UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo

Analisi comparativa tra un *line-blot* commerciale e un Western blot *home made* per la determinazione degli autoanticorpi miosite specifici e miosite associati.

Relatore:
Dr.ssa Ludovica Gaiaschi

Correlatore:
Prof.ssa Maria Grazia Bottone
Dr.ssa Claudia Alpini

Tesi Sperimentale di
Chiara Passerini

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE 4

1.1 Autoimmunità 4

1.2 Miopatie infiammatorie idiopatiche (IIM) o miositi 5

1.2.1 Caratteristiche cliniche generali delle IIM 9

1.2.2 Autoanticorpi miosite-associati (MAA) e miosite-specifici (MSA) 12

1.2.3 Metodi di rilevazione degli MAA e MSA 28

3. MATERIALI E METODI 35

3.1 Popolazione oggetto di studio 35

3.2 Esami di laboratorio 35

3.3 Colture cellulari 39

3.4.1 Preparazione dei lisati proteici 40

3.4.2 Quantificazione proteica e preparazione dei campioni 40

3.4.3 Dot blot 40

3.4.4 Western Blotting 41

3.4.5 Trasferimento su membrana di nitrocellulosa 42

3.4.6 Rivelazione e acquisizione 43

3.4.7 Analisi statistica 43

4. RISULTATI 46

4.1 Selezione della linea cellulare per la preparazione del lisato antigenico 46

4.2 Relazione tra concentrazione dell'anticorpo anti-Ro52 e segnale nel Dot Blot 47

4.3 Valutazione della relazione tra concentrazione dell'anticorpo e segnale nel Western blot 48

4.4 Applicazione del workflow a campioni sierici e confronto esplorativo con FEIA 49

5. DISCUSSIONE 52

6. CONCLUSIONI 54

7. BIBLIOGRAFIA 56

1. INTRODUZIONE

1.1 Autoimmunità

L'autoimmunità è definita come una condizione patologica in cui il sistema immunitario perde la capacità di distinguere correttamente le componenti proprie dell'organismo (*self*) da quelle estranee (*non-self*), determinando l'attivazione di risposte immunitarie dirette contro antigeni *self*. Tale alterazione è conseguente alla perdita della tolleranza immunologica, ovvero dell'insieme dei meccanismi fisiologici che impediscono l'attivazione di risposte immunitarie contro i tessuti propri dell'organismo (Sundaresan et al., 2023).

Le prime osservazioni di fenomeni riconducibili all'autoimmunità risalgono alla fine del XIX e all'inizio del XX secolo e hanno rappresentato importanti punti di partenza per la comprensione delle risposte immunitarie dirette contro il *self*. In questo contesto, Paul Ehrlich introdusse il concetto di *horror autotoxicus*, ipotizzando l'esistenza di meccanismi fisiologici di controllo in grado di impedire al sistema immunitario di danneggiare i tessuti dell'organismo stesso (Ribatti e Crivellato, 2023).

In condizioni fisiologiche normali, il sistema immunitario identifica ed elimina agenti patogeni potenzialmente pericolosi senza danneggiare l'organismo. Tuttavia, malfunzionamenti di quest'ultimo, predisposizioni genetiche, esposizioni ambientali e alterazioni nell'immunoregolazione contribuiscono all'insorgenza di patologie autoimmuni (Yasmeen et al., 2024).

Negli ultimi decenni è stato osservato un progressivo aumento della prevalenza delle malattie autoimmuni nella popolazione mondiale, fenomeno attribuibile sia a una maggiore identificazione diagnostica sia a una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici alla base di tali condizioni (Miller, 2023).

Lo sviluppo di tecnologie diagnostiche sempre più sensibili e accurate ha consentito l'introduzione nella pratica laboratoristica di metodiche innovative, capaci di rilevare numerevoli biomarcatori sempre più specifici e accurati che hanno contribuito a determinare una migliore classificazione delle patologie autoimmuni e a definire diversi fenotipi all'interno delle stesse (Ahsan, 2023).

Tra le malattie autoimmuni sistemiche, rientrano le miopatie infiammatorie idiopatiche, o miositi, oggetto della mia tesi.

1.2 Miopatie infiammatorie idiopatiche (IIM) o miositi

Le miopatie infiammatorie idiopatiche (*Idiopathic Inflammatory Myopathies*, IIM), note comunemente anche come *miositi*, rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie accomunate dalla presenza di un processo immunomediato a carico prevalentemente della muscolatura scheletrica. (Lundberg et al., 2016).

Il termine *miosite* indica, un processo infiammatorio a carico del tessuto muscolare (Váncsa e Dankó, 2016). Sebbene il coinvolgimento della muscolatura scheletrica rappresenti un elemento comune, le IIM comprendono differenti entità cliniche e biologiche, caratterizzate da una significativa eterogeneità sia nella presentazione della malattia sia nei meccanismi immuno-patogenetici coinvolti. Per tale ragione, le IIM non devono essere considerate esclusivamente come patologie muscolari, bensì come condizioni potenzialmente sistemiche, nelle quali il processo immunomediato può interessare, con differente frequenza e gravità, numerosi organi e apparati. In particolare, possono essere coinvolti cute, polmone, articolazioni e cuore, contribuendo alla complessità del quadro clinico e alla variabilità della prognosi (Mariampillai et al., 2018).

A tale eterogeneità clinica si associa una marcata variabilità a livello istopatologico e immuno-patogenetico, che nel tempo ha contribuito all'identificazione di distinti sottogruppi di IIM. Le alterazioni patologiche osservate a livello muscolare, infatti, possono differire tra le diverse forme della malattia e riflettere distinti meccanismi di danno tissutale. Questa variabilità si associa, inoltre, a differenti modalità di evoluzione clinica e a una prognosi eterogenea (Mandel et al., 2017).

Anche la risposta al trattamento può variare tra i diversi sottogruppi, rendendo la corretta caratterizzazione della malattia un elemento fondamentale per una gestione clinica adeguata. La distinzione tra i diversi fenotipi non rappresenta, pertanto, un mero esercizio classificativo, ma assume un ruolo significativo nella valutazione prognostica e nell'individuazione dell'approccio terapeutico più appropriato (Fasano et al., 2016).

Nel corso degli anni la classificazione delle miositi e il loro corretto inquadramento diagnostico ha subito notevoli aggiornamenti. I primi criteri furono proposti da Bohan e Peter nel 1975 e rappresentavano uno dei primi sistemi strutturati per la classificazione di tali patologie. I criteri diagnostici includevano:

- presenza di debolezza muscolare prossimale, simmetrica e progressiva;

- aumento dei livelli sierici degli enzimi muscolari, quali creatinchinasi (CK), aldolasi (ALD), aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e lattato deidrogenasi (LDH);
- alterazioni elettromiografiche caratteristiche e compatibili con una miopatia infiammatoria;
- reperti istopatologici alla biopsia muscolare indicativi di un processo infiammatorio;
- presenza di eruzione cutanea tipica della dermatomiosite, comprendente rash eliotropo e papule di Gottron.

Sulla base di tali criteri, vennero distinti cinque principali gruppi di miositi:

1. polimiosite idiopatica primaria (PM);
2. dermatomiosite idiopatica primaria (DM);
3. DM/PM associate a neoplasia;
4. DM/PM infantili associate a vasculite;
5. DM/PM associate a malattia del tessuto connettivo.

Per ciascun sottotipo furono inoltre definite categorie diagnostiche di malattia: "definita", "improbabile" e "possibile", insieme a specifici criteri di esclusione volti a distinguere le IIM dalle condizioni patologiche in grado di mimarne le manifestazioni cliniche (Bohan e Peter, 1975).

A partire dagli anni 2000, l'identificazione degli autoanticorpi miosite-specifici e miosite-associati, parallelamente ai progressi nell'analisi istopatologica e nelle tecniche di imaging muscolare, ha contribuito allo sviluppo dei nuovi criteri classificativi EULAR/ACR del 2017 **(Figura 1)**. Questi ultimi integrano parametri clinici, laboratoristici, sierologici, istopatologici e radiologici all'interno di un sistema a punteggio (*score)*, consentendo una classificazione caratterizzata da maggiore sensibilità e specificità. Tale evoluzione ha inoltre evidenziato come le IIM non costituiscano un'unica entità clinica, ma comprendano forme differenti, la cui eterogeneità si manifesta non solo nei diversi fenotipi clinici, ma anche nelle modalità di esordio, nell'andamento della malattia e nella risposta ai trattamenti (La Rocca et al., 2023).

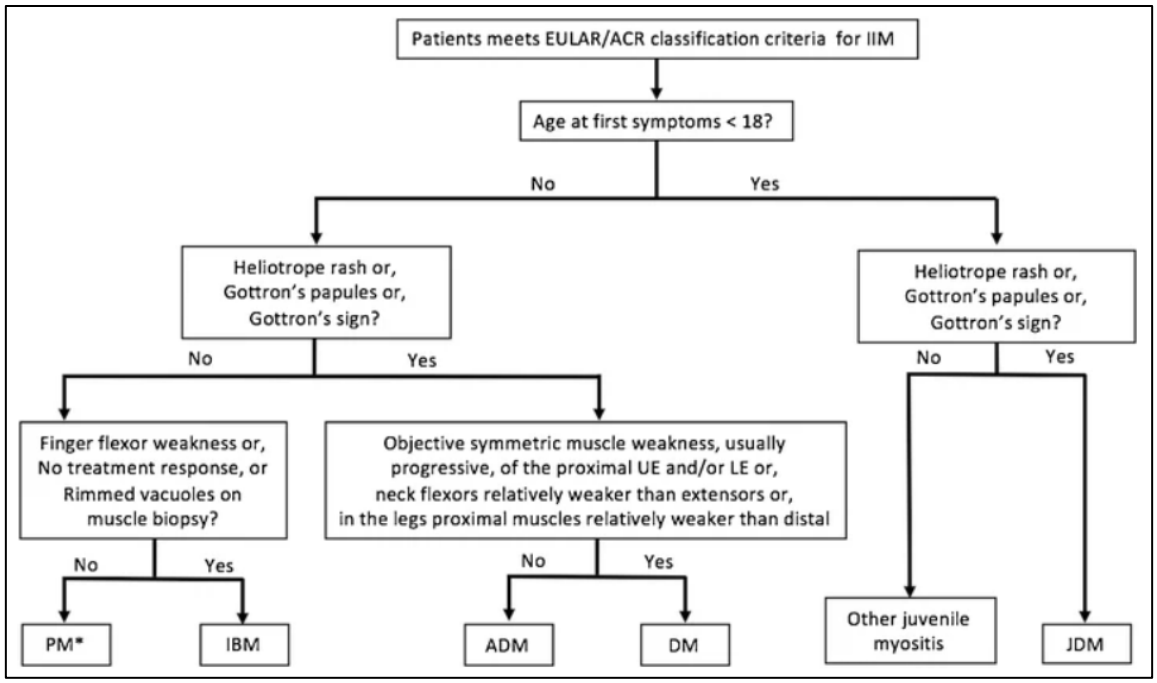


Figura 1. Sottogruppi di IIM secondo i criteri di classificazione EULAR/ACR del 2017. *Il sottogruppo PM comprende le miopatie necrotizzanti immuno-mediate (IMNM). PM, polimiosite; IBM, miosite a corpi inclusi; ADM, dermatomiosite amiopatica; DM, dermatomiosite; JDM, dermatomiosite giovanile (Leclair e Lundberg, 2018).

