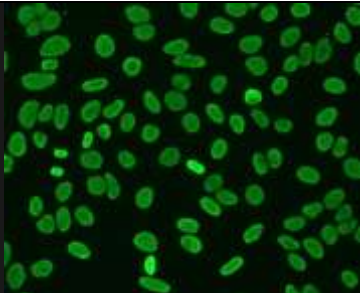
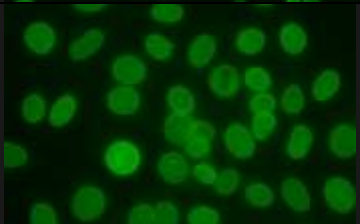
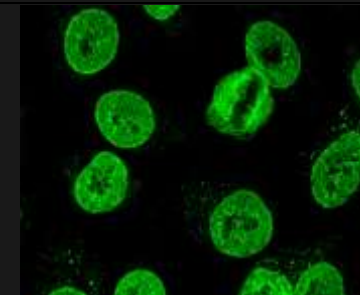
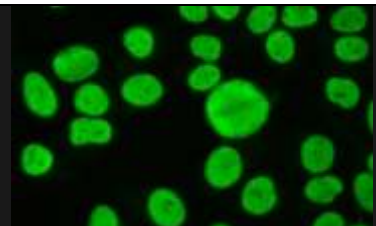
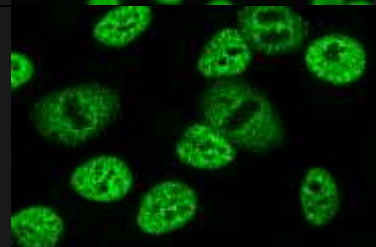
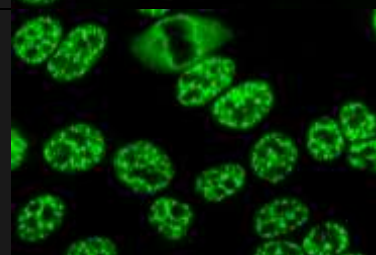
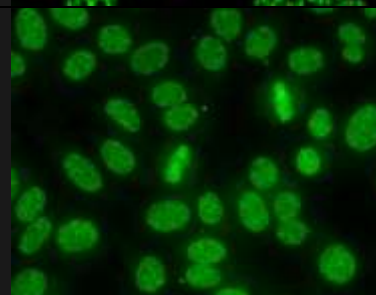

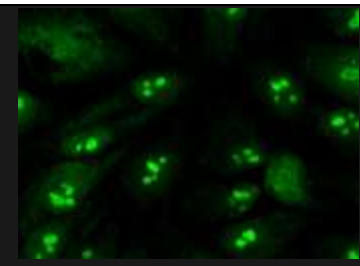
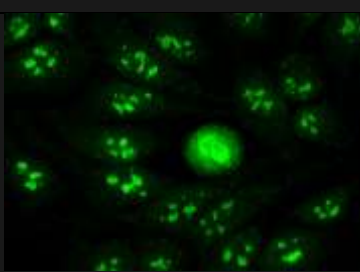
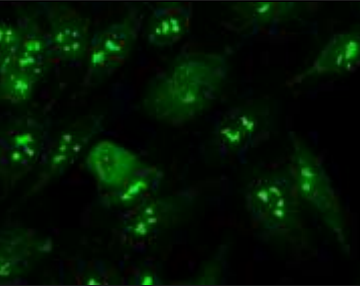
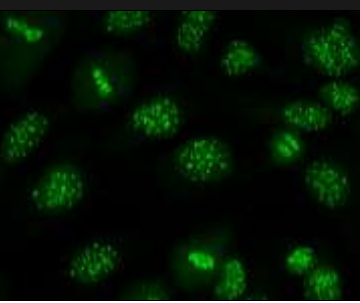
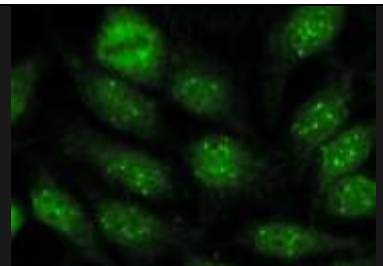

