

ANA e anticorpi anti-DNA: esperienza di VEQ "FIRMA"

D.Villalta^a, G.D. Sebastiani^b, A. Mathieu^c, P.L. Meroni^d, G. Morozzi^e,
R. Tozzoli^f, E. Tonutti^g

^aImmunologia Clinica e Virologia, DML, Azienda Ospedaliera, Pordenone

^bClinica Reumatologica, Ospedale San Camillo, Roma

^cClinica Reumatologica, Università degli Studi, Cagliari

^dImmunologia Clinica, Istituto Auxologico, Milano

^eIstituto di Reumatologia, Università, Siena

^fLaboratorio di Patologia Clinica, Latisana (UD)

^gLaboratorio di Patologia Clinica, Udine

Introduzione

Gli anticorpi anti nucleo (ANA) sono una famiglia di autoanticorpi rivolti verso diverse specificità antigeniche presenti nel nucleo cellulare. Caratteristicamente presenti nelle malattie autoimmuni sistemiche, quali il Lupus eritematoso sistemico (LES), la sclerosi sistemica (SSc), la sindrome di Sjögren (SS), la malattia mista del connettivo (MCTD), la polimiosite/dermatomiosite (PM/DM), costituiscono il test di primo livello per la diagnostica di tali patologie, anche se va sottolineata la non assoluta specificità per le stesse in quanto possono essere presenti in alcune infiammazioni croniche, infezioni o neoplasie.

Il metodo di riferimento per la loro determinazione è la immunofluorescenza indiretta (IFI) su linee cellulari Hep 2. Recentemente sono apparse sul mercato metodiche ELISA che impiegano miscele di antigeni nucleari estrattivi e/o ricombinanti che però, al momento, non offrono garanzia di poter individuare tutte le specificità anticorpali rilevate con la metodica IFI.

Una delle specificità autoanticorpali rilevate con la determinazione degli ANA è quella rivolta verso il DNA nativo a doppia elica (dsDNA). Altamente specifica per il LES, di cui ne costituisce il 10° criterio classificativo secondo l'American College of Rheumatology (ACR) (1), è presente con prevalenza variabile tra il 40% e l'80%. Sensibilità e specificità, però, sono influenzate dalla metodica utilizzata per la determinazione. La tecnica di Farr, infatti, rileva prevalentemente autoanticorpi anti-dsDNA ad alta avidità, presentando quindi una elevata specificità per la diagnosi di LES e una buona sensibilità. L'IFI su *Crithidia luciliae*, che rileva autoanticorpi ad avidità alta e intermedia, è una metodica altamente specifica, ma meno sensibile delle altre. Le tecniche ELISA, le quali rilevano anche gli anticorpi a bassa avidità, sono le più sensibili, ma le meno specifiche

per la diagnosi di LES (2). Il risultato delle tecniche ELISA, inoltre, è molto influenzato dal tipo di antigene usato e dal procedimento di legame dello stesso alla micropiastra, in quanto anche piccole modifiche strutturali della doppia elica possono determinare l'esposizione di sequenze di basi puriniche e pirimidiniche, classicamente riconosciute dagli anticorpi anti-DNA a singola elica (anti-ssDNA), concorrendo alla aspecificità della metodica.

Per quanto sopra riportato e in considerazione della variabilità analitica delle metodiche, allo scopo di migliorare sia l'efficienza che l'efficacia dei processi diagnostici di laboratorio rivolti alla diagnosi e al monitoraggio delle malattie autoimmuni sistemiche, un gruppo di specialisti appartenenti a varie discipline (immunologi clinici, internisti, reumatologi, patologi clinici, nefrologi e dermatologi) esperti nel campo della diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni, hanno costituito un Forum interdisciplinare per la ricerca nelle malattie autoimmuni (FIRMA), di cui uno dei primi atti è stata la formulazione di una proposta di linee guida per la determinazione di vari autoanticorpi, fra cui gli ANA e gli anti-dsDNA. Del tutto recentemente, infine, è stata condotta una esperienza di VEQ fra 17 centri partecipanti al FIRMA, anche al fine di valutare l'impatto della applicazione delle linee guida nelle performance diagnostiche dei singoli laboratori, di cui ne vengono riportati i risultati.