I nuovi criteri di classificazione includono:

- l'età di esordio della malattia;
- le manifestazioni cliniche, quali debolezza muscolare prossimale e simmetrica degli arti superiori, debolezza dei muscoli flessori del collo e dei muscoli prossimali degli arti inferiori, nonchè difficoltà nella deglutizione o coinvolgimento della muscolatura faringea;
- le manifestazioni cutanee caratteristiche: rash eliotropo e papule di Gottron;
- gli indici laboratoristici, rappresentati dall'incremento degli enzimi muscolari, tra cui creatinchinasi (CK), aldolasi (ALD), aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e lattato deidrogenasi (LDH);
- l'esito della biopsia muscolare, quando disponibile;
- la positività per gli anticorpi anti-Jo1, per ciò che riguarda la diagnostica autoimmune di laboratorio.

Nonostante rappresentino un significativo progresso rispetto ai precedenti sistemi classificativi, i criteri EULAR/ACR presentano alcune limitazioni legate principalmente alla scarsa rappresentatività di alcuni sottotipi rari di miopatie infiammatorie idiopatiche. Durante la loro elaborazione, infatti,

non è stato possibile includere adeguatamente le forme meno frequenti, a causa dell'insufficiente numerosità dei pazienti disponibili per tali sottogruppi. Anche sul piano sierologico, soltanto l'autoanticorpo anti-Jo-1 era presente in un numero di casi sufficientemente elevato da consentirne l'inclusione nel sistema classificativo, mentre gli altri autoanticorpi miosite-specifici non raggiungevano una frequenza tale da poter essere adeguatamente considerati (Leclair e Lundberg, 2018).

L'approccio moderno, basato su sistemi classificativi più dinamici e biologicamente informati, integrati con le raccomandazioni dell'organizzazione internazionale *European Neuromuscular Centre* (ENMC), ha contribuito a migliorare la stratificazione dei pazienti, l'orientamento della scelta terapeutica e l'interpretazione dei risultati degli studi clinici. In tale prospettiva, le miositi vengono attualmente distinte in:

1. dermatomiosite (DM),
2. dermatomiosite giovanile (JDM),
3. dermatomiosite clinicamente amiopatica (CADM),
4. polimiosite (PM),
5. miosite a corpi inclusi (IBM),
6. miopatia necrotizzante immuno-mediata (IMNM),
7. sindrome anti-sintetasi (ASS)

(Pathania, 2026)

In alcuni casi, le miositi possono presentare caratteristiche cliniche e immunologiche riconducibili ad altre malattie autoimmuni sistemiche, quali la sclerosi sistemica (SSc), il lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide (AR) e la sindrome di Sjögren (SjD). In tali circostanze si parla di miosite da sovrapposizione (overlap myositis, OM), una condizione caratterizzata, rispetto alla PM e alla DM, da un più frequente coinvolgimento extramuscolare e da una maggiore predisposizione allo sviluppo di infezioni severe. La complessità e l'eterogeneità delle manifestazioni cliniche rendono pertanto necessario un monitoraggio clinico attento e regolare, finalizzato all'identificazione precoce delle possibili complicanze e alla tempestiva definizione dell'approccio terapeutico più appropriato (Nuño-Nuño et al., 2019).

Un ulteriore aspetto di rilevanza clinica nelle IIM è rappresentato dalla loro associazione con le neoplasie, particolarmente evidente nei pazienti affetti da DM, mentre nelle altre forme di IIM tale associazione risulta più variabile. Nella DM, il rischio oncologico appare infatti maggiormente

elevato in prossimità dell'esordio della malattia, supportando l'ipotesi che, in una parte dei pazienti, la miosite possa rappresentare una manifestazione paraneoplastica. Le neoplasie più frequentemente associate alle IIM comprendono carcinomi del polmone, della mammella, dell'ovaio, del colon-retto, del pancreas e dello stomaco, oltre ai linfomi. Inoltre è stato evidenziato come il rischio neoplastico vari in funzione del sottotipo di IIM e di specifiche caratteristiche cliniche e sierologiche dei pazienti. In particolare, la DM è risultata associata a un rischio significativamente maggiore rispetto ad altri sottotipi, mentre l'associazione appare meno marcata nella PM e nella CADM. Tra i principali fattori associati a un incremento del rischio sono stati identificati l'età avanzata, il sesso maschile, la disfagia e la presenza di ulcerazioni cutanee (Oldroyd et al., 2021).

Dal punto di vista epidemiologico, l'incidenza delle IIM è stimata tra 0,2 e 2 casi per 100.000 persone-anno, mentre la prevalenza varia tra 2 e 25 casi per 100.000 persone. La sopravvivenza a 10 anni risulta compresa tra il 62% e il 90% nei pazienti con DM, PM e IMNM, mentre IBM, pur non determinando generalmente una significativa riduzione della sopravvivenza, può avere un impatto rilevante sulla qualità della vita a causa della progressiva compromissione della funzione muscolare (Khoo et al., 2023; Acosta et al., 2019). Anche la distribuzione delle IIM presenta differenze in relazione al sesso e alle caratteristiche sociodemografiche della popolazione. Le donne mostrano una maggiore incidenza di DM, mentre gli uomini risultano più frequentemente interessati dalla IBM. Analogamente, sono state osservate differenze nella distribuzione dei sottotipi in relazione all'appartenenza etnica, con una maggiore incidenza della DM e di altre forme nelle popolazioni sud-asiatiche e nere rispetto alle popolazioni bianche. Nel complesso, tali evidenze indicano che il rischio e la distribuzione dei diversi sottotipi di IIM non sono uniformi nella popolazione, ma risultano influenzati da fattori biologici, genetici e sociodemografici, sottolineando l'importanza di strategie diagnostiche e di sorveglianza adeguatamente orientate alle caratteristiche dei diversi gruppi (Gordon et al., 2026).

1.2.1 Caratteristiche cliniche generali delle IIM

Clinicamente le manifestazioni delle IIM variano in relazione alla specifica forma di malattia. La **Tabella 1** e la **Figura 2** descrivono le caratteristiche principali di queste patologie ma, indipendentemente dal sottotipo, la debolezza muscolare prossimale rappresenta l'elemento clinico predominante, con un esordio variabile (acuto, subacuto o cronico) e un coinvolgimento tipicamente simmetrico e progressivo, che interessa più frequentemente il cingolo pelvico rispetto a quello scapolare (Ashton et al., 2021).

Condizione	Dati demografici	Presentazione clinica	Laboratorio
DM	• Distribuzione bimodale per età: 5-15 anni e 40-50 anni • Predilezione femminile (rapporto femmine-maschi, 2:1)	• Debolezza muscolare prossimale bilaterale e simmetrica. • Manifestazioni cutanee: papule di Gottron, segno di Gottron, eruzione eliotropica, calcinosi cutanea, mani da meccanico, ulcere cutanee • Disfagia	• I valori di CK e/o aldolasi possono essere elevati • MSA: anti-ARS (ad esempio, anti-Jo-1), anti-MDA-5, anti-Mi-2, anti-TIF-1, anti-NXP-2, anti-SAE-1
polimiosite	• Insorgenza in età adulta • Predilezione femminile (rapporto femmine-maschi, 2:1)	• Debolezza muscolare prossimale bilaterale e simmetrica. • Disfagia	• Valore di CK elevato (fino a 50 volte il valore normale) • MSA: anti-ARS (p. es., anti-Jo-1)
IBM	• Insorgenza in età più avanzata (> 50 anni) • Predilezione maschile (rapporto maschi-femmine, 2:1)	• Debolezza muscolare asimmetrica: quadricipiti, flessori delle dita, dorsiflessori della caviglia • Disfagia	• Valore di CK normale o leggermente elevato (fino a 10 volte il valore normale) • MSA: anti-CN1A
IMNM	• Insorgenza in età adulta (30-70 anni)	• Grave debolezza muscolare prossimale bilaterale • predominanza degli arti inferiori • Si manifesta nel contesto dell'uso di statine, malattie del tessuto connettivo, neoplasie o infezioni virali, oppure è idiopatica.	• Valore di CK elevato (fino a 100 volte superiore alla norma) • MSA: anti-SRP, anti-HMGCR
Sindrome antisintetasi	• Insorgenza in età adulta (circa 50 anni)	• Debolezza muscolare prossimale bilaterale • predominanza degli arti inferiori • Si manifesta con febbre, malattia polmonare interstiziale, fenomeno di Raynaud, mani da meccanico e poliartrite infiammatoria.	• Valore di CK elevato (da 10 a 50 volte il valore normale) • MSA: anti-ARS (p. es., anti-Jo-1)
miosite da sovrapposizione	• Predilezione femminile • Esordio in età adulta (< 50 anni)	• Variabile, a seconda della malattia del tessuto connettivo sottostante (ad esempio, LES, sclerosi sistemica, sindrome di Sjögren, artrite reumatoide) • Può presentarsi con caratteristiche di sclerodermia (ispessimento cutaneo, sclerodattilia), malattia polmonare interstiziale, fenomeno di Raynaud	• Valore CK elevato • MAA: anti-Ku, anti-PM/Scl, anti-Ro (SSA) e La (SSB), anti-U1-RNP, anti-U3-RNP (fibrillarina)

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e di laboratorio delle miopatie infiammatorie idiopatiche (Zandee van Rilland et al., 2024).

