UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

Corso di laurea in Biologia

Indirizzo biomedico biomolecolare

Tesi di Laurea

MALATTIE AUTOIMMUNI – LUPUS CALCOLO DEL CUT-OFF PER MASSIMIZZARE LA SENSIBILITÀ E RIDURRE I COSTI

Relatrice: Prof.ssa Valeria Magnelli

Candidata: Arianna Gasparin

Correlatrice: Dott.ssa Stefania Plateroti

Anno accademico 2023-2024

INDICE

1. INTRODUZIONE 1
1.1 Patologie reumatologiche 1
1.2 Patologie reumatologiche autoimmuni 4
1.3 Connettiviti 10
1.4 Lupus eritematoso sistemico 15
1.5 Qualità della vita, impatto psicosociale e costi sociali del LES 22
1.6 Il contributo del laboratorio 26
1.7 Anticorpi anti-dsDNA 30
1.8 Immunofluorescenza e chemiluminescenza 34
1.9 Sensibilità, specificità e cut-off 38
2 SCOPO DEL LAVORO 41
3 MATERIALI E METODI 42
3.1 Strumentazione 42
3.2 Metanalisi comparativa tra le differenti metodiche 48
3.3 Statistica della metanalisi 52
3.4 Procedimento per l'analisi del dsDNA 53
3.5 Calcoli statistici 61
4 RISULTATI 64
4.1 Risultati della metanalisi 64
4.2 Risultati del calcolo del cut-off 69
5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI 70
6 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA 73
7 RINGRAZIAMENTI 80

1. INTRODUZIONE

1.1- Patologie reumatologiche

Le malattie reumatologiche sono un gruppo eterogeneo di patologie che colpiscono principalmente l'apparato muscolo-scheletrico, ma che possono interessare anche organi interni e tessuti connettivi. Si tratta di condizioni spesso croniche che hanno un impatto significativo sulla qualità della vita dei pazienti, limitandone la mobilità e causando dolore persistente. In alcuni casi, possono anche causare danni sistemici irreversibili (Smolen *et al.*, 2016).

Le malattie reumatologiche si dividono in due grandi categorie: le patologie autoimmuni e quelle non autoimmuni. Questa distinzione si basa sulla patogenesi, ovvero sul meccanismo attraverso cui la malattia si sviluppa.

Le patologie autoimmuni sono caratterizzate da un malfunzionamento del sistema immunitario, che attacca erroneamente i tessuti sani dell'organismo. In questi casi, il sistema immunitario perde la capacità di distinguere tra cellule proprie e cellule estranee, generando una risposta infiammatoria cronica (Weyand & Goronzy, 2006).

Le malattie reumatologiche autoimmuni più comuni includono:

- artrite reumatoide
- lupus eritematoso sistemico
- spondilite anchilosante
- artrite psoriasica
- sclerodermia
- sindrome di Sjögren
- vasculiti sistemiche.

Queste malattie coinvolgono spesso più organi e si caratterizzano per un andamento cronico-recidivante. La diagnosi è complessa e richiede una valutazione multidisciplinare, supportata da esami di laboratorio e strumentali. Il trattamento si basa su farmaci

immunosoppressori, corticosteroidi, farmaci antinfiammatori non steroidei e, negli ultimi anni, su terapie biologiche mirate (Singh *et al.*, 2016).

La prognosi è variabile, ma un intervento precoce e una gestione integrata possono rallentare l'evoluzione della malattia e migliorare la qualità della vita (Van der Heijde *et al.*, 2017).

Le patologie reumatologiche non autoimmuni, invece, non derivano da un'alterazione del sistema immunitario. Queste includono:

- l'osteoartrosi
- la gotta
- le borsiti
- le tendiniti
- la fibromialgia
- i reumatismi extra-articolari.

Queste condizioni sono spesso legate all'usura delle articolazioni, a microtraumi ripetuti, a fattori metabolici o a predisposizioni genetiche (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019).

La componente infiammatoria è meno marcata rispetto alle patologie autoimmuni. Tuttavia, possono causare dolore significativo e limitazione funzionale, specialmente nelle fasi avanzate. Alcune di queste malattie pongono sfide diagnostiche importanti, in quanto non mostrano alterazioni visibili agli esami di laboratorio (Wolfe *et al.*, 2010).

Il trattamento prevede l'uso di analgesici, fisioterapia, modifiche dello stile di vita e, in alcuni casi, interventi chirurgici. L'approccio multidisciplinare e la personalizzazione delle cure restano elementi centrali anche in queste forme, per garantire un adeguato controllo dei sintomi e il mantenimento della funzionalità.

Dal punto di vista epidemiologico, le malattie reumatologiche sono molto diffuse a livello globale e rappresentano una delle principali cause di disabilità nei paesi industrializzati (Vos *et al.*, 2020).

La loro incidenza e prevalenza variano a seconda del tipo di patologia, dell'età, del sesso e di altri fattori ambientali o genetici. Le donne risultano più colpite rispetto agli uomini, soprattutto nelle forme autoimmuni (Pincus *et al.*, 2003).

L'osteoartrosi, ad esempio, è la forma più comune ed è spesso associata all'invecchiamento. Al contrario, patologie come l'artrite reumatoide e il lupus eritematoso sistemico insorgono più frequentemente in età giovane-adulta. Lo stile di vita

sedentario, l'obesità e l'inquinamento ambientale sono considerati fattori di rischio aggiuntivi che contribuiscono all'aumento della prevalenza (Alamanos & Drosos, 2005).
Dal punto di vista clinico, le malattie reumatologiche si manifestano con sintomi variabili che possono includere dolore articolare, rigidità, gonfiore, limitazione funzionale, affaticamento, febbre e perdita di peso. La localizzazione e la durata dei sintomi, così come la presenza di segni sistemici, sono elementi fondamentali per orientare la diagnosi. Alcune patologie si manifestano in modo insidioso, altre con esordio acuto. Per definire un quadro completo, i segni clinici devono essere interpretati insieme agli esami diagnostici. La diagnosi precoce è fondamentale per prevenire danni irreversibili, specialmente nelle forme infiammatorie e autoimmuni (Dougados *et al.*, 2009).
Dal punto di vista terapeutico, il trattamento delle malattie reumatologiche è finalizzato al controllo del dolore, alla riduzione dell'infiammazione, al mantenimento della funzione articolare e alla prevenzione delle complicanze. La terapia farmacologica varia in base alla diagnosi specifica, ma spesso include antinfiammatori non steroidei, corticosteroidi, farmaci immunomodulanti e biologici (Smolen *et al.*, 2020).
Accanto alla terapia medica, rivestono un ruolo fondamentale la fisioterapia, l'attività fisica adattata e l'educazione del paziente. In alcuni casi, soprattutto nelle forme avanzate o resistenti, può essere necessario ricorrere a trattamenti chirurgici. L'evoluzione delle conoscenze e delle tecnologie ha permesso un miglioramento significativo nella gestione delle malattie reumatologiche, ma resta essenziale un follow-up continuo e una presa in carico globale del paziente (Bijlsma *et al.*, 2016).

1.2- Patologie reumatologiche autoimmuni

Le malattie reumatologiche autoimmuni sono condizioni patologiche caratterizzate da una varietà di significati clinici, epidemiologici e fisiopatologici. Tuttavia, tutte queste condizioni sono accomunate da un meccanismo patogenetico comune, che coinvolge reazioni immunologiche successive a fenomeni di auto-riconoscimento da parte del sistema immunitario.

L'avanzamento delle conoscenze nel campo del sistema immunitario, favorito da una concezione moderna del suo funzionamento, ha permesso una comprensione approfondita del ruolo fisiologico dei meccanismi di auto-riconoscimento nella formazione del repertorio immunologico durante l'ontogenesi e nello sviluppo e nella regolazione della risposta immune.

Una volta stabilita tale autoreattività fisiologica, è noto da anni che il sistema dispone di numerosi livelli di regolazione per impedire l'insorgenza di autoreazioni immunopatologiche dannose e mantenere quella che viene definita tolleranza immunologica (tolleranza del self). La tolleranza immunologica è il risultato di complessi meccanismi che includono:

1) il controllo della selezione clonale durante lo sviluppo dei linfociti, che elimina la maggior parte delle forme autoreattive (tolleranza centrale);
2) meccanismi che limitano la capacità dei cloni autoreattivi di montare risposte in periferia (tolleranza periferica).

Contrariamente a quanto si riteneva in precedenza, la tolleranza immunologica non si basa sull'inaccessibilità al contatto col sistema immunitario degli autoantigeni; tale situazione, però, può verificarsi, sebbene limitatamente. Comunque, lo sviluppo di una patologia autoimmune può essere condizionato dalle concentrazioni di autoantigene presenti in circolo, quindi da alterazioni della sua clearance, dalle modalità della processazione e presentazione antigenica.

Inoltre, è fondamentale notare che gli autoanticorpi possono essere presenti in assenza di malattia, transitoriamente o anche a lungo. In taluni casi, può essere in gioco un aumento della presenza in circolo dell'autoantigene. Un caso particolare è costituito dai cosiddetti anticorpi naturali, generalmente a bassa affinità e di isotipo IgM, spesso riconoscono epitopi cross-reagenti tra autoantigeni e antigeni

esogeni. Non sono chiaramente correlati alle malattie autoimmuni e ne è stata proposta una funzione fisiologica.

La tassonomia delle malattie autoimmuni si fonda su una classificazione consolidata che distingue tra malattie organo-specifiche e non-organo specifiche o sistemiche. Tale distinzione, oltre a riflettere la localizzazione della malattia, implica differenze fisiopatologiche significative.

Le malattie reumatiche autoimmuni (MRA) sono caratterizzate dall'evidenza di una risposta immune self nei confronti di antigeni ubiquitari (ad es. immunoglobuline). Tali malattie si manifestano con la presenza di lesioni infiammatorie che coinvolgono vari organi e apparati, in parte mediate da anticorpi (come la deposizione di immunocomplessi) ed il quadro clinico risulta complesso e variegato, con manifestazioni che possono variare notevolmente. MRA tra loro differenti possono essere associate, come nel caso della sindrome di Sjögren (SjS) secondaria, e si osservano forme "di passaggio", "di sovrapposizione", o difficilmente classificabili, come nel caso della connettivite mista o delle overlap syndrome.

L'analisi dei dati sperimentali ed epidemiologici, derivanti dall'osservazione delle malattie umane e dei modelli di malattia negli animali da esperimento, suggerisce una eziopatogenesi multifattoriale delle MRA, con un ruolo significativo di fattori genetici/endogeni predisponenti e fattori esogeni (ambientali). Inoltre, in tutte le MRA i modelli patogenetici proposti implicano una combinazione di suscettibilità genetica seguita da esposizione a fattori ambientali quali infezioni, agenti chimici o fisici.

In ambito infettivo, si formula l'ipotesi che determinati fattori possano influenzare l'espressione clinica o l'esacerbazione di malattie autoimmuni in soggetti geneticamente predisposti, attraverso vari meccanismi, tra cui l'attivazione policlonale. Il mimetismo antigenico, l'aumentato rilascio e/o l'aumentata immunogenicità dell'autoantigene, le alterazioni funzionali delle cellule immunologiche regolatorie e i fenomeni di apoptosi sono altri meccanismi che possono contribuire a tale espressione.

Numerosi studi riportano associazioni significative tra il LES e infezioni da virus (ad es. retrovirus), tuttavia, non è stato possibile identificare un agente infettivo

con un chiaro nesso eziologico con la malattia. Inoltre, l'effetto dei microorganismi sull'insorgenza delle malattie autoimmuni è notevolmente complesso e non si limita al ruolo di possibili fattori scatenanti/aggravanti di alcuni specifici patogeni. Contrariamente, il contatto con i microorganismi può fungere da meccanismo protettivo per l'insorgenza di malattie autoimmuni. Secondo la cosiddetta "ipotesi igienica", l'aumento significativo di malattie autoimmuni e di malattie allergiche nei paesi occidentali registrato nelle ultime decadi potrebbe essere attribuibile alla riduzione dell'esposizione a microorganismi conseguente a condizioni igieniche più avanzate, alla maggiore disponibilità di servizi sanitari e all'uso più esteso di antibiotici. Tale andamento epidemiologico è correlato a fattori ambientali e non genetici e tra i fattori in gioco sono stati identificati l'inquinamento ambientale, l'obesità, il deficit di vitamina D, il tabagismo e altri agenti fisici.

Numerose ricerche hanno contribuito a estendere tale ipotesi alle malattie autoimmuni, con un focus specifico sulle malattie autoimmuni sistemiche, quali il LES e l'artrite reumatoide (AR). L'ipotesi igienica si fonda sull'assunto che una riduzione dell'esposizione microbica dell'organismo conduca a una diminuzione della stimolazione dei meccanismi immunoregolatori fisiologici, con conseguente riduzione dell'efficienza dei meccanismi di controllo della risposta immune e di tolleranza periferica.

L'ipotesi igienica, intesa come il complesso di norme e pratiche volte al mantenimento di condizioni di vita ottimali per la salute pubblica, trova la sua applicazione nell'ambito dello stile di vita occidentale, che ha acquisito rilevanza solo nel corso degli ultimi decenni. Tale stile si caratterizza per:

- urbanizzazione;
- diminuzione del contatto con altre specie animali;
- implementazione di misure di sanità pubblica volte in particolare a un controllo efficace delle malattie infettive;
- estese misure di sanificazione e disinfezione;
- riduzione dell'esposizione a parassiti e microorganismi patogeni e anche non patogeni.

È fondamentale notare che, prima dell'adozione dello stile di vita occidentale, l'esposizione ai microorganismi, e verosimilmente a quella ai parassiti, è

presumibilmente rimasta relativamente costante per un periodo estremamente prolungato e che le recenti misure di sanificazione hanno avuto un impatto non solo sui patogeni in modo positivo, ma anche sui commensali. È stato dimostrato che il contatto con diverse specie di commensali, che si sono co-evolute con la nostra specie, esercita un effetto positivo sullo sviluppo dei meccanismi di controllo della risposta immune. Questo effetto è in contrasto con quello provocato dal contatto con microorganismi patogeni, la cui co-evoluzione con la specie umana ha avuto carattere conflittuale e aggressivo. In tale contesto, si evidenzia la presenza di agenti patogeni quali i parassiti che, sebbene siano in grado di causare effetti deleteri, sono altresì in grado di indurre efficacemente i meccanismi di regolazione del sistema immunitario.

Pertanto, lo stile di vita occidentale, indubbiamente vantaggioso in termini di riduzione delle infezioni pericolose per la sopravvivenza, può potenzialmente determinare come effetto collaterale alterazioni sfavorevoli nella composizione del microbioma, con conseguente riduzione della sua complessità e molteplicità, nonché eliminazione di commensali immunologicamente utili.

I meccanismi attraverso cui gli agenti infettivi possono contribuire allo sviluppo dell'autoimmunità potrebbero, almeno in parte, essere responsabili di un effetto proautoimmune delle vaccinazioni. Alcuni risultati ottenuti in modelli animali sembrano indicare una possibile sinergia tra vaccinazioni e altri fattori ambientali nell'indurre malattia in individui con forte predisposizione genetica. Inoltre, sono state riportate segnalazioni di insorgenza di malattie autoimmuni in sequenza temporale con le vaccinazioni, in particolare per la vaccinazione contro l'epatite B. Tuttavia, è importante sottolineare che la valutazione del rischio di induzione di malattie autoimmuni a seguito di singole pratiche vaccinali è estremamente complessa.

Altri fattori ambientali, quali il fumo di sigaretta e l'esposizione ai raggi ultravioletti (UVB), potrebbero contribuire alla patogenesi dell'autoimmunità sistemica. Numerosi studi hanno dimostrato che l'esposizione dei cheratinociti a dosi medie o alte di UVB determina, in maniera dose-dipendente, un processo di apoptosi con rilascio di citochine proinfiammatorie o necrosi, con successiva traslocazione, esposizione in membrana e rilascio di autoantigeni rilevanti. Il fumo

di sigaretta emerge come il principale fattore di rischio ambientale per l'artrite reumatoide (AR), con una lunga esposizione a questo agente, in un contesto genetico specifico, che sembra essere un fattore scatenante per lo sviluppo del fattore reumatoide (FR) e anche degli anticorpi anticitrullina. Diversi studi condotti in vari Paesi hanno fornito risultati contrastanti riguardo all'impatto del fumo sullo sviluppo del LES, probabilmente attribuibile alle diverse composizioni delle sigarette e dei loro additivi.

In ambito occupazionale, numerosi studi confermano un ruolo dell'esposizione alla silice come fattore di rischio per il LES (Lupus Eritematoso Sistematico), l'AR (Artrite Reumatoide) e la sclerosi sistemica (SSc). Le polveri di silice agiscono come potenti immunoadiuvanti non specifici, determinando un incremento dei processi apoptotici. L'esposizione a resine epossidiche è stata associata a forme circoscritte di sclerodermia (morfea).

Numerose evidenze scientifiche confermano l'associazione tra farmaci e autoimmunità sistemica. Più di 70 farmaci sono stati identificati come responsabili di manifestazioni cliniche simil-lupiche, comunemente note come LES indotto da farmaci.

Anche condizioni di stress psicologico significativo sono state associate allo sviluppo di patologie autoimmuni sistemiche. In particolare, è stata dimostrata una associazione significativa tra l'insorgenza di AR e l'esperienza di uno stress maggiore entro i 5 anni precedenti. Dai dati raccolti emerge l'ipotesi che lo stress possa concorrere allo scatenamento o all'aggravamento della malattia, in parte a causa di un deficit di risposta dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, con conseguente deficitaria inibizione. Inoltre, lo stress può contribuire all'aumento della secrezione di citochine proinfiammatorie attraverso l'azione delle catecolamine, che agiscono sui recettori E-adrenergici presenti sulle cellule immunocompetenti. (Tozzoli *et al.*, 2020; Ioannis *et al.*, 2007)

Un ruolo significativo degli steroidi sessuali (estrogeni, progesterone, androgeni) nell'autoimmunità è stato ipotizzato da tempo; di fatto, un'azione immunomodulatoria generale è da ritenersi accertata per gli ormoni sessuali: gli estrogeni esercitano un'azione immunomodulatoria di tipo generale, mentre gli androgeni agiscono in modo più specifico. Gli estrogeni esercitano un effetto

immunostimolante e proinfiammatorio, oltre a promuovere la proliferazione cellulare, mentre il progesterone e gli androgeni agiscono come immunosoppressori naturali, simili ai corticosteroidi, e come promotori dell'apoptosi. A livelli periovulatori e di gravidanza, l'E2 (17-β estradiol) ha principalmente effetti antinfiammatori, inibendo la produzione e la segnalazione di citochine pro-infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale (TNF), l'interleuchina (IL)-1β e l'IL-6. Inoltre, a concentrazioni più basse, l'E2 favorisce l'espressione di citochine antinfiammatorie e attiva le cellule T regolatorie (Treg). La prolattina aumenta la produzione di anticorpi, regola lo sviluppo delle cellule T CD4+ e innesca la produzione di citochine pro-infiammatorie. Il progesterone, invece, stimola il passaggio da una risposta immunitaria prevalentemente pro-infiammatoria a una antinfiammatoria, favorisce la differenziazione delle Treg ed esercita un effetto inibitorio sulle cellule NK. Diversi studi indicano che il testosterone ha effetti soppressivi sul sistema immunitario, inibendo la produzione di citochine pro-infiammatorie, la differenziazione Th1, la produzione di immunoglobuline e l'attività citotossica delle cellule NK, e potenziando l'espressione di citochine antinfiammatorie.

In ambito endocrino-andrologico, l'AR presenta una prevalenza significativamente maggiore nel sesso femminile rispetto a quello maschile fino all'età di 45 anni, con una successiva tendenza a uniformarsi. La maggior parte degli studi condotti finora ha evidenziato una riduzione degli androgeni circolanti nei soggetti maschili con AR rispetto ai controlli sani, nonché un'analoga riduzione nelle pazienti in età post-menopausale. Tuttavia, numerosi aspetti della malattia rimangono ancora da chiarire, e il ruolo del rapporto estrogeni/androgeni nel contesto di ogni malattia può variare in base agli altri aspetti fisiopatologici specifici. (Ortona *et al.*, 2016)

1.3– Connettiviti

Le connettiviti sistemiche rappresentano un gruppo di patologie reumatologiche autoimmuni croniche che colpiscono principalmente il tessuto connettivo, una componente ubiquitaria dell'organismo con funzioni strutturali e di supporto. Queste malattie sono caratterizzate da una risposta immunitaria anomala, in cui il sistema immunitario attacca cellule e strutture del proprio organismo, provocando infiammazione diffusa e danno d'organo (Firestein *et al.*, 2017).

In medicina, il termine "connettivite" è utilizzato per indicare proprio questa tipologia di disturbo, che, pur nella sua eterogeneità, condivide caratteristiche patogenetiche, sierologiche e cliniche. Le connettiviti si distinguono da altre malattie autoimmuni per il loro coinvolgimento sistemico e per la loro frequente associazione con manifestazioni cliniche sovrapponibili a quelle di diverse entità patologiche (Isenberg *et al.*, 2005).

Dal punto di vista clinico, le connettiviti sistemiche si manifestano con un ampio spettro di sintomi e segni che possono variare notevolmente da un paziente all'altro. Tra i più comuni vi sono affaticamento cronico, febbricola, rash cutanei, artralgie, mialgie, fenomeno di Raynaud, secchezza oculare e orale (in caso di sindrome di Sjögren), oltre a manifestazioni sistemiche che coinvolgono cuore, polmoni, reni e sistema nervoso (Tsokos, 2011).

