hanno una minor probabilità di originare risultati non corretti (falsi negativi), mentre il problema si pone invece per quei laboratori che decidono di utilizzare solo la tecnica ELISA.

Questo è emerso anche dal nostro studio dove su gli 8 campioni risultati discordanti tra le due metodiche alcuni di questi hanno mostrato una notevole differenza: un risultato positivo in IFI ad una diluizione di 1.160 (fortemente positivo), analizzato con la tecnica ELISA ha prodotto un risultato assolutamente negativo con un OD di 0,360 (considerando che il cut-off è 1 questo secondo la tecnica ELISA è un vero e proprio negativo). Sapendo che, normalmente, la tecnica IFI ha una sensibilità e specificità maggiore rispetto all'EIA possiamo dire di essere in questo caso di fronte ad un falso negativo che induce molto probabilmente il laboratorio ad effettuare un errore nell'interpretazione del risultato.

Le mie conclusioni sono avvalorate da studi presenti in letteratura. Tra i tanti citiamo Tonutti et al. [2003] che hanno pubblicato uno studio in cui hanno valutato l'affidabilità diagnostica di 5 kit immunoenzimatici EIA commerciale per la ricerca degli ANA e ne hanno verificato il possibile utilizzo in alternativa al metodo IFI. Anche il gruppo Tonutti et. al non ha trovato differenze statisticamente significative tra i due metodi dal momento che hanno dimostrato che la sensibilità diagnostica di alcuni metodi ANA-EIA sia del tutto sovrapponibile a quella del test ANA-IFI e perciò in grado di essere utilizzati in alternativa al metodo IFI. Ma avendo anche notato che non tutti i kit hanno gli stessi livelli di sensibilità e di specificità rispetto alla metodica IFI consigliamo un utilizzo associato delle metodiche per perfezionare la qualità dei risultati.

Successivamente anche Fenger et al. [2004] posero l'attenzione su queste due metodiche. Il loro studio ebbe come scopo quello di valutare la metodica EIA e di compararla con il classico metodo di immunofluorescenza per la determinazione degli anticorpi antinucleo. Essi conclusero che la sensibilità dell'EIA e dell'IFI possono essere ampiamente comparate e che la scelta del tipo di test da adottare dipende strettamente dal metodo di lavoro del laboratorio.

Ancora più recentemente Copple et al. [2011] eseguirono uno studio sulla base dei due precedenti; inizialmente i campioni furono sottoposti alla ricerca degli ANA attraverso la tecnica ELISA. Questa fu poi seguita dall'IFI per confermare e caratterizzare il pattern e il titolo degli autoanticorpi. Dal loro studio emerse che effettuare uno screening degli ANA con una tecnica EIA riduce la soggettività, i costi e il tempo di analisi ma che i risultati positivi devono essere confermati con un test ANA-IFI per determinare la specificità degli anticorpi. Anche Copple et al. ritengono che il metodo deve essere assolutamente scelto in base all'esigenze del laboratorio.

## 8. Prospettive future

Il futuro per il rilevamento degli ANA sembra essere molto promettente. Nonostante l'IFI rimanga la tecnica più utilizzata per la sua caratteristica di alta sensibilità, l'evoluzione della tecnologia e le strumentazioni sempre più sofisticate stanno introducendo metodi sempre più efficaci.

Saggi immunologici multiplex e microarray offrono, infatti, una valida alternativa alle tradizionali tecniche IFI, ELISA e immunoblot, permettendo una rilevazione più sensibile una maggiore velocità di rilevazione e tempi di consegna più veloci.