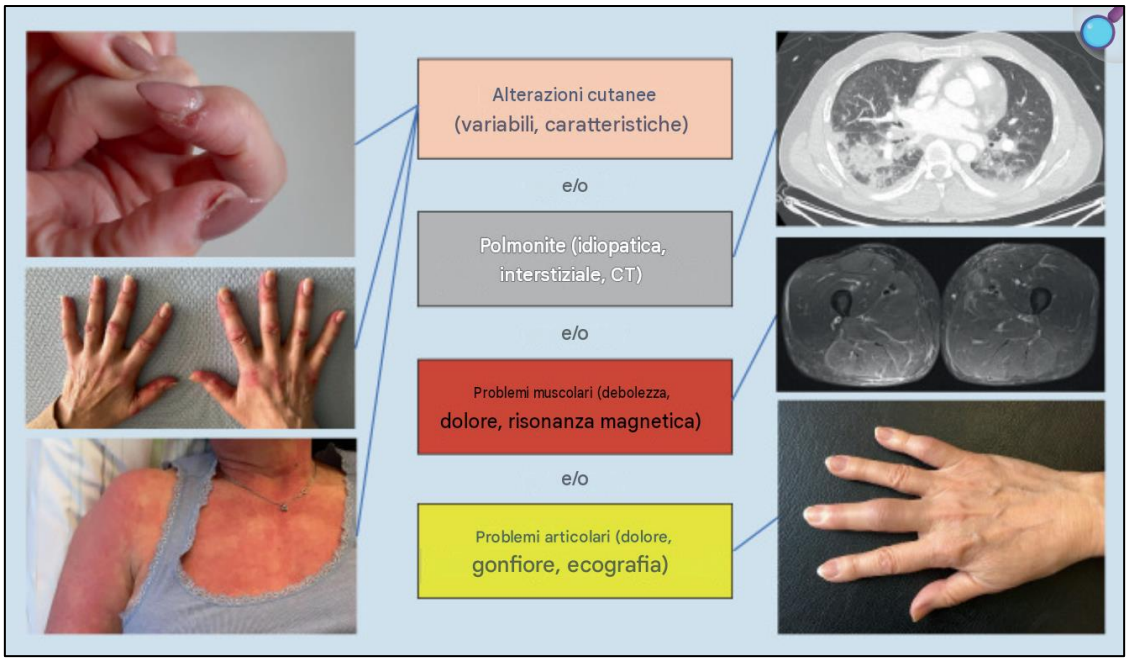


Figura 2. Principali manifestazioni cliniche associate alle IIM tra cui alterazioni cutanee (fenomeno di Raynaud e mechanic's hands), coinvolgimento polmonare, debolezza muscolare e segni articolari (Biesen et al., 2024).

La ricerca degli autoanticorpi specifici per la miosite (MSA) e degli autoanticorpi associati alla miosite (MAA) contribuisce ulteriormente all'identificazione del sottotipo clinico, orienta la necessità di approfondimenti diagnostici e può fornire indicazioni sulla risposta al trattamento (A. Oldroyd et al., 2017).

Nel complesso, la diagnosi delle IIM può risultare complessa a causa dell'eterogeneità delle manifestazioni cliniche e della sovrapposizione di alcuni reperti con quelli di altre patologie. È stato stimato che il ritardo diagnostico possa raggiungere mediamente 2/3 anni, con frequenti diagnosi iniziali errate che possono determinare l'impostazione di trattamenti inappropriati. Per questo motivo, un approccio diagnostico integrato, basato sulla correlazione tra quadro clinico, parametri laboratoristici, autoanticorpi, indagini elettrofisiologiche, imaging e, quando necessario, esame istopatologico, risulta essenziale per una corretta identificazione della malattia e per la distinzione dalle principali condizioni che possono mimarne le manifestazioni (Zandee van Rilland et al., 2024).

Tuttavia, i recenti progressi nella comprensione della patogenesi delle IIM, insieme allo sviluppo di nuove metodiche di laboratorio dedicate alle miositi, delineano prospettive promettenti nella valutazione e nel trattamento di questa patologia in futuro (Campanilho-Marques et al., 2025).

Dalle revisioni degli ultimi criteri EULAR, emerge l'importanza e il ruolo fondamentale assunto dal rilevamento degli anticorpi specifici per la miosite (MSA) e degli anticorpi miosite associati (MAA) nella diagnosi e nella definizione dei sottotipi di miopatia infiammatoria idiopatica (A. Oldroyd et al., 2017).

1.2.2 Autoanticorpi miosite-associati (MAA) e miosite-specifici (MSA)

Gli autoanticorpi associati alle miositi rappresentano uno degli strumenti più importanti per la classificazione e la caratterizzazione clinica di tali patologie. La scoperta e la progressiva identificazione di questi autoanticorpi ha profondamente modificato l'approccio diagnostico e prognostico di tali patologie, consentendo non solo di riconoscere sottogruppi clinicamente distinti ma anche di correlare specifici patterns sierologici sia alle manifestazioni d'organo che al decorso della malattia e alla risposta terapeutica (McHugh e Tansley, 2018).

Gli MSA comprendono anticorpi diretti contro aminoacil-tRNA sintetasi (anti-Jo-1, anti-PL7, anti-PL12, anti-EJ, anti-OJ, anti-Zo, anti-HA), Mi-2, SRP, MDA5, TIF1γ, NXP2, SAE e HMGCR. L'anti-Jo-1 è tipicamente associato alla sindrome antisintetasi, caratterizzata da ILD, artrite, fenomeno di Raynaud e manifestazioni cutanee. Gli anti-MDA5 sono correlati a fenotipi specifici di dermatomiosite e a forme di ILD potenzialmente severe, mentre gli anti-Mi-2 si riscontrano più frequentemente nella dermatomiosite classica. Alcuni autoanticorpi hanno rilevanza prognostica: gli anti-TIF1γ sono associati a un aumentato rischio di neoplasia e gli anti-NXP2 a forme di ILD più aggressive. Gli anti-SAE, infine, identificano un fenotipo di dermatomiosite con marcata componente cutanea (Diomedi et al., 2026).

Gli MAA, invece, possono essere riscontrati anche in altre connettiviti sistemiche e comprendono, tra gli altri, anti-PM/Scl, anti-Ku, anti-Ro52 e anti-U1RNP **(Tabella 2)** (van Dooren et al., 2011) .

Clinical phenotype	Antibody	Antigen protein gene	Possible related etiology	Clinical features	Autoantibody pathogenicity
DM	Anti-MDA5	*IFIH1*	virus	CADM, RP-ILD, strong vasculitis-like skin rash, ulceration	
	Anti-TIF1-γ	*TRIM33*	cancer	CADM, fewer ILD complications, cancer, JDM, diffuse rash with telangiectasia, dysphagia	No
	Anti-CCAR1	*CCAR1*		Coexistence with antiTIF1-γ, possible resistance to cancer	
	Anti-Sp4	*SP4*		Coexistence with antiTIF1γ, younger adults without cancer, JDM	
	Anti-Mi-2	*CHD3, CHD4*	UV exposure	Classical DM, less ILD complications, severe muscle fiber necrosis	Yes
	Anti-NXP2	*MORC3*		Less ILD, cancer, skin calcification, edema, dermatomyositis sine dermatitis	
	Anti-SAE	*SAE1, SAE2*		ILD? Cancer?	
ASS	Anti-Jo1	*HARS1*	smoking	ILD, arthritis, fever, mechanic's hands	No
	Anti-PL7	*TARS1*		[c]Severe ILD?	
	Anti-PL12	*AARS1*		[c]Severe ILD, less miyositis, less skin rash,	
	Anti-EJ	*GARS1*			
	Anti-OJ	*RARS1, MARS1, LARS1, QARS1, EPRS1 DARS1, IARS1, KARS1*		[d]Cancer	
	Anti-Ha	*YARS*			
	Anti-KS	*NARS*			
	Anti-Zo	*FARSα, FARSβ*			
	Anti-CARS	*CARS*			
	Anti-VARS	*VARS*			
IBM	Anti-cN1A	*NT5C1A*		Asymmetric distal muscle weakness, slow prognosis, immunosuppressant resistance	
IMNM	Anti-HMGCR	*HMGCR*	statins	Less ILD, absence of rash	Yes
	Anti-SRP	*SRP54*[a]		Acute progression and severe muscle symptoms, absence of cancer, absence of rash	Yes
Overlap	Anti-PM/Scl	*EXOSC9, EXOSC10*		Mild ILD, overlap with myositis and,	
	Anti-Ku	*XRCC5, XRCC6*		UCTD, Raynaud's syndrome, arthritis	
	Anti-U1RNP	*SNRNP70*[b], *SNRPA*[b], *SNRPC*[b],		SSc, SLE, and myositis overlap, MCTD, scleroderma-like fibrosis	
	Anti-RuvBL1/2	*RuvBL1,2*		Myositis-SSc overlap, male dominant, cardiac involvement	

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e ruoli patogeni degli autoanticorpi specifici della miosite e degli autoanticorpi associati alla miosite (Ogawa-Momohara e Muro, 2025).

Caratteristiche biochimiche e correlazione clinica dei principali MSA e MAA

MSA:

- **Anticorpi anti-MDA5**. La proteina MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) è codificata dal gene *IFIH1*, appartiene alla famiglia dei recettori RIG-I-like e svolge un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria innata antivirale, riconoscendo nel citoplasma l'RNA virale a doppio filamento e attivando una cascata di segnali intracellulari determinando la

produzione di interferoni di tipo I e l'attivazione di geni coinvolti nella risposta antivirale e infiammatoria **(Figura 3)**.

