



# ANA Screening: l'uso combinato di metodologie tradizionali e innovative è di ausilio nella diagnosi delle connettiviti

Marco Varelli\*, Stefania Fasano\*, Rosa De Falco\*, Antonio Monti\*  
\*Istituto Diagnostico Varelli, Via Cornelia dei Gracchi, Napoli

## Introduzione

Il metodo di riferimento per la ricerca degli anticorpi anti nucleo è l'ANA Screening eseguito con metodica in immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2. Tuttavia sono ben note le limitazioni di questa procedura in termini di standardizzazione, sia per quanto concerne la variabilità analitica, che soprattutto, per la sua interpretazione soggettiva. Inoltre, pur essendo questa metodica dotata di elevata sensibilità per alcuni tipi di patologie autoimmuni, è possibile riscontrare risultati falsamente negativi in presenza autoanticorpi rivolti verso specifici antigeni intracellulari, come SSA/Ro, Jo1, proteina P ribosomiale e PCNA.

Sul fronte specificità, è noto come gli ANA siano presenti anche in pazienti affetti da altre patologie o in individui sani: a tal proposito, esistono recenti evidenze scientifiche che segnalano, in una percentuale variabile di casi, la positività di specifici autoanticorpi diretti verso l'antigene DFS70, per lo più non correlata alla presenza di una malattia autoimmune.

## Scopo dello studio

Scopo del presente lavoro è valutare un possibile miglioramento delle performance dell'ANA Screening su cellule HEp-2, in termini di accuratezza diagnostica e robustezza del dato analitico, correlandone i risultati con altri test di laboratorio, caratterizzati da elevata standardizzazione, riproducibilità e bassa soggettività, come le metodiche in chemiluminescenza (CLIA). In particolare sono state valutate le performance analitiche di un test di screening antigene specifico, dotato di elevata specificità per le connettiviti, e di un test per evidenziare risultati positivi legati alla presenza di autoanticorpi anti-DFS70 non correlati alla presenza di una malattia autoimmune.

## Metodi

Sono stati arruolati 121 campioni consecutivi afferiti al laboratorio dell'Istituto Diagnostico Varelli, che richiedevano il dosaggio degli anticorpi anti nucleo. L'ANA screening è stato eseguito con la metodica convenzionale in IFI su cellule HEp-2 (Aesku su Sistema HELIOS), tutti i sieri sono stati valutati in parallelo con due test in chemiluminescenza sull'analizzatore BIO-FLASH® (INOVA Diagnostics, inc) (Fig.1):

- QUANTA Flash® CTD Screen Plus (dsDNA, Sm/RNP, Ro52, Ro60, SS-B, Scl-70, Centromero, Mi-2, Ku, Th/To, RNA Pol III, Pm/Scl, PCNA, Jo-1 e proteina P ribosomiale) per la ricerca di autoanticorpi specifici per le connettiviti (Fig.1)
- QUANTA Flash® DFS70, per la ricerca di autoanticorpi anti DFS70.

## Risultati

Il 24,8% dei campioni (n=30) sono ANA positivi in IFI (Fig.2); tutti i campioni ANA positivi in IFI sono risultati positivi con almeno una delle metodiche CLIA, mentre il 7,4 % dei campioni (n=9) risulta essere ANA IFI negativo e positivo al test CLIA QUANTA Flash® CTD Screen Plus (Fig.3). Le positività alle metodiche in CLIA risultano così distribuite: il 76,7% dei campioni è positivo QUANTA Flash® CTD Screen Plus (n=32), il 20% dei campioni è positivo QUANTA Flash® DFS70 (N=6) mentre 1 solo campione (3,3%) risulta positivo sia al QUANTA Flash® CTD Screen Plus che al QUANTA Flash® DFS70 (Fig.4). Rispetto alla popolazione generale, il 26,4% (n=32) dei campioni è risultato positivo al QUANTA Flash® CTD Screen Plus, il 5% (n=6) al QUANTA Flash® DFS70 e solo un campione è risultato positivo sia al QUANTA Flash® CTD Screen Plus che al QUANTA Flash® DFS70 (0,8%) contro il 24,8% dei campioni (n=30) ANA IFI Positivo (Tab.1).