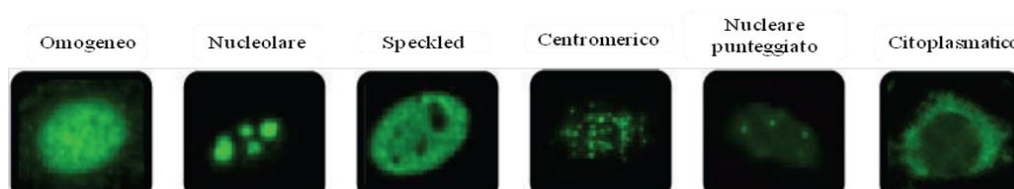
Anche se la tecnica ELISA è in continuo sviluppo, i ricercatori stanno sviluppando tecnologie basate sull'utilizzo delle nanosfere nella speranza che queste possano diventare il nuovo ANA test del futuro. Queste metodiche hanno come obiettivo quello di combinare l'omogeneità di preparazione antigeniche, presenti nell'IFI, con la semplicità della procedura di analisi dell'ELISA allo scopo di fornire informazioni ancora più dettagliate sulla specificità degli antigeni bersaglio. Essendo tuttavia una metodica ancora in via di sviluppo, al giorno d'oggi sono solo in grado di rilevare una piccola percentuale di auto antigeni (circa 18), avendo così una sensibilità decisamente inferiore a quella dell'immunofluorescenza [Greidinger et al., 2003].

Più recentemente le società di diagnostica hanno iniziato a sviluppare nuove tecnologie per automatizzare l'interpretazione del modello IFI; sono stati infatti così introdotti sistemi automatizzati per l'interpretazione degli autoanticorpi: ANA, anti-DNA e ENA.

L'introduzione di immagini digitali in IFI insieme allo sviluppo di sistemi di interpretazione automatizzati, ha permesso il superamento di alcuni inconvenienti importanti che presenta la tecnologia IFI tra i quali l'interpretazione soggettiva, la riproducibilità dei risultati tra i diversi laboratori e la difficoltà legata alla standardizzazione del metodo [Brusca et al., 2001].

In questo campo il primo sistema introdotto, che permette un'interpretazione dei dati in modo totalmente automatizzato, fu la tecnologia AKILIDES [Willitzki et al., 2012].

Nonostante il numero di modelli riconosciuti e la precisione dell'immagine digitali debbano essere ulteriormente migliorati, l'interpretazione dei saggi cellulari in modo automatico con la tecnologia AKILIDES può essere già al giorno d'oggi utilizzata all'interno dei laboratori che svolgono autoimmunità; sicuramente i ricercatori hanno valutato che risulta essere un metodo di screening decisamente utile nella diagnostica di routine, soprattutto per escludere i campioni negativi e fornire agli esperti la possibilità di risparmiare tempo e concentrare la loro attenzione solo su i campioni positivi [Nakabayashi et al., 2001].



**Figura 26. Immagini dei pattern di fluorescenza ottenuti con meccanismi automatizzati**

## Bibliografia

Abbas A., Lichtman A., and Pober J. (2002), *Immunologia Cellulare e Molecolare*, IV edizione, Piccin

Arbuckle M., McClain M., Rubertone M., Scofield H., Dennis G., James J, M.D., and Harley J., (2003), *Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus*, in “The New England Journal of Medicine” (349); pp. 1526-1533

Avaniss-Aghajani E.; Berzon S.; Sarkissian A. (2007), *Clinical Value of Multiplexed Bead-Based Immunoassays for Detection of Autoantibodies to Nuclear Antigens*, in “Clinical and Vaccine Immunology”. May 14 (5), pp. 505-509

Bizzarro N. (2001), *L’appropriatezza nella richiesta dei test autoanticorpali per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni*, in “Riv Med Lab – JLM”, 2 (2)

Bizzarro N. (2006), *Il valore predittivo degli autoanticorpi: evidenze cliniche e sperimentali*, in “RIMel/IJLaM”; 2

Bradwell AR.; Stokes RP., Johnson GD., (1995), in *Atlas of Hep-2 patterns and laboratory techniques*

Brusca I., Li Vigni P., Sucato R., La Chiusa S.M. (2001), *La preparazione dei vetrini in immunofluorescenza indiretta: valutazione di un sistema automatico*, *Biochimica Clinica*, Vol. 25, n. 3

Copple S.S., Sawitzke A. D., Wilson A. M., Tebo A. E., and Hill H. R. (2011), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Screening Then Indirect*



*Immunofluorescence Confirmation of Antinuclear Antibodies, A Statical Analysis*, in "Am J Clin Pathology"; 135; pp 678-684

Egner W. (2000), *The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE* in Am J Clin Pathology ; 53; pp. 424-432