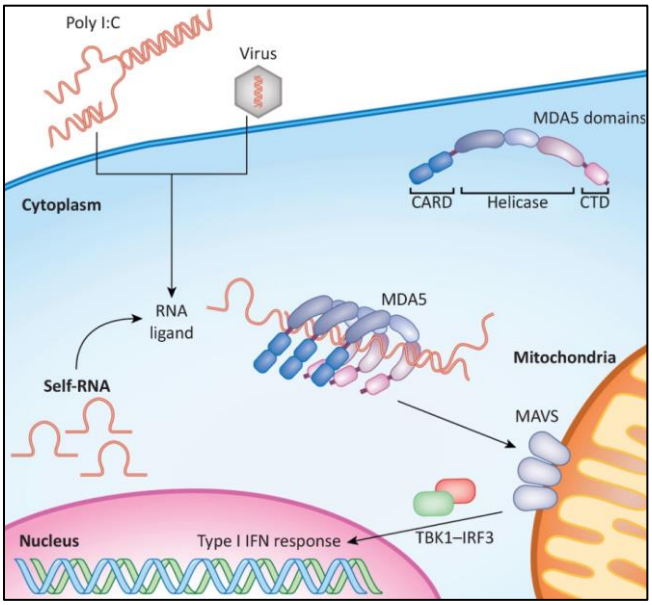


Figura 3. *Pathway* MDA5 (Junior et al., 2019).

Sono autoanticorpi miosite-specifici associati a un particolare fenotipo di DM, caratterizzato prevalentemente da manifestazioni cutanee, frequente assenza o modesta entità del coinvolgimento muscolare e un'elevata predisposizione allo sviluppo di malattia polmonare interstiziale (RP-ILD) (Hu et al., 2021). Gli anti-MDA5 furono inizialmente identificati in pazienti giapponesi affetti da CADM, nei quali erano stati precedentemente descritti autoanticorpi rivolti contro una proteina di circa 140 kDa, denominata CADM-140 (Sato et al., 2005). Successivamente, MDA5 è stata identificata come il principale autoantigene riconosciuto da tali anticorpi, permettendo di definire un sottogruppo sierologicamente e clinicamente distinto di pazienti con DM (Sato et al., 2009). Il fenotipo anti-MDA5+ è caratterizzato da manifestazioni cutanee peculiari, tra cui papule di Gottron, ulcerazioni cutanee e manifestazioni vasculopatiche e articolari. Il coinvolgimento muscolare può invece essere assente o limitato, configurando forme clinicamente amiopatiche o ipomiopatiche. L'RP-ILD rappresenta la principale complicanza sistemica, caratterizzata da un decorso rapidamente progressivo e da una prognosi sfavorevole. Il coinvolgimento polmonare sembra inoltre essere strettamente connesso ai meccanismi immunopatologici della malattia. Nei pazienti con DM associata a ILD è stata osservata un'elevata espressione di MDA5 a livello del tessuto polmonare; inoltre, nei soggetti anti-MDA5+ è stata riscontrata una maggiore deposizione di componenti del complemento e immunoglobuline rispetto ai pazienti anti-

MDA5–. In un modello murino transgenico per MDA5 umano, la somministrazione di anticorpi anti-MDA5 ha determinato danno polmonare accompagnato da deposizione di immunoglobuline e complemento, fornendo un'ulteriore evidenza a sostegno di un possibile ruolo degli immunocomplessi nella patogenesi del danno polmonare (Zaizen et al., 2023). Ai pazienti anti-MDA5+ è associata un'elevata mortalità, richiedendo pertanto un riconoscimento precoce e un tempestivo trattamento immunosoppressivo (Fuzzi et al., 2022; Lu et al., 2024). Tra i principali fattori associati a un decorso sfavorevole sono stati descritti livelli elevati di ferritina e LDH, febbre, linfopenia e altri marcatori di intensa attivazione infiammatoria e macrofagica. Anche i livelli sierici degli anticorpi anti-MDA5 possono fornire informazioni sull'attività e sull'andamento della malattia, sebbene il loro valore prognostico debba essere interpretato nel contesto del quadro clinico complessivo. Dal punto di vista patogenetico, l'associazione tra MDA5 e risposta antivirale ha portato a ipotizzare un possibile ruolo delle infezioni virali nell'innesco della malattia. In particolare, l'attivazione persistente dell'asse MDA5/interferone di tipo I potrebbe contribuire alla perdita della tolleranza immunologica e alla successiva produzione di autoanticorpi (Jin et al., 2023). Nei pazienti anti-MDA5+ sono stati infatti osservati elevati livelli di IFN-α e una forte attivazione dei geni regolati dall'interferone di tipo I sia nelle cellule mononucleate del sangue periferico sia nei tessuti cutanei. È stato inoltre ipotizzato che infezioni virali o altri stimoli ambientali possano determinare il rilascio di MDA5 e di RNA nell'ambiente extracellulare, favorendo la formazione di immunocomplessi contenenti MDA5 e autoanticorpi anti-MDA5 (Hu et al., 2021). Questi ultimi sembrano contribuire al mantenimento della risposta interferonica: studi in vitro hanno infatti dimostrato che gli immunocomplessi contenenti MDA5 e anti-MDA5 possono stimolare le cellule dendritiche plasmacitoidi e indurre la produzione di IFN-α attraverso un meccanismo dipendente dall'RNA e dal recettore Toll-like 7 (TLR7). Si configurerebbe pertanto un possibile circuito di amplificazione nel quale il riconoscimento dell'RNA da parte di MDA5 promuove la risposta interferonica, mentre gli immunocomplessi MDA5–anti-MDA5 contribuiscono a mantenerla attiva, favorendo la persistenza dell'infiammazione e dell'autoimmunità (Wang et al., 2021). Il possibile coinvolgimento di fattori infettivi è stato ulteriormente suggerito da osservazioni epidemiologiche e cliniche. Alcuni pazienti anti-MDA5+ riferiscono infatti sintomi simil-influenzali prima dell'esordio della malattia, studi epidemiologici hanno evidenziato una distribuzione stagionale dei casi e una particolare concentrazione geografica di pazienti in determinate aree, suggerendo il possibile contributo di fattori ambientali o infettivi. Anche l'infezione da SARS-CoV-2 è stata proposta come possibile fattore scatenante in soggetti predisposti, sebbene le evidenze

disponibili non consentano ancora di stabilire un rapporto causale diretto (So et al., 2022; Lu et al., 2024).

- **Anticorpi anti aminoacil-tRNA sintetasi** (anti-ARS) costituiscono una famiglia di autoanticorpi diretti contro gli enzimi fondamentali per la sintesi proteica (ARS), responsabili della catalisi dell'aminoacilazione dei tRNA, mediante l'attacco dello specifico amminoacido al corrispondente tRNA. Oltre alla loro funzione canonica nella traduzione proteica, le ARS svolgono ulteriori funzioni cellulari e immunologiche e possono essere rilasciate nello spazio extracellulare, contribuendo potenzialmente all'attivazione delle risposte immunitarie. La presenza di autoanticorpi diretti contro una delle ARS è fortemente associata alla sindrome antisintetasica (ASS), una condizione autoimmune caratterizzata dalla presenza di un anticorpo anti-ARS e da una o più manifestazioni cliniche tipiche, tra cui ILD, miosite, artrite, fenomeno di Raynaud, mechanic's hands e febbre. Tra i diversi anti-ARS, l'anti-Jo1, diretto contro l'istidil-tRNA sintetasi (HisRS), rappresenta la specificità più frequentemente identificata. Gli altri principali autoanticorpi riconosciuti comprendono anti-PL7, diretto contro la treonil-tRNA sintetasi; anti-PL12, diretto contro l'alanil-tRNA sintetasi; anti-EJ, diretto contro la glicil-tRNA sintetasi; anti-OJ, associato al complesso multisintetasico; anti-KS, diretto contro l'asparaginil-tRNA sintetasi; anti-Zo, diretto contro la fenilalanil-tRNA sintetasi; e anti-Ha, diretto contro la tirosil-tRNA sintetasi (Galindo-Feria et al., 2022; Marco e Collins, 2020). Le diverse specificità anti-ARS presentano una distribuzione variabile e si associano a fenotipi clinici parzialmente distinti. In un recente studio condotto su 205 pazienti con ASS, l'anti-Jo1 rappresentava la specificità più frequente (49,3%), seguito da anti-PL7 (19,0%), anti-EJ (11,2%), anti-PL12 (10,2%) e anti-OJ (3,4%); il 6,8% dei pazienti presentava inoltre positività per più di un anti-ARS. Nella stessa coorte, le manifestazioni muscolari erano presenti nel 56,1% dei pazienti all'esordio, senza differenze significative tra le diverse specificità anticorpali, mentre le manifestazioni articolari risultavano più frequenti nei soggetti anti-Jo1 e quelle cutanee nei pazienti positivi per anti-PL7, anti-PL12 e anti-EJ. L'ILD rappresentava una delle principali manifestazioni dell'ASS, interessando il 54,1% dei pazienti all'esordio e raggiungendo il 100% dei soggetti anti-EJ durante il follow-up (H. S. Tang et al., 2025). Sul piano prognostico, l'ILD rappresenta una delle principali manifestazioni determinanti l'*outcome* dell'ASS e può evolvere verso fibrosi polmonare progressiva, associata a una prognosi significativamente peggiore, in particolare nei pazienti anti-PL7 (Shan et al., 2025). Anche le manifestazioni cutanee quali rash eliotropo e papule di

Gottron possono essere presenti sebbene tradizionalmente considerate caratteristiche della DM. Un'analisi del registro internazionale MYONET, comprendente 649 pazienti con ASS, ha evidenziato manifestazioni cutanee di tipo dermatomiositico nel 31% dei casi, confermando la possibilità di una significativa sovrapposizione fenotipica tra ASS e DM (Hum et al., 2024). Dal punto di vista patologico, l'ASS si distingue dalla DM anche per la diversa espressione della myxovirus resistance protein A (MxA), la cui positività sarcoplasmatica, caratteristica della DM, risulta generalmente assente nei pazienti con ASS (Uruha et al., 2019). Tuttavia, studi più recenti hanno documentato una positività per MxA anche in una minoranza di pazienti con ASS, suggerendo che la sua assenza sia caratteristica ma non assoluta e che il reperto debba pertanto essere interpretato nel contesto del quadro clinico e sierologico (Xing et al., 2024). Sebbene gli anti-ARS sopra descritti rappresentino le specificità classicamente associate all'ASS, la caratterizzazione del repertorio autoanticorpale è tuttora in evoluzione. Studi recenti hanno infatti identificato nuove reattività dirette contro altre ARS, tra cui cisteinil- e valil-tRNA sintetasi, suggerendo che il repertorio degli autoantigeni coinvolti nelle miositi potrebbe essere più ampio di quanto precedentemente riconosciuto (Muro et al., 2022).