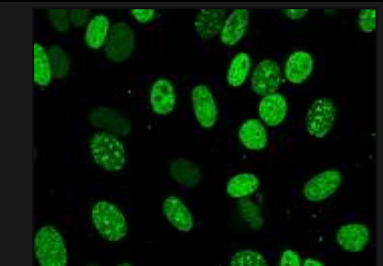

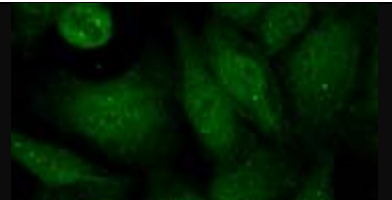
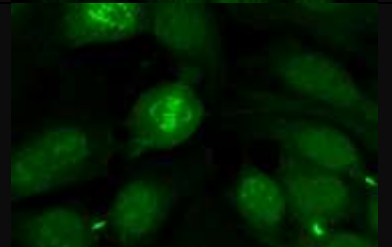
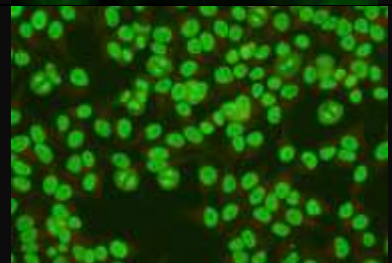
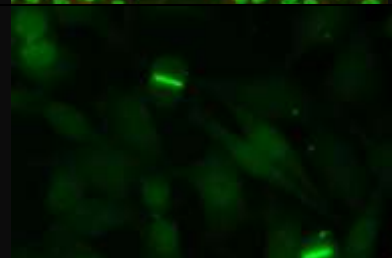


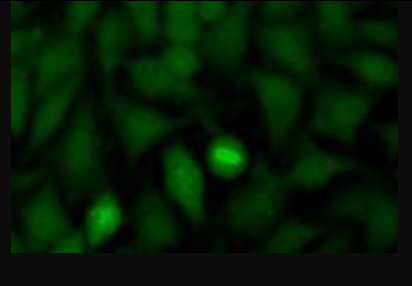
PATTERN NUCLEARI				
DEFINIZIONE	DESCRIZIONE MORFOLOGICA	ANTIGENI	PATOLOGIE ASSOCIATE	IMMAGINE FLUOROSCOPICA
Omogeneo (Homogeneous)	Fluorescenza diffusa uniforme dell'intero nucleo delle cellule in interfase. I nucleoli possono essere fluorescenti o meno in funzione del tipo di cellule HEp2 utilizzato come substrato. Fluorescenza omogenea associata alla cromatina condensata nelle cellule in mitosi.	dsDNA, istoni, nucleosomi, HMG	LES, LES indotto da farmaci, artrite idiopatica giovanile, AIH.	
Membrana nucleare (Smooth nuclear envelope)	Fluorescenza omogenea del nucleo in interfase con netta accentuazione della fluorescenza sulla membrana nucleare. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi. La fluorescenza perinucleare è accentuata nel punto di contatto tra cellule adiacenti.	Lamina A, B, C	LES, SjS, AR, artriti sieronegative.	
Nuclear Pore Complex	Fluorescenza punteggiata e discontinua a livello della membrana nucleare (pori nucleari) della cellule in interfase, assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	gp 210, nucleoporina p62	PBC, AIH.	

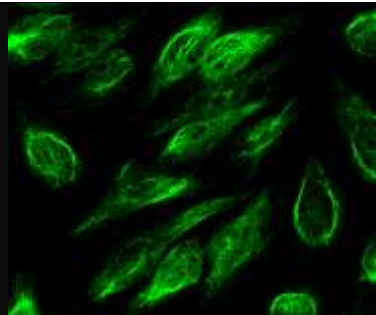
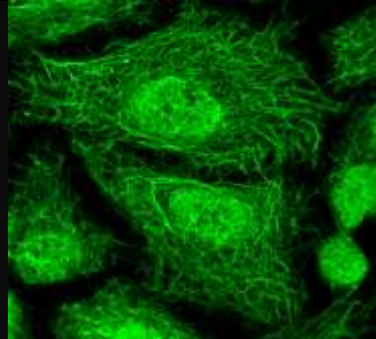
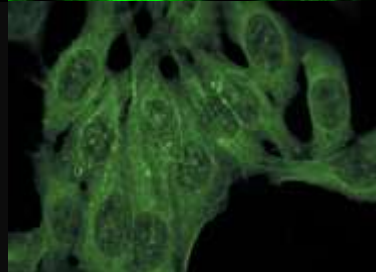
Granulare (Speckled)	A) Fine Speckled	Fluorescenza finemente granulare e uniformemente distribuita su tutto il nucleo che può interessare anche i nucleoli. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	SS-A/Ro, SS-B/La, Mi-2, Ku	LES, SjS, SSc, MCTD, DM/PM	
	B) Coarse Speckled <i>uniamo</i>	Fluorescenza distribuita su tutto il nucleo con granulazione di media grandezza. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	hnRNP, U1-snRNP, U2-snRNP Sm, RNA polymerase III	MCTD, LES, SS, SjS, UCTD, Fenomeno di Raynaud	
	C) Nuclear Matrix <i>uniamo</i>	Fluorescenza a grandi granuli localizzata soprattutto attorno ai nucleoli. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	hnRNP	LES, MCTD, AR, SSc	
	D) Dense fine speckled	Pattern di tipo speckled nel nucleo in interfase con una eterogeneità nella dimensione, intensità di fluorescenza e distribuzione dei granuli. Fluorescenza "granulare" associata alla cromatina durante la metafase.	DFS70/LEDGF	SjS (rara), SSc, LES, controlli sani.	
	Diffuse grainy	Fluorescenza a smeriglio del nucleo e dei nucleoli. Fluorescenza granulare dei nucleoli e della mitosi tipo NOR-90. Fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi. Tale pattern è suggestivo ma non specifico, la presenza di anticorpi anti Scl-70 deve essere confermata con test specifici.	Topoisomerasi I (Scl-70)	dcSSc, SLE, Raynaud	


