

## PROTOCOLLO ANA READING (PARE)

### FIRMA

#### Background

La ricerca di anticorpi anti-nucleo (ANA) è formalmente richiesta per la classificazione e la diagnosi di numerose malattie autoimmuni.

La metodica in immunofluorescenza indiretta su cellule HEp2 è la metodica standard (Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis.* 2010 ;69(8):1420-2).

La ricerca di ANA in IIF è penalizzata da numerosi *pitfalls* quali la soggettività del lettore, la variabilità legata ai differenti *batch* di substrati, la standardizzazione dei sistemi ottici di lettura etc.

Sono stati recentemente proposti sistemi a lettura automatizzata con possibilità di archiviazione delle immagini come parziale soluzione alle problematiche sopra riportate. Non esistono in letteratura al momento grossi studi di validazione dei sistemi proposti e soprattutto non vi sono studi comparativi che prevedano l'uso di apparecchiature diverse sulle stesse serie di campioni.

Un aspetto ulteriore è rappresentato dal fatto che negli studi presentati i campioni da pazienti con patologie autoimmuni non sono generalmente corredati da una caratterizzazione clinica dei donatori.

#### Scopo

Validazione multicentrica di diversi sistemi di lettura automatica della IIF per la ricerca di ANA.

#### Disegno sperimentale

##### *Campioni da testare*

- **Patologici definiti:** 200 sieri ANA pos da pazienti con connettiviti diagnosticate e in regolare *follow up* clinico presso le U.O. reclutanti. L'ideale sarebbe poter avere distribuiti i campioni per patologie: LES, AR, S. Sjogren, SSc, PM-DM, MCTD diagnosticate secondo i criteri classificativi ACR.

La positività per ANA dovrà essere accompagnata dalla caratterizzazione per anti-ENA ed anti-dsDNA (eseguiti con le tecniche routinariamente utilizzate presso l'U.O. reclutante).

- **Patologici prospettici:** 50 sieri da pazienti inviati per la ricerca di ANA e raccolti in maniera prospettica (anche con una diagnosi non ancora definita). I pazienti dovranno essere seguiti dalle U.O. reclutanti per almeno un anno ed essere caratterizzati per anti-ENA ed anti-dsDNA. I

50 pazienti dovranno rappresentare il numero definitivo, pertanto si suggerisce di reclutarne almeno il doppio al fine di far fronte agli eventuali *drop out* .

- **Controlli sani:** 100 sieri ANA neg da soggetti sani (di età e sesso paragonabili al gruppo degli ANA pos); anche questo gruppo di campioni dovrà essere stato testato per anti-ENA ed anti-dsDNA.
- **Controlli patologici:**
  - 90 sieri con patologie infettive virali (HBV, HCV, HIV, CMV, EBV pos).
  - 10 sieri con paraproteine monoclonali.

I campioni dovranno essere inviati al “Core-Lab” (Radice), che provvederà a conservare un’aliquota di ciascuno per eventuali rivalutazioni di ANA, anti-ENA ed anti-dsDNA. Le rivalutazioni saranno effettuate sia con metodica IIF che mediante l’utilizzo di altre tecniche (in uso nel core lab di riferimento piuttosto che con i kit forniti da FIRMA).

Dal Core-Lab i campioni saranno inviati nei laboratori dove saranno locati i sistemi di lettura automatizzata. Ciascuno dei laboratori dotati dei sistemi di lettura automatizzata eseguirà la ricerca di ANA sui campioni ricevuti con il materiale (vetrini e reagenti) ad hoc e la metodica in uso. Il numero dei sistemi automatizzati sarà definito in base alla disponibilità delle Ditte interessate allo studio.

*Volume dei campioni.*

Il volume di siero da inviare non dovrà essere inferiore a 2 ml (se possibile 3 ml).

I campioni dovranno essere inviati a:

dr.ssa Antonella Radice – UO Microbiologia (secondo piano, settore C) – AO Ospedale San Carlo Borromeo, Via Pio II, 3 – 20153 Milano