Spesso, i pazienti presentano anche disturbi gastrointestinali, alterazioni ematologiche (come anemia o leucopenia), neuropatie periferiche e disfunzioni cognitive. La variabilità clinica e la possibile sovrapposizione tra diverse sindromi rendono spesso difficile la diagnosi, che si basa su una combinazione di criteri clinici, esami ematochimici, sierologici e indagini strumentali (Smolen *et al.*, 2016).

Le principali connettiviti sistemiche includono:

- Il lupus eritematoso sistemico, caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi antinucleo (ANA), anti-DNA a doppia elica e anti-Sm, e da un coinvolgimento multiorgano che può includere cute, articolazioni, rene, sistema nervoso centrale e cuore (Rahman & Isenberg, 2008).
- La sclerosi sistemica (o sclerodermia), distinta in forme limitate e diffuse, con ispessimento della cute, fenomeno di Raynaud marcato e fibrosi di vari organi interni come polmoni e tratto gastrointestinale (Firestein *et al.*, 2017).

- La sindrome di Sjögren, che comporta un'infiammazione cronica delle ghiandole esocrine, con conseguente secchezza di bocca e occhi, ma che può presentare anche complicanze sistemiche come vasculiti, neuropatie e linfomi (Isenberg *et al.*, 2005).
- Le miositi infiammatorie idiopatiche, polimiosite e dermatomiosite, che colpiscono principalmente i muscoli scheletrici provocando debolezza simmetrica prossimale, elevati livelli di CPK e, nel caso della dermatomiosite, rash cutanei specifici (Cervera *et al.*, 2003).
- La connettivite mista, in cui si rilevano autoanticorpi anti-RNP e un quadro clinico con tratti sovrapposti di LES, sclerodermia e polimiosite, che ne rende complessa la gestione (Tsokos, 2011).

Un ulteriore gruppo di patologie autoimmuni sistemiche, che può presentarsi in forma isolata o associata alle connettiviti, è rappresentato dalle **vasculiti sistemiche**. Si tratta di malattie caratterizzate da un'infiammazione immunomediata dei vasi sanguigni, che può colpire arterie, vene e capillari, determinando danno d'organo per ischemia o emorragia (Jennette et al., 2013). Le vasculiti vengono classificate in base al calibro del vaso coinvolto in forme a grandi, medie e piccole dimensioni, ciascuna con caratteristiche cliniche, sierologiche e prognostiche specifiche.

Dal punto di vista clinico, le vasculiti possono esordire con sintomi aspecifici come febbre, malessere, perdita di peso e artralgie, ma spesso evolvono con manifestazioni d'organo che variano a seconda della sede vascolare coinvolta. Le forme a piccole arterie, come la granulomatosi con poliangioite (GPA) e la poliangioite microscopica (MPA), sono frequentemente associate alla presenza di autoanticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) e possono colpire rene, polmone, cute e sistema nervoso periferico (Falk & Jennette, 2010).

Le vasculiti possono anche rappresentare una complicanza di altre malattie autoimmuni sistemiche, come il LES e la sindrome di Sjögren, contribuendo ad aggravare il coinvolgimento d'organo. La diagnosi richiede un approccio integrato basato su criteri clinici, markers sierologici e, quando indicato, esame istologico tramite biopsia dei tessuti colpiti. Il trattamento si basa sull'uso di corticosteroidi e immunosoppressori come ciclofosfamide o rituximab, modulati in base alla gravità della malattia e agli organi interessati (Yates et al., 2016).

Una caratteristica distintiva delle connettiviti è la presenza di autoanticorpi specifici che, oltre a essere utili per la diagnosi, possono avere anche un valore prognostico. Gli ANA sono presenti in quasi tutte le connettiviti, ma altri autoanticorpi più specifici permettono di differenziare tra le varie forme (Firestein *et al.*, 2017).

Per esempio, gli anti-centromero sono tipici della forma limitata della sclerodermia, mentre gli anti-Scl70 (anti-topoisomerasi I) sono associati alla forma diffusa e a una prognosi più severa. Gli anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono frequentemente riscontrati nella sindrome di Sjögren, ma possono anche essere presenti nel LES e in altre connettiviti. Gli anti-Mi-2 sono caratteristici della dermatomiosite, mentre gli anti-Jo-1 indicano una sindrome da antisintetasi, spesso associata a miosite e coinvolgimento polmonare interstiziale.

Le connettiviti possono presentarsi in forma isolata oppure in associazione tra loro o con altre malattie autoimmuni, dando origine a quadri clinici complessi noti come sindromi overlap. Questo fenomeno rende ancora più sfumati i confini nosologici tra le singole connettiviti, sottolineando l'importanza di un approccio clinico integrato e multidisciplinare. Le sindromi overlap possono comportare un coinvolgimento più aggressivo e multisistemico, richiedendo un monitoraggio più stretto e terapie combinate (Rahman & Isenberg, 2008).

La diagnosi delle connettiviti sistemiche richiede una valutazione completa e integrata che tenga conto dell'anamnesi dettagliata, dell'esame obiettivo e di test sierologici e strumentali. La presenza di autoanticorpi è utile, ma non esclusiva: occorre infatti considerare il contesto clinico, la progressione temporale dei sintomi e la risposta ai trattamenti (Tsokos, 2011; Smolen *et al.*, 2016).

Alcuni strumenti, come gli indici di attività, ad esempio il SLEDAI per il lupus, aiutano a quantificare la severità della malattia e a guidare le scelte terapeutiche (Rahman & Isenberg, 2008).

Il SLEDAI è un punteggio che valuta l'attività della malattia basandosi su diversi parametri clinici e di laboratorio, come il coinvolgimento di organi, la presenza di anticorpi e la funzione immunitaria. Il punteggio totale aiuta i medici a determinare se la malattia è in fase attiva, in remissione o in peggioramento. Quando si afferma che un test ha una correlazione alta con SLEDAI, significa che i livelli degli anticorpi misurati da quel test sono ben associati all'attività della malattia:

- se il SLEDAI è alto (malattia attiva), i valori del test tendono a essere elevati
- se il SLEDAI è basso (malattia in remissione), i valori del test tendono a diminuire.

Al contrario, una correlazione bassa con SLEDAI indica che i risultati del test non seguono l'andamento dell'attività della malattia e quindi il test potrebbe non essere utile per monitorare la progressione della patologia nel tempo.

Dal punto di vista terapeutico, le connettiviti sistemiche richiedono trattamenti personalizzati, basati sull'attività della malattia, sui tessuti coinvolti e sulla risposta individuale alle terapie. I farmaci più comunemente impiegati comprendono i corticosteroidi, che rappresentano la terapia iniziale di molte forme attive, gli immunosoppressori, come azatioprina, metotrexato e micofenolato mofetile, e gli antimalarici, come l'idrossiclorochina. Nei casi più gravi o resistenti, vengono utilizzati farmaci biologici come il rituximab o il belimumab (Firestein *et al.*, 2017).

In presenza di complicanze gravi come la nefrite lupica, la fibrosi polmonare progressiva o la miocardite, possono essere necessari trattamenti immunosoppressivi intensivi o l'uso di agenti di ultima generazione (Van der Vlag & Berden, 2011).

Il follow-up regolare è fondamentale per monitorare l'efficacia della terapia, prevenire complicanze iatrogene e valutare eventuali riacutizzazioni. La gestione deve essere olistica e centrata sul paziente, includendo anche il supporto psicologico, la riabilitazione fisica e l'educazione terapeutica (Isenberg *et al.*, 2005).

Le complicanze delle connettiviti sono molteplici e possono compromettere in modo significativo la qualità della vita e l'aspettativa di vita. Ad esempio, nel LES, la nefrite lupica è una delle principali cause di morbilità; nella sclerodermia, le crisi renali e l'ipertensione polmonare sono tra le complicanze più gravi; nella dermatomiosite, la possibile associazione con neoplasie rende necessaria una sorveglianza oncologica accurata. Anche il rischio cardiovascolare è aumentato in molte connettiviti, richiedendo un attento controllo dei tradizionali fattori di rischio e di quelli specifici (Cervera *et al.*, 2003).

Le connettiviti rappresentano un modello ideale per studiare i meccanismi dell'autoimmunità sistemica e l'interazione tra predisposizione genetica, fattori ambientali e risposta immunitaria. In questo senso, costituiscono una sfida costante per la medicina moderna e un campo in continua evoluzione dal punto di vista diagnostico, terapeutico e della ricerca scientifica. L'uso di nuove tecnologie, come la genomica, la proteomica e

l'analisi del microbioma, sta aprendo la strada a una medicina di precisione che potrebbe, in futuro, consentire di personalizzare ulteriormente le cure e di intervenire in maniera precoce nei soggetti a rischio (Smolen *et al.*, 2016).

In sintesi, le connettiviti sistemiche sono patologie complesse e multifattoriali che richiedono un approccio multidisciplinare e personalizzato. La diagnosi precoce, il monitoraggio attento e l'impiego delle terapie più appropriate sono fondamentali per migliorare la prognosi e garantire una buona qualità di vita ai pazienti. L'approfondimento del LES, una delle più rappresentative connettiviti sistemiche, permetterà di comprendere meglio le sfide cliniche, immunologiche e terapeutiche associate a queste malattie.

Tra queste patologie, il LES occupa una posizione centrale, non solo per la sua incidenza relativamente più alta rispetto ad altre connettiviti rare, ma soprattutto per la varietà delle sue manifestazioni cliniche, la complessità della gestione e il ruolo paradigmatico che riveste nello studio delle malattie autoimmuni sistemiche (van der Vlag & Berden, 2011). Il LES, infatti, rappresenta un modello di riferimento per comprendere i meccanismi patogenetici comuni a molte connettiviti, tra cui la produzione di autoanticorpi, l'attivazione aberrante del complemento, il danno mediato da immunocomplessi e la natura fluttuante dell'attività di malattia.

1.4 – Lupus eritematoso sistemico

Il LES è una malattia infiammatoria cronica a patogenesi autoimmune, che si manifesta con un coinvolgimento multiorgano e un andamento imprevedibile. La denominazione di "lupus" risale agli scritti di medicina del periodo medievale, in cui alcuni autori indicavano con questo termine la capacità della malattia di "divorare le carni", facendo riferimento alla sua natura infiammatoria, simile al comportamento del lupo verso la sua preda. In seguito, il termine fu associato agli aggettivi "eritematoso", per descrivere l'aspetto rossastro delle manifestazioni cutanee, e "sistemico", per indicare l'interessamento dei numerosi organi colpiti dalla malattia. Il LES è classificato tra le malattie reumatiche, poiché i sintomi a carico dell'apparato muscolo-scheletrico sono le manifestazioni più comuni, sia all'esordio che nelle fasi di riacutizzazione della malattia. Il LES è una patologia che si manifesta in modo multifattoriale e variabile. Presenta una prevalenza significativa nel sesso femminile, con un'incidenza più elevata nella seconda e terza decade di vita. La malattia può coinvolgere diversi organi e sistemi, ma la prognosi attuale è notevolmente migliorata grazie a una diagnosi precoce e all'uso di protocolli terapeutici innovativi. La diagnosi di LES si basa su una combinazione di alterazioni sierologiche e cliniche.

I primi criteri classificativi furono elaborati da Cohen nel 1971, richiedendo la presenza di almeno 4 criteri su 14. Nel 1982, l'ACR revisionò tali criteri, includendo gli ANA e gli anti-dsDNA e sottolineò l'importanza della disregolazione del sistema immunitario nella patogenesi della malattia. Questi nuovi criteri, che risultarono più sensibili e specifici rispetto ai precedenti, furono validati e adottati. Successivamente, nel 1997, i criteri ACR furono sottoposti a una rielaborazione, ma non furono mai sottoposti a validazione. (Hchberg *et al.*, 1997) Questo perché alcuni autori hanno sollevato obiezioni riguardo l'inclusione di manifestazioni cutanee aspecifiche, come la fotosensibilità, e l'esclusione di specifiche patologie, tra cui il lupus cutaneo subacuto (SCLE), alcuni disordini neurologici e la biopsia renale, che ad oggi rappresenta il gold standard per la definizione della glomerulonefrite lupica. (Hahn *et al.*, 2012)

Nel 2012, il Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) Group ha apportato delle modifiche ai criteri classificativi per il LES (tabella 2.VI), sulla base delle osservazioni fatte ai criteri del 1997 nel corso degli anni e del ruolo sempre più importante della biopsia renale. Una delle principali innovazioni di tali criteri riguarda la possibilità di classificare un paziente come affetto da LES anche in presenza di una glomerulonefrite accertata da una biopsia renale in associazione alla sola positività degli ANA o anti-dsDNA. In alternativa, è richiesto il soddisfacimento di 4 su 17 criteri, inclusi almeno uno immunologico e uno clinico. Si osserva che questi criteri si sono dimostrati più sensibili (97% vs. 83%), ma meno specifici (84% vs. 96%) rispetto ai criteri precedentemente impiegati. (Petri *et al.*, 2012)

Criteri ACR (1997)	Criteri SLICC 2012
Criteri clinici	
Rash cutaneo	ACLE/SCLE
Rash discoide	CCLE
Fotosensibilità	-
-	Alopecia non cicatriziale
Ulcere orali	Ulcere nasali o orali
Artrite	Artrite in almeno 2 articolazioni
Pleurite/pericardite	Pleurite o pericardite
Proteinuria > 0,5 g/die Cilindri	UPCR/proteinuria 24h > 500 mg/die Cilindri di GR
Psicosi/epilessia	Epilessia Psicosi Mononeurite multipla Mielite Neuropatia dei nervi cranici o periferica Cerebrite (stato confusionale acuto)
Anemia emolitica Leucopenia (GB < 4000/mm³) Linfopenia (L < 1500/mm³) Piastrinopenia (PLT < 100,000/mm³)	Anemia emolitica Leucopenia (GB < 4000/mm³) Linfopenia (L < 1000/mm³) Piastrinopenia (PLT < 100,000/mm³)
Criteri immunologici	
ANA Anti-nDNA Anti-Sm IgG o IgM anti-cardiolipina, LAC, falsa positività per la sifilide	ANA Anti-dsDNA Anti-Sm Anticorpi anti fosfolipidi, LAC, falsa positività per la sifilide Anticorpi anti-cardiolipina o anti-β2GPI Riduzione del complemento (C3, C4, CH50) Test di Coombs diretto positivo in assenza di anemia emolitica
Sono necessari 4 criteri su 11	**Sono necessari 4 criteri (di cui almeno 1 immunologico e 1 clinico) oppure biopsia renale indicativa di LN con ANA/anti-dsDNA positivi**

LES: lupus eritematoso sistemico; ACLE: lupus cutaneo acuto; SCLE: lupus cutaneo subacuto; CCLE: lupus cutaneo cronico; UPCR: urine proteine creatinine ratio; GR: globuli rossi; GB: globuli bianchi; L: linfociti; PLT: piastrine; LAC: *Lupus Anticoagulant*; ANA: anticorpi anti nucleo; anti-dsDNA: anticorpi anti-DNA nativo; anti-Sm: anticorpi anti-Smith; LN: glomerulonefrite lupica.

Figura 1. Mostra il confronto tra criteri ACR (1997) e SLICC (2012) per il LES (Ines et al, 2015)

Il LES è una malattia infiammatoria che colpisce il tessuto connettivo diffuso in tutto l'organismo, per questo motivo è classificato tra le malattie infiammatorie dei connettivi. È considerato una malattia autoimmune con una componente predominante del sistema immune adattativo, in cui le cellule T e le cellule B sono i principali fattori patogenetici. Recentemente, l'attenzione della comunità scientifica si è rivolta anche all'immunità innata, con un focus particolare sulle cellule dendritiche e sui fagociti, che giocano un ruolo cruciale nell'interazione con vari autoantigeni durante le fasi iniziali del processo infiammatorio.

Recentemente, è stato condotto uno studio epidemiologico nell'Italia settentrionale che ha rilevato una prevalenza di LES pari a 42,3 casi per 100.000 abitanti nella popolazione adulta e 15,3 casi per 100.000 abitanti nella popolazione pediatrica. I fattori genetici e ambientali sembrano rivestire un ruolo cruciale in questo contesto, contribuendo presumibilmente non solo alle diversità geografiche, ma anche alla gravità e al decorso della malattia nei singoli pazienti. L'incidenza del LES è significativamente più elevata nelle popolazioni afroamericane, ispaniche e asiatiche rispetto a quelle caucasiche. Ad esempio, in Italia si osservano 2 casi ogni 50.000 abitanti, mentre nella popolazione afrocaraibica si registra un'incidenza di 4,6 casi per 100.000 abitanti. Il rapporto tra femmine e maschi è di 9:1, con un'età di insorgenza che varia dai 25 ai 40 anni. Tuttavia, non è raro che il LES si manifesti durante l'età giovanile o in quella più avanzata.

L'eziologia del LES rimane non chiara: è noto che il LES si manifesta quando individui geneticamente predisposti sono esposti a fattori ambientali che innescano la malattia. La predisposizione genetica è evidenziata dall'identificazione di almeno 38 loci di suscettibilità e da dati epidemiologici che mostrano una forte aggregazione familiare con casi di lupus nei genitori, con un rischio incrementato di oltre 14 volte.

La produzione di anticorpi, l'iperattività dei linfociti B e T e le alterazioni della risposta immunitaria sono eventi cruciali nella patogenesi del lupus. Contemporaneamente, si osserva un aumento dell'apoptosi delle cellule T con necrosi secondaria delle cellule apoptotiche non fagocitate e rilascio del materiale nucleare e citoplasmatico. Gli antigeni nucleari vengono presentati dalle cellule deputate alle cellule T, inducendo l'attivazione dei linfociti B autoreattivi con

produzione di autoanticorpi. È stato dimostrato che nelle cellule mononucleate provenienti dal sangue periferico di soggetti affetti da LES si verifica una up-regolazione della produzione di IFN-D, che è una citochina pro-infiammatoria.
Gli autoanticorpi di maggiore rilevanza riscontrati nel LES sono gli anticorpi anti-antigeni intracellulari (ANA - Anti Nuclear Antibodies). Questi anticorpi presentano diverse specificità, con localizzazione sia nucleare che citoplasmatica. Le più rilevanti includono: anti-dsDNA, anticorpi anti-antigeni nucleocitoplasmatici specifici (anti-ENA), in particolare anti-Sm, anti-istoni, antinucleosomi, anti-proteine ribosomiali. Gli autoanticorpi, definiti come "anticorpi diretti contro le proprie cellule", possono svolgere un ruolo eziopatogenetico attraverso due principali meccanismi: la formazione di immunocomplessi (IC), che si depositano nei tessuti attivando il sistema del complemento e l'azione citolitica diretta sulla superficie di globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Inoltre, gli anticorpi possono penetrare all'interno delle cellule, causando significativi danni funzionali.
Il quadro clinico presenta una notevole variabilità, comprendendo sintomi di natura sistemica e alterazioni che coinvolgono vari organi e apparati. Astenia e malessere generale sono presenti in quasi tutti i pazienti all'esordio e nelle fasi di attività della malattia. La febbre può manifestarsi con diverse intensità e manifestazioni, e in oltre la metà dei casi si osserva una riduzione ponderale più o meno significativa. Il coinvolgimento articolare, una caratteristica del lupus, si verifica in più del 90% dei casi e può rappresentare l'esordio della malattia o manifestarsi durante le fasi di riaccensione. Si manifesta con artralgie accompagnate o meno da artrite franca, che nei due terzi dei casi è di tipo simmetrico, colpisce preferenzialmente le piccole articolazioni della mano, il polso, il gomito, l'articolazione scapolo-omerale, coxo-femorale e il ginocchio. Nel 10-15% dei casi si osserva la sindrome di Jaccoud, caratterizzata da deformità delle dita delle mani.
Le manifestazioni cutanee, dopo quelle articolari, rappresentano le più frequenti in corso di LES. Spesso costituiscono il quadro clinico d'esordio della malattia e ricompaiono come segno di riacutizzazione. Queste manifestazioni cutanee presentano una notevole variabilità e possono essere suddivise in due principali categorie: manifestazioni specifiche, che includono lesioni tipiche del LES e

consentono la diagnosi differenziale, e manifestazioni aspecifiche, che possono essere presenti anche in altre condizioni morbose. L'esame istologico delle manifestazioni specifiche mostra ipercheratosi, edema dell'epidermide e del derma, infiltrazione di cellule mononucleate del derma, degenerazione delle lamine epidermiche profonde, ispessimento delle membrane basali vascolari, picnosi e carioressi, necrosi fibrinoide delle pareti vascolari. Le manifestazioni cutanee aspecifiche includono l'orticaria, la vasculite, la porpora e il livedo reticularis, spesso associati alla sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi.

La compromissione renale rappresenta un rilevante coinvolgimento d'organo che interessa approssimativamente la metà dei soggetti affetti da LES. Le manifestazioni renali si manifestano prevalentemente durante i primi cinque anni di malattia e spesso determinano un aggravamento della prognosi. Il processo patologico può interessare tutte le strutture renali, ma la manifestazione più frequente e significativa è la glomerulonefrite. I quadri di presentazione della glomerulonefrite lupica sono vari e includono la proteinuria asintomatica, l'ematuria asintomatica, la sindrome nefritica, la sindrome nefrosica, l'insufficienza renale cronica e la glomerulonefrite a rapida evoluzione. La sindrome nefrosica nel LES spesso presenta caratteristiche diverse dalla forma idiopatica, manifestandosi ad esempio con ematuria e riduzione del filtrato glomerulare con iperazotemia.