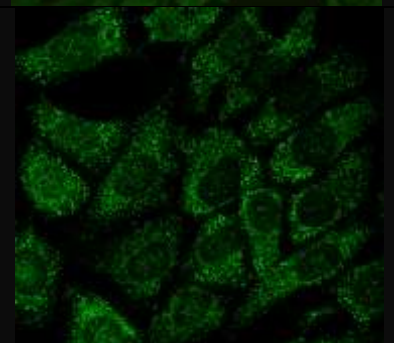
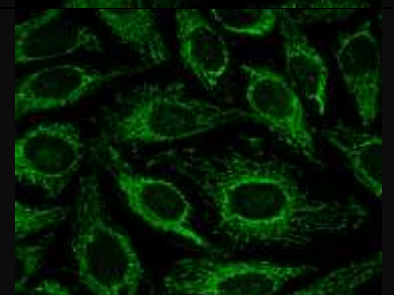
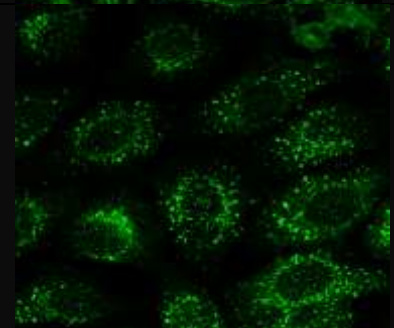
Nucleolare (Nucleolar)	A) Omogeneo	Fluorescenza omogenea dell'intero nucleolo. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleophosmin, nucleolin, No55/SC65	SSc, SSc/PM overlap	
	B) Clumpy	Colorazione irregolare dei nucleoli e dei corpi di Cajal. Fluorescenza pericromosomica durante la mitosi.	U3-snoRNP/fibrillarin	SSc	
	C) Speckled	Fluorescenza granulare dei nucleoli. Durante la metafase si evidenziano fino a 5 dots fluorescenti impilati relativi alla regione dell'organizzatore nucleolare (NOR).	RNA polymerase I, hUBF/NOR-90	SSc, SjS	
Centromerico (Centromere)		Fluorescenza puntiforme (40-80 dots/cellula) distribuita all'interno del nucleo in interfase, durante la mitosi la fluorescenza si evidenzia come dots allineati lungo la cromatina.	CENP A/B (C)	lc SSc, PBC, CREST	