Materiali e Metodi

I sieri utilizzati per la Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) sono stati selezionati in 5 diversi centri, prelevati da pazienti con una diagnosi già nota per malattia autoimmune sistemica e da controlli normali. In totale sono stati raccolti 9 sieri patologici (5 LES, 2 vasculiti ANCA associate, 1 SS e 1 SSc) e 2 normali. Dopo aggiunta di sodio azide, furono inviati al

laboratorio dell'Istituto di Reumatologia dell'Università di Siena dove vennero suddivisi in aliquote, siglati con una lettera e inviati a 17 centri appartenenti al FIRMA, i quali hanno dosato "in cieco" i sieri per i seguenti parametri: ANA, anticorpi anti-dsDNA, ENA, ANCA, anticorpi anti-cardiolipina, anticorpi anti-beta 2 glicoproteina. Ogni laboratorio ha spedito le schede con i risultati, le metodiche utilizzate e i relativi valori di riferimento all'Istituto di Reumatologia dell'Università di Siena, da dove tutto il materiale, unitamente alle diagnosi relative a ciascun siero, è stato inviato ai responsabili dell'elaborazione dei dati, precedentemente individuati.

Dosaggio degli ANA

Tutti i 17 laboratori a cui sono stati inviati i sieri hanno eseguito il dosaggio ANA, usando sorgenti commerciali di Hep 2. In particolare 7 laboratori usarono Hep 2 della ditta Inova; 3 della ditta Immunoconcept; 3 della ditta Biorad; 1 della ditta Euroimmun, Alphadia, Delta e Virgo, rispettivamente. 10 laboratori hanno scelto il titolo 1:40 come diluizione di partenza e i restanti 7 laboratori il titolo 1:80, in ottemperanza a quanto previsto nelle linee guida. Tutti i laboratori descrissero il pattern fluoroscopico; 9 titolarono i sieri fino all'end point, 5 fino a 1:640, 1 fino a 1:160, 1 espresse il titolo in scala qualitativa ordinale di valori crescenti da + a +++++, 1 laboratorio, infine, espresse il risultato solo in termini qualitativi positivo/negativo.

Dosaggio degli anticorpi anti-dsDNA

Tre laboratori eseguirono il dosaggio con il metodo di Farr (2 DPC, 1 Dasit). I rimanenti 14 laboratori non utilizzando tale metodica, in ottemperanza a quanto suggerito dalle linee guida, utilizzarono la tecnica IFI, con diluizioni di partenza 1:10 (9 laboratori) e 1:20 (5 laboratori). Anche in questo caso vennero usati preparati commerciali (4 Immunoconcept, 2 binding Site, 2 Alphadia, 2 Inova, 1 Dasit, Biorad, Biodiagnostics, MBL, rispettivamente). 9 dei 14 laboratori utilizzando la tecnica IFI eseguirono anche la determinazione quantitativa con tecnica ELISA (4 Shield, 2 Diamedix, 1 Dasit, Fenning e Inova, rispettivamente).

Risultati

Dosaggio degli ANA

La concordanza globale dei risultati espressi in termini qualitativi positivo/negativo fu del 96.8% (Fig. 1). Dei 6 casi discordanti, sulle 187 determinazioni eseguite, 3 furono i falsi positivi (50%) e 3 i falsi negativi (50%); di quest'ultimi 2 su 3 furono riportati da un solo laboratorio. Minore risultò la concordanza dei valori quantitativi espressi in titolo

(75.5%), con distribuzione dei valori su un range piuttosto ampio per i sieri A, B, e F (Tab. I). Ci fu, infine, il 71.3% di concordanza nella descrizione dei pattern fluoroscopici (Tab. II).

Figura 1. Percentuale di positività/negatività ANA-IFI per ciascun siero.