Gli esami di maggiore rilevanza, sia per fini diagnostici che di monitoraggio, includono la creatininemia, la clearance della creatinina e, in particolare, l'esame delle urine, che deve essere eseguito con la massima accuratezza per evidenziare non solo l'ematuria, ma anche i vari tipi di cilindri (ialini, granulari, cellulari, leucocitari e/o eritrocitari). Le manifestazioni ematologiche sono inoltre frequenti nei pazienti affetti da LES. La leucopenia si osserva nel 50% dei casi, generalmente causata da anticorpi anti-leucociti, e si manifesta spesso con linfopenia, che può essere indicativa dell'esordio della malattia, insieme ad altri sintomi sistemici o d'organo. È possibile riscontrare anche leucocitosi, che può essere associata a eventi infettivi o a una risposta alla terapia con corticosteroidi. L'anemia colpisce oltre la metà dei pazienti e tipicamente si manifesta con astenia e affaticabilità. Una quota di pazienti pari al 10-15% dei casi presenta invece un'anemia di natura immunologica, causata cioè dalla presenza di anticorpi anti-emazie con consumo

di aptoglobina e aumento dei reticolociti circolanti.
La piastrinopenia è un evento frequente che si manifesta con un'incidenza del 10-15% della popolazione generale. È attribuibile ad anticorpi anti-piastrine, ma può anche essere considerata un elemento caratteristico della sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi, che a sua volta rientra nello spettro delle manifestazioni lupiche. In genere, non si osserva un rischio elevato di sanguinamento, sebbene possano verificarsi sia porpora cutanea che, in casi rari, fenomeni emorragici gravi.
Le manifestazioni cardiache includono condizioni quali pericardite, miocardite, endocardite, disfunzione valvolare e infarto del miocardio e sono piuttosto frequenti. La pericardite sintomatica rappresenta l'evento più comune, con una prevalenza che varia tra il 10 e il 20% dei casi. Nel 10-15% dei pazienti affetti da LES si osserva la miocardite, mentre la cardiopatiaischemica, caratterizzata sul piano clinico da angina pectoris o da infarto del miocardio, è una manifestazione tipica. Le lesioni coronariche che sottendono tali eventi sono, nella maggior parte dei casi, di natura aterosclerotica, favorita e accelerata dalla flogosi cronica, dalla terapia steroidea, dall'ipertensione e dalla sindrome nefrosica. Infine, l'endocardio può essere interessato dall'endocardite verrucosa atipica.
In ambito vascolare, si osserva il fenomeno di Raynaud nel 20% dei pazienti affetti da LES, con possibilità di insorgenza anche anni prima dell'esordio della malattia. Circa il 50% dei pazienti con LES manifesta la pleurite, che occasionalmente rappresenta l'esordio della patologia. Il parenchima polmonare può essere interessato dalla polmonite interstiziale acuta, una condizione rara (1-10%), caratterizzata da infiltrati diffusi alle basi polmonari. La polmonite di natura infettiva, batterica, virale o talora fungina è certamente più frequente, in quanto facilitata dalle condizioni generali o locali e dalla terapia immunosoppressiva assunta dai pazienti. La polmonite interstiziale cronica è più comune rispetto alla forma acuta.
Le manifestazioni a carico del tubo digerente e del pancreas non sono eccessivamente diffuse nel LES, contrariamente a quelle neurologiche che, se adeguatamente indagate, possono manifestarsi anche nelle loro forme meno gravi nel 50% dei casi. La loro comparsa, oltre a esacerbare temporaneamente il decorso della malattia, rivela un prognostico poco favorevole, poiché occasionalmente

risulta causa diretta di decesso.

L'impegno del sistema nervoso può essere di natura primitiva, ovvero indotto direttamente dai fattori eziopatogenetici della malattia che esercitano la loro azione anche sul sistema nervoso, oppure secondario all'interessamento lupico di altri organi, apparati o sistemi, i quali, a loro volta, sono responsabili di sindromi sistemiche (come l'uremia e l'ipertensione). L'impegno del sistema nervoso può inoltre essere secondario a complicanze della malattia o della terapia, quali ad esempio le infezioni e l'aterosclerosi.

Nel 15% dei casi di pazienti affetti da LES si può manifestare un coinvolgimento oculare, che si presenta come congiuntivite o episclerite, e, in casi più rari, come occlusione dell'arteria centrale della retina, a causa di fenomeni di natura vasculitica o trombotica. (Tozzoli *et al.*,2020)

1.5- Qualità della vita, impatto psicosociale e costi sociali del LES

Il LES è una patologia autoimmune cronica, complessa e multisistemica, che si distingue non solo per la varietà delle sue manifestazioni cliniche, ma anche per l'impatto profondo e pervasivo sulla qualità della vita dei pazienti. La malattia colpisce in prevalenza giovani donne in età fertile, ma può insorgere a qualsiasi età, con implicazioni significative in termini di costi sanitari, sociali ed economici. A differenza di altre patologie croniche più visibili, il LES presenta un andamento spesso imprevedibile, caratterizzato da fasi di remissione e riacutizzazione, che rende la gestione quotidiana complessa e multidimensionale (Rahman & Isenberg, 2008).

Dal punto di vista della qualità della vita, il LES incide profondamente sul benessere fisico, psicologico e sociale dei pazienti. I sintomi più frequentemente riportati includono astenia cronica, dolore articolare e muscolare, rash cutanei, fotosensibilità, alterazioni cognitive e disturbi del sonno. Queste manifestazioni, spesso soggettive e non visibili all'esterno, generano un vissuto di frustrazione, senso di incomprensione e isolamento sociale. In particolare, la cosiddetta "fatica da lupus" è riportata come uno dei sintomi più invalidanti, con un impatto maggiore sulla funzionalità quotidiana rispetto al dolore stesso (Tunnicliffe *et al.*, 2015).

Oltre agli aspetti clinici, l'impatto psicosociale è considerevole: i pazienti affetti da LES possono incontrare difficoltà nel mantenere relazioni interpersonali, nella carriera lavorativa e nella pianificazione della propria vita. La natura imprevedibile della malattia, le sue complicanze potenzialmente gravi e la necessità di monitoraggi clinici frequenti generano ansia, depressione e una costante sensazione di instabilità. Non è raro che il paziente sviluppi un vero e proprio distress psicologico, con necessità di supporto specialistico psicoterapeutico. In tal senso, il carico emotivo è amplificato dalla percezione di una malattia "invisibile", che spesso non trova riscontro nella comprensione dell'ambiente circostante (Tunnicliffe *et al.*, 2015).

Accanto a questi aspetti, i costi sociali ed economici del LES rappresentano una delle dimensioni più rilevanti ma ancora sottovalutate della malattia. Le spese sanitarie dirette comprendono costi legati a visite specialistiche, esami diagnostici di laboratorio e per immagini, ricoveri ospedalieri, farmaci immunosoppressori e biologici, terapie di supporto, controlli ambulatoriali regolari e trattamenti per le complicanze. A questi si

aggiungono i costi non sanitari diretti, come le spese di trasporto per raggiungere i centri di cura, gli adattamenti domestici, o l'acquisto di prodotti per la protezione solare nei pazienti fotosensibili (Moore *et al.*, 2013).

Tuttavia, la parte più consistente del carico economico del LES è rappresentata dai costi indiretti, che derivano dalla perdita di produttività lavorativa, dall'assenteismo, dal presenteismo (ridotta efficienza lavorativa durante le ore lavorative), dai pensionamenti anticipati e dalla necessità di assistenza informale da parte di familiari o caregiver. In molti casi, le persone affette da LES sono costrette a ridurre l'orario lavorativo o ad abbandonare l'attività professionale, con un impatto significativo sul reddito personale e familiare. Le complicazioni della malattia, come la nefrite lupica o il coinvolgimento del sistema nervoso centrale, possono rendere necessaria un'assistenza continuativa, con un aumento dei costi sociali e sanitari a lungo termine (Cervera *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2013).

Secondo stime internazionali, il costo annuo totale medio per paziente affetto da LES può variare da 5.000 a oltre 30.000 euro, a seconda della severità della malattia, della presenza di complicanze, della risposta alla terapia e del sistema sanitario di riferimento. In Italia, i dati disponibili mostrano una forte variabilità regionale, dovuta anche alla distribuzione non uniforme dei centri specialistici reumatologici e alla differente accessibilità ai trattamenti più innovativi (Rahman & Isenberg, 2008).

Secondo stime internazionali, il costo annuo totale medio per paziente affetto da LES può variare da 5.000 a oltre 30.000 euro, a seconda della severità della malattia, della presenza di complicanze, della risposta alla terapia e del sistema sanitario di riferimento (Moore *et al.*, 2013). In Italia, i dati disponibili mostrano una forte variabilità regionale, dovuta anche alla distribuzione non uniforme dei centri specialistici reumatologici e alla differente accessibilità ai trattamenti più innovativi (Rahman & Isenberg, 2008).

Un'ulteriore voce di spesa è rappresentata dal riconoscimento dell'invalidità civile, che, sebbene previsto per il LES in determinate condizioni cliniche, implica un iter burocratico spesso lungo e complesso. I pazienti possono accedere a benefici economici (pensione di invalidità, indennità di accompagnamento) e a tutele lavorative specifiche (collocamento mirato, esonero da turni notturni), ma l'accesso effettivo a tali diritti è spesso ostacolato da una scarsa conoscenza della malattia da parte delle commissioni mediche e da

valutazioni non sempre coerenti con la reale compromissione funzionale (Cervera *et al.*, 2003).

Oltre all'invalidità, esistono barriere all'accesso alle cure, tra cui lunghi tempi di attesa per le visite specialistiche, costi a carico del paziente per i farmaci non rimborsati, e difficoltà a raggiungere centri di riferimento soprattutto nelle aree rurali o meno servite. Questa disomogeneità organizzativa contribuisce ad aumentare le disuguaglianze di salute e aggrava il carico socioeconomico del LES (Moore *et al.*, 2013).

Anche le famiglie dei pazienti sostengono un peso importante. L'assistenza informale da parte dei familiari, che spesso si traduce in ore di lavoro non retribuite, riduzione dell'orario lavorativo o rinuncia all'attività lavorativa, rappresenta una forma di costo "nascosto" ma sostanziale. Questo fenomeno è noto come "caregiver burden" e può generare a sua volta stress, ansia e disagio psichico nei familiari, aumentando il costo sociale complessivo della malattia (Tunnicliffe *et al.*, 2015).

Dal punto di vista delle politiche sanitarie, appare urgente adottare strategie di gestione integrata del LES, che includano non solo un trattamento farmacologico efficace, ma anche programmi di supporto psicosociale, riabilitazione, reinserimento lavorativo e assistenza sociale. L'approccio multidisciplinare, che coinvolge reumatologi, nefrologi, dermatologi, psicologi, assistenti sociali e medici di medicina generale, è fondamentale per ridurre il carico globale della malattia (Rahman & Isenberg, 2008).

Un'altra dimensione fondamentale è quella della ricerca clinica, che rappresenta un investimento strategico per ridurre i costi a lungo termine. Lo sviluppo di nuove terapie biologiche, la personalizzazione del trattamento in base a biomarcatori predittivi e l'adozione della medicina di precisione permetteranno, in futuro, di migliorare l'efficacia delle cure, ridurre le complicanze e contenere i costi indiretti. Tuttavia, la sostenibilità economica delle terapie più innovative rappresenta una sfida per i sistemi sanitari, che devono bilanciare l'accesso ai farmaci con i vincoli di bilancio (Moore *et al.*, 2013).

La pandemia di COVID-19 ha ulteriormente evidenziato la vulnerabilità dei pazienti con LES, sia in termini di rischio clinico che di difficoltà nell'accesso alle cure. Le interruzioni delle visite specialistiche, la ridotta disponibilità di farmaci, come l'idrossiclorochina nei primi mesi della pandemia, e il peggioramento del benessere psicologico legato all'isolamento hanno aumentato il carico globale della malattia, rendendo ancora più

urgente una riforma dell'assistenza territoriale e della telemedicina (Tunnicliffe *et al.*, 2015).

Quindi, investire nella presa in carico globale del paziente con LES, nella formazione dei professionisti, nella ricerca e nell'informazione pubblica è essenziale per ridurre l'impatto socioeconomico della malattia e migliorare concretamente la qualità della vita di chi ne è affetto.

1.6 Il contributo del laboratorio

Il LES è una malattia autoimmune cronica, sistemica e complessa, caratterizzata da un'alterata risposta del sistema immunitario che porta alla produzione di autoanticorpi contro componenti intracellulari, in particolare nucleari (Isenberg e Rahman, 2006).

Il LES si manifesta con un'ampia variabilità clinica e coinvolge diversi organi e apparati, rendendo necessaria una diagnosi basata sulla combinazione di dati clinici, sierologici e laboratoristici.

Negli ultimi anni, il contributo del laboratorio alla gestione del LES si è ampliato in modo significativo. Esso non solo supporta la diagnosi iniziale, ma contribuisce anche all'identificazione di sottotipi clinici, al monitoraggio dell'attività di malattia e alla valutazione della risposta terapeutica (Tozzoli et al., 2020).

Le analisi di laboratorio possono essere suddivise in due categorie principali: esami bioumorali generali e test autoanticorpali. I primi rivestono un ruolo orientativo ma importante: alterazioni della cromatina ematica, aumento degli indici di flogosi (VES, PCR), leucopenia, anemia e consumo del complemento (C3, C4) devono sempre indurre sospetto clinico per LES.

Tuttavia, il contributo più significativo alla diagnosi proviene dalla rilevazione degli autoanticorpi. Come evidenziato da Sherer e colleghi (2004), i pazienti con LES possono presentare un numero estremamente elevato e variegato di autoanticorpi sierici. Alcuni di questi sono aspecifici, altri sono altamente specifici e associati a quadri clinici particolari.

Tra i primi autoanticorpi da ricercare nel sospetto di LES vi sono gli anticorpi antinucleo (ANA), considerati il test di screening più sensibile per questa malattia. Gli ANA sono presenti in oltre il 95% dei pazienti con LES, ma la loro specificità è limitata, poiché possono essere riscontrati anche in altre connettiviti, in malattie infettive, e persino in soggetti sani, soprattutto anziani (Wener, 2014; Tozzoli et al., 2020).

La presenza di ANA rappresenta comunque un criterio obbligatorio nei più recenti sistemi di classificazione: in assenza di ANA positivi, la diagnosi di LES è altamente improbabile. (Aringer et al., 2019)

Il test più comunemente utilizzato per la rilevazione degli ANA è l'immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2, che permette di rilevare non solo la presenza, ma anche il pattern fluorescente (nucleare, citoplasmatico, puntiforme, ecc.), spesso utile per

orientare verso forme specifiche di autoimmunità. Tuttavia, la sola positività degli ANA non è sufficiente: è necessaria una corretta interpretazione clinica, che tenga conto della sintomatologia, dei valori del complemento e della presenza di autoanticorpi più specifici, come gli anti-dsDNA o gli anti-Sm.

Solo in questo contesto, dunque, la positività degli ANA assume valore diagnostico. In alcuni casi, è possibile osservare positività ANA isolate in pazienti asintomatici o con sintomi lievi e non specifici; in questi casi, è importante evitare diagnosi improprie e proseguire con follow-up clinici regolari. Quando invece gli ANA si accompagnano a sintomi sistemici (es. artrite, fotosensibilità, rash, proteinuria), e ad autoanticorpi specifici, il sospetto diagnostico si rafforza in modo significativo.

Il titolo considerato significativo ai fini diagnostici è 1:160, sebbene il valore di 1:80 sia accettato come criterio di ingresso nelle classificazioni EULAR/ACR del LES (Aringer et al., 2019).

Fondamentale è anche la descrizione del pattem fluorescente osservato, secondo la nomenclatura standardizzata proposta dall'Intemational Consensus on ANA Pattems (ICAP), che distingue pattern nucleari, citoplasmatici e mitotici (Chan et al., 2016).

Alcuni pattern, come il centromerico o il nucleolare, sono fortemente associati a patologie specifiche come la sclerodermia, mentre altri, come il pattern Dense Fine Speckled (DFS70), sono frequentemente osservati in soggetti sani e hanno valore esclusivamente interpretativo (Mahler & Fritzler, 2010).

In caso di ANA positivi a titolo significativo, o anche a basso titolo in presenza di segni clinici suggestivi, è indicato procedere con la determinazione degli anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA). Questi autoanticorpi permettono una maggiore specificità diagnostica e comprendono, tra i più comuni, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Sm, anti-RNP, anti-Scl70 e anti-Jo1. Ogni specificità è correlata a precise entità cliniche: per esempio, gli anti SSA sono tipici della sindrome di Sjögren, mentre gli anti-Scl70 sono associati alla sclerosi sistemica diffusa (Wichainun et al., 2020).

L'analisi degli ENA può essere effettuata con diverse metodiche, tra cui ELISA, CLIA e immunoblot.

I criteri classificativi EULAR/ACR del 2019 (Aringer et al., 2019) riconoscono la positività degli anti-dsDNA come uno dei criteri immunologici fondamentali. Questi autoanticorpi, altamente specifici per il LES, sono spesso presenti fin dalle fasi iniziali

della malattia e si associano in modo diretto all'attività clinica, in particolare al rischio di nefrite lupica (Mahler e Fritzler, 2015).

È stato dimostrato che un aumento della concentrazione sierica di anti-dsDNA può precedere le riacutizzazioni della malattia, rendendoli non solo uno strumento diagnostico, ma anche un importante marcatore prognostico e di monitoraggio (Pisetsky, 2016).

Questa utilità deriva in parte dalla loro capacità di formare immunocomplessi circolanti, i quali si depositano nei tessuti bersaglio, attivano il complemento e inducono un'intensa risposta infiammatoria (Wener, 2014).

Questo meccanismo è centrale nella patogenesi della nefrite lupica, una delle complicanze più gravi del LES.

Dal punto di vista biochimico e fisiopatologico, va sottolineato che gli anti-dsDNA sono anticorpi policlonali, cioè costituiti da una miscela di immunoglobuline dirette contro epitopi diversi del DNA. Questa eterogeneità influisce sulla loro rilevabilità a seconda della metodica utilizzata e rende difficile stabilire con certezza quale test sia il più affidabile (Cockx et al., 2022).

Gli anti-dsDNA differiscono per classe immunoglobulinica (IgG, IgM, IgA), per affinità e per avidità. In particolare, gli anticorpi ad alta avidità sono quelli più specifici per il LES attivo, e sono maggiormente associati a manifestazioni cliniche severe, mentre quelli a bassa avidità possono comparire anche in altre patologie autoimmuni o in corso di infezioni virali (Mahler e Fritzler, 2015).

Una delle criticità principali nella determinazione degli anti-dsDNA è la notevole variabilità tra le metodiche. Studi comparativi hanno dimostrato che uno stesso campione può fornire risultati diversi a seconda della tecnica impiegata, a causa di fattori come la natura dell'antigene (nativo o ricombinante), il supporto (soluzione o fase solida) e la tecnologia di rilevazione (ottica, fluorescente, chemiluminescente) (Wener, 2014; Tozzoli et al., 2020).

Per ridurre l'errore e garantire continuità nei controlli longitudinali, è fortemente raccomandato utilizzare sempre la stessa metodica per il monitoraggio del paziente. Inoltre, è suggerito un approccio diagnostico a due livelli: uno screening iniziale con una metodica ad alta sensibilità (come ELISA o CLIA), seguito da un test di conferma ad alta specificità (come CLIFT). Questo approccio consente di equilibrare sensibilità e specificità e ridurre il rischio di falsi positivi e negativi (Cockx et al., 2022).

La diagnosi clinica del LES si basa anche sulla valutazione delle manifestazioni cliniche iniziali, che possono essere sfumate e aspecifiche (febbre, astenia, calo ponderale, artromialgie). La diagnosi differenziale è spesso complessa, poiché molte delle manifestazioni possono sovrapporsi ad altre condizioni infiammatorie o autoimmuni. In alcuni casi, può manifestarsi una sindrome di *overlap*, in cui si osservano caratteristiche cliniche e laboratoristiche tipiche del LES insieme a quelle di altre connettiviti (Tozzoli et al., 2020).

Gli anticorpi anti-dsDNA, quindi, rappresentano uno dei biomarcatori più importanti nel contesto del LES, sia per la diagnosi che per il monitoraggio dell'attività di malattia. Il loro valore non dipende solo dalla presenza, ma anche dalla quantità, dall'avidità e dalla metodica utilizzata per rilevarli. Per questo motivo, è essenziale interpretare i dati di laboratorio all'interno del contesto clinico complessivo, tenendo conto delle manifestazioni sistemiche, dei livelli del complemento e degli altri autoanticorpi eventualmente presenti. La gestione ottimale del LES passa attraverso una stretta integrazione tra valutazione clinica, approccio laboratoristico e monitoraggio continuo, elementi fondamentali per garantire un trattamento personalizzato ed efficace.

1.7 Anticorpi anti-dsDNA

Il LES è una malattia autoimmune sistemica, cronica e complessa, caratterizzata da un'alterata risposta del sistema immunitario, che porta alla produzione di autoanticorpi diretti contro numerosi componenti intracellulari. Tra questi, un ruolo di particolare rilievo è svolto dagli anticorpi anti-DNA a doppia elica (anti-dsDNA), considerati un marker immunologico distintivo e altamente specifico del LES. La presenza di questi autoanticorpi, oltre ad avere un significato diagnostico, si rivela fondamentale nel monitoraggio dell'attività della malattia. Infatti, in molti casi, un aumento della loro concentrazione sierica precede le riacutizzazioni (flare) cliniche, rendendoli un utile indicatore di attività e di potenziale coinvolgimento d'organo, in particolare a livello renale.