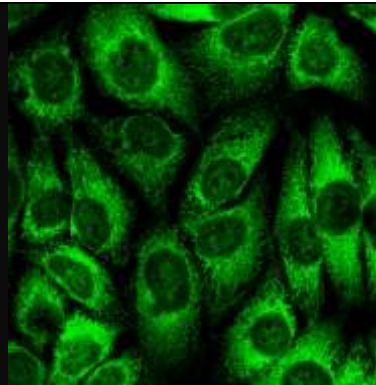
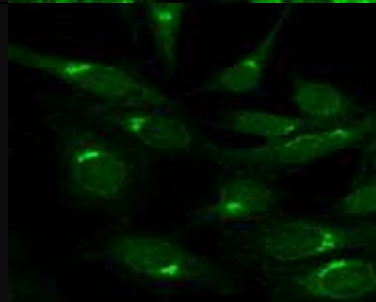
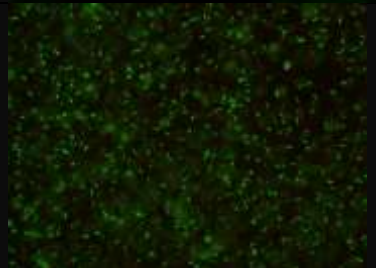
Nuclear dots	Multiple nuclear dots	Fluorescenza puntiforme (6-20 dots/cellula) distribuita all'interno del nucleo in interfase. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	Sp-100, Sp-140, PML proteins, MJ/NXP-2	PBC, AIH, DM, SARD	
	Few nuclear dots	Fluorescenza puntiforme (1-6 dots/cellula). La fluorescenza è riferita ai corpi di Cajal. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	p-80 coilina	SjS, LES, SSc, PM, controlli sani, AIH	
Ciclo cellulare	PCNA	Pattern di tipo speckled pleomorfo con variabilità sia nelle dimensioni sia nell'intensità di fluorescenza della punteggiatura speckled. L'antigene, essendo legato al ciclo cellulare, non è espresso in tutte le fasi del ciclo. Le cellule in fase G1 sono negative, le cellule in fase S sono intensamente fluorescenti, mentre in fase S-tardiva e G2-precocce, si può avere fluorescenza dei nucleoli e punteggiatura poco evidente. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	Ciclina (fattore di processività della DNA polimerasi δ - PFDP δ)	LES, Epatite cronica B o C, SSc.	
	CENP-F	Pattern di tipo speckled non pleomorfo ma con differente intensità di colorazione nelle diverse fasi del ciclo cellulare. La fluorescenza è più intensa in fase G2, scarsa/negativa in G1. I centromeri, fluorescenti solo in prometafase e metafase, si evidenziano come dots piccoli e poco fluorescenti allineati.	Mitosina	È prevalentemente associato a patologie neoplastiche. E' ancora in corso di definizione l'associazione di questi autoanticorpi con la patologia.	

PATTERN MITOTICI				
DEFINIZIONE	DESCRIZIONE MORFOLOGICA	ANTIGENI	PATOLOGIE ASSOCIATE	IMMAGINE FLUOROSCOPICA
Centriolo/Centrosoma (Centriole/Centrosome)	Fluorescenza a spot del centriolo (1/2 per cellula in interfase nel citoplasma), localizzata ai poli dell'apparato mitotico durante la metafase. Assenza di fluorescenza della cromatina condensata durante la mitosi.	Pericentrina, Nineina, Cep250, Cep110	SSc, Raynaud, patologie infettive (virus e mycoplasma)	
Fuso mitotico (NuMa-2) (Mitotic Spindle)	Fluorescenza fibrillare del fuso mitotico associata a fluorescenza a "forma di cono" dei due poli mitotici.	HsEg5	SjS (rara), LES, CTD	
NuMA-Like (MSA-1)	Fluorescenza simile al pattern MSA-2 associata a un pattern nucleare di tipo speckled.	NuMA-1 (210 kDa)	SjS (rara) LES. Marcatore aspecifico legato anche ad altre condizioni come infezioni da <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Midbody (MSA-2)	Fluorescenza nel punto di contatto tra due cellule nella fase finale della divisione (telofase).	ATPasi	SSc, Fenomeno di Raynaud	

<p>Mitotic chromosomal envelope</p>	<p>Fluorescenza della cromatina in profase e metaphase. Assenza di fluorescenza nei nuclei in interfase.</p>	<p>Proteina istonica H3, MCA-1</p>	<p>LES discoide (rara), Leucemia linfocitica cronica, SjS, polimialgia reumatica.</p>	
--	--	--	---	---

PATTERN CITOPLASMATICI				
DEFINIZIONE	DESCRIZIONE MORFOLOGICA	ANTIGENI	PATOLOGIE ASSOCIATE	IMMAGINE FLUOROSCOPICA
Filamentoso /Actina (Filamentous/Actin)	Fluorescenza dei microfilamenti del citoscheletro che assumono l'aspetto di fasci fibrosi paralleli che si estendono lungo tutto l'asse delle cellule in interfase. La fluorescenza ricopre in parte il nucleo. Nelle cellule in metafase la fluorescenza si condensa in granuli citoplasmatici. Le fibre appaiono disposte su un unico piano. Si confronta con tipica fluorescenza su sezione di stomaco di roditore.	Actina	AIH, PBC, MCTD, myasthenia gravis, Morbo di Crohn	
Filamentoso /Vimentina (Filamentous/Vimentin)	Fluorescenza dei filamenti intermedi del citoscheletro che assumono l'aspetto di fasci fibrosi radiali o di strie attorcigliate o spiraliformi, che si estendono lungo tutto l'asse delle cellule in interfase. Le cellule in metafase presentano fluorescenza granulare del citoplasma.	Vimentina, Citocheratina	Patologie infettive/infiammatorie, epatopatie alcoliche, SARD, psoriasi, controlli sani	
Fibrillare a segmenti (Fibrillar segmental)	Fluorescenza di fibre corte provviste di propaggini di tipo dendritico. Fluorescenza di fibre corte adiacenti al nucleo e alla membrana citoplasmatica	Alpha-actinina, tropo miosina, vinculina	Miastenia gravis, morbo di Crohn, Colite ulcerosa	