- **Anticorpi anti-TIF1γ** (transcriptional intermediary factor-1γ) sono autoanticorpi miosite-specifici diretti contro TIF1γ, una proteina appartenente alla famiglia TRIM (tripartite motif), codificata dal gene TRIM33 e coinvolta in diversi processi cellulari, tra cui la regolazione trascrizionale, la riparazione del DNA, la differenziazione cellulare e la proliferazione. Gli anticorpi anti-TIF1γ sono associati alla JDM e, nell'adulto, alla DM associata a neoplasia. La loro presenza identifica un fenotipo clinico caratterizzato da manifestazioni cutanee particolarmente marcate, miosite generalmente più lieve e frequente coinvolgimento esofageo con disfagia (Kotobuki et al., 2021). In particolare, nei pazienti adulti con DM anti-TIF1γ+ sono state osservate più frequentemente manifestazioni quali rash eliotropo, shawl sign e V sign, mentre il coinvolgimento polmonare interstiziale e le mechanic's hands risultano meno comuni (Yang et al., 2022). L'associazione più rilevante dal punto di vista clinico è tuttavia quella con il rischio di malignità. In uno studio recentemente condotto su pazienti con DM anti-TIF1γ+, la prevalenza complessiva di neoplasie associate alla miosite è risultata intorno al 40%, con un'ampia variabilità tra le diverse casistiche, che può oscillare da valori prossimi al 20% fino a superare l'80%. Inoltre, alcuni fattori clinici si associano a un rischio oncologico più elevato: un'età superiore ai 65 anni, un intervallo più breve tra l'esordio dei sintomi e la

diagnosi di DM e livelli più alti di velocità di eritrosedimentazione (Tang et al., 2024). La relazione tra anti-TIF1γ e neoplasia è particolarmente rilevante nei primi anni successivi all'esordio della DM, rendendo l'identificazione di questi autoanticorpi uno strumento importante per la stratificazione del rischio oncologico e per l'impostazione di un adeguato percorso di screening e monitoraggio nei pazienti adulti (Kotobuki et al., 2021; Tang et al., 2024).

- **Anticorpi anti-NXP2** (nuclear matrix protein 2). Sono autoanticorpi miosite-specifici diretti contro NXP2, una proteina appartenente alla famiglia microrchidia (MORC), costituita da proteine nucleari caratterizzate da un'ampia gamma di funzioni biologiche, tra cui la regolazione della trascrizione, la condensazione e il rimodellamento della cromatina e la riparazione delle rotture del DNA. NXP2/MORC3 è inoltre stata localizzata nei corpi nucleari PML, dove può reclutare p53 e favorirne l'attivazione, inducendo la senescenza cellulare ed è stata inoltre implicata nella regolazione della replicazione virale (Ver et al., 2015). Gli anticorpi anti-NXP2 sono stati inizialmente identificati come marcatori della JDM, nella quale rappresentano uno degli autoanticorpi più frequentemente riscontrati ma sono stati successivamente descritti anche nei pazienti adulti con DM e, più raramente, in altre forme di miosite (Fredi et al., 2022). La loro presenza definisce un fenotipo caratterizzato da un marcato coinvolgimento muscolare, con debolezza prossimale e distale, mialgia, atrofia e frequente disfagia; possono inoltre essere presenti edema sottocutaneo e contratture articolari. Una caratteristica particolarmente associata al fenotipo anti-NXP2+ è la calcinosi, soprattutto nei pazienti con JDM, nei quali si osserva una maggiore frequenza di questa complicanza e una più elevata probabilità di svilupparla in presenza dell'autoanticorpo (Chung et al., 2020). Negli adulti, la positività per anti-NXP2 si correla invece più frequentemente con un coinvolgimento muscolare severo e con disfagia, pur non escludendo la possibilità che la calcinosi si manifesti anche in questa fascia di età (Liu et al., 2023). La presenza di anti-NXP2 è inoltre associata in alcuni casi a un aumentato rischio di malignità negli adulti, con una particolare prevalenza nei soggetti di sesso maschile e di età avanzata. In particolare, alcuni studi hanno riportato una frequenza di neoplasie compresa tra il 24% e il 37,5% nei pazienti adulti anti-NXP2+ rispetto ai pazienti anti-NXP2– (Aussy et al., 2017). Pertanto, l'identificazione degli anticorpi anti-NXP2 risulta particolarmente utile per definire un fenotipo di DM e nell'adulto la loro positività può rappresentare anche un elemento da considerare nella valutazione complessiva del rischio oncologico (Liu et al., 2023).

- **Anticorpi anti Mi-2.** Sono autoanticorpi diretti contro Mi-2α e Mi-2β, componenti del complesso nucleosome-remodeling deacetylase (NuRD), coinvolto nella regolazione della struttura della cromatina e dell'espressione genica. Sono prevalentemente associati alla DM classica e risultano più frequenti nelle popolazioni occidentali, nelle quali possono essere rilevati in circa il 20–25% dei pazienti con DM, mentre la prevalenza tende a essere inferiore nelle popolazioni asiatiche, attestandosi intorno al 10% (Ogawa-Momohara e Muro, 2025). Il fenotipo clinico è caratterizzato da un marcato coinvolgimento muscolare, spesso associato alle manifestazioni cutanee tipiche della DM, e da livelli elevati di CK. Il coinvolgimento di ILD è generalmente meno frequente rispetto ad altri sottogruppi sierologici di DM e, analogamente, le complicanze neoplastiche sembrano presentarsi con minore frequenza; tuttavia, la presenza di ILD non può essere esclusa e, quando presente, può assumere un decorso clinicamente rilevante (Flashner et al., 2025). Nel complesso, i pazienti anti-Mi-2+ presentano una buona risposta alla terapia immunosoppressiva e una prognosi generalmente favorevole. È stata inoltre descritta un'associazione tra esposizione alla radiazione ultravioletta (UV) e sviluppo di autoanticorpi anti-Mi-2, supportata sia da studi epidemiologici sia da evidenze più recenti che suggeriscono un possibile ruolo dell'esposizione UV nella promozione della risposta autoimmune contro Mi-2, sottolineando il contributo dei fattori ambientali alla patogenesi della DM (Guel et al., 2023).

- **Anticorpi anti-SAE** (small ubiquitin-like modifier activating enzyme). Sono autoanticorpi miosite-specifici rari, associati prevalentemente alla DM. SAE è un complesso enzimatico nucleare coinvolto nell'attivazione della proteina SUMO (small ubiquitin-like modifier) e nella conseguente sumoilazione, una modifica post-traduzionale reversibile che partecipa alla regolazione di numerosi processi cellulari, tra cui l'attività, la localizzazione e la stabilità delle proteine. Gli autoanticorpi anti-SAE sono stati identificati per la prima volta nel 2007 e caratterizzano un particolare fenotipo di DM, nel quale le manifestazioni cutanee quali eritema diffuso, prurito, ulcerazioni e, più raramente, necrosi, rappresentano spesso il segno clinico predominante e possono precedere di alcuni mesi l'insorgenza della miosite (Demortier et al., 2023). L'interessamento muscolare tende invece a essere relativamente lieve, come indicato dai livelli generalmente più contenuti di CK e dalla minore presenza di necrosi e degenerazione delle fibre muscolari rispetto ad altri sottogruppi di DM. Sebbene

l'interessamento polmonare sia meno caratteristico rispetto ad altri fenotipi di miosite, l'ILD può comunque manifestarsi e dovrebbe pertanto essere sistematicamente ricercata (Demortier et al., 2023; Fornaro et al., 2024). Un'ulteriore caratteristica clinica rilevante è la disfagia, mentre particolare attenzione deve essere riservata al rischio di neoplasia: una quota di pazienti ha presentato una cancer-associated myositis e, in un recente studio cinese, le neoplasie hanno rappresentato la principale causa di morte (Zhang et al., 2025). Più recentemente, è stata inoltre evidenziata la possibile persistenza e refrattarietà delle manifestazioni cutanee, che in alcuni pazienti possono richiedere trattamenti immunosoppressivi multipli nonostante il relativamente modesto coinvolgimento muscolare (Depascale et al., 2025).

- **Anticorpi anti-SRP** (signal recognition particle). Rappresentano una delle principali specificità autoanticorpali associate alla IMNM. L'SRP è un complesso ribonucleoproteico coinvolto nel riconoscimento delle sequenze segnale delle proteine neosintetizzate e nel loro indirizzamento verso il reticolo endoplasmatico, consentendone la corretta traslocazione durante la traduzione. La positività per gli anticorpi anti-SRP identifica generalmente un fenotipo caratterizzato da esordio acuto o subacuto e marcata debolezza muscolare prossimale e simmetrica, spesso associata a elevati livelli di CK e a necrosi e rigenerazione delle fibre muscolari con scarso infiltrato infiammatorio (Ma e Bu, 2022; Li et al., 2024). Il coinvolgimento extramuscolare è meno predominante rispetto alla componente muscolare, ma possono essere presenti disfagia, ILD e interessamento cardiaco, quest'ultimo particolarmente rilevante per le implicazioni prognostiche e meritevole di un attento monitoraggio (Ma e Bu, 2022; Clark et al., 2026). Studi recenti hanno inoltre evidenziato una significativa eterogeneità clinica all'interno del fenotipo anti-SRP: accanto a forme acute caratterizzate da severa debolezza muscolare e buona risposta al trattamento, sono state identificate forme subacute e sottogruppi associati a prognosi meno favorevole, caratterizzati da una maggiore frequenza di ILD e coinvolgimento cardiaco, nonché da maggiore rischio di refrattarietà e recidiva (Cui et al., 2025). Il coinvolgimento cutaneo è invece poco caratteristico, contribuendo a distinguere il fenotipo anti-SRP dalle forme di DM associate ad altre specificità autoanticorpali (Clark et al., 2026).