L'origine degli anti-dsDNA è riconducibile a un'interazione complessa tra fattori genetici predisponenti, influenze ormonali, stimoli ambientali e alterazioni immunologiche. Tra i meccanismi coinvolti, è stata evidenziata l'attivazione di cellule B autoreattive e la formazione di NETs (Neutrophil Extracellular Traps), strutture extracellulari costituite da DNA e proteine nucleari rilasciate dai neutrofili in risposta a stimoli infiammatori. Queste strutture contribuiscono a esporre antigeni nucleari al sistema immunitario, facilitando lo sviluppo della risposta autoimmune.

È importante sottolineare che gli anti-dsDNA non rappresentano una popolazione omogenea di anticorpi. Essi possono variare in termini di specificità antigenica, riconoscendo differenti componenti del DNA come le basi azotate, lo scheletro zuccherino o la conformazione conformazionale della doppia elica. Inoltre, si distinguono in diverse classi immunoglobuliniche (IgG, IgM, IgA) e si differenziano per affinità e avidità, due parametri che determinano la forza del legame anticorpo-antigene. In particolare, gli anticorpi ad alta avidità risultano essere i più specifici per il LES, nonché quelli maggiormente associati all'attività di malattia e alla nefrite lupica. Al contrario, quelli a bassa avidità possono essere rilevati anche in altre malattie autoimmuni o in corso di infezioni, risultando meno specifici.

Dal punto di vista patogenetico, gli anti-dsDNA partecipano direttamente ai processi infiammatori caratteristici del LES. Una volta rilasciato nel circolo ematico, il DNA extracellulare si lega agli anticorpi formando immunocomplessi che si depositano nei

tessuti, attivano il complemento (soprattutto C3 e C4) e inducono un'intensa risposta infiammatoria. Questo meccanismo è alla base di numerose manifestazioni cliniche del LES, con particolare riferimento al rene, dove può instaurarsi una nefrite lupica, una delle complicanze più gravi della malattia.

Per quanto riguarda l'utilizzo clinico, gli anti-dsDNA sono inclusi nei principali criteri classificativi del LES, tra cui quelli formulati dall'European League Against Rheumatism (EULAR) e dall'American College of Rheumatology (ACR) nel 2019, nonché nei criteri del Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC). Essi rappresentano anche uno degli indicatori chiave utilizzati nel punteggio SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index), uno strumento impiegato per valutare l'attività di malattia.

Esistono numerose metodiche per la rilevazione degli anticorpi anti-dsDNA, ciascuna con caratteristiche specifiche in termini di sensibilità, specificità e utilità clinica. Tra le più conosciute vi sono il Farr Assay, considerato per lungo tempo il gold standard per la sua elevata specificità, ma oggi meno utilizzato a causa della manipolazione di radioisotopi, e il test immunofluorescente su Crithidia luciliae (CLIFT), che offre un'elevata specificità ma una sensibilità relativamente bassa. Le metodiche immunometriche, come ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), CLIA (Chemiluminescent Immunoassay), FEIA (Fluorescence Enzyme Immunoassay) e ALBIA (Addressable Laser Bead Immunoassay), sono oggi largamente impiegate per la loro praticità e per la possibilità di quantificare la risposta anticorpale. La tabella seguente riassume le principali caratteristiche delle metodiche più utilizzate:

Metodo	Principio	Sensibilità	Specificità	Applicazione
Farr Assay (RIA)	Radioimmunoprecipitazione	Media	Alta	Diagnosi storica
CLIFT	IFI su protozoo con DNA mitocondriale	Bassa	Molto alta	Conferma
ELISA	Antigeni legati a fase solida	Alta	Variabile	Screening e follow-up
CLIA	Chemiluminescenza	Alta	Alta	Diagnosi e monitoraggio
FEIA / ALBIA	Tecnologie automatizzate	Alta	Buona	Diagnosi automatizzata

Una delle principali problematiche associate alla determinazione degli anti-dsDNA è rappresentata dalla variabilità analitica tra i diversi metodi. È stato ampiamente documentato che uno stesso campione può fornire risultati differenti a seconda della metodica impiegata. Tale variabilità è legata a numerosi fattori, tra cui la natura dell'antigene utilizzato (nativo o ricombinante), la modalità di presentazione (in soluzione o su supporto solido), la tecnologia di rilevazione (ottica, fluorescente, chemiluminescente) e la capacità del metodo di discriminare tra anticorpi ad alta o bassa avidità. Per ridurre il margine di errore e garantire confrontabilità nel tempo, è consigliabile che il monitoraggio longitudinale dei pazienti venga effettuato sempre con la stessa metodica.

L'approccio diagnostico ottimale prevede l'impiego combinato di test con caratteristiche complementari. In particolare, è suggerita una strategia a due livelli: uno screening iniziale con una metodica ad alta sensibilità, come ELISA o CLIA, seguito da un test di conferma ad alta specificità, come il CLIFT. Tale combinazione consente di bilanciare il rischio di falsi negativi e falsi positivi, migliorando l'affidabilità dell'indagine sierologica. È inoltre fondamentale contestualizzare i risultati laboratoristici all'interno del quadro

clinico complessivo del paziente, associando l'interpretazione degli anti-dsDNA alla positività degli ANA (anticorpi antinucleo), ai livelli del complemento e ad altri marker di infiammazione.

In conclusione, gli anticorpi anti-dsDNA costituiscono un biomarcatore di grande rilevanza nel contesto del LES, sia per la diagnosi che per il monitoraggio dell'attività di malattia. La loro determinazione richiede una conoscenza approfondita delle metodologie disponibili e delle variabili che influenzano l'esito del test. L'integrazione dei risultati sierologici con le informazioni cliniche e laboratoristiche consente una gestione più accurata e personalizzata del paziente affetto da LES.

1.8- Immunofluorescenza e chemiluminescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica immunocitochimica largamente utilizzata in ambito clinico e di laboratorio, in particolare per lo studio delle patologie autoimmuni. Il principio su cui si basa consiste nell'impiego di anticorpi coniugati con molecole fluorescenti, i fluorocromi, capaci di emettere luce visibile quando eccitati da una sorgente luminosa a lunghezza d'onda specifica. La fluoresceina isotiocianato (FITC) è il fluorocromo più comunemente utilizzato nella diagnostica autoimmune: essa assorbe luce blu (circa 490 nm) ed emette luce verde (circa 520 nm), rendendo visibile il legame tra l'anticorpo e l'antigene al microscopio a fluorescenza (Bogdanos et al., 2009).

Esistono due principali varianti della tecnica: l'immunofluorescenza diretta e quella indiretta. Nella prima, un anticorpo marcato si lega direttamente a un antigene presente nel campione biologico. È utilizzata ad esempio per rilevare patogeni intracellulari come *Chlamydia trachomatis*. L'immunofluorescenza indiretta, invece, è la più impiegata in ambito autoimmune e prevede l'uso di un antigene noto fissato su un supporto (generalmente un vetrino), che viene incubato con il siero del paziente. In caso di presenza di autoanticorpi, questi si legheranno all'antigene. A questo punto, un secondo anticorpo, marcato con fluorocromo e specifico per le immunoglobuline umane, viene aggiunto per rendere visibile il complesso antigene-anticorpo (Mahler & Fritzler, 2010).

La procedura standard prevede inizialmente la diluizione del siero del paziente, spesso con un rapporto 1:80 per l'indagine degli anticorpi antinucleo (ANA). Il siero viene poi distribuito su vetrini preallestiti con substrati tissutali o cellulari e incubato in una camera umida per circa 30 minuti. Successivamente, il vetrino viene sottoposto a lavaggi con una soluzione tampone salina fosfata (PBS), per eliminare gli anticorpi non legati. Si procede quindi con l'aggiunta dell'anticorpo secondario marcato con FITC, seguito da una nuova incubazione e da ulteriori lavaggi. Infine, il vetrino viene montato con un liquido a base di glicerolo e coperto con un copri-oggetto per la lettura al microscopio (Wiik et al., 2010).

La lettura avviene mediante un microscopio a fluorescenza, che seleziona le lunghezze d'onda adeguate tramite filtri ottici. La luce emessa dal fluorocromo, dopo essere stata riflessa e filtrata, raggiunge l'occhio dell'osservatore. L'uso di diversi filtri di barriera può influenzare sensibilmente l'intensità della fluorescenza e la nitidezza delle strutture visibili. Anche l'obiettivo utilizzato ha un impatto significativo sull'intensità del segnale:

ingrandimenti maggiori, come il 40x, concentrano la luce su un'area minore, intensificandone l'effetto. Tuttavia, la lettura per determinare la positività o negatività del campione viene generalmente effettuata a 20x, mentre il 40x viene utilizzato per caratterizzare più nel dettaglio il pattern fluorescente.

Una fase fondamentale della procedura è la titolazione, che permette di esprimere in modo semi-quantitativo la concentrazione degli anticorpi rilevati. Il titolo è definito come la massima diluizione del siero in cui è ancora presente un segnale positivo. Ad esempio, un titolo di 1:640 indica che l'anticorpo è ancora rilevabile anche a quella diluizione. Per ottimizzare i tempi e i consumi, è possibile saltare diluizioni intermedie e stimare il titolo sulla base dell'esperienza visiva dell'operatore, oppure utilizzare una scala di intensità qualitativa (es. 3+, 2+, 1+, +/-) per esprimere la forza del segnale osservato (Fritzler, 2016).

Negli ultimi anni, la procedura è stata sempre più spesso automatizzata, grazie all'introduzione di strumenti come i sistemi QUANTA-Lyser, che gestiscono lavaggi, aspirazioni e dispensazioni in modo standardizzato. Ciò ha portato a una maggiore riproducibilità dei risultati e a una significativa riduzione degli errori operatori (Bloch et al., 2019). In parallelo, l'utilizzo di sorgenti luminose a LED nei microscopi ha sostituito le tradizionali lampade a mercurio, offrendo numerosi vantaggi: accensione immediata, maggiore durata (oltre 10.000 ore), assenza di calore, bassa manutenzione e stabilità dell'intensità luminosa nel tempo.

Nel complesso, l'immunofluorescenza indiretta rappresenta uno strumento diagnostico essenziale nella pratica clinica, in particolare per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie autoimmuni sistemiche. La sua sensibilità, unita alla possibilità di osservare pattern specifici, consente di orientare rapidamente il sospetto diagnostico e di selezionare ulteriori approfondimenti di tipo antigenico-specifico. L'adozione di protocolli standardizzati, la formazione del personale e l'integrazione con sistemi automatizzati costituiscono elementi chiave per garantire la qualità e l'affidabilità del dato.

La reazione chemiluminescente è definita come l'emissione di luce di intensità e durata variabili, con colori che coprono lo spettro visibile, a seguito di una trasformazione chimica. L'immunodosaggio a chemiluminescenza (CLIA) ha acquisito un'attenzione crescente in vari ambiti, tra cui le scienze biologiche e la diagnosi clinica, grazie a caratteristiche di elevata sensibilità, buona specificità, ampia gamma di applicazioni,

semplicità delle apparecchiature e ampi intervalli lineari. L'immunoreazione si verifica quando un antigene si lega a un anticorpo. Tuttavia, la velocità di tale processo è spesso limitata da due fattori principali: la bassa velocità di diffusione delle grandi molecole coinvolte e il problema del blocco del sito. Di conseguenza, la velocità di immunoreazione, regolata dal trasporto di massa e dalla cinetica di reazione, tende a essere bassa. L'immunodosaggio convenzionale necessita di un tempo di incubazione prolungato, che a sua volta determina la necessità di diverse ore per il completamento dell'analisi. Si è poi sviluppato metodi innovativi per ridurre i tempi di analisi, migliorando il trasporto di massa e la cinetica di reazione.

Il CLIA rappresenta un approccio metodologico per la determinazione della concentrazione dei campioni, basato sull'intensità della luminescenza emessa durante le reazioni chimiche. In linea generale, la reazione di chemiluminescenza produce uno dei prodotti di reazione in uno stato elettronico eccitato che, quando cade allo stato base, produce luce. Il processo di emissione della luce nella chemiluminescenza è analogo a quello della fotoluminescenza, con l'eccezione del processo di eccitazione. Nel caso della fluorescenza e della fosforescenza, come visto in precedenza, lo stato elettronico eccitato è il risultato dell'assorbimento di luce UV-visibile, che a sua volta rientra nello stato fondamentale (SO) partendo dallo stato eccitato di singoletto (S1) o dallo stato eccitato di tripletto (T1).

Mentre, in linea generale, una reazione chemiluminescente (CL) può essere generata da due meccanismi fondamentali: in una reazione diretta, due reagenti, generalmente un substrato e un ossidante, in presenza di alcuni cofattori, reagiscono per ottenere un prodotto o un intermedio, occasionalmente in presenza di un catalizzatore. Una frazione del prodotto o dell'intermedio si forma in uno stato elettronicamente eccitato, che può successivamente rilassarsi allo stato fondamentale con l'emissione di un fotone. Il substrato è il CL, precursore, che viene convertito nella molecola elettronicamente eccitata, responsabile dell'emissione di luce o che agisce come donatore di trasferimento di energia nel CL indiretto. I substrati di CL più diffusi includono il luminolo, l'isoluminolo e i loro derivati, i derivati dell'estere di acridinio, la perossidasi e la fosfatasi alcalina. In contrapposizione, la CL indiretta o sensibilizzata si basa su un processo di trasferimento dell'energia della specie eccitata a un fluoroforo. Questo processo implica che le molecole non direttamente coinvolte nella reazione di CL trasferiscono il loro

eccesso di energia a un fluoroforo, il quale, a sua volta, viene eccitato, passando al suo stato fondamentale con l'emissione di fotoni. Questa complessa rete di reazioni ha portato a una vasta gamma di applicazioni pratiche del CL in fase solida, gassosa e liquida.

L'immunoassorbimento enzimatico (ELISA) è una tecnica analitica biochimica ampiamente diffusa che si basa sull'analisi immunoenzimatica (EIA) in fase solida per rilevare la presenza di una sostanza, generalmente un antigene, in un campione liquido o umido. Nell'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), gli antigeni del campione vengono legati a una superficie solida. Successivamente, un altro anticorpo specifico viene applicato sulla superficie, in modo che possa legarsi all'antigene. Questo anticorpo viene legato a un enzima e, in una fase finale del processo, viene aggiunta una sostanza contenente il substrato dell'enzima. La reazione successiva produce un segnale rilevabile, solitamente un cambiamento di colore del substrato. Grazie ai suoi vantaggi in termini di sensibilità, velocità e automazione, il test immunochimico a chemiluminescenza (CLIA) ha svolto un ruolo fondamentale nel promuovere lo sviluppo della rilevazione di sostanze ultra-micro attive nella diagnosi e nella prognosi clinica. Attualmente, in qualità di tecnologia in rapida crescita nel settore dell'immunologia, il CLIA si è affermato come uno dei dispositivi medici più rilevanti per la diagnosi in vitro (IVD).

1.9– Sensibilità, specificità e cut-off

L'attendibilità caratterizza un risultato o un metodo analitico. I fattori che la determinano:

1. Sensibilità: quella analitica è la capacità del metodo di identificare anche piccole quantità di un analita. Quella diagnostica è la capacità di un test di identificare correttamente come positivi i soggetti malati.
2. Specificità: quella analitica è la capacità del metodo di identificare solo e interamente l'analita in esame. Quella diagnostica è la capacità di un test di identificare correttamente i negativi come soggetti sani.

Un test ideale dovrebbe dimostrare un'elevata sensibilità e specificità. Tuttavia, all'interno dello stesso test, la specificità e la sensibilità sono due caratteristiche interdipendenti: quando una aumenta, l'altra diminuisce, e viceversa.

Nella pratica clinica, al fine di confermare la presenza di una determinata malattia, si opta per un esame che presenti elevata specificità, mentre per escluderla si sceglie un esame con alta sensibilità. È possibile dosare queste due caratteristiche del test sacrificando l'una all'altra, variando il valore di riferimento del test e spostando il punto di discriminazione tra positivo e negativo. In linea generale, si consiglia di prediligere test sensibili quando la mancata identificazione di una malattia può avere conseguenze significative, mentre si raccomanda di optare per test specifici quando un risultato positivo potrebbe rivelarsi dannoso, come nel caso di terapie o interventi invasivi non necessari.

Un test altamente sensibile è preferibile quando l'obiettivo è identificare il maggior numero possibile di casi patologici, come nei test di screening, poiché riduce il numero di risultati falsamente negativi. Un test altamente specifico, d'altra parte, presenta un minor numero di falsi positivi, rendendolo ideale per confermare la presenza di una malattia. Un test è specificamente sensibile al 100% quando tutti i soggetti sani risultano negativi, evitando così errori di diagnosi nei pazienti non patologici.

Nel corso di un test di laboratorio, la condizione più comune è che valori elevati di analita siano indicativi di una malattia, mentre valori bassi indicano l'assenza di malattia.

I valori intermedi possono risultare compatibili sia con la presenza che con l'assenza di malattia.

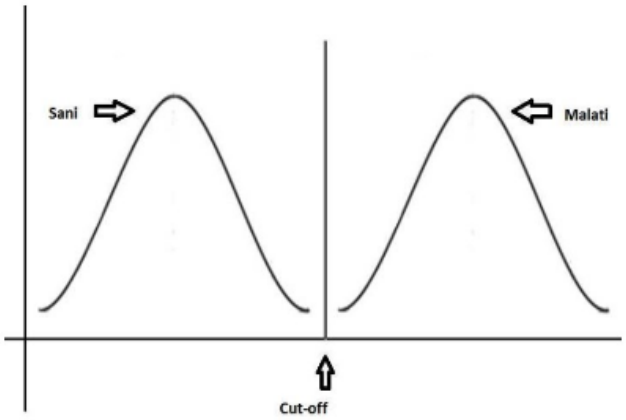


Figura 2 grafico d'esempio delle curve Gaussiane

La rappresentazione grafica di tale fenomeno mostra come le due popolazioni, quella dei soggetti sani e quella dei soggetti malati, si distribuiscono secondo due gaussiane che si sovrappongono nei valori intermedi del test di laboratorio.
In questa fase, è possibile variare il valore di soglia del test, ovvero il cut-off, al fine di ottenere una separazione più netta tra le due popolazioni.
Il punto di discriminazione ottimale di un test si ottiene mediante le curve ROC (Receiver Operating Characteristics). Ogni soglia di decisione corrisponde a una coppia (sensibilità e specificità).
La curva ROC rappresenta uno strumento di notevole utilità per riassumere, in un unico grafico, le prestazioni di un test diagnostico in funzione del valore di cut-off.
Sull'asse delle ordinate sono rappresentati i valori di sensibilità del test, o tasso di veri positivi (TPR - True Positive Rate), mentre sull'asse delle ascisse è indicato 1 - specificità del test, o tasso di falsi positivi (FPR - False Positive Rate).
Per ciascun cut-off, è possibile determinare un valore per la sensibilità e un valore per la specificità, corrispondenti ai punti del grafico. La sovrapposizione di tali punti dà luogo a una curva a scaletta, nota come curva ROC.

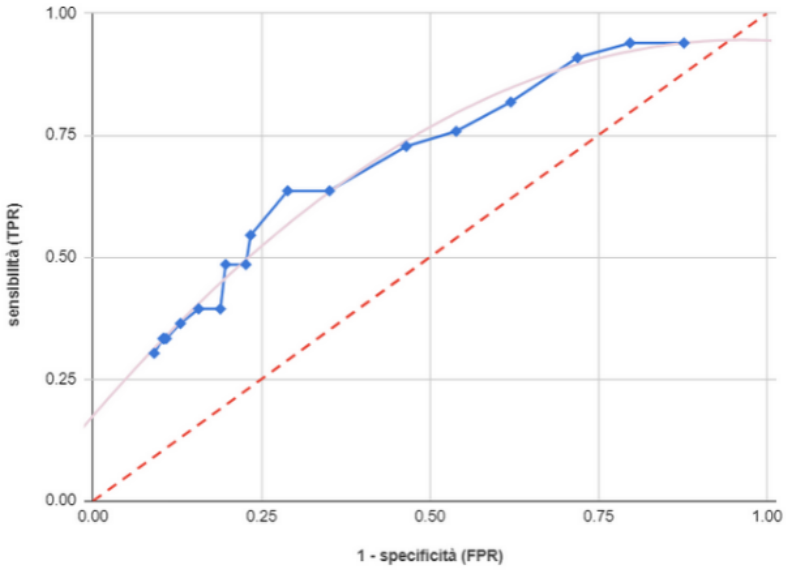


Figura 3 grafico d'esempio del calcolo della curva ROC

Uno dei metodi più utilizzati per determinare il valore soglia ottimale all'interno della curva ROC è l'Indice di Youden, quello che utilizzeremo per quello che vogliamo andare a ricercare nella tesi. Questo indice viene calcolato con la formula:

$$J = \text{Sensibilità} + \text{Specificità} - 1$$

L'Indice di Youden identifica il punto della curva ROC che garantisce il miglior equilibrio tra sensibilità e specificità. In particolare, un valore più alto di J indica che il test è efficace nel separare correttamente i soggetti positivi da quelli negativi. La scelta del cut-off tramite questo indice consente di ottimizzare il test per minimizzare gli errori diagnostici e ridurre i costi legati a test di conferma non necessari.