Dense fine speckled	Fluorescenza densa di aspetto omogeneo o finemente granulare che ricopre tutto il citoplasma detta "milky way" che si condensa in zona perinucleare e diminuisce d'intensità verso la membrana citoplasmatica, negativo lo spazio internucleolare.	PL-7, PL-12, proteina P ribosomiale	Sindrome anti-sintetasi, PM/DM, LES, LES giovanile, LES con interessamento neuropsichiatrico.	
Fine speckled	Fluorescenza a fini granuli del citoplasma che si condensa in zona perinucleare e diminuisce d'intensità verso la membrana citoplasmatica.	Jo-1/histidyl-tRNA synthetase	Sindrome anti-sintetasi, PM/DM, SSc, PM con fibrosi polmonare	
Reticolare/mitocondrio (Cytoplasmic reticular/mitochondria)	Fluorescenza a granuli irregolari con netto rinforzo in sede perinucleare e con aspetto citoplasmatico filamentoso. Si confronta con tipica fluorescenza su sezione di fegato, rene e stomaco di ratto.	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, sub unità E1α della PDC, E3BP/proteina X	PBC	
Lisosomiale-like (Lysosome-like) GW-Like	Fluorescenza di aspetto granulare puntiforme distribuita irregolarmente nel citoplasma con granuli di grandi dimensioni.	Endosomi (early endosome antigen 1), GW/Processing bodies (GW182, Su/Ago2), corpi multivescicolari/lisosomi	LES, SjS, RA, PBC, UCTD, patologie neurologiche	

SRP	Fluorescenza citoplasmatica da fine speckled a granulare. Negativi i nuclei e nucleoli.	SRP	PM/DM	
Apparato di Golgi (Polar/Golgi-like)	Fluorescenza citoplasmatica granulare, posta a "calotta" a un polo del nucleo, localizzata a livello dell'apparato di Golgi	giantin/macrogolgin, golgin-95/GM130, golgin-160, golgin-97, golgin-245	SjS (rara), LES, RA, MCTD, atassia cerebellare idiopatica, degenerazione cerebellare paraneoplastica, infezioni virali	
Rods and Rings	Fluorescenza di strutture ad anello (ring) e a bastoncino (rod) di circa 2-5 µm di diametro e 3-10µm di lunghezza rispettivamente.	IMPDH2, altri antigeni sono in corso di caratterizzazione.	Pazienti con infezione da HCV in corso di terapia con IFN/ribavirina, LES (rara), tiroidite di Hashimoto, controlli sani.	

Acronimi:

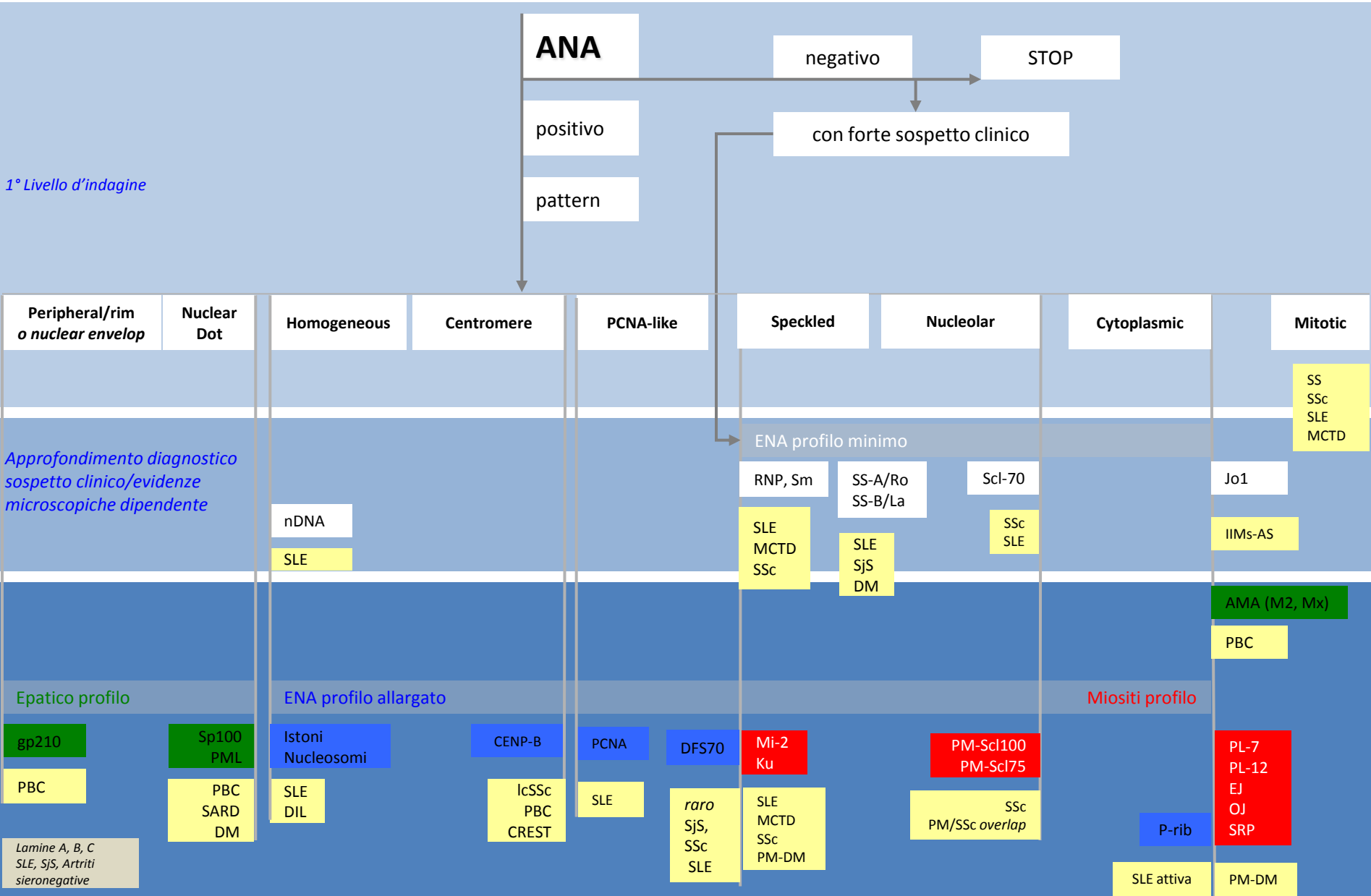
AIH	Epatite autoimmune (Auto Immune Hepatitis)
AR	Artrite Reumatoide
CTD	Connective Tissue Diseases
CREST	Calcinosi, Fenomeno di Raynaud, esofagopatia, sclerodattilia, teleangectasie
dcSS	diffuse cutaneous Systemic Sclerosis
DM	Dermatomiosite
IFN	Interferon
IcSSc	limited cutaneous Systemic Sclerosis
LES	Lupus eritematoso sistemico
MCTD	Mixed Connective Tissue Diseases
PBC	Cirrosi biliare primitiva (Primary Biliary Cirrhosis)
PM	Polimiosite
SARD	Systemic autoimmune Rheumatic Diseases
SjS	Sindrome di Sjogren
SRP	Signal Recognition Particle
SSc	Sclerosi Sistemica
UCTD	Undifferentiated Connective Tissue Diseases

Bibliografia:

1. Gerli R, Caponi L. Anti-ribosomal P protein antibodies. *Autoimmunity*. 2005;**38**:85-92.
2. A.R. Bradwell, R.G. Hughes. Atlans of HEp-2 patterns 3rd Edition. 2007
3. Tozzoli R. Bizzaro N. Villalta D. Tonutti E. Il Laboratorio nelle Malattie Reumatiche Autoimmuni. Società Editrice Esculapio; 2007
4. Shoenfeld Y. Gershwin ME. Meroni PL. Editors. Autoantibodies. 2nd Edition. Elsevier Science; 2007
5. Conrad K., et al. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases, A Diagnostic Reference. 2nd Editon; 2007
6. Wiik A.S., et al. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J of Autommunity* 2010;**35**:276-290.
7. Conrad K., et al. From Prediction to Prevention of Autoimmune Diseases. *Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity*. Volume 7 – 2011
8. <http://www.anapatterns.org> ICAP – International Consensus on ANA Patterns.
9. Granito A., et al. PML Nuclear Body Component Sp140 Is a Novel Autoantigen in Primary Biliary Cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology* 2010;**105**:125-131.