- **Anticorpi anti-HMGCR** (3-idrossi-3-metilglutaril-CoA reduttasi). Identificano la IMNM, caratterizzata da una marcata componente muscolare e fortemente associato, sebbene non esclusivamente, all'esposizione alle statine. HMGCR è l'enzima che catalizza la conversione dell'HMG-CoA in mevalonato e rappresenta il principale bersaglio farmacologico delle statine, che ne inibiscono l'attività limitando la sintesi epatica del colesterolo. La presenza di anticorpi anti-HMGCR è stata infatti riscontrata sia in pazienti precedentemente esposti alle statine sia in soggetti statin-naïve, evidenziando come l'esposizione farmacologica non sia una condizione necessaria per lo sviluppo della malattia e suggerendo l'esistenza di differenti meccanismi patogenetici. Il quadro clinico è generalmente caratterizzato da debolezza muscolare prossimale simmetrica, spesso associata a marcato incremento dei livelli di CK, e può persistere o progredire anche dopo la sospensione delle statine, distinguendosi dalle più comuni manifestazioni muscolari tossiche associate a questi farmaci. Sono state inoltre descritte differenze fenotipiche tra pazienti statin-exposed e statin-naïve: i primi sono generalmente più anziani e presentano una storia di esposizione alle statine, mentre i secondi tendono a essere più giovani e possono manifestare un decorso più prolungato e una maggiore refrattarietà al trattamento; tuttavia, le differenze nella risposta terapeutica non sono assolute e non consentono di considerare i due gruppi come entità clinicamente completamente distinte (Khoo e Chinoy, 2023). Più recentemente, studi sperimentali hanno inoltre fornito evidenze a sostegno di un possibile ruolo patogenetico diretto degli autoanticorpi anti-HMGCR, dimostrando la loro capacità di inibire l'attività dell'enzima e di favorire l'accumulo sarcoplasmatico di lipidi e la necrosi delle fibre muscolari (Giannini et al. 2025). Nonostante la forte associazione con le statine, l'incidenza della malattia rimane relativamente bassa e la reale frequenza del disturbo nella popolazione è stata solo recentemente oggetto di studi epidemiologici dedicati (Khoo et al., 2025).

- **Anticorpi anti cN-1A** (cytosolic 5'-nucleotidase 1A). La cN1A, codificata dal gene NT5C1A, è un enzima citosolico appartenente alla famiglia delle 5'-nucleotidasi, particolarmente espresso nel muscolo scheletrico e coinvolto nella regolazione del metabolismo nucleotidico attraverso l'idrolisi dell'adenosina monofosfato ad adenosina e fosfato inorganico (Daniel et al., 2024). Gli autoanticorpi anti-cN1A sono stati identificati come una caratteristica sierologica della IBM e presentano una sensibilità moderata e una specificità generalmente elevata. La loro presenza può pertanto fornire un utile supporto diagnostico, soprattutto nei pazienti con un quadro clinico o istopatologico non

completamente caratteristico, ma non è sufficiente da sola a stabilire la diagnosi di IBM, poiché anticorpi anti-cN1A possono essere riscontrati anche in altre miopatie infiammatorie e in malattie autoimmuni sistemiche, in particolare nel LES e nella SjD. La IBM si distingue dalle altre miositi per la combinazione di un processo infiammatorio autoimmune e di fenomeni degenerativi, caratterizzati da atrofia muscolare, accumulo di proteine e formazione di vacuoli marginati; il quadro clinico è contraddistinto da una debolezza muscolare lentamente progressiva, con interessamento preferenziale dei flessori profondi delle dita e dei quadricipiti, e da una risposta generalmente scarsa alle terapie immunosoppressive (Salam et al., 2022). Sebbene il significato prognostico degli anti-cN1A rimanga ancora controverso, alcuni studi hanno evidenziato un'associazione tra la loro positività e manifestazioni cliniche più severe, in particolare una maggiore compromissione della deglutizione (Lucchini et al., 2021). Pertanto, gli anti-cN1A rappresentano soprattutto un biomarcatore complementare, da interpretare nel contesto del quadro clinico, degli esami strumentali e delle caratteristiche istopatologiche, piuttosto che un criterio diagnostico isolato (Daniel et al., 2024).

MAA:

- **Anticorpi anti-PM/Scl**. Sono diretti principalmente contro le proteine PM/Scl-75 e PM/Scl-100, corrispondenti rispettivamente alle componenti EXOSC9 ed EXOSC10 del complesso esosomiale dell'RNA, una struttura nucleare coinvolta nel processamento e nella degradazione degli RNA. Il complesso PM/Scl presenta una localizzazione nucleolare e la sua identificazione mediante immunofluorescenza indiretta è caratterizzata tipicamente da un pattern nucleolare (Ogawa-Momohara e Muro, 2025). La storia di questi autoanticorpi ha origine nel 1977, quando Wolfe et al. descrissero per la prima volta, in pazienti con PM, un'attività autoanticorpale diretta contro un antigene successivamente denominato PM-1. Negli anni seguenti fu chiarita la sua associazione con la sindrome di sovrapposizione tra PM e SSc, e il complesso antigenico venne identificato come PM/Scl. Le analisi molecolari condotte all'inizio degli anni '90 permisero infine di caratterizzare le principali componenti antigeniche del complesso, note come PM/Scl-75 e PM/Scl-100 (Mahler e Raijmakers, 2007). Gli anti-PM/Scl sono considerati autoanticorpi associati alla miosite e si riscontrano soprattutto nelle sindromi di sovrapposizione tra SSc e IIM, sebbene possano essere presenti anche in pazienti con DM o PM in assenza di caratteristiche cliniche definite di SSc. Nei pazienti con SSc, la loro presenza è stata associata a una maggiore frequenza di miosite, manifestazioni cutanee della DM, calcinosi e ILD (Cavazzana et al., 2023). Evidenze più recenti hanno inoltre ampliato la caratterizzazione del fenotipo anti-PM/Scl: in una coorte di

pazienti con IIM senza SSc, i soggetti anti-PM/Scl+ hanno mostrato più frequentemente interessamento polmonare e articolare, fenomeno di Raynaud, *mechanic's hands* e *hiker's feet*, oltre a una maggiore attività di malattia e frequenza di recidive, delineando un quadro clinico per alcuni aspetti simile alla ASS (Barbosa e Shinjo, 2025).

- **Anticorpi anti Ku**. Ku è un complesso proteico nucleare eterodimerico costituito dalle subunità Ku70 e Ku80, coinvolto principalmente nel riconoscimento delle estremità del DNA e nei processi di riparazione delle rotture a doppio filamento attraverso il pathway della *Non-Homologous End Joining* (NHEJ). Gli autoanticorpi anti-Ku, inizialmente descritti in pazienti con sindrome di sovrapposizione PM/SSc, possono essere riscontrati in diverse malattie sistemiche del tessuto connettivo. Nei pazienti con miosite anti-Ku+ è stato descritto un fenotipo caratterizzato da debolezza muscolare prevalentemente distale, frequente interessamento polmonare interstiziale e scarsa frequenza delle manifestazioni cutanee tipiche della DM, mentre la calcinosi appare assente (Casal-Dominguez et al., 2021). Sono stati inoltre descritti casi di miosite con predominante coinvolgimento della muscolatura assiale, associato in alcuni casi a miocardite, sebbene non sia ancora stabilito se tali manifestazioni siano effettivamente più frequenti nei pazienti anti-Ku+ rispetto alle altre IIM (Kono et al., 2022). Dal punto di vista istopatologico, la miosite anti-Ku può presentare caratteristiche di miopatia necrotizzante, associate tuttavia a espressione di MHC di classe II e aggregati infiammatori perivascolari, elementi che la distinguono dalle miopatie necrotizzanti immuno-mediate anti-SRP e anti-HMGCR (Oyama et al., 2024).

- **Anticorpi anti SSA/Ro.** Rappresentano una delle principali specificità autoanticorpali appartenenti al gruppo degli autoanticorpi anti-ENA (*Extractable Nuclear Antigens*) e sono classicamente associati a malattie autoimmuni sistemiche quali la SjD e il LES. Tuttavia, il sistema Ro/SSA non costituisce un singolo bersaglio antigenico, ma comprende almeno due differenti proteine, Ro60 e Ro52, caratterizzate da struttura, localizzazione e funzioni biologiche distinte. Per tale motivo, la denominazione generica di "anti-SSA/Ro" può risultare poco precisa dal punto di vista diagnostico e clinico, rendendo preferibile la determinazione separata degli autoanticorpi anti-Ro60 e anti-Ro52/TRIM21 (Lee et al., 2021). Studi recenti hanno ulteriormente sottolineato la necessità di distinguere queste due specificità sierologiche, raccomandando l'impiego delle denominazioni anti-TROVE2/Ro60 e anti-

TRIM21/Ro52 nella pratica scientifica e nella refertazione laboratoristica (Nikolic et al. 2026). Ro52, corrispondente alla proteina *tripartite motif-containing 21* (TRIM21), è una proteina intracellulare appartenente alla famiglia delle TRIM e caratterizzata dalla presenza di un dominio RING con attività di ligasi E3 dell'ubiquitina, di un dominio B-box, di una regione *coiled-coil* e di un dominio C-terminale PRYSPRY responsabile del riconoscimento del frammento Fc delle immunoglobuline **(Figura 4)**.