Fenger M., Wiik A., HØter-Madsen M., Lykkegaard J.J., Rozenfeld T., Hansen M.S., Samsøe Bente D., and Jacobsen S. (2004), *Detection of Antinuclear Antibodies by Solid-Phase Immunoassays and Immunofluorescence Analysis*, in "Clinical Chemistry" (50) 11, pp. 2141-2147

Feltkamp T E W (1996), *Antinuclear antibody determination in a routine laboratory*, in "Annal Rheumatic Disease", (55), pp. 723-727

Fernandez Sav et al. (2003), *Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors*, in "Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo" 58 (6); 315-319

Fritzler M. J., Wiik A., Tan E. M., Smolen J. S., McDougal J. S., Chan E., Gordon T. P., Hardin J. A., Kalden J. R., Lahita R. G., Maini R. N., Reeves W. H., Rothfield N. F., Takasaki Y., Wilson M., Byrd M. G., Slivka L., and Koziol J.A. (2003), *A Critical Evaluation of Enzyme Immunoassay Kits for Detection of Antinuclear Autoantibodies of Defined Specificities. III. Comparative Performance Characteristics of Academic and Manufacturers' Laboratories*, in "The Journal of Rheumatology" (30) 11, pp. 2374-2381

Fritzler M. J. (2011), *The Antinuclear Antibody Test: Last or Lasting Gasp?* in "Arthritis e Rheumatism". Editorial, January (63) 1, pp. 19-22

Gniewek R. A., Stites D. P., McHugh T. M., Hilton J. F., and Nakagawa M. (1997), *Comparision of Antinuclear Antidody Testing Methods:*

*Immunofluorescence Assay versus Enzyme Immunoassay*, in “Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology”. May, (4) 2, pp. 185-188

Greidinger E. L., Hoffmann R. W. (2003), *Antinuclear Antibodies Testing: Methods, Indications, and Interpretation* in “Laboratory Medicine”. February Vol. 34, n. 2

Habash-Bseiso D., Yale S. H., Glurich I., and Goldberg J. W. (2005), *Serologic Testing in Connective Tissue Diseases* in “Clinical Medicine and Research” (3): 3, pp. 190-193

Hayashi N., Kawamoto T., Mukai M., Morinobu A., Koshiba M., Kondo S., Maekawa S., and Kumagai S. (2001), *Detection of Antinuclear Antibodies by Use of an Enzyme Immunoassay with Nuclear HEP-2 Cell Extract and Recombinant Antigens: Comparison with Immunofluorescence Assay* in 307 Patients in “Clinical Chemistry” (47): 9, pp. 1649-1659

Hoffman I., Peene I., Veys E. M, and Filip K. (2002), *Detection of Specific Antinuclear Reactivities in Patients with Negative Anti-Nuclear Antibody Immunofluorescence Screening Test* in “Clinical Chemistry” 48:12, pp. 2171-2176

Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D. H., Homburger H. A. (2000), *Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens* in “Archives of Pathology & Laboratory Medicine” January 124

Kern P., Kron M., and Hiesche K. (2000), *Measurement of Antinuclear Antibodies: Assessment of Different Test Systems* in “Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology”, January (7): 1, pp. 72-78

Keren D. F. (2002), *Antinuclear Antibody testing* in “Clinical Laboratory Medicine” (22), pp. 447-474

Khanh T., Reveille J. (2003), *The Clinical Relevance of Autoantibodies in Scleroderma*, in “Arthritis Research & Therapy”, Vol. 5, n. 2, pp. 80-93

Kumar Y., Bhatia A. and Minz R. W. (2009), *Antinuclear Antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited* in “Diagnostic Pathology”, January 4:1

Mariz H., Sato E., Barbosa S., Rodrigues S., Dellavance A., and Andrade L. (2011), *Pattern on the Antinuclear Antibody-HEp-2 Test Is a Critical Parameter for Discriminating Antinuclear Antibody-Positive Healthy Individuals and Patients With Autoimmune Rheumatic Diseases*, in “Arthritis e Rheumatism”, Jan (63), pp. 191-200