Indicazioni all'ANA-test

Pazienti con sintomi sistemici (alto valore *pre-test*):
artriti, artralgie, rash cutanei, anemia, pleuriti, pericarditi



Anticorpi anti antigeni cellulari ANA-test	
IFI su cellule HEp-2(000) fissate in acetone su vetrino	
Metodo di riferimento da utilizzare come test di screening Coniugato: anti-IgG	
Diluizione di partenza 1:160 per soggetti >16 anni (per i soggetti <16 anni non essendo stato raggiunto un consenso internazionale sulla diluizione di screening, si può utilizzare una diluizione di screening pari a 1:80)	
VANTAGGI	LIMITI
Possibilità di evidenziare più autoanticorpi cellulari, citoplasmatici e mitotici	Metodo semiquantitativo (titolazione)
Possibilità di automatizzare la preparazione dei vetrini	Lettura operatore dipendente
Maggiore sensibilità rispetto ai test immunometrici Possibilità di archiviazione immagini, storia clinica dei pazienti e refertazione automatiche, tracciabilità	Bassa specificità e VPP basso (caratteristiche dipendenti dal valore pre-test e dalla malattia autoimmune eventualmente presente nel soggetto)
	SSa, Jo1 e proteina P ribosomiale non sempre evidenziabili La presenza di pattern sovrapposti può rendere difficoltosa l'interpretazione del quadro fluoroscopio
Immunoenzimatico	
Estratto nucleare di HEp-2 purificato e/o alcuni antigeni purificati adesi alla superficie del supporto. A causa del numero ridotto di specificità anticorpali rilevabili rispetto all'IFI, se si decide di utilizzare questo metodo come test di screening è necessario dichiarare in modo chiaro il numero e il tipo degli antigeni identificabili e in caso di negatività eseguire il test IFI.	
Coniugato: anti-IgG	
VANTAGGI	LIMITI
Riproducibilità del risultato	Metodo qualitativo (positivo, negativo, borderline)
Facile esecuzione e automatizzabile	Diversi livelli di sensibilità e specificità per i kit in commercio
Oggettività di lettura	Non garantisce la rilevazione di tutte le specificità anticorpali
	Sensibilità ridotta rispetto a IFI (non rappresentativo di tutti gli antigeni cellulari valutabili al microscopio)
	Accuratezza diagnostica variabile: possibilità di falsi negativi
	Elevato volume di campione richiesto, costo elevato

Allegato 3 - Metodi per la Determinazione degli Autoanticorpi nelle Connettiviti ANA-correlate

Anticorpi anti-dsDNA (nDNA)	
IFI su <i>Crithidia Luciliae</i>	
Coniugato anti-IgG Diluizione di partenza: 1:10	
VANTAGGI	LIMITI
Alta specificità (rileva anticorpi ad alta e media avidità) Discreta sensibilità Preparazione dei vetrini automatizzabile Lettura dei preparati al microscopio automatizzabile	Metodo semiquantitativo (titolazione)
ELISA, CLIA, FIA	
VANTAGGI	LIMITI
Metodo quantitativo Molto sensibile (rileva anche anticorpi a bassa avidità) Facile esecuzione e automatizzabile Affidabilità analitica Riproducibilità del risultato Lettura contro Standard Internazionale WHO/ISP Wo/80	Minore specificità Diversi livelli di sensibilità e specificità per i kit in commercio a seconda dell'antigene utilizzato (purificato o ricombinante) Accuratezza diagnostica variabile Costo elevato
FARR: Metodo di riferimento per anti-nDNA	
VANTAGGI	LIMITI
Molto specifico (rileva ab ad alta avidità) VPP alto	Metodologia d'interesse prettamente storico Applicazione limitata Difficoltà di gestione delle sostanze radioattive

Anticorpi anti-ENA (Antigeni Nucleari Estraibili)	
ELISA, FIA, CLIA	
Determinazione di singoli autoanticorpi	
VANTAGGI	LIMITI
Metodo quantitativo Molto sensibile Facile esecuzione e automatizzabile Affidabilità analitica Riproducibilità del risultato Definisce specificità antigenica Standardizzazione	Pannello antigenico limitato Specificità variabile per i kit in commercio a seconda dell'antigene utilizzato (purificato o ricombinante) Accuratezza diagnostica variabile Elevato volume di campione richiesto Costo elevato
Immunoblot (dot blot, line blot)	
Identificazione contemporanea di più autoanticorpi su supporto di nitrocellulosa	
VANTAGGI	LIMITI
Profili aggiornabili con nuovi antigeni: flessibilità Alte sensibilità e specificità Consente determinazione di diversi profili autoanticorpali Facile esecuzione e automatizzabile Affidabilità analitica Riproducibilità del risultato Facile interpretazione dei risultati	Metodo qualitativo e/o semiquantitativo
Western-blot	
Immunoblot lineare su membrana di nitrocellulosa	
VANTAGGI	LIMITI
Buona sensibilità Buona specificità Facile esecuzione e automatizzabile	Metodo qualitativo Difficile interpretazione dei risultati

