

# Gli esami di autoimmunologia nella diagnosi e nel monitoraggio della sclerosi sistemica - La risposta del Laboratorio

D. Bassetti

*U.O. Microbiologia Virologia, Struttura Semplice Sierologia Autoimmunità  
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.P.S.S. Trento*

## Riassunto

La Medicina di Laboratorio risulta di fondamentale ausilio della gestione della diagnosi, prognosi, monitoraggio clinico e terapeutico dei pazienti affetti da sclerosi sistemica, in particolare con la ricerca, effettuata con tecniche analitiche diverse, di alcuni autoanticorpi associati alla malattia. Nel 95% dei pazienti possono essere rilevati tali anticorpi, ciascuno dei quali con una propria peculiarità significativamente utilizzabile nella gestione diagnostica e prognostica della patologia. Anticorpi anti-centromero ed anti-topoisomerasi I (Scl-70) rendono possibile la differenziazione dei pazienti con sclerosi sistemica da controlli sani o da pazienti con altre malattie connettivali. Gli anticorpi anti-centromero contraddistinguono una forma ad interessamento cutaneo limitato senza coinvolgimento fibrotico polmonare; viceversa anticorpi anti-topoisomerasi I presentano un elevato potere predittivo per impegno cutaneo diffuso e polmonare. Anticorpi anti-fibrillarina ed anti-RNA polimerasi, rilevati con minore frequenza, sono correlati ad una forma cutanea diffusa ed interessamento sistemico.

## Summary

### Autoimmunology Tests in the diagnosis and monitoring of Systemic Sclerosis: the answer of the Laboratory

The Medicine of Laboratory is very helpful in assessing the diagnosis, prognosis, monitoring and treatment of scleroderma patients. In particular several autoantibodies associated with systemic sclerosis can be detected by immunological methods. In more than 95% of the patients anti-nuclear antibodies or others autoantibodies are present, each of which is useful in the diagnosis of affected patients and in determining their prognosis. Anti-centromere antibodies and anti-topoisomerase I (Scl-70) antibodies are available in distinguishing patients with systemic sclerosis from healthy controls, from patients with other connective tissue disease. Anti-centromere antibodies predict a limited skin involvement and the absence of pulmonary fibrosis; the presence of anti-topoisomerase I increases the risk for diffuse skin involvement and scleroderma lung disease. Anti-fibrillaritin and anti-RNA-polymerase autoantibodies occur less frequently but are predictive of diffuse skin involvement and systemic disease.

La Medicina di Laboratorio svolge un ruolo di fondamentale importanza nella gestione globale della Sclerosi Sistemica (SSc) e, sebbene a tutt'oggi nessun indicatore biomolecolare sia inserito nei criteri classificativi ACR della malattia stessa, la pratica clinica evidenzia come il supporto fornito dai dati di laboratorio costituisca una pietra miliare indispensabile.

Il Laboratorio individua sia alterazioni di ordine generale, come un aumento dei parametri della flogosi, anemia, ipergammaglobulinemia o inerenti agli organi compromessi, che specifiche, quali il rilievo di autoanticorpi circolanti, dotati di elevata predittività ed in grado di contribuire alla

caratterizzazione e classificazione della malattia, mediante la definizione di subset clinico<sup>1-3</sup>.

## Specificità autoanticorpali nella SSc

Nel 95% dei pazienti affetti da SSc sono riscontrabili autoanticorpi: essi sono evidenziabili generalmente mediante la tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFA), applicata al substrato di cellule umane HEP-2.

In esse sono riconoscibili patterns fluoroscopici diversi, corrispondenti ad altrettante specificità anticorpali, che possono essere successivamente identificate con metodi immunoenzimatici (ELISA), immunoblotting (IB) o con-

troimmunolettroforesi (CIE).

I quadri fluoroscopici determinati dai principali autoanticorpi SSc-correlati sono distinguibili in positività IFA di tipo:

- granulia diffusa o diffuse grainy (aspetto omogeneo con rinforzo dei nucleoli),
- anti-centromero o ACA,
- nucleolare omogeneo,
- nucleolare speckled,
- nucleolare clumpy,
- nucleolare Multiple Dots,
- anti-centrioli e centrosoma,
- citoplasmatico tipo anti-mitocondri
- citoplasmatico anti-vimentina.