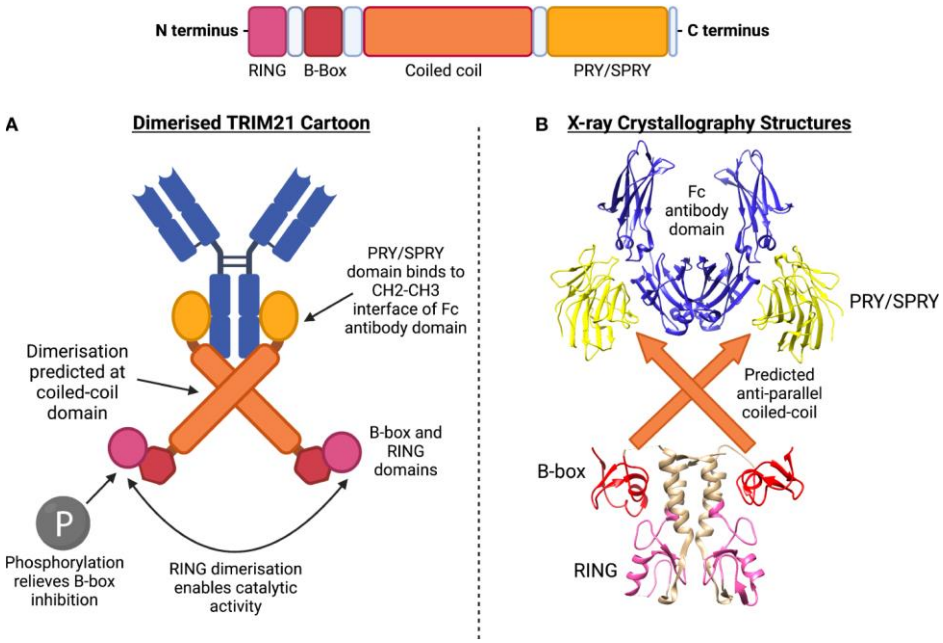


Figura 4. La struttura di TRIM21 include i domini RING, B-box, coiled-coil e PRY/SPRY. (A) Schema del dimero di TRIM21 che illustra l'organizzazione dei domini e il legame del dominio PRY/SPRY alla regione costante (Fc) dell'anticorpo. La dimerizzazione attraverso il dominio coiled-coil è prevista per omologia con altri membri della famiglia TRIM. La fosforilazione del motivo LxxIS nel dominio RING allevia l'inibizione esercitata dal B-box, consentendo la dimerizzazione dei domini RING necessaria per l'attività catalitica. (B) Strutture cristallografiche a raggi X di TRIM21: (1) il dominio PRY/SPRY in complesso con il dominio Fc dell'anticorpo; (2) i domini B-box e RING cristallizzati in una conformazione dimerica. La struttura a spirale centrale prevista per il coiled-coil non è stata formalmente identificata. (Jones et al., 2021).

TRIM21 svolge un ruolo centrale nell'immunità innata e nella difesa antivirale, agendo come recettore intracellulare per le immunoglobuline associate a particelle patogene penetrate nel citosol. Il legame con il dominio Fc delle IgG permette a TRIM21 di favorire l'ubiquitinazione e la successiva degradazione proteasomica dei complessi immunoglobulina-patogeno, contribuendo così alla neutralizzazione intracellulare degli agenti infettivi. La proteina

partecipa inoltre alla regolazione della trasduzione del segnale e dell'attività di diversi fattori della famiglia degli *Interferon Regulatory Factors* (IRF), modulando la produzione di interferoni di tipo I e altre risposte infiammatorie. Alterazioni dell'espressione o della funzione di TRIM21 possono pertanto contribuire alla perdita della tolleranza immunologica e allo sviluppo di autoanticorpi diretti contro questa proteina (Holwek et al. 2023; Jones et al., 2021).

Ro60, recentemente indicata anche come TROVE2, è invece una proteina di circa 60 kDa che differisce strutturalmente e funzionalmente da TRIM21. Ro60 è una componente dei piccoli complessi ribonucleoproteici associati agli Y-RNA e svolge un ruolo nel riconoscimento e nella gestione di RNA aberranti o mal ripiegati, contribuendo alla qualità e all'omeostasi dell'RNA cellulare **(Figura 5)**. Sebbene anti-Ro60 e anti-Ro52 vengano frequentemente rilevati contemporaneamente, non esistono evidenze che dimostrino che le due specificità autoanticorpali siano necessariamente legate da un unico processo antigenico; la loro coesistenza può piuttosto riflettere la convergenza di distinti fenomeni di perdita della tolleranza immunologica (Lee et al., 2021).

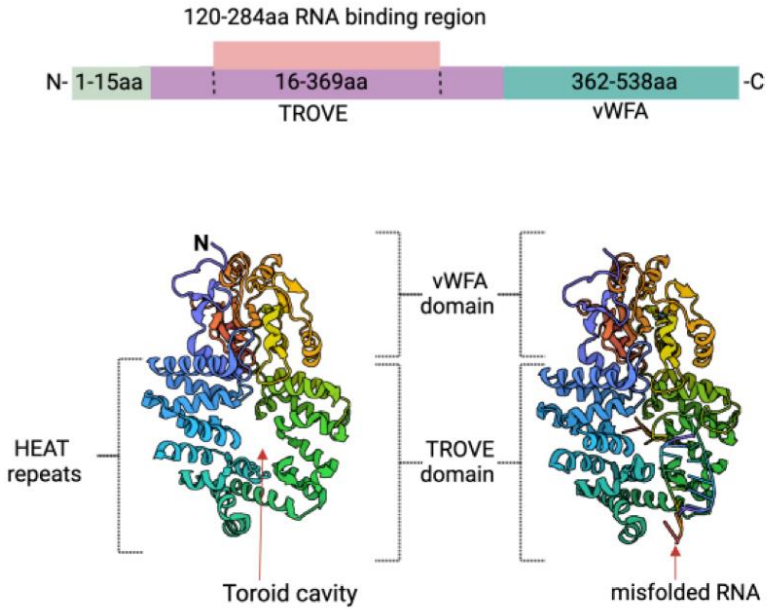


Figura 5. Struttura del dominio Ro60/SSA2 e sorveglianza strutturale e funzionale dei piccoli RNA per la distribuzione cellulare. Ro60 comprende due domini principali, vWFA e TROVE (1YVR e 1YVP). Il dominio TROVE è composto da ripetizioni toroidali HEAT (Mahla et al., 2024).

La distinzione tra anti-Ro52 e anti-Ro60 assume particolare rilevanza in ambito clinico, poiché le due specificità presentano differenti associazioni con le malattie autoimmuni. Nello

studio di Robbins et al. **(Figura 6)**, condotto su 399 pazienti positivi per anti-Ro52 e/o anti-Ro60, la positività isolata per anti-Ro60 risultava maggiormente associata al LES, mentre la contemporanea positività per anti-Ro52 e anti-Ro60 era fortemente associata alla SjD primaria. Al contrario, i pazienti con anti-Ro52 isolati presentavano uno spettro di patologie più eterogeneo e, tra le malattie autoimmuni, mostravano una maggiore associazione con le miositi infiammatorie e con i reumatismi infiammatori, mentre risultavano meno frequentemente associati a LES e SjD rispetto ai pazienti con anti-Ro60 o con doppia positività Questi dati sono coerenti con studi precedenti nei quali la reattività anti-Ro52 è risultata particolarmente frequente nelle IIM, dove può essere rilevata più frequentemente rispetto alla reattività anti-Ro60 e può coesistere con altri autoanticorpi miosite-specifici, in particolare anti-Jo-1 (Robbins et al., 2019).

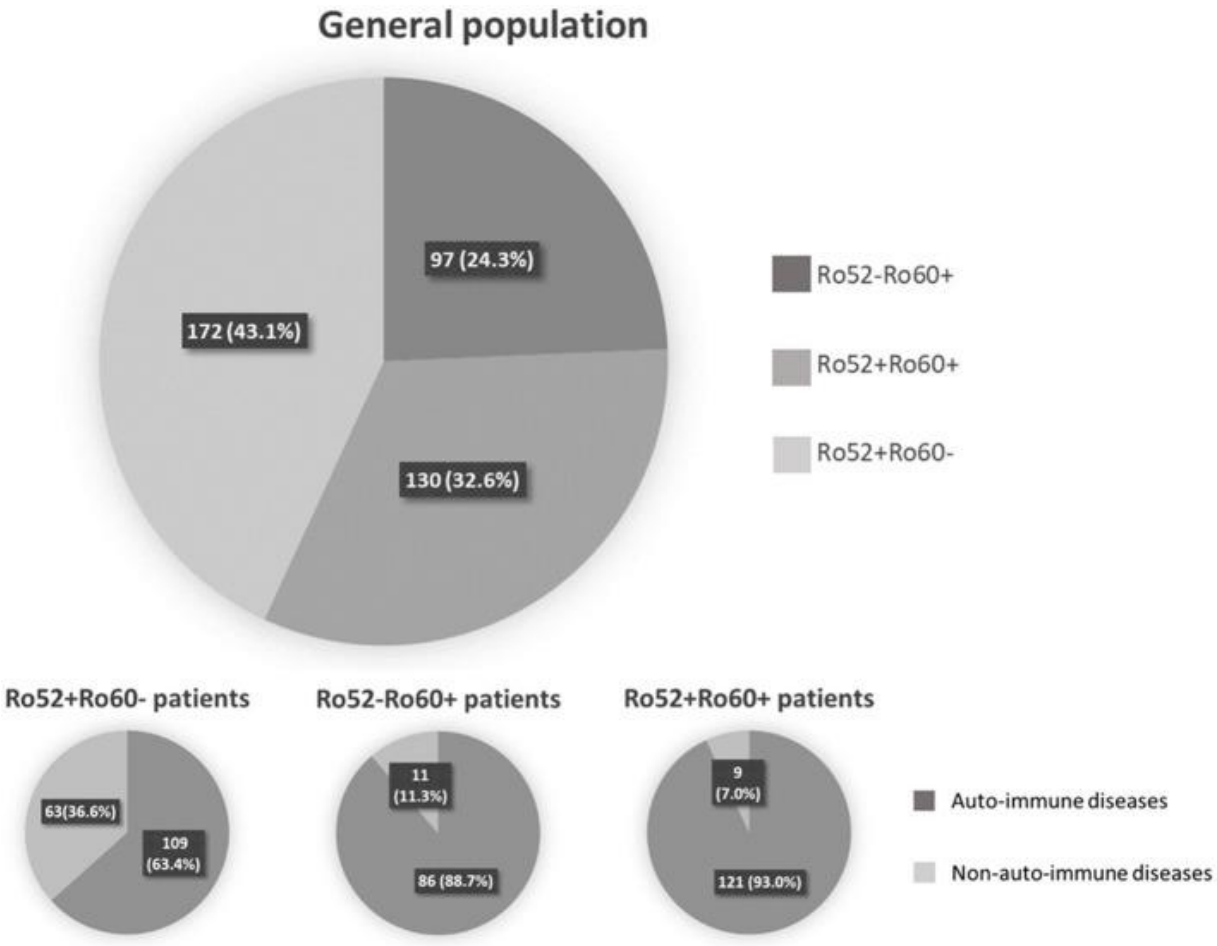


Figura 6. Ripartizione dei pazienti in base alla presenza o all'assenza di anticorpi anti-Ro52 e/o anti-Ro60 (Robbins et al., 2019).