Metodi di recente introduzione: MULTIPLEXING (MIA)	
Array non planare: Microsfere o particelle codificate riconosciute con fluorimetria laser in citometri a flusso o laser nefelometria	
Determinazione di singoli autoanticorpi	
VANTAGGI	LIMITI
Buona sensibilità Dosaggio multiparametrico su singolo campione Facile esecuzione e automatizzabile Buona affidabilità analitica Buona riproducibilità Rilevazione simultanea di più anticorpi in un singolo campione Elevata produttività Accesso random Molti parametri possono essere aggiunti agli autoanticorpi Minor volume di campione richiesto	Rischio di falsi positivi Metodo qualitativo o semiquantitativo Rischio di cross-reazione anticorpale Bassa standardizzazione La sensibilità e la specificità dipendono fortemente dal valore del cut-off Specificità variabile per i kit in commercio a seconda della tipologia dell'antigene utilizzato (purificato o ricombinante)
Flow cytometric microbead sandwich immunoassays	
VANTAGGI	LIMITI
Cinetica in fase fluida che è più veloce di quella in fase solida o dell'array planare Multiplexing personalizzabile dall'utilizzatore Maggior precisione dovuta alla misurazione di centinaia di microsfere per ciascun analita Minor volume di campione richiesto Possibilità di studiare l'intero processo autoimmune: ormoni, citochine, anticorpi, autoanticorpi Elevate produttività e affidabilità Costi contenuti	Specificità variabile per i kit in commercio a seconda della tipologia dell'antigene utilizzato (purificato o ricombinante) Distribuzione limitata
Array planare o chip di silicone: microspot su vetrino	
VANTAGGI	LIMITI
Supporto piatto, importante per una scansione accurata Possibilità di studiare l'intero processo autoimmune: ormoni, citochine, anticorpi, autoanticorpi Basso background di fluorescenza	I chip in vetro o in silicone richiedono un grande impiego di siti chimici per l'attacco delle proteine Difficoltà dovute alla variabilità tra lotti legata ai siti chimici di attacco

Bibliografia:

1. Binder SR. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus*. 2006;**15(7)**:412-21.
2. Shoenfeld Y, et al. Autoantibodies-the smoke and the fire. *Autoimmunity*. 2005;**38(1)**:1-2.
3. Salamunić I. Laboratory diagnosis of autoimmune diseases – new technologies, old dilemmas. *Biochemia Medica* 2010;**20(1)**:45-56.
4. Fritzler MJ. Advances and applications of multiplexed diagnostic technologies in autoimmune diseases. *Lupus*. 2006;**15(7)**:422-7.
5. Willitzki A, et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012;**(2012)**:ID284740, 8 pages.
6. Fritzler MJ, Fritzler ML. Microbead-based technologies in diagnostic autoantibody detection. *Expert Opin Med Diagn*. 2009;**3(1)**:81-9.
7. Kivity S, et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clin Rheumatol*. 2012;**31(3)**:503-9.
8. Jörn Voigt, et al. Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells. *Clin Dev Immunol*. 2012;**(2012)**:ID651058, 7 pages.
9. Melegari A, et al. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun Rev*. 2012;**11(10)**:713-6.
10. Rigon A, et al. Novel opportunities in automated classification of antinuclear antibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev*. 2011;**10(10)**:647-52.
11. Damoiseaux JG, et al. From ANA to ENA: How to proceed? *Autoimmun Rev*. 2006;**5(1)**:10-7.
12. Nifli AP. Et al. Comparison of a multiplex, bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum. *J Immunol Methods*. 2006;**311(1-2)**:189-97.
13. Tozzoli R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2007;**6(6)**:334-40.
14. Plebani M, et al. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2009;**8(3)**:238-43.
15. Kingsmore SF. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;**5(4)**:310-20.
16. Crow MK, et al. Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis Res Ther*. 2003;**5(6)**:279-87.
17. Feng Y, et al. Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases. *Clin Chem*. 2004;**50(2)**:416-22.
18. Quintana FJ, et al. Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body. *Lupus*. 2006;**15(7)**:428-30.