2 – SCOPO DEL LAVORO

Ho svolto il tirocinio presso il laboratorio di analisi dell'ospedale Martini di Torino. Dopo aver frequentato i vari settori del laboratorio in fase di stage, mi sono concentrata su quello autoimmune, da cui poi è nata l'idea dell'argomento di questa tesi.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare in modo critico e comparativo i diversi metodi diagnostici disponibili per la rilevazione degli anticorpi anti-dsDNA, con particolare attenzione alla loro applicabilità nella diagnosi e nel monitoraggio del LES. Attraverso una metanalisi dei dati presenti in letteratura, sono state valutate le caratteristiche analitiche e cliniche di ciascun metodo, evidenziandone punti di forza e di debolezza, al fine di definire un approccio diagnostico multimodale e più consapevole.

Parallelamente, è stata condotta un'attività sperimentale in laboratorio, presso la sede di tirocinio, con l'obiettivo di ottimizzare il flusso diagnostico esistente mediante l'analisi statistica dei dati reali derivanti dall'impiego del test QUANTA Flash (BioFlash).

In particolare, si è cercato di valutare la possibilità di introdurre un cut-off alternativo a quello fornito dal produttore, valutando sensibilità e specificità, con l'intento di migliorare la selettività del test, ridurre i falsi positivi e contenere i costi associati all'esecuzione del test di conferma mediante Crithidia luciliae (CLIFT).

3 – MATERIALI E METODI

3.1 – Strumentazione

Nel laboratorio analisi dove ho svolto il tirocinio, la strumentazione era composta da:



Figura 4 macchinario BioFlash

L'analizzatore chemiluminescente ad accesso casuale BioFlash dotato di un luminometro, conosciuto anche come QUANTA Flash. È un analizzatore completamente automatizzato, progettato per eseguire test immunometrici in ambito clinico e diagnostico in vitro. La tecnologia di rilevamento alla base del funzionamento dello strumento è la chemiluminescenza, un metodo altamente sensibile e specifico per la quantificazione di antigeni o anticorpi nei campioni biologici. Grazie alla sua automazione completa e alla capacità di gestire più fasi analitiche in sequenza, BioFlash rappresenta un valido supporto nei laboratori di diagnostica clinica ad alta produttività. Il BioFlash è uno strumento da banco che esegue in modo sequenziale e automatizzato le seguenti operazioni:

- Dispensazione del campione biologico (contenente l'anticorpo o l'antigene) all'interno di cuvette pre-riempite con reagente specifico legato a un antigene o anticorpo marcato.
- Incubazione in ambiente termostatato per favorire la formazione dei complessi immunologici antigene-anticorpo.
- Eliminazione del buffer di reazione e dei reagenti non legati attraverso stadi di lavaggio.

- Aggiunta del reagente rivelatore, capace di generare una reazione chimica luminosa proporzionale alla concentrazione dell'analyte.
- Rilevamento del segnale luminoso e determinazione quantitativa degli anticorpi o antigeni presenti nel campione.

Il sistema restituisce un valore di chemiluminescenza espresso in Unità di Luce Relativa (RLU), calcolato tramite una curva di calibrazione.

Bioflash è stato progettato per fornire un'interfaccia intuitiva e funzionalità avanzate grazie a un software dedicato che permette di:

- Creare e stampare liste di lavoro.
- Inserire test manualmente da tastiera o tramite lettore di codici a barre.
- Analizzare i dati salvati nel database interno.
- Gestire livelli di accesso differenziati per utenti.
- Monitorare parametri di sicurezza tramite log dedicati.
- Controllare lo stato del sistema e dei materiali.
- Ripristinare e calibrare i materiali consumabili.

Il BioFlash funziona con test immunometrici in chemiluminescenza, i quali possono assumere configurazioni diverse a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche dell'analyte, della matrice biologica da analizzare, delle indicazioni del produttore e del tipo di anticorpi o antigeni target. Rispetto ai test ELISA, questi test si distinguono per l'uso di un marcatore capace di produrre luce anziché un cambiamento cromatico. Nel metodo ELISA, il marcatore è solitamente un enzima (es. perossidasi) che reagisce con un substrato producendo una variazione di colore. Nei test chemiluminescenti, invece, il marcatore è una molecola (es. isoluminolo) in grado di emettere direttamente luce rilevata da un luminometro.

Le principali tipologie di reazione includono:

- Test "Sandwich" per la determinazione di antigeni: anticorpi legano sequenzialmente l'antigene target, generando un segnale proporzionale alla quantità presente.
- Test a doppio antigene: due antigeni catturano un anticorpo specifico presente nel campione.
- Test a competizione diretta: l'analyte compete con un tracciante marcato per il legame con un anticorpo.

- Test IgM-specifici: particelle magnetiche rivestite di anticorpi monoclonali specifici per IgM, con tracciante costituito da antigene marcato.
- Test competitivo inverso: il tracciante è una molecola marcata con un "tag" luminescente che compete con l'analyte per il legame; il segnale è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analyte.

Il BioFlash impiega particelle paramagnetiche come fase solida. Rispetto ai supporti tradizionali (piastre ELISA, tubi, ecc.), tali particelle offrono superficie di cattura più ampia, maggiore efficienza cinetica grazie al moto casuale, compatibilità con la dispensazione automatica all'interno della cuvetta ed accesso casuale alla reazione, permettendo l'esecuzione asincrona dei test. Le particelle sono formate da un nucleo magnetico rivestito con un polimero contenente gruppi chimici attivi per il legame covalente con l'antigene o l'anticorpo.

Le molecole chemiluminescenti usate nei reagenti BioFlash sono dei derivati dell'isoluminolo. Quando l'isoluminolo è legato covalentemente alla molecola di interesse (antigene o anticorpo), l'intensità della luce emessa può essere inferiore di diversi ordini di grandezza rispetto all'isoluminolo libero, a causa del raffreddamento provocato dalle macromolecole.

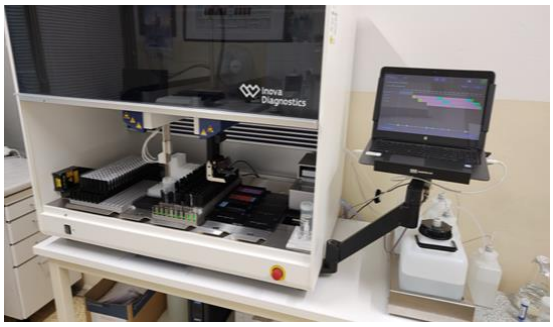


Figura 5 strumento QUANTA-Lyser

QUANTA-Lyser utilizza tecnologie di elettronica, robotica e informatica all'avanguardia. I componenti hardware di QUANTA-Lyser forniscono metodi di lettura dei codici a barre, pipettaggio, lavaggio, miscelazione, incubazione e rilevamento conformi ai requisiti ELISA/EIA e IFA:

- Lettura dei codici a barre automatica per campione, reagente e vetrino IFA
- Preparazione della diluizione del campione con opzioni di volume flessibili
- Preparazione delle diluizioni seriali

- Distribuzione del campione a varie configurazioni di pozzetti sui vetrini e su piastre di microtitolazione a 96 pozzetti
- Aggiunta del reagente
- Lavaggio della piastra di microtitolazione
- Lavaggio del pozzetto del vetrino IFA
- Miscelazione in provette micropozzetti e piastre di microtitolazione
- Rilevamento dei liquidi nei contenitori di lavaggio del sistema
- Incubazione a temperatura controllata
- Rilevamento delle densità ottiche utilizzando le opzioni di lunghezza d'onda singola/doppia

Il software QUANTA-Lyser controlla tutte le fasi di elaborazione automatica. Fornisce l'interfaccia utente per la configurazione dello strumento nel modo più efficace e include un menu esteso di opzioni di definizione del dosaggio che consente l'ottimizzazione per ogni singola applicazione.

I vetrini che si utilizzano sono quattro diversi con i rispetti i reagenti, controlli e componenti non reattivi. Quello che ci interessa per questa tesi:

Il dsDNA

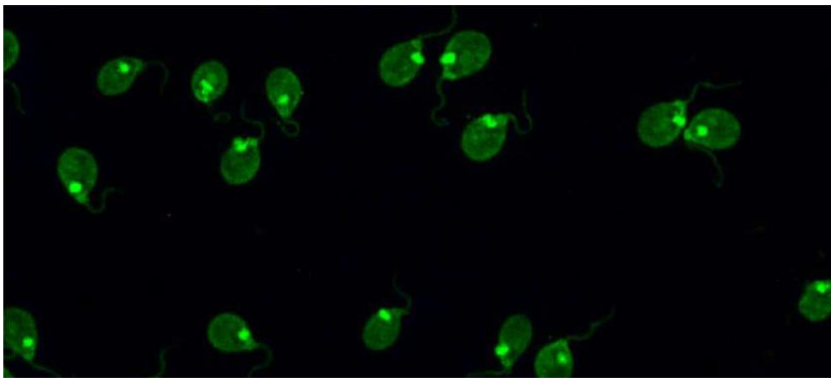


Figura 6 come viene visualizzato il dsDNA successivamente all'analisi del QUANTA-Lyser

Il sistema di analisi dsDNA della Immuno Concepts del QUANTA Lyser si basa su una metodologia di immunofluorescenza indiretta (IFA). L'anticorpo del siero, reattivo al dsDNA, viene rilevato attraverso la colorazione del cinetoplasto all'interno dell'organismo Crithidia luciliae, un parassita della mosca carnaria che non risulta

patogeno per gli esseri umani. Il cinetoplasto di questi emoflagellati è parte del mitocondrio, dove l'dsDNA si trova concentrato in forma di elica. Il cinetoplasto appare a forma di disco leggermente concavo, contenente la cresta mitocondriale e una massa di DNA fibroso; esso si trova tra il nucleo, situato al centro, e il corpo basale del flagello. Poiché l'dsDNA del cinetoplasto non contiene DNA a filamento singolo (ssDNA), si verifica una riduzione significativa dei contaminanti che potrebbero altrimenti interferire con le reazioni di laboratorio (sito Werfen).



Figura 8 microscopio ECLIPSE Si e software QUANTA Link



Figura 7 microscopio ECLIPSE Si

Il microscopio ECLIPSE Si è un microscopio dritto della Nikon che permette di visualizzare campioni di sangue, batteri, preparati citologici, istologici. Permette l'osservazione in campo chiaro e scuro, osservazione del contrasto di fase, osservazione della fluorescenza diascopica e semplice osservazione polarizzante.

Per osservare i vetrini a fluorescenza si una il microscopio in fluorescenza diascopica.

La microscopia a fluorescenza in luce trasmessa (Diascopia) prevede l'illuminazione del campione dal basso. Il percorso ottico è quello dei microscopi comuni, con la lampada in basso e la luce focalizzata sul campione attraverso il condensatore. Per selezionare le lunghezze d'onda volute, viene posto nella portalampada del microscopio un filtro di eccitazione, un filtro di sbarramento viene posizionato, invece, sopra il revolver del microscopio per bloccare la luce residua di eccitazione e per selezionare la lunghezza d'onda giusta che raggiungerà l'occhio dell'osservatore.

Il campione è eccitato dalla luce che passa attraverso il filtro primario e l'emissione fluorescente è catturata dalla lente dell'obiettivo, prima di arrivare all'oculare questa viene filtrata e, quindi, selezionata dal filtro secondario (sito fluorescencemicroscopy).

Il QUANTA link



Figura 9 schermata del software per inserire i risultati visti a microscopio

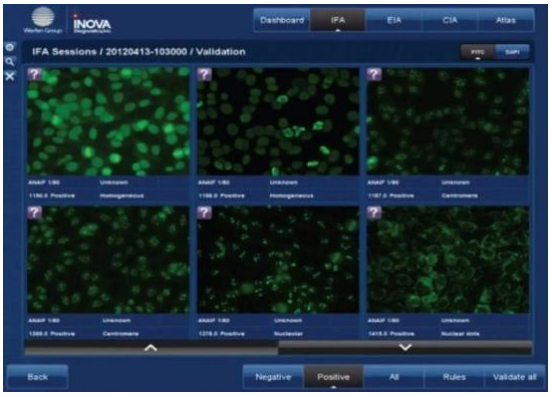


Figura 10 schermata software dell'atlante di visualizzazione

È una rete intelligente centralizzata, un sistema di gestione del flusso di lavoro che offre il controllo immediato di tutta l'elaborazione dei campioni IFA autoimmuni, ELISA e chemiluminescenza. Integra perfettamente gli strumenti con il sistema informativo del laboratorio (LIS).

Il dispositivo è in comunicazione diretta con il Quanta Lyser; pertanto, viene utilizzato per la visualizzazione delle informazioni associate al vetrino, più precisamente al singolo pozzetto. Tramite il dispositivo in esame è possibile visualizzare il codice e il nome del paziente, l'esecuzione delle analisi e la prima valutazione effettuata dal sistema. Inoltre, il dispositivo in esame consente l'inserimento manuale dei risultati dell'analisi a seguito della visualizzazione del vetrino attraverso il microscopio, con la possibile aggiunta di vari commenti.

Il dispositivo Quanta Link è in grado di interagire anche con il sistema BioFlash, consentendo l'accesso a funzionalità aggiuntive. Tali funzionalità includono la visualizzazione dei risultati, l'esecuzione di analisi ripetitive e l'implementazione di analisi supplementari senza la necessità di intervenire sul programma principale di BioFlash (sito Werfen).

3.2– Metanalisi comparativa tra le differenti metodiche

Gli anticorpi anti-dsDNA sono biomarcatori essenziali per la diagnosi e il monitoraggio del LES e rivestono un ruolo cruciale nella classificazione della malattia secondo i criteri ACR/EULAR (Infantino *et al.*, 2022).

Tuttavia, la loro rilevazione è complessa a causa dell'eterogeneità degli autoanticorpi e delle differenze tra i metodi diagnostici disponibili. L'identificazione precoce degli anticorpi anti-dsDNA è fondamentale per prevenire le complicanze della malattia, poiché sono strettamente correlati all'attività patologica, in particolare al coinvolgimento renale tipico della nefrite lupica. Una diagnosi tempestiva consente di avviare un trattamento precoce, riducendo la progressione del danno d'organo e migliorando significativamente la prognosi dei pazienti. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che la presenza di anti-dsDNA è associata a un aumento del rischio di danno d'organo cumulativo nel tempo, sottolineando l'importanza di una rilevazione accurata (Infantino *et al.*, 2022).

La scelta del metodo diagnostico più appropriato per identificare questi anticorpi rappresenta quindi una priorità clinica, con implicazioni dirette sul follow-up e sulla gestione terapeutica dei pazienti.

Numerosi metodi sono stati sviluppati per la rilevazione degli anti-dsDNA, ognuno con specifiche caratteristiche in termini di sensibilità, specificità e correlazione con l'attività della malattia.

Infantino *et al.* (2022) hanno esaminato diversi approcci diagnostici, tra cui ELISA, CLIFT, CLIA e FEIA, evidenziandone vantaggi e limiti. Il CLIFT, che utilizza il cinetoplasto di Crithidia luciliae, è noto per la sua elevata specificità ma bassa sensibilità, risultando più adatto come test di conferma piuttosto che come screening. Al contrario, i metodi immunometrici come CLIA e FEIA offrono maggiore sensibilità e automazione, ma possono rilevare anticorpi a bassa affinità, con un significato clinico meno rilevante. Anche tecnologie più avanzate, come il multiplex e i microarray, stanno emergendo come strumenti promettenti per ottenere un quadro più completo dei profili anticorpali dei pazienti (Infantino *et al.*, 2022).

L'impiego crescente di tecnologie ad alta capacità consente un'analisi più approfondita degli autoanticorpi, aprendo nuove prospettive per il miglioramento della diagnosi e del monitoraggio clinico.

Analogamente, Isenberg *et al.* (1987) hanno confrontato diversi metodi per la rilevazione degli anti-dsDNA, tra cui il test di Farr, l'emoagglutinazione, l'immunofluorescenza su Crithidia luciliae (CLIF), l'immunofluorescenza su metafasi umane, ELISA classico e tecniche più recenti come il fluoroimmunoenzimatico EliA dsDNA e il PMAT (Particle-Based Multi-Analyte Technology). Il test di Farr ha dimostrato un'elevata specificità per gli anticorpi ad alta affinità e una forte correlazione con il coinvolgimento renale nell'SLE. Tuttavia, la sua complessità tecnica lo rende poco adatto alla routine clinica. L'immunofluorescenza su metafasi umane ha mostrato una sensibilità superiore rispetto al CLIF e una forte correlazione con il test di Farr (r=0,84). Il PMAT, valutato da Lorca-Arce *et al.*, ha evidenziato una sensibilità del 42,2% e una specificità dell'87,4%, con una significativa correlazione con SLEDAI-2K. Infine, il metodo RIA di Isenberg ha mostrato la sensibilità più alta tra i test valutati (57%), con una buona specificità, sebbene vi siano state alcune discrepanze nei risultati tra diversi laboratori (Isenberg *et al.*, 1987).

Questi dati suggeriscono che nessun test singolo possa essere adottato universalmente come metodo di riferimento, mentre l'integrazione di più tecnologie potrebbe garantire risultati più affidabili.

Zaminski *et al.* (2023) hanno approfondito ulteriormente il confronto tra metodi diagnostici, valutando il test EIA e il CLIFT in un'ampia coorte multietnica di pazienti con SLE. I risultati hanno evidenziato un'elevata discordanza tra i due metodi, con il CLIFT che si è dimostrato più specifico e l'EIA più sensibile. Lo studio suggerisce che entrambi i test potrebbero essere necessari per una diagnosi più accurata e un monitoraggio più efficace della malattia. Altri studi hanno analizzato la rilevazione degli ANA attraverso immunofluorescenza indiretta (IIF) ed ELISA, evidenziando come l'IIF sia il metodo più sensibile, mentre l'ELISA offra una maggiore specificità. Inoltre, è stata riscontrata una correlazione significativa tra il pattern ANA omogeneo e un punteggio più elevato di attività della malattia, misurato tramite il British Isles Lupus Assessment Group Index (BILAG), confermando il valore prognostico di questa metodica (El-Chennawi *et al.*, 2009).

L'integrazione dell'analisi degli anticorpi anti-dsDNA con la valutazione degli ANA potrebbe quindi rappresentare un valore aggiunto per la stratificazione dei pazienti con SLE e la previsione dell'evoluzione clinica della malattia.

Enocsson *et al.* (2013) hanno studiato tre diversi saggi per la rilevazione degli anti-dsDNA, confermando che nessun test singolo è completamente affidabile e suggerendo l'uso di un approccio combinato per migliorare l'accuratezza diagnostica. Le variazioni nelle prestazioni dei diversi test riflettono non solo differenze nei principi analitici, ma anche variabili legate alla popolazione studiata, alle condizioni cliniche dei pazienti e ai criteri di interpretazione dei risultati. Pertanto, l'armonizzazione dei metodi e la definizione di cut-off diagnostici standardizzati rappresentano elementi chiave per garantire una maggiore riproducibilità dei test nei diversi contesti clinici e di laboratorio. Dai vari studi emerge che nessun metodo singolo è sufficiente per una diagnosi accurata del LES. L'uso combinato di test con elevata sensibilità e specificità potrebbe rappresentare la strategia più efficace per un inquadramento diagnostico corretto e un monitoraggio accurato della progressione della malattia. L'avvento di tecnologie sempre più avanzate, come l'integrazione di modelli predittivi basati su intelligenza artificiale e machine learning, potrebbe ulteriormente migliorare la capacità diagnostica e consentire una gestione più personalizzata dei pazienti con SLE. Infine, la crescente disponibilità di sistemi multiplex e piattaforme automatizzate contribuirà a migliorare l'efficienza e la standardizzazione delle analisi, garantendo diagnosi sempre più precise e affidabili nella pratica clinica.

Nella pagina successiva si potrà visualizzare la tabella dei risultati ottenuti dalle ricerche svolte nei vari articoli.

Autore	Metodo	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Correlazione con SLEDAI
Isenberg	Farr	54,1	99	Elevata (renale)
Isenberg	CLIFT	28	98,2	Bassa
Isenberg	Emoagglutinazione	20	85	Non significativa
Isenberg	Immunofluorescenza su metafasi	50	97	Forte
Isenberg	ELISA	35,8	99	Variabile
Infantino	CLIFT	-8	-2	Bassa
Infantino	ELISA	-10	-10	Moderata
Infantino	CLIA	89,8	95,2	Alta
Infantino	FEIA	-8,4	-10,7	Alta
Infantino	MFI	85,7	92,8	Moderata
Infantino	Microarray	-3	-5	Alta
Infantino	CMIA	89,8	95,2	Alta
Infantino	PMAT	42,2	87,4	Positiva con SLEDAI-2K
Zaminski	EIA	60	47	Moderata
Zaminski	CLIFT	72	37	Alta
Venner	BioPlex	62	85	Alta
Venner	Farrzyme ELISA	56	91	Moderata
Venner	Farr RIA	97	97	Alta
El-Chennawi	IIF	100	86,2	Alta (BILAG)
El-Chennawi	ELISA	90,7	89,7	Moderata
Wongjarit	LIA	22	100	Bassa
Wongjarit	ELISA	66	96	Alta
Wongjarit	CLIFT	68	94	Alta
Lorca-Arce	PMAT	42,2	87,4	Positiva con SLEDAI-2K
Enocsson	Multipli	75	88	Variabile

3.3– Statistica della metanalisi

In Excel, calcoleremo la media della sensibilità, specificità e correlazione con SLEDAI per ciascun metodo diagnostico. Si seguono i seguenti passaggi:

1. Si apre un nuovo foglio di lavoro Excel e crea una tabella con le seguenti colonne: **"Metodo", "Sensibilità (%)", "Specificità (%)", "Correlazione con SLEDAI"**.
2. Si inseriscono i dati relativi ai diversi metodi analizzati (quelli riportati nella tabella presente nella pagina precedente).
3. Per calcolare la media della sensibilità, si seleziona una cella vuota e si utilizza la formula:

   =MEDIA(range)

   dove **"range"** rappresenta l'intervallo di celle contenente i valori di sensibilità.
4. Si ripete lo stesso procedimento per calcolare la media della specificità.
5. Si ricontrollano i valori in correlazione con SLEDAI e si aggiunge il risultato.
6. Si crea un grafico comparativo per visualizzare le prestazioni diagnostiche dei diversi metodi.