Marrone M., Chialà A., Tampoia M., Iannone F., Raho L., Covelli M., Grattagliano V., Pansini N., Lapadula G. (2007), *Prevalenza degli Anticorpi Anti-peptide citrullinato (ANTI-CCP) nella Sclerosi Sistemica*, in “Reumatismo”; 59 (1); pp. 20-24

Martino S., Capristo C., Cardinale F., Fiore M., Martire B., Moschese V., Soresina A. (2010), *La ricerca degli autoanticorpi nella malattie autoimmuni sistemiche del bambino*, in “Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica”

Melegari A, et al. (2012), *A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence* in “Autoimmunity Reviews”, doi: 10.1016/j.autrev.2011. 12.010

Merloni P.L, Schur P. H. (2010), *ANA screening: an old test with new recommendations* in “Annals Rheumatic Disease” (69), pp. 1420-1422

Monaco F. (2008), *Endocrinologia per i corsi di Laurea delle Professioni Sanitarie*, Società Editrice Universo

Nakabayashi T., Kumagai T., Yamauchi K., Sugano M., Kuramoto A., Fujita K., Hidaka H., and Tozuka M. (2001), *Evaluation of the Automatic Fluorescent Image Analyzer, Image Titer, for Quantitative Analysis of Antinuclear Antibodies* in "Am J Clin Pathology" 115, pp. 424-429

Peene I., Metheus L., Veys E M., Keyser F. (2001), *Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum sample referred for ANA testing* in "Annals Rheumatic Disease", May 60, pp. 1131-1136

Pontieri, Russo, Frati (2005), *Patologia Generale*, III edizione, Piccin

Pontieri (2007), *Patologia Generale e Fisiopatologia Generale*, II edizione, Piccin

Pozzoli R. (1995), *Manuale Atlante di Microscopia in Immunofluorescenza per la Diagnosi di Patologie Autoimmuni*, Dasit S.p.A.

Rollins G. (2011), *Antinuclear Antibody Testing Dilemmas* in Clinical Laboratory News, November Vol.37, n.11

<http://www.aacc.org/publications/cln/2011/november/Pages/AntinuclearAntibodyTestingDilemmas.aspx#>

Rollins G. (2009), *Challenges and Controversies in Anti-Nuclear Antibody Testing* in Clinical Laboratory News, October, Vol. 32, n.

10 [http://www.aacc.org/publications/cln/2009/october/Pages/am09\\_highlights3.aspx#](http://www.aacc.org/publications/cln/2009/october/Pages/am09_highlights3.aspx#)

Sebastiani G.D (2009), *Anticorpi anti-citoplasma dei granulociti neutrofili (ANCA)* in “Reumatismo”; 61 (1), pp. 69-76

Seriolo B., Sulli A., Burrioni A., Cutolo M. (2003), *Rheumatoid arthritis and atherosclerosis* in “Reumatismo”; 55 (3), pp 140-146

Tonutti E., Bassetti D., Piazza A., Visentini D., Poletto M., Bassetto F., Caciagli P., Villalta D., Tozzoli R., Bizzarro N. (2003), *Affidabilità del metodo ELISA come test alternativo al metodo di immunofluorescenza indiretta nella determinazione degli anticorpi antinucleo. Valutazione di 5 Kit commerciali*, in “Riv Med Lab” 4:2, pp. 122-127

Tonutti E., Picierno A., Visentini D., Butazzoni M., Molinaro P., Grimaldi E., Bizzarro N., (2007) *Valutazione di 4 kit diagnostici per la ricerca degli anticorpi anti-nucleo su cellule HEp-2 e HEp-2000 con metodica di immunofluorescenza indiretta* in “RIMeL/IJLaM”; 3, pp. 99-105

Tozzoli R., Bizzarro N., Tonutti E., Villalta D., Bassetti D., Manoni F., Piazza A., Pradella M., and Rizzotti P. (2002), *Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Test in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases* in “Am J Clin Pathology” 117, pp. 316-324

Tozzoli R. (2006), *L'evoluzione della tecnologia e le ricadute sui percorsi diagnostici nelle malattie autoimmuni* in “RIMeL/IJLaM”; 2; pp.141-150