Per il 19,8% dei campioni (n=24) con la doppia positività ANA HEp-2 in IFI e QUANTA Flash® CTD Screen Plus in CLIA si rafforza il sospetto clinico di Connettivite; e vanno indirizzati in un percorso diagnostico volto a comprendere le specificità anticorpali che sostengono tale positività e vanno classificati come ANA IFI Veri Positivi. Il 7,4% dei campioni, risulta essere ANA IFI negativo e positivo al test CLIA QUANTA Flash® CTD Screen Plus, questi campioni mostrano reattività verso antigeni tipici delle connettiviti, molto probabilmente quegli antigeni per cui il test IFI presenta bassa sensibilità, andrebbero valutati meglio ed eventualmente classificati come ANA IFI Falsi Negativi. Il 5% dei campioni è positivo all'ANA in IFI, è negativo al test CLIA per le connettiviti (QUANTA Flash® CTD Screen Plus) ma positivo al dosaggio del DFS70 in CLIA (QUANTA Flash® DFS70), questi campioni presentano una positività per ANA non supportata da nessun autoanticorpo associato alle malattie del connettivo, per cui non dovrebbe essere previsto nessun percorso di approfondimento.

## Conclusioni

Nella popolazione esaminata, l'esecuzione delle metodiche in CLIA, QUANTA Flash® CTD Screen Plus e QUANTA Flash® DFS70, per lo screening degli anticorpi associati alle connettivopatie e per la determinazione gli anticorpi anti DFS70, in associazione all'ANA Screening in IFI su cellule HEp-2 mostra notevoli vantaggi: facilita la gestione del dato di laboratorio, migliora le performance analitiche dell'ANA screening in IFI andando a sopperirne le lacune in termini di specificità e sensibilità, è di ausilio al medico nella gestione clinica del paziente facilitandone il percorso diagnostico.



Antigeni	QUANTA Flash® CTD Screen Plus
dsDNA	X
RNP	X
Ro60	X
Ro52	X
SS-B	X
Scl-70	X
Jo-1	X
Sm	X
CENP-B	X
RNA Pol III	X
PM/Scl	X
Mi-2	X
PCNA	X
Th/To	X
Ku	X
Ribosoma P	X

Fig.1: Analizzatore BIO-FLASH® per i dosaggi in CLIA (sinistra) e composizione antigenica del QUANTA Flash® CTD Screen Plus (destra)

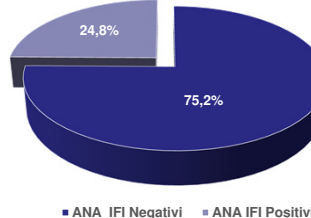


Fig.2: Test ANA su HEp-2 in IFI, 30 campioni (24,8%) risultano ANA IFI Positivi

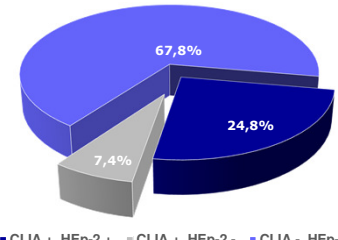


Fig.3: Sensibilità del QUANTA Flash® CTD Screen Plus in confronto con l'ANA in IFI, 9 campioni (7,4%) si presentano CTD Screen Plus positivi in CLIA e negativi in ANA IFI.

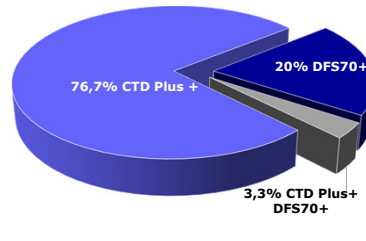


Fig.4: Dettaglio delle positività ANA IFI, tutte confermate con i metodi CLIA QUANTA Flash

Metodologia Analitica e Marcatori	N° Positivi	% Positivi
ANA IFI su HEp-2	30	24,8%
ANA IFI + CLIA QUANTA Flash CTD Screen	24	19,8%
ANA IFI + CLIA QUANTA Flash DFS70	6	5%
CLIA QUANTA Flash CTD Screen	32*	26,4%
CLIA QUANTA Flash DFS70	6	5%
CLIA QUANTA Flash CTD Screen + DFS70	1	0,8%
<b>CLIA QUANTA Flash</b>	<b>39*</b>	<b>32,2%</b>

\* 9 campioni ANA IFI Negativi e QUANTA Flash CTD Screen Positivi  
Tab.1: Percentuali di positività per differenti metodi e marcatori su 121 campioni esaminati