3.4– Procedimento per l'analisi del dsDNA

Per l'analisi del dsDNA, si parte dal macchinario BioFlash, che, dopo l'accensione e i controlli giornalieri volti a confermare la corretta funzionalità delle analisi, consente di procedere con il controllo dei campioni dei pazienti. Viene usato il test QUANTA Flash dsDNA. Nel caso in cui il macchinario non sia stato utilizzato in precedenza, i reagenti sono già caricati nel carosello e mantenuti a temperatura costante grazie al sistema di refrigerazione.



Figura 10 stato dello strumento dopo il carico e la lettura dei campioni

Il dosaggio QUANTA Flash per questo studio è stato sviluppato utilizzando dsDNA sintetico accoppiato alla superficie di microsfere paramagnetiche.

Prima dell'uso, le microsfere liofilizzate vengono risospese utilizzando il tampone di risospensione. Un campione di siero del paziente viene prediluito con il tampone per campioni BIO-FLASH in una piccola cuvetta di plastica monouso. Piccole quantità di siero diluito del paziente, le microsfere e il tampone di analisi vengono tutti combinati in una seconda cuvetta, miscelati e quindi incubati per nove minuti circa a 37 °C.

Le microsfere magnetizzate vengono sedimentate utilizzando un potente magnete nella stazione di lavaggio e lavate più volte, quindi viene aggiunto l'anti-IgG umano coniugato con isoluminolo e nuovamaente incubato per circa nove minuti a 37 °C.



Figura 12 prima fase del test di rivelazione degli anticorpi anti-dsDNA



Figura 13 prima fase di lavaggio del test per la rilevazione degli anticorpi anti-dsDNA

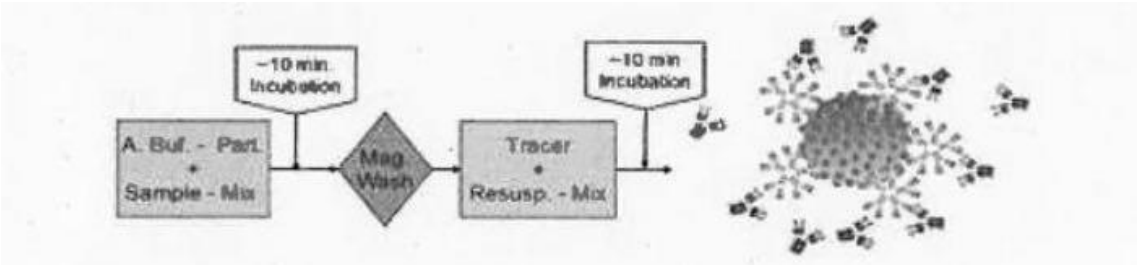


Figura 14 seconda fase di incubazione del test

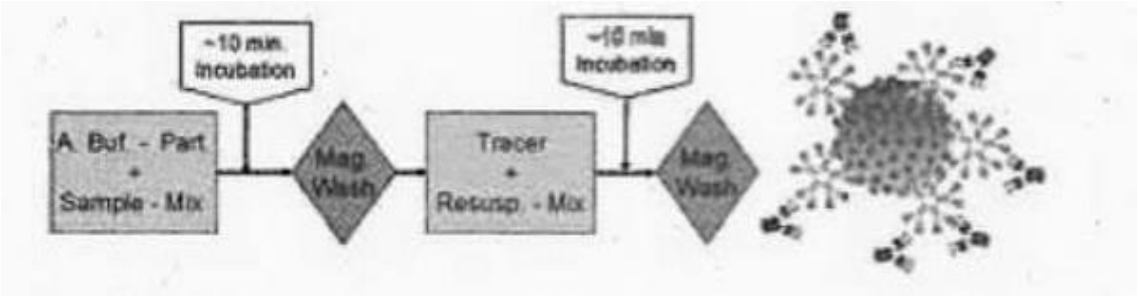


Figura 15 seconda fase di lavaggio del test

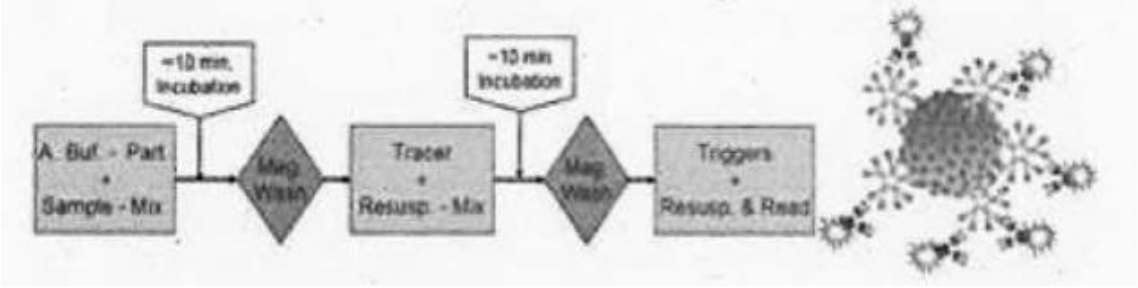


Figura 16 analisi completa per il luminometro

Il coniugato isoluminolo viene ossidato quando la soluzione di idrossido di sodio e le soluzioni di perossido, che sono i triggers, vengono aggiunte alla cuvetta, e il lampo di luce prodotto da questa reazione viene misurato come unità di luce relative (RLU) dal sistema ottico BioFlash.

Le RLU sono proporzionali alla quantità di coniugato isoluminolo legato alle IgG umane, che a sua volta è proporzionale alla quantità di autoanticorpi legati all'antigene sulle microsfere. Per poter convertire il valore di RLU in una concentrazione è necessaria una curva di calibrazione. La Working Curve (curva di lavoro) si ottiene creando una curva che segua l'andamento della master curve, passando però per il valore dei risultati relativi ai calibratori. La working curve è la curva utilizzata dal sistema per estrapolare i valori di concentrazione del campione testato partendo dai valori di RLU misurati.

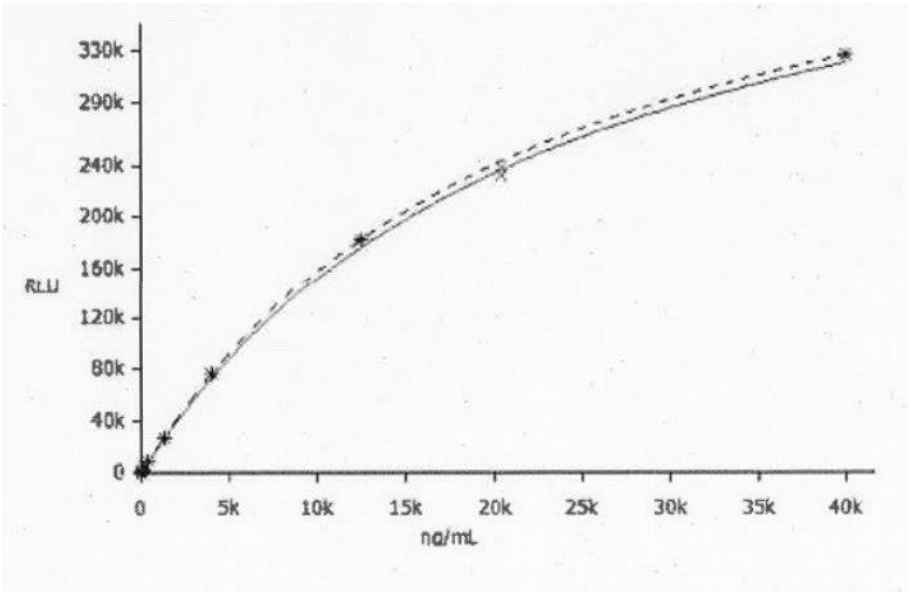
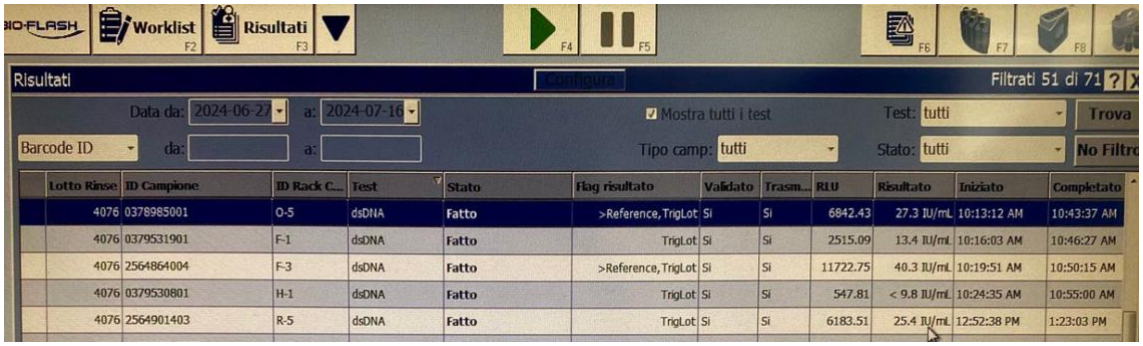


Figura 17 esempio di working curve (linea semplice) e master curve (linea tratteggiata)

L’analisi di un solo campione dura all’incirca 30 minuti e gli altri campioni vengono analizzati ogni minuto circa, valore che poi potrà essere visualizzato sul relativo schermo del computer. Se il valore del campione è superiore a 35 IU/ml, il valore di cut-off fornito dal produttore del macchinario, allora il campione è considerato positivo.



Lotto Rinse	ID Campione	ID Rack C...	Test	Stato	Flag risultato	Validato	Trasm...	RLU	Risultato	Iniziato	Completato
4076	0378985001	O-5	dsDNA	Fatto	>Reference,TrigLot	Si	Si	6842.43	27.3 IU/mL	10:13:12 AM	10:43:37 AM
4076	0379531901	F-1	dsDNA	Fatto	TrigLot	Si	Si	2515.09	13.4 IU/mL	10:16:03 AM	10:46:27 AM
4076	2564864004	F-3	dsDNA	Fatto	>Reference,TrigLot	Si	Si	11722.75	40.3 IU/mL	10:19:51 AM	10:50:15 AM
4076	0379530801	H-1	dsDNA	Fatto	TrigLot	Si	Si	547.81	< 9.8 IU/mL	10:24:35 AM	10:55:00 AM
4076	2564901403	R-5	dsDNA	Fatto	TrigLot	Si	Si	6183.51	25.4 IU/mL	12:52:38 PM	1:23:03 PM

Figura 118 come si visualizzano una parte dei risultati del BioFlash

A questo punto, si procede con il sistema di analisi dsDNA con il QUANTA Lyser. È possibile utilizzare lo stesso campione di siero usato per il BioFlash oppure aliquotarne uno nuovo dal siero rimanente nella provetta di prelievo del paziente.

Il QUANTA Lyser è progettato per gestire l’intero ciclo del test IFA in modo completamente automatico, riducendo notevolmente l’intervento manuale.

L’intero processo inizia con la preparazione del sistema: l’operatore carica i campioni di siero, le piastre già rivestite con DNA a doppio filamento (che funge da antigene), i reagenti del kit (come diluenti, coniugati enzimatici, substrati cromogenici e soluzione di stop) e i controlli necessari.

Procedura di analisi:

- Preparare i vetrini del substrato: Lasciare che il vetrino del substrato raggiunga la temperatura ambiente prima di toglierlo dalla busta. Etichettarlo con una matita e posizionarlo in una camera umida adatta. Aggiungere 1 goccia (20-25µL) di controllo positivo e negativo non diluito nei pozzetti 1 e 2 rispettivamente. Aggiungere 1 goccia (20-25µL) di campione paziente diluito ai pozzetti rimanenti.
- Incubazione del vetrino: Incubare il vetrino per 30-5 minuti in una camera umida (un tovagliolo di carta inumidito posto sul fondo di un contenitore chiuso di plastica o di vetro) per mantenere le condizioni di umidità adeguate. Non lasciare che il substrato si asciughi durante la procedura di analisi.

- Lavaggio dei vetrini: Dopo l'incubazione, utilizzare una bottiglia di plastica o una pipetta per lavare delicatamente il siero con il tampone PBS Il diluito. Orientare il vetrino e il flusso di tampone PBS Il in modo da ridurre al minimo il passaggio dei campioni tra i pozzetti. Evitare di dirigere il flusso direttamente sui pozzetti per evitare di danneggiare il substrato. Se si desidera, posizionare i vetrini in un vaso Coplin con tampone PBS Il diluito per un massimo di 5 minuti.
- Aggiunta del coniugato fluorescente: Eliminare l'eccesso di tampone PBS Il. Riporre il vetrino nella camera umida e coprire immediatamente ogni pozzetto con una goccia di coniugato fluorescente. Incubare i vetrini per altri 30 + 5 minuti.
- Lavare i vetrini: Ripetere il passaggio 3.

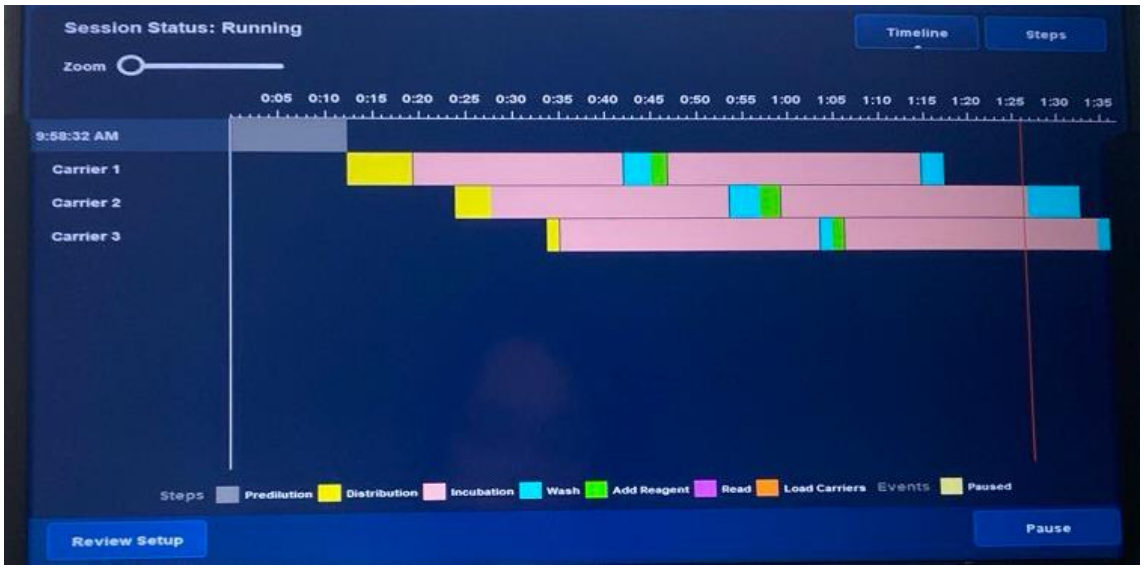


Figura 19 raffigura la sessione di analisi sul Quanta Lyser

Una volta terminata l'analisi, si rimuovono i vetrini e si coprono con un coprivetrino. Si elimina il tampone PBS in eccesso e si aggiungono due gocce di olio. A questo punto, si fa combaciare il bordo inferiore del vetrino con il bordo del coprivetrino. Si abbassa con delicatezza il vetrino sul coprivetrino in modo che l'olio scorra fino al bordo superiore del vetrino senza formare bolle d'aria e copra tutti i pozzetti con i campioni utilizzati.

Prima di passare alla prossima fase ci tengo a spiegare che la corretta interpretazione dei risultati dipende dalle caratteristiche morfologiche dell'organismo Crithidia luciliae.

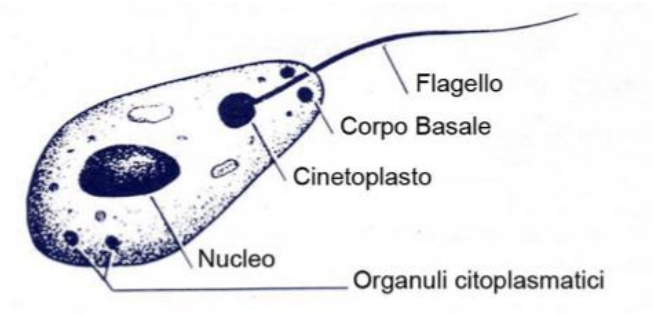


Figura 20 immagine dell'organismo Crithidia luciliae

Il rivestimento esterno è costituito da uno strato di pellicola composto di lipoproteina. Al suo interno si trova la membrana plasmatica che racchiude il citoplasma, formato da:

- Lo strato esterno è costituito da ectoplasma che contiene il corpo basale e il flagello.
- endoplasma, un citoplasma interno molto fluido che contiene il nucleo, il cinetoplasto e altri organuli.

Solitamente, il cinetoplasto è situato più vicino al corpo basale che al nucleo, ma l'esatta posizione di questo organulo può variare da cellula a cellula a causa della natura fluida dell'endoplasma. Per questo motivo, per differenziare chiaramente il cinetoplasto dal nucleo, bisogna prima osservare il pozzetto con il controllo positivo. In ogni caso, il cinetoplasto è sempre quello più vicino al flagello.

I controlli positivo e negativo devono essere eseguiti una sola volta per ogni esame. Se, quindi, in un esame si utilizzano più vetrini per l'analisi del dsDNA, è necessario e sufficiente che il controllo positivo e negativo siano sul primo vetrino in sequenza di esecuzione.

Un siero si considera negativo se la fluorescenza del cinetoplasto è minore o uguale al pozzetto di controllo negativo. La colorazione nucleare, senza colorazione del cinetoplasto, si considera anch'essa negativa.

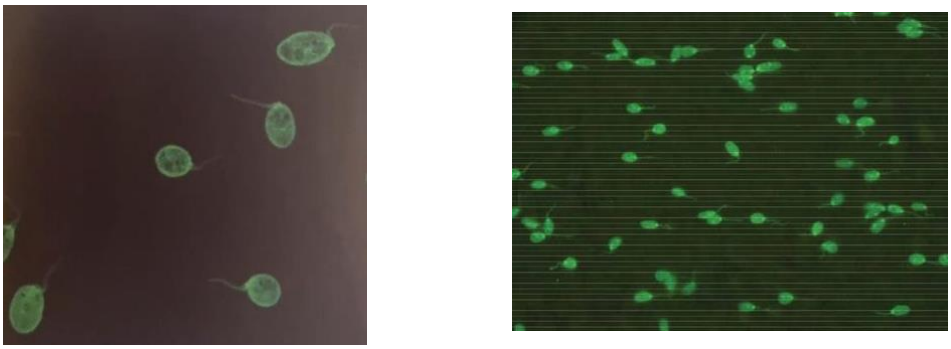


Figura 12 Crithidia negativa

Un siero si considera positivo se il cinetoplasto mostra una colorazione chiaramente distinguibile con fluorescenza maggiore rispetto al pozzetto di controllo negativo e più simile al pozzetto positivo.

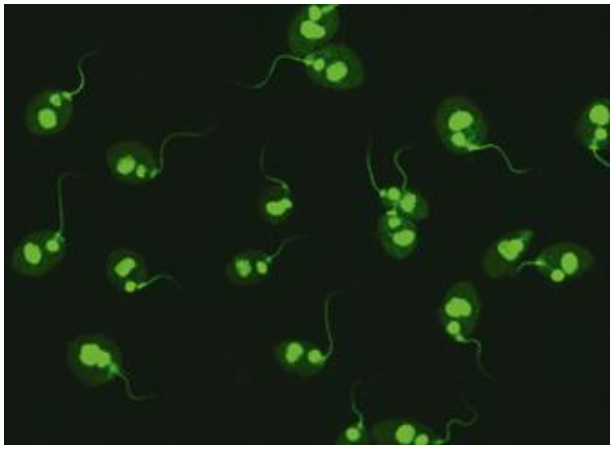


Figura 22 Crithidia positiva

Una volta completata l'osservazione al microscopio a fluorescenza, i risultati del test anti-dsDNA su Crithidia luciliae devono essere inseriti manualmente nel sistema gestionale QUANTA Link. Nella schermata dedicata al test, è necessario compilare i seguenti campi:

- Dilution: viene selezionata la diluizione del siero analizzato, corrispondente a quella utilizzata in fase di preparazione del campione (es. 1/10, 1/20, o titolazioni successive in caso di positività).
- Result: se è presente un segnale fluorescente specifico a livello del cinetoplasto di Crithidia, si seleziona l'opzione POS (positivo), altrimenti si seleziona l'opzione

NEG (negativo). Il cinetoplasto rappresenta il sito di localizzazione specifica del DNA a doppio filamento; pertanto, è l'unico elemento da considerare per la valutazione della positività del test.

- Intensity: è possibile indicare un'intensità soggettiva del segnale (ad es. debole, moderata o forte) o un valore numerico generato dal sistema. Questo parametro aiuta a descrivere la forza della fluorescenza osservata.
- Note: In questo campo è possibile inserire osservazioni aggiuntive, ad esempio la presenza di segnali aspecifici (ad es. fluorescenza nel nucleo ma non nel cinetoplasto) o difficoltà interpretative (ad esempio debolezza del segnale, elevato background, scarsa qualità del vetrino).