Ulvestad E., Kanestrøm A., Madland T. M., Thomassen E., Haga H.J., and Vollset S. E. (2000), *Evaluation of Diagnostic Test for Antinuclear Antibodies in Rheumatological Practice* in “Scand J. Immunology” 52, pp. 309-315

Villalta D., Sebastiani G.D., Mathieuf A., Meroni P.L., Morozzi G., Tozzoli R., Tonutti E. (2002), *ANA e anticorpi anti-DNA: esperienza di VEQ "FIRMA"* in "Riv Med Lab" 3: 2-S1

Voigt J., Krause C., Rohwader E., Saschenbrecker S., Hahn M., Danckwardt M., Ferier C., Ens C., Fechner K., Barth E., Martinetz T., and Stoker W. (2012), *Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEP-2 Cells* in "Clinical and Developmental Immunology", article ID 651058, 7 pages

Wananukul S., Voramethkul W., Kaewopas Y., and Hanvivatvong O., (2005), *Prevalence of Positive Antinuclear Antibodies in Healthy Children*, in "Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology", Jun-Sep; 23(2-3), pp. 153-157

Willitzki A., Hiemann R., Peters V., Sack U., Schierack P., Rödiger S., Anderer U., Conrad K., Bogdanos D., Reinhold D., and Roggenbuck D. (2012), *New Platform Technology for Comprehensive Serologica Diagnostics of Autoimmune Diseases*, in "Clinical and Developmental Immunology", article ID 284740, 8 pages

## Ringraziamenti

Giunta alla fine di questo lungo percorso non mi rimane che ringraziare tutte quelle persone che in un modo o nell'altro hanno contribuito al raggiungimento di questo mio obiettivo.

Ringrazio in primo luogo la Proff.ssa Serafina Bastistelli per avermi seguita in questo lavoro di tesi con professionalità, disponibilità e tanta pazienza.

Grazie a tutti i miei colleghi del Bio Lab che mi hanno accolta con grandissimo affetto;

A Michele, che mi ha dato l'opportunità di svolgere questa esperienza professionale, sostenendomi con professionalità e fiducia;

A Cinzia, che nonostante i suoi mille impegni professionali ha sempre trovato il tempo per ascoltarmi e consigliarmi, sostenendomi nei momenti di sconforto come una vera è propria mamma;

A Valentino, per la sua gentilezza e simpatia;

A Elisa P. che con la sua simpatia, energia e vitalità è sempre riuscita a strapparmi un sorriso dalle mia labbra;

A Simona, Laura, Deborah, Barbare P. e Elisa C. che mi hanno assistita passo dopo passo, sostenendomi con fiducia riuscendo sempre a stimolare in me curiosità e passione. Grazie soprattutto per aver creato intorno a me una vera e propria famiglia!!

A Giuliana, Loredana, Francesca, Giada, Tiziana, Donatella, Barbara M., Leo, Edlira, Barbara, Daniela per la loro disponibilità e gentilezza;

Grazie ai miei genitori, a te mamma che mi hai sempre sostenuta in qualsiasi momento di rabbia, di felicità ma anche di tristezza. Grazie per esserci sempre stata e per avermi sempre dato la forza di andare avanti nel mio percorso. Grazie a te babbo per essere stato sempre il mio punto di riferimento riuscendo sempre a tranquillizzarmi, facendomi sentire forte e pronta in tutto ciò che dovevo affrontare;

Grazie a mio fratello Luca che, probabilmente senza il suo aiuto arrivare qui oggi sarebbe stato per me tutto molto più difficile e complicato. Lo so, sono stato il tuo incubo, qualche colpo me l'avrai sicuramente mandato, ma questi credo che siano i favori che si fanno tra i fratelli che si vogliono bene;

Grazie a Claudia che ha saputo rendere questi 2 anni indimenticabili. Grazie per tutti i momenti passati insieme, caffè, aperitivi, giorni, notti che rimarranno sempre dentro di noi. Anche se qualche volta mi hai fatto arrabbiare, grazie per aver reso il mio studio più leggero, pieno di risate, battute merende e notizie scoppiettanti ma anche ricco di nervosismi, crisi e pianti; non so se ti ricordi quel faticoso giorno dell'esame di biochimica quanti fazzoletti hai consumato!!Grazie ai tuoi cd che ci hanno sempre accompagnato nella famosa strada rossa della sogesta ma soprattutto grazie a Koduro che ha reso un periodo della nostra esperienza universitaria realmente indimenticabile.