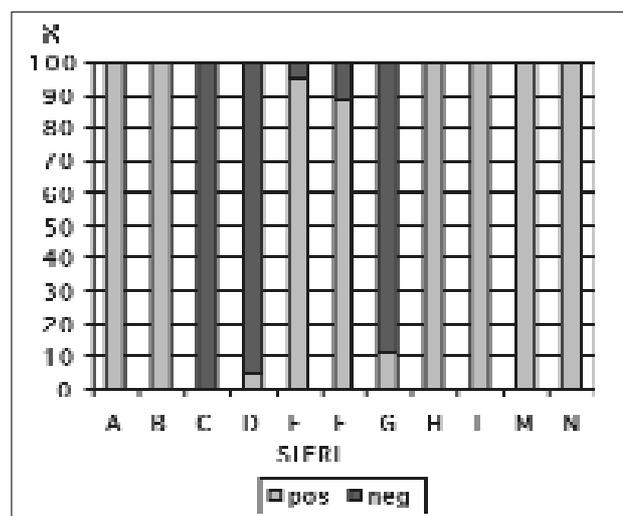


Tabella I. Distribuzione dei titoli degli ANA per ciascun siero esaminato.

	NEG	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	>640
A	-	-	1	3	2	7	1
B	-	-	-	2	6	3	3
C	15	-	-	-	-	-	-
D	14	-	1	-	-	-	-
E	1	-	-	1	4	8	1
F	2	-	-	1	4	4	4
G	13	-	2	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	14
L	-	-	-	-	-	-	14
M	-	-	-	-	-	1	13
N	-	-	-	1	-	1	12

Tabella II. Quadri fluoroscopici descritti dai vari laboratori per ciascun siero esaminato. (OM: omogeneo; SP: speckled; NU: nucleolare; ACA: centromerico; DG: discrete granular pattern; A.: altri).

	OM	SP	NU	ACA	DG	OM+ SP	OM+ NU	SP+ NU	A.
A	10	4	-	-	-	3	-	-	-
B	-	16	-	1	-	-	-	-	-
E	13	-	-	-	-	3	-	-	-
F	-	14	1	-	-	-	2	2	-
H	-	1	12	-	-	-	2	2	-
L	-	17	-	-	-	-	-	-	-
M	4	3	-	-	3	2	4	-	1
N	11	-	-	-	-	5	-	-	1

Dosaggio degli anticorpi anti-dsDNA

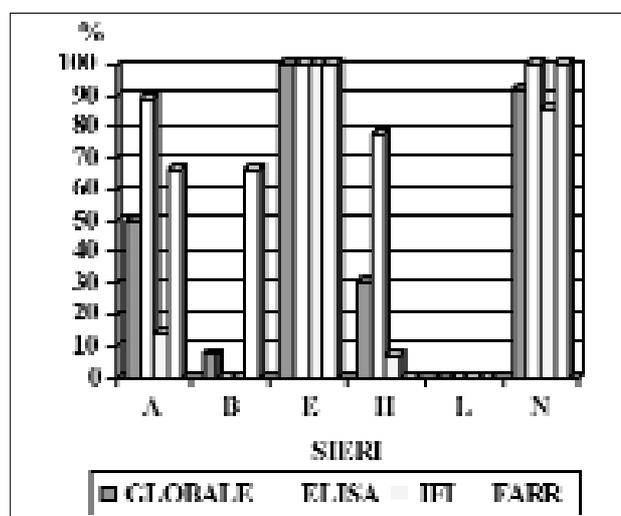
La concordanza globale dei risultati espressi in termini qualitativi positivo/negativo fu del 92.4%; limitatamente ai sieri che con almeno 1 metodo risultarono positivi, la concordanza risultò dell'80.6%. Le percentuali di positività per ciascun metodo nei sieri A,B,E,H,N sono riportate nella Figura 2, dalla quale è possibile vedere la significativa differenza in termini percentuali dei risultati ottenuti con i 3 metodi considerati. Il siero L, classificato come LES, risultò negativo con tutti e tre i metodi; il siero H, classificato come vasculite ANCA positiva, risultò positivo, seppure prevalentemente a basso titolo, in 7/9 ELISA e 1 IFI. Pertanto la sensibilità clinica e la specificità risultarono essere rispettivamente 57.8% e 93.0% per il metodo ELISA, 40.0% e 99.4% per il metodo IFI, 66.0% e 100% per il metodo Farr.

La variabilità analitica dei risultati quantitativi oscillò dal 37.9% al 128% negli ELISA (dal 37.9% al 59.5% se si escludono i risultati ottenuti con un metodo commerciale che in termini assoluti differì in maniera significativa dagli altri) e dal 23.9% al 67.4% nei Farr. In quest'ultimo caso, però va considerato che sono solo 2 i metodi/kit presi in considerazione.