Al termine della compilazione, i dati vengono salvati e archiviati nel sistema, rendendoli disponibili per il referto e la tracciabilità diagnostica.

3.5– Calcoli statistici

Per recuperare i dati utilizzati per l'analisi del cut-off, è stato impiegato sempre il QUANTA Link. Questo strumento consente di effettuare una ricerca interna al sistema di tutti i campioni analizzati.

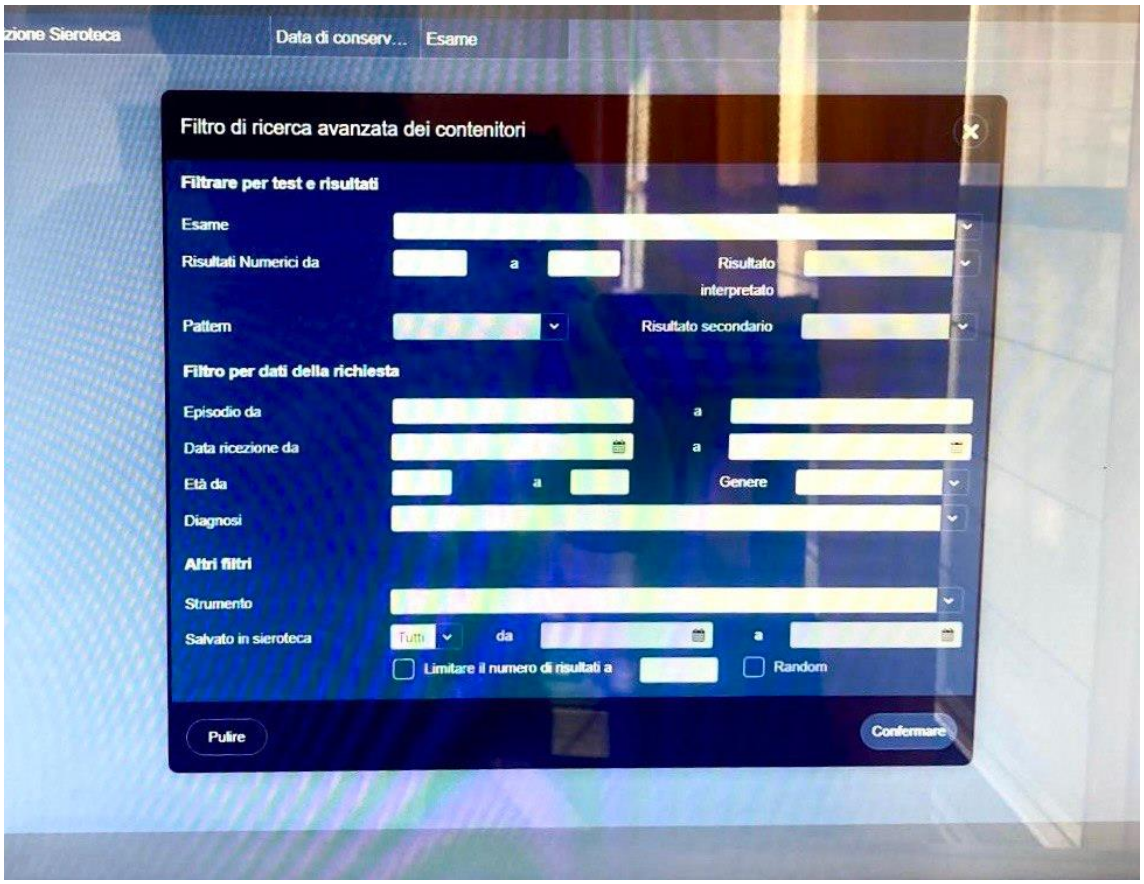


Figura 23 pagina della ricerca avanzata del Quanta Link

Bisogna svolgere due ricerche differenti, una per il BioFlash ed una per il QUANTA Link. Alla pagina della ricerca avanzata inserisco i seguenti dati di mio interesse:

- Esame: "ds DNA" nel caso del BioFlash; "dsDNA IFA (Crithidia Luciliae)" nel caso del QUANTA Lyser
- Risultati numerici da […] a: 35-50 per il BioFlash, P e DP (positivo e debole positivo) per il QUANTA Lyser
- Data ricezione da […] a: 01/03/22 – 27/02/25

Una volta recuperati i file con il nome del contenitore (BC contenitore) ed il valore posso iniziare l'analisi di mio interesse.

Per valutare l'efficacia diagnostica del test BioFlash nell'identificazione della positività anti-dsDNA nei pazienti sospetti di LES, è stata condotta un'analisi ROC basata sui dati forniti dal test iniziale, ds DNA, e dal test di conferma, dsDNA IFA (Crithidia Luciliae). L'obiettivo principale era identificare una soglia di positività (cut-off) che migliorasse la capacità discriminante del test e allo stesso tempo riducesse i costi legati ai test di conferma, effettuati con metodo Crithidia

Il test BioFlash ha come cut-off iniziale un valore di 35 UA/mL; al di sopra di tale valore, i risultati vengono considerati sospetti positivi. Tuttavia, questo valore può generare un numero elevato di falsi positivi, con conseguente aumento dei costi e della necessità di effettuare il secondo test di conferma. Per ottimizzare la soglia di positività del primo test e ridurre il numero di conferme inutili, è stato calcolato il valore di Youden sulla curva ROC ottenuta.

BC Contenitore	Risultati Numerici
2221143501	45,1
240018202	41,8
240053301	43,8
2221229103	44,6
246044201	44,4
246839501	35,1
247714601	46,1
248776801	41,1
2539287301	37,6
2539612003	38,2
3519472005	37,3
250562101	40,9
4106953602	46,4
252209001	37,6

Esempio delle prime quindici righe del file excel sul BioFlash

BC Contenitore	Interpretato Risultato
2537334701	P10
237370201	P10
237358801	P10
2103561101	P10
9004518101	P10
3811826501	P10
239382001	P10
239489001	P10
239736001	P10
240018202	P10
240053301	P10
2537989302	P10
241494901	P10
9004534101	DB10

Esempio delle prime quindici righe del file excel sul QUANTA Lyser

Sono stati analizzati due insiemi di dati:

- Il primo file, relativo al test BioFlash, includeva solo i valori sospetti, ovvero risultati maggiori o uguali a 35 UA/mL, che includevano sia veri positivi che falsi positivi.
- Il secondo file, derivante dal test Crithidia, conteneva esclusivamente i veri positivi, ovvero i pazienti che erano risultati positivi anche al secondo test.

Ogni paziente nel primo file è stato confrontato con l'elenco dei confermati nel secondo file, a cui è stata assegnata un'etichetta:

- 1 per i pazienti confermati positivi (veri positivi).
- 0 per i pazienti non confermati (falsi positivi).

A partire da questi dati è stata generata la curva ROC, che rappresenta la sensibilità del test rispetto al tasso di falsi positivi (1 - specificità) in funzione di diversi valori soglia. Per ciascun punto della curva è stato calcolato lo Youden Index, dato dalla seguente formula:

Youden Index=Sensibilità + Specificità – 1

Il punto della curva con il valore massimo dello Youden Index è stato considerato il cut-off ottimale, corrispondente a 43,6 UA/mL.

4 – RISULTATI

4.1 – Risultati della metanalisi

I risultati ottenuti dal calcolo statistico della metanalisi corrispondono alla seguente tabella:

Metodo	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Correlazione con SLEDAI
Farr	54.1	99	Elevata (renale)
CLIFT	72	98.2	Bassa
ELISA	80.3	85.6	Moderata
CLIA	89.8	95.2	Alta
FEIA	87.5	89.2	Alta
MFI	85.7	92.8	Moderata
Microarray	88.5	92.5	Alta
CMIA	89.8	95.2	Alta
BioPlex	62	85	Alta
Farrzyme ELISA	56	91	Moderata
Farr RIA	97	97	Alta
LIA	22	100	Bassa
PMAT	42.2	87.4	Positiva con SLEDAI-2K
IIF	100	86.2	Alta (BILAG)
EIA	60	47	Moderata

Dall'analisi dei dati emerge che i metodi con la combinazione più favorevole di sensibilità e specificità sono CLIA, CMIA e Microarray, rendendoli particolarmente utili per il monitoraggio clinico del SLE. Il CLIFT, pur avendo un'elevata specificità, presenta una sensibilità inferiore, risultando quindi più adatto come test di conferma. L'uso combinato di esami sensibili e specifici sembra essere l'approccio più efficace per migliorare la diagnosi e il follow-up dei pazienti affetti da LES.

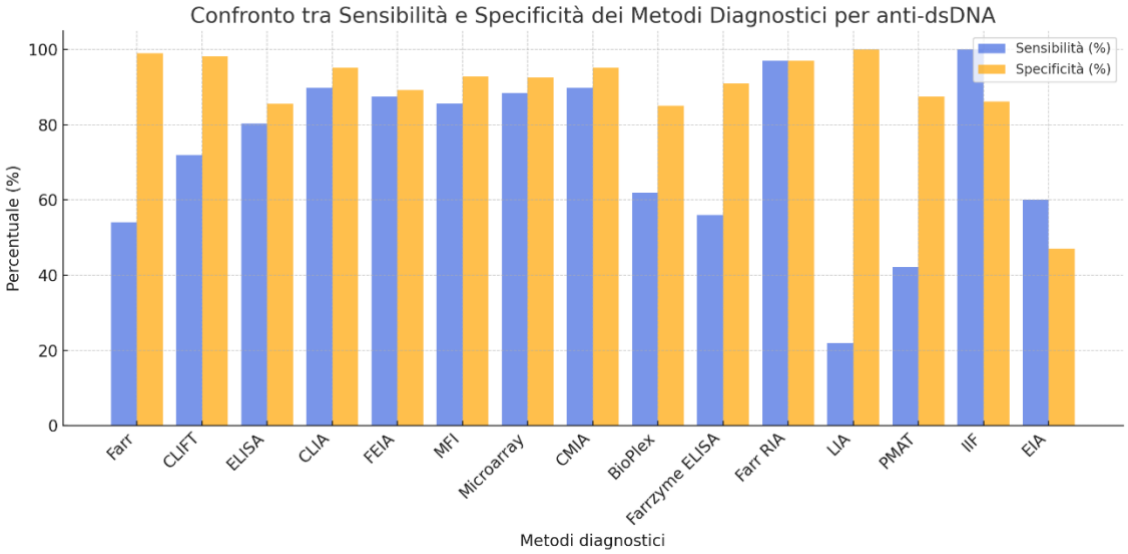


Figura 24 Il seguente grafico comparativo mostra la sensibilità e la specificità dei diversi metodi diagnostici per la rilevazione degli anticorpi anti-dsDNA

- Ogni metodo diagnostico è rappresentato sull'asse X.
- Le barre blu indicano la sensibilità di ciascun metodo.
- Le barre arancioni indicano la specificità dello stesso metodo.
- Il confronto tra le due barre per ogni test consente di valutare il bilanciamento tra sensibilità e specificità.

Considerato che i test ad alta sensibilità sono ideali per la fase di screening, mentre i test ad alta specificità sono fondamentali per la conferma diagnostica, la scelta del metodo diagnostico deve quindi dipendere dal contesto clinico e dagli obiettivi specifici dell'analisi. Di seguito, la lettura del grafico:

- *Metodi con alta sensibilità e bassa specificità*

  Test come IIF (Immunofluorescenza Indiretta) e CLIA (Chemiluminescenza) presentano una sensibilità elevata; quindi, riescono a identificare la maggior parte

dei pazienti con lupus. Tuttavia, la loro specificità è più bassa, il che può comportare un numero maggiore di falsi positivi.

- *Metodi con alta specificità e bassa sensibilità*

  Test come Farr e CLIFT offrono un'elevata specificità, rendendoli ideali per confermare la diagnosi con un rischio minimo di falsi positivi. Tuttavia, la loro sensibilità è inferiore, il che significa che potrebbero non individuare tutti i pazienti affetti, aumentando il numero di falsi negativi.

- *Metodi equilibrati*

  Alcuni test, come CLIA, CMIA e Microarray, mostrano sia un'alta sensibilità che un'alta specificità, rendendoli strumenti ideali sia per la diagnosi che per il monitoraggio della malattia.

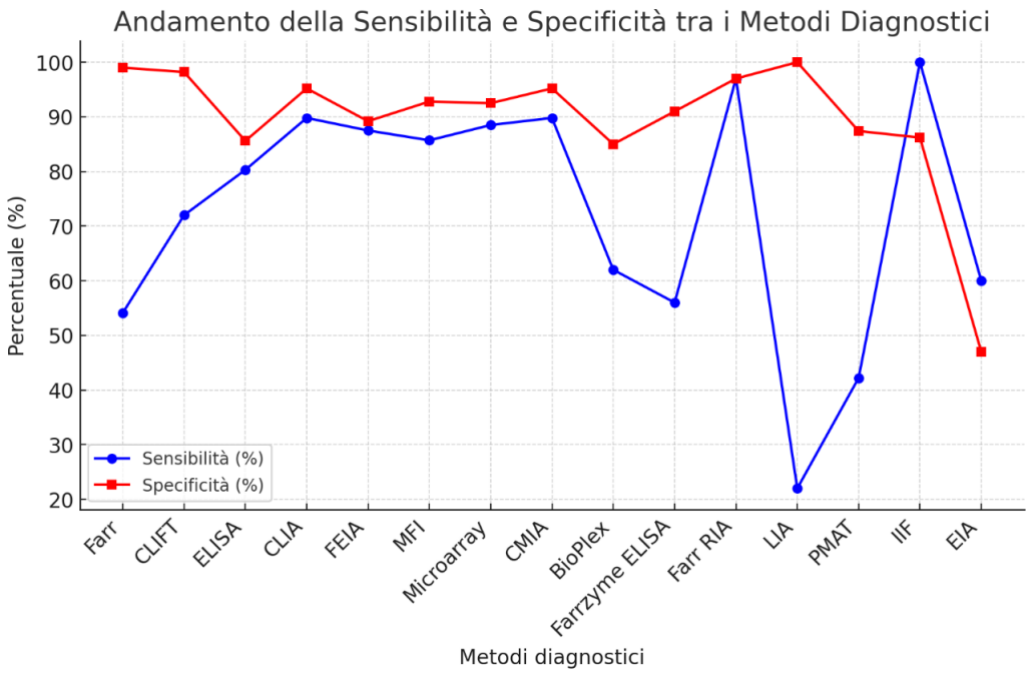


Figura 24 grafico a linee che mostra l'andamento della sensibilità e specificità tra i diversi metodi diagnostici.

Mostra l'andamento della sensibilità e della specificità per ciascun metodo diagnostico analizzato. Questo tipo di rappresentazione grafica permette di mettere in evidenza chiaramente le differenze tra i vari test e di individuare eventuali trend.

La sensibilità di un test indica la sua capacità di identificare correttamente i pazienti affetti da lupus. Valori elevati indicano un metodo più efficace nell'individuazione della

malattia, riducendo il rischio di falsi negativi. Nel grafico si osserva che i test IIF, Farr RIA e CLIA presentano sensibilità elevate, rendendoli particolarmente adatti alla diagnosi precoce della malattia. Un'alta specificità, invece, è particolarmente utile per confermare una diagnosi piuttosto che per il monitoraggio della malattia. Test come LIA, Farr e CLIFT mostrano specificità molto elevate e suggeriscono la loro utilità in contesti in cui è fondamentale ridurre il numero di falsi positivi.

Il grafico mostra come nessun test sia perfettamente bilanciato tra sensibilità e specificità. Alcuni test eccellono nella sensibilità, ma sacrificano la specificità (es. IIF), mentre altri hanno un'elevata specificità, ma una sensibilità più bassa (es. LIA, Farr). Ciò rafforza l'idea che una combinazione di test sia necessaria per garantire una diagnosi più affidabile e un monitoraggio efficace della malattia.

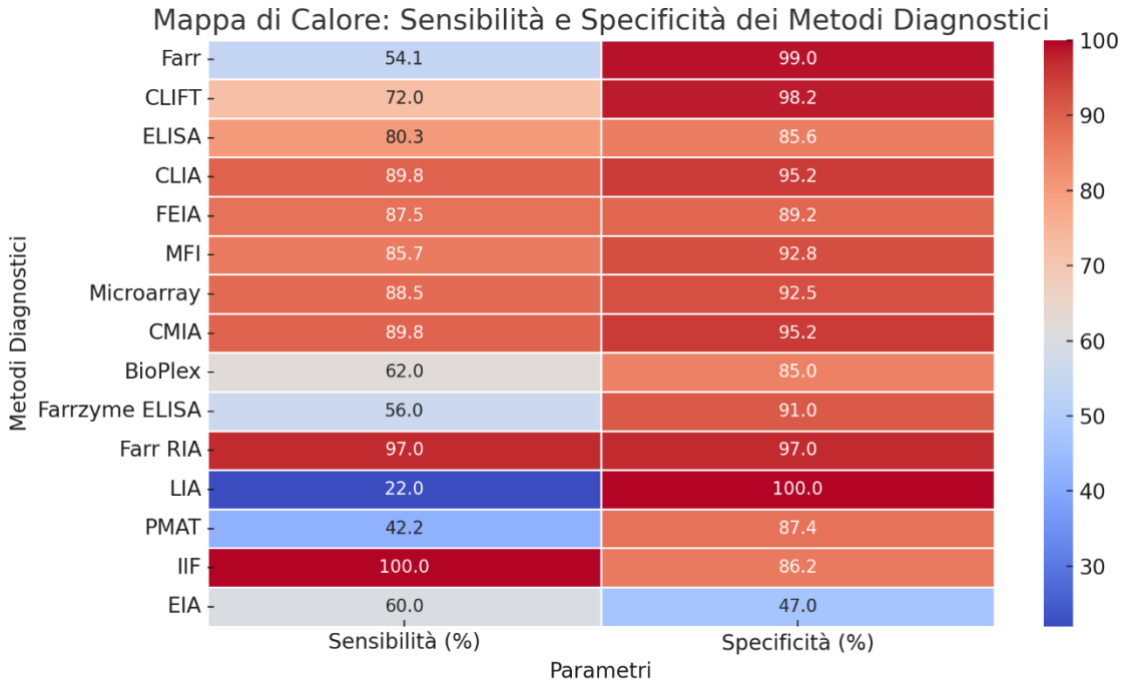


Figura 25 la heatmap (mappa di calore) che rappresenta le sensibilità e specificità dei metodi diagnostici, evidenziando le differenze tra loro con una scala cromatica.

La heatmap è una rappresentazione grafica della precisione dei diversi esami diagnostici basata su una scala di colori che evidenzia i diversi livelli di sensibilità e specificità.

Il colore di gradazione è utile per riconoscere velocemente i risultati che presentano le percentuali più alte o più basse. I colori caldi, come il rosso, corrispondono a percentuali più alte, mentre i colori freddi, come il blu, a percentuali più basse. In questo esempio:

- Le celle con i colori più intensi corrispondono a esami con prestazioni elevate in termini di sensibilità e specificità.
- Le aree più chiare o fredde possono essere esami con prestazioni meno bilanciate, che potrebbero non essere appropriati alla diagnosi e al controllo.

Questo tipo di rappresentazione permette di confrontare facilmente i test e di identificare quelli che presentano un migliore equilibrio tra sensibilità e specificità. Il grafico è molto utile in contesti clinici e di ricerca, in quanto consente di individuare rapidamente i test più affidabili e le situazioni in cui dovrebbero essere utilizzati, senza dover analizzare singolarmente ogni valore numerico.

4.2– Risultati del calcolo del cut-off

Dall'integrazione dei dati ottenuti dai due metodi diagnostici è emerso che un valore di 43,6 UI/mL rappresenta un punto di equilibrio ottimale. Questo cut-off identifica meglio i casi realmente positivi, ma riduce anche il numero di casi in cui il test risulta positivo senza una reale conferma da parte del secondo metodo.

Applicando questo nuovo valore soglia:

- La sensibilità del test (ovvero la capacità di individuare i soggetti realmente positivi) è risultata pari al 46,0%.
- La specificità (ovvero la capacità di escludere correttamente i soggetti non malati) è risultata pari al 67,9%.

Ciò significa che, mantenendo come soglia 43,6 UI/mL, si riesce ancora a identificare quasi la metà dei pazienti realmente positivi, ma si evita circa un terzo dei falsi positivi, contribuendo così a un uso più efficiente delle risorse di laboratorio e riducendo il numero di test Crithidia inutili.