Grazie ad Eleonora che, mi ha sempre sostenuta e consigliata in tutto quello che facevo. Anche questo giorno come quello di 3 anni fa ci ritroviamo a dividerlo insieme. Rispetto a 3 anni fa sarà un'emozione diversa, ancora più unica e indimenticabile dal momento che ho conosciuto un' Eleonora diversa, la vera Eli!!!Grazie per tutti quei momenti di studio passati insieme in cui ognuna voleva avere ragione e dopo 30 secondi scoppiavamo a ridere come due pazze, capendo che stavamo dicendo esattamente la stessa cosa!!!

Grazie a Maggie, compagna di vittorie, sconfitte, sacrifici, arrabbiate, delusioni, emozioni e soddisfazioni. Grazie per avermi sempre consigliata e ascoltata anche quando, presa dalle mie ire, iniziavo a scriverti come una matta e tu cosa facevi??.... passavi il comando a Riki!!!!ahahaah furbetta!!!un grazie lo devo anche al nostro amato what's app che mi ha permesso di essere sempre insieme a te anche quando le ore di fuso orario che ci separavano erano infinite!!mi basta guardarti negli occhi e già ti capisco....come quella sera a cena, ricordi???che continuavamo a guardarci e a ridere come due suonate anzi ,come direbbe qualcuno a noi molto vicino come due babbee!!!potrei stare qui le ore a scrivere tutte le emozioni che abbiamo passato insieme e sono convinta che ne passeremo tantissime altre. Quello che mi viene da dire è che non ho incontrato



semplicemente un'amica, una persona speciale, una compagna di pallavolo, una compagna di risate ma una vera e proprio sorella!!! Grazie Capitanooooooooo!!!!!!!!!!!!!!

Grazie ad Ale che in così poco tempo è riuscito a darmi tutto quello che mai nessuno prima era stato in grado di fare, grazie per la tua grinta che ogni mattina mi trasmetti e grazie per tutte le emozioni che mi stai facendo provare.

Infine grazie a tutta la mia squadra di pallavolo, grazie a Danilo per la sua fiducia, a Matilde mia compagna di riscaldamento, a Giulia per le sue 6 inaspettate, a Maggie per avermi lasciato la fascia da capitano quando non c'era, ad Alice per le sue unghiate a rete, a Valentina il giullare della squadra, a Elisa T. per i mani fuori che mi fa, a Camilla per la sua spensieratezza, a Martina per le sue bollenti notizie, a Ramona per le sue perle da mamma, a Francesca per la sua allegria, a Miryam per i suoi panini che non ha mai portato, a Elisa M. perché è sempre carina e gentile, a Elena per i suoi backstage, a Giada per i suoi scout, a Lollo per i suoi esercizi da personal trainer, a Loris e Giovi per farmi sempre giocare ad indovina chi, ad Alfio per essere sempre presente, a Giorgia e Tommy nostri tifosi numeri uno, a Momo per averci regalato una nuova mascotte, Serena!!! Grazie davvero a tutte per avermi incoraggiata ad inseguire questo mio sogno, come mi incoraggiate a seguire una palla dentro il campo o come mi incitate a prendere quei pallonetti tremendi che sono il mio incubo!!! grazie per tutti i momenti, che sono davvero tanti, che abbiamo passato insieme a ridere, a scherzare, grazie per aver sempre creduto in me!!! ormai siete diventate la mia famiglia, quella famiglia sulla quale posso e potrò sempre contare, grazie per avermi fatto capire quanto sia bello condividere emozioni insieme ad un gruppo speciale come tutte voi!!!!

Un ringraziamento speciale devo farlo al presidente, o meglio a Riki, o meglio ancora al babbeo numero unoooooo!!!! grazie per essere stato il mio confidente personale, come quel pomeriggio dove hai ascoltato tutte le mie confessioni e tutti i miei dubbi, consigliandomi come un vero e proprio fratello... forse avrei dovuto ascoltarti un po' di più ma sai la testardaggine è il mio punto forte!!!