Discussione

I dati relativi alla determinazione qualitativa degli ANA sono risultati essere buoni, lievemente migliori a quelli riportati in una precedente esperienza FIRMA (3) e significativamente migliori a quelli riportati in recenti esperienze della letteratura (4). Al miglioramento delle performance con ogni probabilità ha contribuito anche l'applicazione delle linee guida recentemente prodotte dal gruppo FIRMA e in particolare la condivisione di un cut-off di positività e l'utilizzo, da parte di tutti i centri, di Hep 2 come substrato. Ancora soggetto ad una discreta variabilità analitica, invece, è l'espressione quantitativa degli ANA; in questo incidono senz'altro la soggettività interpretativa, la diversità dei preparati commerciali, dei coniugati, nonché delle ottiche utilizzate. Per quanto riguarda la definizione del quadro fluoroscopico la concordanza globale è risultata del 70.1%, ma con notevoli differenze tra i singoli sieri. Si passa infatti dal 100% di concordanza del siero L, (con positività autoanticorpale per SSA, SSB, Sm/RNP) a concordanze decisamente minori com'è il caso del siero M (positività autoanticorpale per Scl-70). In quest'ultimo caso gioca un ruolo importante la mancanza di una definizione univoca del pattern fluoroscopico che generalmente si associa a tale positività autoanticorpale. Alla bassa concordanza globale, infine, concorre il fatto che in caso di associazione di più di un quadro fluoroscopico alcuni laboratori descrivono solo quello prevalente, altri le singole morfo-

Figura 2. Percentuali di positività per anti-dsDNA: globale, ELISA, IFI, Farr.



logie. Da un punto di vista pratico, però, solo l'unica descrizione difforme relativa al caso B può avere un risvolto clinico, in quanto in presenza di un quadro fluoroscopico di tipo centromerico non sono indicate ulteriori indagini di approfondimento poiché da solo indicativo della specificità autoanticorpale. Essendo la positività anti-centromero associata alla CREST, inoltre, una descrizione errata del quadro può essere fuorviante per la diagnosi.

Come atteso la concordanza globale dei risultati del dosaggio degli anticorpi anti-dsDNA è stata inferiore a quella degli ANA (92.4%) e significative sono risultate le differenze fra metodi. Da questa esperienza di VEQ il Farr è risultato il test più affidabile in quanto dotato della maggiore sensibilità clinica e della maggiore specificità; il metodo IFI a fronte di una alta specificità è risultato il test meno sensibile; il metodo ELISA, pur essendo più sensibile dell'IFI, manifesta una minore specificità. Tali evidenze, che peraltro confermano quanto già descritto in letteratura (5), giustificano quanto proposto dalle linee guida FIRMA e cioè, in fase diagnostica, qualora si desideri privilegiare la specificità, il test di riferimento rimane il Farr e in alternativa l'IFI. Per quanto riguarda il monitoraggio, dal momento che è importante usare un test quantitativo, per chi non usa il Farr una valida alternativa può essere rappresentata dall'ELISA. In ogni caso, considerate le elevate variabilità analitiche dei risultati espressi in termini quantitativi per entrambi i test, i dosaggi dovrebbero essere sempre eseguiti con lo stesso metodo e possibilmente nello stesso laboratorio.

Bibliografia

1. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725-34.

2. Smeenk RJ. Measurement of antibodies to DNA. In: van Venrooij WJ, Maini RN, eds. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht: Kluver Academic Publisher, 1993. A8:1-12.
3. Sebastiani GD, Galeazzi M, Morozzi G, De Pità O, Mathieu A, Meroni PL, et al. Anticorpi anti-nucleo e anti-dsDNA: analisi metodologica e controllo di qualità dei risultati. *Reumatismo* 2000; 53 (suppl 2): 136-8.
4. Bizzarro N, Bozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, et al. Variabilità between methods to determinate ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical Industry. *J Immunol Methods* 1998;219:99-107.
5. Smeenk RJT, Berden JHM, Swaak AJK. DsDNA autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1996. pp. 227-36.