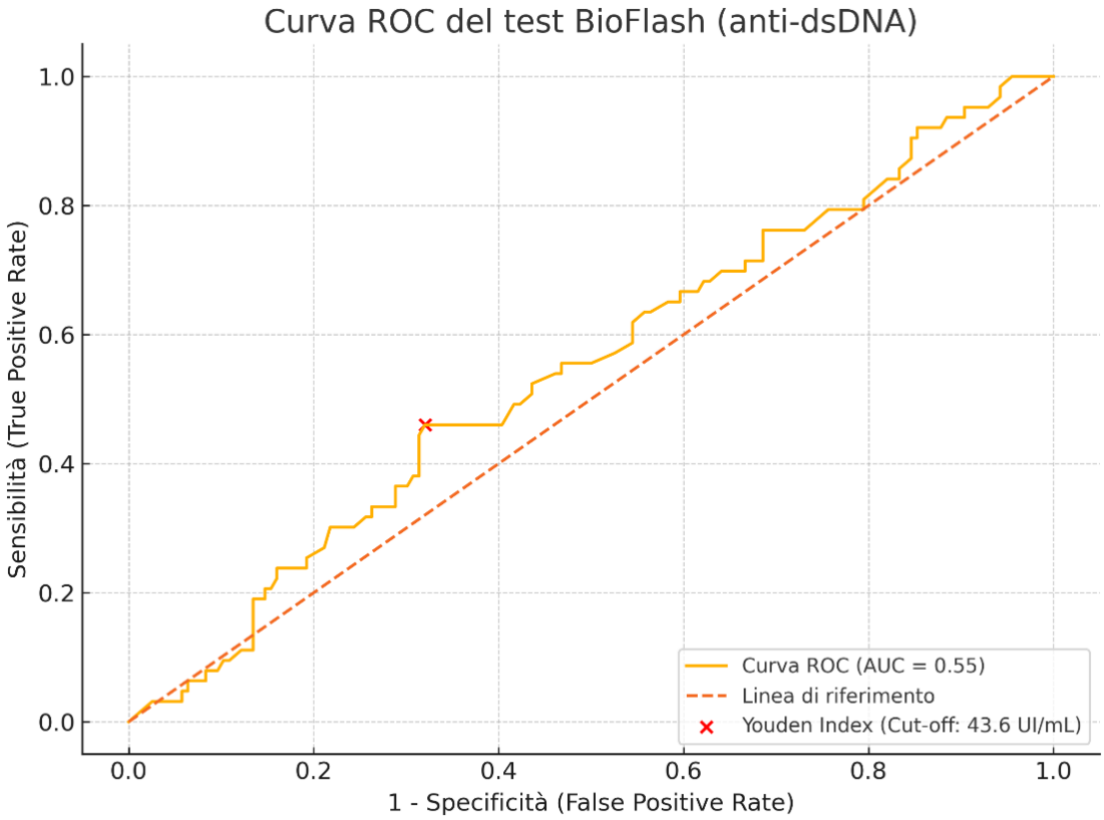


Figura 26 Curva ROC del test BioFlash (anti-dsDNA) risultante dai calcoli statistici fatti

5 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel contesto della diagnosi del LES, l'analisi comparativa dei diversi metodi per la rilevazione degli anticorpi anti-dsDNA ha messo in evidenza come nessuna metodica, singolarmente, sia in grado di garantire un'accuratezza diagnostica e predittiva assoluta. Ogni tecnica presenta vantaggi e limiti specifici, che ne condizionano l'utilizzo in momenti diversi del percorso diagnostico.

I test caratterizzati da un'elevata specificità, come il test di Farr e il Crithidia luciliae (CLIFT), si sono confermati strumenti fondamentali per la conferma della diagnosi, in quanto consentono di ridurre il rischio di falsi positivi. Tuttavia, la loro sensibilità relativamente bassa ne limita l'efficacia nel monitoraggio dell'attività di malattia, risultando meno adatti nel seguire l'andamento clinico dei pazienti nel tempo.

Al contrario, metodiche con sensibilità più elevata, come l'EliA dsDNA e l'Anti-dsDNA-NcX ELISA, hanno dimostrato una maggiore capacità di correlarsi con l'attività della malattia, valutata mediante indici clinici come lo SLEDAI. Questi test risultano quindi più indicati nel follow-up dei pazienti, dove la precisione nella valutazione delle variazioni nel tempo è essenziale. Anche tecnologie più recenti come il PMAT (multiplex particle-based assay), pur mostrando una sensibilità inferiore rispetto ad altri metodi, hanno evidenziato una correlazione statisticamente significativa con l'attività della malattia, suggerendo un ruolo potenziale in ambito clinico.

Questa eterogeneità nei risultati ottenuti evidenzia la necessità di un approccio multimodale, che combini l'uso di test specifici per la conferma diagnostica con test più sensibili per il monitoraggio. L'integrazione di più metodiche consente di migliorare sia l'accuratezza diagnostica sia la gestione clinica personalizzata.

La standardizzazione delle tecniche diagnostiche, in particolare per metodiche come il RIA, rappresenta un punto critico per garantire la riproducibilità dei risultati tra diversi laboratori.

A completamento di queste riflessioni teoriche, è stata condotta un'analisi applicativa in laboratorio, finalizzata a ottimizzare l'utilizzo del test QUANTA Flash (BioFlash), impiegato nella pratica diagnostica per la rilevazione degli anticorpi anti-dsDNA. Attualmente, viene utilizzato un cut-off di 35 UA/mL, indicato dal produttore (Werfen),

sopra il quale i campioni vengono considerati sospetti e inviati a conferma mediante il test Crithidia luciliae.

L'analisi effettuata durante il tirocinio in laboratorio ha consentito di valutare le performance reali del test e di calcolare un cut-off alternativo, pari a 43.6 UA/mL, utilizzando strumenti statistici quali la curva ROC e l'indice di Youden. Questo nuovo valore soglia ha dimostrato di migliorare l'efficienza operativa del laboratorio, riducendo il numero di test di conferma inutili. In particolare, passando dal cut-off standard a quello ottimizzato, il numero di campioni inviati al Crithidia si ridurrebbe da 255 a 140 (–45%), mentre la percentuale di conferme aumenterebbe dal 24,7% al 27,1%, segnalando una selezione più mirata dei campioni.

Tuttavia, questa modifica comporta una perdita in termini di sensibilità: 25 veri positivi (pari al 39,7% di quelli totali) con valore BioFlash compreso tra 35 e 43.5 UA/mL non verrebbero più testati, e quindi sfuggirebbero alla diagnosi. Questo compromesso tra efficienza e accuratezza è centrale nella scelta del cut-off da adottare e va valutato attentamente in base agli obiettivi del laboratorio e del contesto clinico in cui opera.

L'esperienza laboratoristica ha confermato che l'interpretazione dei risultati diagnostici deve sempre avvenire in un'ottica di bilanciamento tra sensibilità, specificità ed efficienza. In contesti clinici di elevata specializzazione, dove è essenziale identificare anche i casi borderline, potrebbe essere preferibile mantenere una soglia più bassa. In altri casi, in cui la sostenibilità economica rappresenta un criterio prioritario, un cut-off più elevato può rappresentare un valido compromesso.

La riflessione complessiva condotta in questo lavoro, che unisce dati di laboratorio reali e considerazioni derivanti dalla letteratura, sottolinea come la diagnosi del LES richieda una strategia flessibile, integrata e basata su evidenze. Nessuna singola metodica risulta sufficiente da sola, ma l'unione di approcci differenti, calibrati sul paziente e sul contesto, rappresenta l'unico percorso realmente efficace.

In conclusione, l'analisi conferma che la diagnosi e il monitoraggio del LES richiedono un approccio integrato e dinamico, che unisca la potenza analitica dei test diagnostici con una visione clinica d'insieme. L'ottimizzazione dei cut-off, l'utilizzo strategico di test con diversa sensibilità e specificità e la progressiva introduzione di strumenti avanzati, come la diagnostica predittiva basata su intelligenza artificiale, sono le chiavi per una gestione personalizzata, precisa ed efficace della patologia.

Resta essenziale, in questo percorso, garantire la standardizzazione dei test per assicurare la riproducibilità dei risultati e promuovere un approccio diagnostico condiviso tra laboratori e clinici.

Sebbene i risultati ottenuti siano promettenti, è importante sottolineare alcuni limiti dello studio. In primo luogo, i dati a disposizione provenivano unicamente da pazienti con valori BioFlash ≥ 35 UA/mL, escludendo di fatto i campioni considerati negativi. Questo ha impedito di valutare la presenza di falsi negativi e di calcolare la sensibilità e la specificità assolute del test rispetto a un gold standard clinico, non disponibile nella documentazione esaminata. Inoltre, il test Crithidia è stato utilizzato come riferimento interno, ma, pur essendo altamente specifico, è noto per la sua bassa sensibilità, e ciò potrebbe aver portato a una sottostima dei veri positivi. A causa della mancanza di dati clinici dettagliati sui pazienti (manifestazioni cliniche), non è stato possibile fornire interpretazioni dei risultati più applicative.

Nonostante questi limiti, lo studio ha permesso di analizzare criticamente un percorso diagnostico reale, suggerendo strumenti pratici per ottimizzarlo, e allo stesso tempo riflettere sulle implicazioni più ampie dell'utilizzo delle metodiche sierologiche nel LES. Il lavoro si propone dunque non solo come valutazione tecnica, ma anche come contributo alla costruzione di un approccio diagnostico più efficiente, preciso e orientato al paziente.

6 – BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Alamanos, Y., & Drosos, A. A. (2005). Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 4(3), 130–136.

- Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. *2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus*. Arthritis Rheumatol. 2019;71(9):1400–12.

- Biesen, R., Dähnrich, C., Rosemann, A., Barkhudarova, F., Rose, T., Jakob, O., Bruns, A., Backhaus, M., Stöcker, W., Schlumberger, W., Egerer, K., & Hiepe, F. (2011). Anti-dsDNA-NcX ELISA: dsDNA-loaded nucleosomes improve diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy, 13*(1), R26.

- Bijlsma, J. W. J., Welsing, P. M., Woodworth, T. G., Middendorp, S., & Smolen, J. S. (2016). The value of patient-reported outcomes in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10), 612–620.

- Cervera, R., Khamashta, M. A., Font, J., Sebastiani, G. D., Gil, A., Lavilla, P., ... & Hughes, G. R. (2003). Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period. *Medicine*, 82(5), 299–308.

- Cockx M, Hooveld L, Decalf V, Libeer JC, Bossuyt X. *Laboratory evaluation of anti-dsDNA antibodies*. Clin Chim Acta. 2022;528:34–43.

- Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Carmona, L., Wolfe, F., Vos, T., ... & March, L. (2014). The global burden of rheumatoid arthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(7), 1316–1322.

- Dougados, M., Betteridge, N., Burmester, G. R., Czirják, L., Cutolo, M., da Silva, J. A. P., ... & van der Heijde, D. (2009). EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(6), 976–982.

- El-Chennawi, F. A., Mosaad, Y. M., Habib, H. M., & El-Degheidi, T. (2009). Comparative study of antinuclear antibody detection by indirect immunofluorescence and enzyme immunoassay in lupus patients. *Immunological Investigations, 38*(8), 839–850.

- Enocsson, H., Dahle, C., Kastbom, A., Wetterö, J., & Gunnarsson, I. (2013, April). Comparison of three assays to assess antibodies against double-stranded DNA in systemic lupus erythematosus. *Poster presented at the ACR Conference*.

- Falk, R. J., & Jennette, J. C. (2010). ANCA disease: where is this field heading? *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(5), 745–752.

- Firestein, G. S., Budd, R. C., Gabriel, S. E., McInnes, I. B., & O'Dell, J. R. (2017). *Kelley's Textbook of Rheumatology* (10th ed.). Elsevier.

- Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019). Osteoarthritis. *Lancet*, 393(10182), 1745–1759. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9

- Infantino, M., Palterer, B., Previtali, G., Alessio, M. G., Villalta, D., Carbone, T., Platzgummer, S., Paura, G., Castiglione, C., Fabris, M., Pesce, G., Porcelli, B., Terzuoli, L., Bacarelli, M.-R., Tampoia, M., Cinquanta, L., Brusca, I., Buzzolini, F., Benucci, M., ... Bizzaro, N. (2022). Comparison of current methods for anti-dsDNA antibody detection and reshaping diagnostic strategies. *Scandinavian Journal of Immunology, 96*(6), e13220.

- Isenberg DA, Rahman A. *Systemic lupus erythematosus*. Lancet. 2006;367(9511):587–96.

- Isenberg, D. A., Dudeney, C., Williams, W., Addison, I., Charles, S., Clarke, J., & Todd-Pokropek, A. (1987). Measurement of anti-DNA antibodies: a reappraisal using five different methods. *Annals of the Rheumatic Diseases, 46*(6), 448–456.

- Isenberg, D., Maddison, P., Woo, P., Glass, D., & Breedveld, F. (2005). *Oxford Textbook of Rheumatology* (3rd ed.). Oxford University Press.

- Jennette, J. C., Falk, R. J., Bacon, P. A., Basu, N., Cid, M. C., Ferrario, F., ... & Watts, R. A. (2013). 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis & Rheumatism*, 65(1), 1–11.

- Lemarié, R., Jacomet, F., Goutte, B., Bonnafoux, C., Tridon, A., & Evrard, B. (2011). The anti-dsDNA antibodies: Validation of an original two-step strategy of detection. *Annales de Biologie Clinique, 69*(1), 47–53.

- Lorca-Arce, D., Pérez-Isidro, A., Becerra, J., Martínez, M. J., De Moner, N., Ríos-Garcés, R., Prieto-González, S., Espinosa, G., Cervera, R., Andalucía, C., Viñas-Gomis, O., & Ruiz-Ortiz, E. (2024). Evaluation of a novel particle-based assay for detecting SLE-related autoantibodies. *Heliyon, 10*, e30767.

- Mahler M, Fritzler MJ. *Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci. 2015;1343:42–58.

- Moore, R. A., Derry, S., Wiffen, P. J., & Straube, S. (2013). Costs and consequences of systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Arthritis Care & Research*, 65(9), 1453–1460.

- Pincus, T., Callahan, L. F., Sale, W. G., Brooks, A. L., Payne, L. E., & Vaughn, W. K. (2003). Severe functional declines, work disability, and

increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis & Rheumatism*, 27(8), 864–872.

- Pisetsky DS. *Anti-DNA antibodies—quintessential biomarkers of SLE*. Nat Rev Rheumatol. 2016;12(2):102–10.
- Rahman, A., & Isenberg, D. A. (2008). Systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine*, 358(9), 929–939.
- Riboldi, P., Gerosa, M., Moroni, G., Radice, A., Allegri, F., Sinico, A., Tincani, A., & Meroni, P. L. (2005). Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity, 38*(1), 39–45.
- Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. *Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients*. Semin Arthritis Rheum. 2004;34(2):501–37.
- Singh, J. A., Saag, K. G., Bridges, S. L., Akl, E. A., Bannuru, R. R., Sullivan, M. C., ... & McAlindon, T. (2016). 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 68(1), 1–26. https://doi.org/10.1002/art.39480
- Smolen, J. S., Aletaha, D., McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 388(10055), 2023–2038.
- Smolen, J. S., Landewé, R. B. M., Bijlsma, J. W. J., Burmester, G. R., Dougados, M., Kerschbaumer, A., ... & van der Heijde, D. (2020). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(6), 685–699.

- Somerfield, S. D., Roberts, M. W., & Booth, R. J. (1981). Double-stranded DNA antibodies: A comparison of four methods of detection. *Journal of Clinical Pathology, 34*(9), 1032–1035.

- Tozzoli R, Bizzaro N, Villalta D, Fabris M, Tonutti E, Bassetti D. *New technologies in the laboratory diagnosis of autoimmune diseases*. Clin Chem Lab Med. 2020;58(6):909–20.

- Tozzoli, R., Bizzaro, N., Villalta, D., & Tonutti, E. (2016). *Il laboratorio nelle malattie reumatiche autoimmuni* (2ª ed., pp. 3–7, 26–28, 335, 341, 377). Società Editrice Esculapio.

- Tsokos, G. C. (2011). Systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine*, 365(22), 2110–2121.

- Tunnicliffe, D. J., Singh-Grewal, D., Craig, J. C., & Tong, A. (2015). Lupus means sacrifices: Perspectives of adolescents and young adults with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 24(7), 765–771.

- Van der Heijde, D., Ramiro, S., Landewé, R., Baraliakos, X., Van den Bosch, F., Sepriano, A., ... & Dougados, M. (2017). 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(6), 978–991.

- Venner, A. A., Ibañez, D., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., MacKinnon, A., Blasutig, I. M., & Yip, P. M. (2013). Comparison of three anti-dsDNA assays: Performance and correlation with systemic lupus erythematosus disease activity. *Clinical Biochemistry, 46*(4-5), 317–320.

- Villalta, D., Bizzaro, N., Corazza, D., Tozzoli, R., & Tonutti, E. (2002). Evaluation of a new automated enzyme fluoroimmunoassay using recombinant plasmid dsDNA for the detection of anti-dsDNA antibodies in SLE. *Journal of Clinical Laboratory Analysis, 16*(5), 227–232.

- Vos, T., Lim, S. S., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi, M., Abbasifard, M., ... & Murray, C. J. L. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 396(10258), 1204–1222.

- Wei, Q., Jiang, Y., Xiao, M., Zhang, X., Qi, J., Xie, J., Wu, J., Wu, Z., & Gu, J. (2020). Comparison of chemiluminescence microparticle immunoassay, indirect immunofluorescence assay, linear immunoassay and multiple microbead immunoassay detecting autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Immunology, 91*(3), e12849.

- Wener MH. *Laboratory Tests in the Diagnosis and Monitoring of Systemic Lupus Erythematosus*. J Immunol Methods. 2014;418:4–10.

- Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2006). Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Medical Clinics of North America*, 90(5), 955–970.

- Wolfe, F., Clauw, D. J., Fitzcharles, M. A., Goldenberg, D. L., Häuser, W., Katz, R. S., ... & Walitt, B. (2010). The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care & Research*, 62(5), 600–610.

- Wongjarit, K., Thammacharoenrach, N., Dityen, K., Kaewopas, Y., Kositpesat, N., Ukritchon, S., Osiri, M., & Wongpiyabovorn, J. (2023). Determination of specific autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus by line immunoassay, ELISA and CLIF. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 41*(1), 73–79.

- Yates, M., Watts, R. A., Bajema, I. M., Cid, M. C., Crestani, B., Hauser, T., ... & Mukhtyar, C. (2016). EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(9), 1583–1594.

- Zaminski, D., Saxena, A., Izmirly, P., Buyon, J. P., & Belmont, H. M. (2023). Clinical implications of discordance between anti-dsDNA antibodies by multiplex flow immunoassay and *Crithidia luciliae* assay in a multiethnic racial cohort of patients with SLE. *Lupus Science & Medicine, 10*.

Sitografia

https://www.euroimmun.com/products/autoimmune-diagnostics/id/rheumatology/sle/

https://www.fluorescencemicroscopy.it/diascopia.html

https://www.microscope.healthcare.nikon.com/it_EU/products/upright-microscopes/eclipse-si

https://www.werfen.com/na/en

https://www.youtube.com/@MEDISTSRL

https://www.youtube.com/watch?v=tkam0AmOiOo

7 – RINGRAZIAMENTI

In primis vorrei ringraziare l'ospedale Martini, in particolare il Dott. Nigra, per avermi accolto nella loro struttura e laboratorio analisi per lo svolgimento del mio stage. Ringrazio la mia tutor, la Dott.ssa Plateroti, per avermi seguito fino alla conclusione del mio percorso di tirocinio e di questa tesi, per essersi interessata nell'aiutarmi sia ad ambientarmi nel laboratorio analisi ospedaliero, mia prima esperienza, sia per avermi insegnato le varie procedure e analisi che un laboratorio deve saper effettuare al meglio, come il Martini. Ringrazio anche tutto lo staff del laboratorio, i medici, i tecnici e gli altri biologi, per avermi accolto così caldamente ed avermi sostenuto nella mia formazione, non insegandomi solo quello che il mio ruolo dovrebbe andare a ricoprire, ma insegandomi anche i loro di ruoli e facendomi mettere mano, in alcuni casi dove legge permetteva letteralmente, nelle analisi che si dovevano svolgere. Vi ringrazio per avermi fatto sentire come una di voi, di avermi fatto sentire come a casa. Probabilmente esagero, ma è quello che io ho percepito da voi tutti, chi più chi meno :)

In secundis vorrei ringraziare la mia università ed i miei docenti, soprattutto la Dott.ssa Magnelli mia relatrice. Senza i vostri corsi, il vostro interesse nell'insegnare, il vostro venirci incontro fin quanto possibile e anche il vostro bocciarci, non solo promuoverci, non sarei riuscita ad avere una preparazione tale da potermi ambientare nel laboratorio dove ho svolto lo stage. Senza il vostro aiuto nell'insegnarci la biologia inerente al nostro corso, non sarei arrivata dove sono ora in questo momento. Sicuramente un giorno ci sarei arrivata, ma se l'ambiente fosse stato ostile, probabilmente non sarei oggi qua alla sessione straordinaria in regola con gli studi.

In ultimo, ma non per importanza, vorrei ringraziare la scuola dove lavoro. In questi due anni di studio mi avete anche voi sostenuto nel poter proseguire gli studi. Mi avete anche voi accolto calorosamente e venuti incontro quando avevo bisogno di giornate complicate a causa di studio ed esami. Vorrei ringraziare i miei amici, sia i vecchi sia i nuovi fatti in questi due anni, senza il sostenerci a vicenda, senza il vostro sopportarmi nelle mie lamentele e crisi per il troppo da fare o per la paura di affrontare un esame, senza il vostro

incoraggiamento, senza di voi, avrei avuto difficolta nel continuare il mio percorso. Noi sappiamo quanto abbiamo dato, tutti noi, e sono fiera di quello che siamo oggi.

Le ultime righe di ringraziamento le voglio dedicare alla mia piccola, grande famiglia. In questi ultimi anni ci sono stati molti alti e bassi e sappiamo tutti a cosa mi riferisco. Non è stato semplice per nessuno, anche per chi fa il duro ed il forte tutto il tempo. Sappiamo quanto è stata dura e quanta strada si deve ancora fare, ma ci riusciremo, come io sono riuscita a concludere anche questo percorso. Forse non è il voto che vi aspettavate o forse vi può andar bene, ma sappiate che ne sono felice di come si è conclusa. Grazie per avermi sorretto, e non solo economicamente, per tutti questi anni e grazie per aver reso casa quasi uno zoo, creando un inconscio “pet therapy”. Vi voglio bene.