Grazie alle applicazioni pratiche delle biotecnologie, ad ognuna di queste positività IFA è stato possibile attribuire una specificità anticorpale verso singoli antigeni, che ha consentito un notevole miglioramento delle caratteristiche analitiche dei tests in uso.

Il rilievo quantitativo di tali positività, espresso in titolo di diluizione o unità enzimatiche, non sembra mostrare correlazione significativa con l'attività della malattia: l'utilizzo di tali determinazioni resta quindi limitato ad una definizione diagnostica e clinica della malattia e non ad una valutazione prognostica o di monitoraggio della malattia stessa<sup>4,5</sup>.

Viceversa, indagini cliniche e di laboratorio, condotte al fine di identificare correlazioni fra singole positività autoanticorpali e varianti cliniche della SSc, hanno evidenziato possibilità applicative della loro predittività specifica per una più precisa definizione dei singoli casi di malattia<sup>3,6,7</sup>.

### Autoanticorpi nucleari

Il pattern "granulia diffusa" è determinato da positività verso l'autoantigene topoisomerasi I, noto anche come Scl 70: esso è una proteina di p.m. 100 kD, identificata da Douvas nel 1979 come Scl 70 e successivamente da Schero nel 1986 come topoisomerasi I. Trattasi dell'enzima che compie la sua azione biologica nello svolgimento della super elica del DNA mediante tagli transienti. Non è stato ben definito un suo ruolo patogenetico nella SSc, anche se è dimostrato un suo coinvolgimento nella sclerodermia animale silicio-indotta. Dal punto di vista genetico è stata verificata un'associazione con l'aplotipo DR W11. I metodi di identificazione in laboratorio si basano sulle tecniche IFA, dove i nuclei delle cellule HEp-2 presentano fluorescenza a "granulia diffusa" o a "vetro smerigliato", immunodiffusione doppia (IDD) con timo di vitello, ELISA ed immunoblotting con antigene ottenuto mediante ricombinazione genica.

Le applicazioni cliniche dell'anticorpo anti-topoisomerasi I si esplicano nella conferma sierologica della diagnosi di SSc, dove è presente nel 20-59 % dei casi. Esso consente inoltre la differenziazione della forma ad interessamento cutaneo diffuso (dcSSc), dove è presente nel 70 %, dalla forma cutanea limitata dove è riscontrabile nel 13 %. L'autoanticorpo è associato anche alle forme cliniche con interessamento fibrotico dei polmoni e sembrerebbe costituire anche un fattore predittivo di rischio di neoplasia maligna<sup>2,8,9</sup>.

Un'altra positività IFA caratteristica della SSc è il pattern

anti-centromero, descritto per la prima volta da Moroi e Tan nel 1980 ed identificato come reazione verso l'autoantigene CENP A, B, C da Earnshaw nel 1986. Si tratta di un complesso proteico di 17-80-140 kD, svolgente un'azione di stabilizzazione del cinetocore e di organizzazione dei cromosomi e microtubuli delle cellule in mitosi. Un possibile ruolo patogenetico è da attribuirsi all'induzione di alterazioni mitotiche, mentre geneticamente è stata evidenziata l'associazione con gli aplotipi DR 1,4 e DR W8.

I metodi identificativi si basano sull'IFA, dove determinano il caratteristico aspetto anti-centromero (ACA), spesso ad elevato titolo e su tecniche ELISA ed immunoblotting con utilizzo dell'antigene ricombinante CENP B.

La positività anti-centromerica trova utilizzo clinico nella individuazione del subset ad interessamento cutaneo limitato (lcSSc), dove è ritrovata nel 57-80% dei casi: essa è associata alla sindrome in passato definita CREST et al. 25 % dei fenomeni di Raynaud SSc-associati<sup>2,3</sup>.

Possibile, anche se rara, è la sua associazione con l'autoanticorpo verso topoisomerasi I. Rispetto a quest'ultimo, l'anti-CENP B sembra connotare una forma meno severa di SSc<sup>5</sup>.

### Autoanticorpi nucleolari

Le positività anti-nucleolo (ANoA) sono riscontrate nell'8-43 % delle SSc: la positività nucleolare di tipo omogeneo è rivolta verso l'autoantigene PM-Scl, complesso proteico costituito da 11 proteine di 20-110 kD, identificato da Wolfe nel 1977 come PM-1 e successivamente da Reichlin come PM-Scl. La sua azione biologica si esplica a livello della maturazione e trasporto dei ribosomi, tanto che è bloccato da actinomomicina D. Il ruolo patogenetico non è chiaro; è associato ad aplotipi DR 3, DQ W2 ed è identificabile con IFA in una positività nucleolare omogenea, con nucleoplasma debolmente positivo e metafasi negative; recentemente sono state introdotti metodi di caratterizzazione in ELISA e immunoblotting. Questo anticorpo, riscontrabile nel 2-5 % delle SSc, definisce un subset di scleromiosite; clinicamente è associato a forme limitate di sclerodermia ed è evidenziabile in forme pediatriche.

La positività nucleolare speckled è attribuita all'autoanticorpo verso RNA polimerasi I presente nel nucleolo e RNA polimerasi II-III del nucleoplasma. Nel 1982 Stetler identificò l'antigene, nel 1987 Reiner ne trovò l'associazione con SSc. E' costituito da un gruppo di 8-14 proteine di p.m.10-220 kD, catalizzanti la trascrizione del DNA in mRNA. Detti autoanticorpi sono identificabili in IFA come positività speckled del nucleolo e del nucleoplasma con metafasi positive.

La loro prevalenza nella SSc è del 4 % genericamente, del 13 % nelle forme cutanee diffuse e in quelle con interessamento viscerale. La positività nucleolare clumpy è determinata dall'autoanticorpo verso l'antigene U3snoRNP, identificato da Ochs nel 1985 come fibrillarina e successivamente da Reimer come la citata proteina metilata di p.m. 34 kD, responsabile della processazione iniziale del pre-rRNA e del suo seguente trasporto. E' identificata in IFA con fluorescenza clumpy del nucleolo e debole positività del nucleoplasma, anche in metafase. Presente nel 3-6 % delle SSc è prevalente nel sesso maschile, ove caratterizza

sindromi con minor interessamento articolare e maggior componente teleangectasica. La positività verso l'antigene Ku, identificato da Mimori nel 1981 nelle sindromi overlap PM/SSc come proteina dimerica di 70/80 kD coinvolta nella riparazione del DNA, determina una fluorescenza omogenea dei nucleoli e del nucleoplasma e può essere confermata con metodiche IB ed ELISA. La si ritrova nell'1-14% delle SSc, nel 26-55 % delle sindromi overlap PM/SSc.

La positività verso la proteina di 40 kD, identificata da Tan nel 1983 come To/Th ribonucleasi 7-2,8-2RNP, coinvolta nell'assemblaggio dei pre-ribosomi, è identificabile come fluorescenza omogenea del nucleolo con metafasi negative. Caratterizza il 4 % delle SSc, soprattutto quelle con interessamento polmonare ed intestinale, associate ad ipotiroidismo e "dita a salsicciotto".

### Autoanticorpi minori

La positività anti-centrioli e centrosoma, attribuibile probabilmente a reattività verso l'enzima enolasi di 48 kD, è riscontrabile in forme prodromiche di SSc accompagnate da fenomeno di Raynaud: si manifesta con positività di 1 centriolo in fase G1, di 2 centrioli in fase G2 e S ai poli del fuso in metafase.

Altra positività di raro riscontro è quella verso l'autoantigene RNA polimerasi I del fattore umano di trascrizione nucleolare (hUBF), nota anche come NOR-90 (Nucleolar Organizer Region) con p.m. 90kD, come dimostrato da Fritzler nel 1994. Detta proteina, attiva nella ricostituzione nucleolare, è evidenziata con positività nucleolare tipo Multiple Dots nelle cellule in metafase.

Le positività di tipo citoplasmatico riscontrate nella SSc, come anti-mitocondri, vimentina e midbody, sono di raro riscontro e solitamente accompagnano le altre positività nucleari: abbastanza frequente è l'associazione di anticorpi anti-mitocondri ed anti-centromero. Il loro significato clinico è ancora oscuro e comunque non pare avere specificità per SSc. Il riscontro segnalato da autori diversi di presenza in pazienti con SSc di ANCA positività correlabile ad autoanticorpi verso proteinasi 3 e/o mieloperossidasi ha indotto ricerche volte a dimostrare un loro possibile ruolo patogenetico nel coinvolgimento renale della malattia: i risultati sono discordanti e tenderebbero ad indicare solo una sovrapposizione di vasculite necrotizzante alla patologia di base. Anche per gli anticorpi anti-catepsina G caratterizzanti alcune positività ANCA atipiche, pur significativamente presenti nella SSc, rimane da chiarire il significato della loro presenza.

Gli anticorpi anti-annexina V, evidenziati in patologie con APTT allungato, sono stati associati alla patologia ischemica digitale della SSc. Nell'ambito del riscontro in pazienti con SSc di positività correlate all'artrite reumatoide, si è evidenziato che, mentre la positività per RF è utilizzabile genericamente come indice prognostico sfavorevole, il rilievo di anticorpi più specifici, come gli anti-CCP, è in grado di identificare negli stessi pazienti forme di AR associate.

Il meccanismo iniziale responsabile del danno vascolare è stato oggetto di studi, che hanno evidenziato in corso di SSc sia la presenza di cellule endoteliali circolanti che di anticorpi specifici, correlanti in modo significativo con

l'ipertensione polmonare, tanto da poter essere ipotizzabile in futuro un loro utilizzo come marcatori di attività della malattia e nel monitoraggio della sua progressione<sup>10</sup>.

### Conclusioni

La Medicina di Laboratorio, oltre ad offrire parametri di ordine generale relativi ad uno stato di flogosi, di attivazione immunitaria e di coinvolgimento d'organi, mette a disposizione del Clinico la possibilità di evidenziare, con metodi analitici di elevata sensibilità e specificità, un ampio pannello di autoanticorpi correlati alla SSc: essi possono orientare e/o confermare la diagnosi di malattia, avendo spesso significato di markers (anti-topoisomerasi I, anti-centromero, anti-fibrillarina, anti-RNA polimerasi), possono contribuire alla definizione più dettagliata di subsets clinici (forme ad interessamento diffuso o limitato) fornendo anche qualche nota prognostica, possono infine essere validamente utilizzati nel monitoraggio della malattia stessa.

ANTIGENE	FREQUENZA
• Topoisomerasi I*	· 70% in dcSSc
• Centromero*	· 70-80% in lcSSc
• RNA pol I*	· 4%
• Fibrillarina*	· 8%
• PM-Scl	· 3%
• To/Th	· rara
• Ku	· rara
• NOR-90	· rara
*marker diagnostico	

#### Autoanticorpi nella SSc e relative frequenze

### Bibliografia

1. LeRoy E, Black C, Fleischmajer R. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 12:202-5.
2. Reveille J, Solomon D. Evidence-based guidelines for the use of immunologic test: antientromere, Scl-70 and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 49:399-412.
3. Steen V. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arth Rheum* 2005; 35:35-42.
4. Mierau R, Genth E. Sklerodermie-assoziierte autoantikörper: klinische und diagnostische relevanz. *Z Rheumatol* 2006; 65:279-84.
5. Harris M, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:778-804.
6. Hu P, Fertig N, Medsger T, Wright T. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1363-73.
7. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:80-93.
8. Cepeda EJ, Reveille JD. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:723-32.
9. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2003; 42:534-40.
10. Tamby MC, Chanseaud Y, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P, Brunet S, et al. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2005; 60:765-72.