Nelle IIM, l'interesse clinico per gli anticorpi anti-Ro52 è legato soprattutto alla loro associazione con il coinvolgimento polmonare. La presenza di anti-Ro52 non è infatti specifica per una determinata forma di miosite, ma è stata ripetutamente associata a una maggiore frequenza di ILD. È stato evidenziato che gli anti-Ro52 sono presenti in circa il 20–40% dei pazienti con miosite autoimmune e numerosi studi hanno riportato un'associazione tra la loro presenza e l'ILD, in alcuni casi accompagnata da un decorso più severo e da una peggiore sopravvivenza (Chan, 2022). Questa associazione è stata ulteriormente confermata da studi specificamente condotti nelle IIM in cui è stata osservata una prevalenza di ILD significativamente maggiore nei soggetti anti-Ro52+ (64%) rispetto ai negativi (26%). Particolarmente rilevante per le IIM è inoltre l'associazione tra anti-Ro52 e gli autoanticorpi anti-ARS, caratteristica soprattutto dei pazienti con ASS. La positività concomitante per anti-Ro52 e anti-ARS sembra infatti identificare un sottogruppo caratterizzato da un rischio particolarmente elevato di ILD. In uno studio del 2024 condotto su 190 pazienti con IIM, la presenza isolata di anti-Ro52 era associata a un rischio di ILD circa otto volte superiore rispetto all'assenza dell'anticorpo; tale associazione risultava ancora più marcata nei pazienti positivi contemporaneamente per anti-ARS e anti-Ro52, nei quali il rischio di ILD risultava circa 38 volte maggiore. La presenza di anti-ARS da sola era invece associata a un aumento del rischio di circa 14 volte, evidenziando come la combinazione delle due specificità possa avere un importante valore nella stratificazione del rischio polmonare (Weng et al., 2024). Nel complesso, la presenza degli autoanticorpi anti-Ro52 può contribuire alla definizione del fenotipo clinico e, soprattutto, all'identificazione dei pazienti maggiormente predisposti al coinvolgimento polmonare interstiziale. La positività per anti-Ro52, tuttavia, non deve essere interpretata isolatamente, poiché l'anticorpo può essere riscontrato in numerose connettiviti e anche in altre condizioni caratterizzate da coinvolgimento polmonare; il suo significato diagnostico e prognostico deve quindi essere integrato con il quadro clinico, gli altri autoanticorpi presenti e la valutazione della funzione e dell'interessamento polmonare (Decker et al., 2022).

- **Anticorpi anti-U1RNP.** Rappresentano il principale marker sierologico della connettivite mista del tessuto connettivo (MCTD o sindrome di Sharp), ma possono essere riscontrati anche in altre malattie del tessuto connettivo, tra cui LES, SSc e SjD, nonché nei pazienti con miosite e sindrome da overlap. La loro presenza, pertanto, non consente di definire autonomamente uno specifico sottotipo di miosite, ma può contribuire all'identificazione di

un particolare fenotipo clinico. Nei pazienti con miosite anti-U1RNP+, infatti, sono state osservate frequentemente artrite, coinvolgimento muscolare e manifestazioni extramuscolari, tra cui ILD e fenomeno di Raynaud; in particolare, l'80% dei pazienti sviluppava debolezza muscolare durante il decorso della malattia, mentre l'artrite era presente nel 60% dei casi e l'ILD nel 45% (Casal-Dominguez et al., 2019). Studi più recenti hanno inoltre evidenziato che i pazienti con miosite e positività isolata per anti-U1RNP possono presentare caratteristiche cliniche e istopatologiche simili alla IMNM, con una maggiore frequenza di alterazioni necrotizzanti alla biopsia muscolare, elevati livelli di CK e una prevalenza di ILD del 56%; in questi pazienti, artrite e fenomeno di Raynaud rappresentano ulteriori manifestazioni extramuscolari caratteristiche (Ge et al., 2023). L'U1-snRNP è uno dei cinque small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNP) che costituiscono lo spliceosoma dei mammiferi, complesso macromolecolare deputato al processamento del pre-mRNA attraverso la rimozione delle sequenze introniche e la giunzione degli esoni per la formazione dell'mRNA maturo. L'U1-snRNP riconosce in particolare il sito di splicing al 5' del pre-mRNA e comprende l'U1-snRNA associato a specifiche proteine, tra cui U1-70K, U1-A e U1-C, che rappresentano importanti bersagli della risposta autoimmune anti-U1RNP (Kattah et al., 2010).

1.2.3 Metodi di rilevazione degli MAA e MSA

La metodica di riferimento per lo screening iniziale degli autoanticorpi nelle malattie autoimmuni sistemiche, e anche per le miositi, è rappresentata dal test di ricerca degli anticorpi antinucleo citoplasmatici (ANA) mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2 (Yoshida et al., 2024). Esso consente di rilevare autoanticorpi diretti contro differenti componenti cellulari e, attraverso l'identificazione del relativo *pattern* di fluorescenza e del titolo anticorpale, di ottenere una prima indicazione circa la possibile specificità anticorpale. L'ANA test non permette tuttavia, nella maggior parte dei casi, di identificare direttamente il singolo autoanticorpo associato alla miosite e deve pertanto essere considerato principalmente come un test di screening, al quale devono seguire metodiche antigeno-specifiche per la caratterizzazione degli MSA e degli MAA. La sua importanza risiede quindi non soltanto nella possibilità di evidenziare una risposta autoimmune, ma anche nell'orientare le successive indagini sierologiche sulla base del *pattern* osservato.

L'IFI viene eseguita incubando il siero del paziente con cellule HEp-2 precedentemente fissate su un vetrino. Gli eventuali autoanticorpi presenti nel campione riconoscono i rispettivi antigeni cellulari e,

dopo l'aggiunta di un anticorpo secondario anti-IgG umane coniugato con un fluorocromo, possono essere visualizzati mediante microscopia a fluorescenza. L'osservazione della distribuzione della fluorescenza consente di distinguere differenti pattern nucleari, citoplasmatici e mitotici, classificati secondo la nomenclatura definita dall'International Consensus on ANA Patterns (ICAP) **(Figura 7)**.

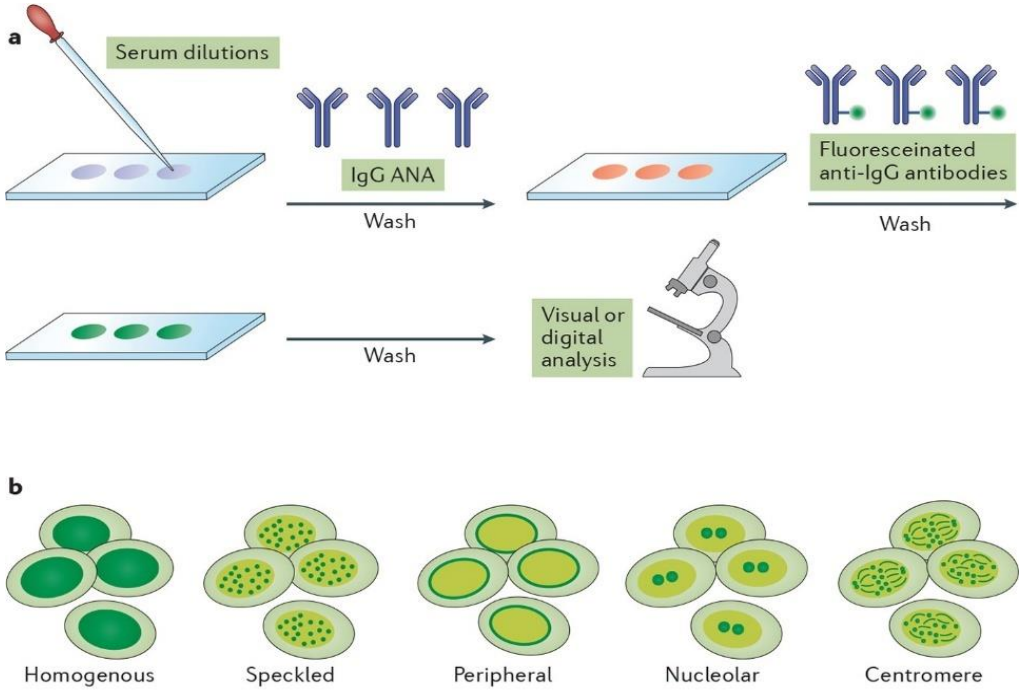


Figura 7. Procedura ANA test: analisi degli anticorpi antinucleo (ANA) mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2 (Pisetsky, 2017).

Tale classificazione ha favorito una maggiore standardizzazione della descrizione dei reperti osservabili mediante IFI e risulta particolarmente importante nelle IIM, nelle quali numerosi autoanticorpi possono essere associati a pattern citoplasmatici oltre che nucleari. Il pattern osservato rappresenta pertanto un elemento di orientamento verso la successiva ricerca di specifiche MSA e MAA mediante metodiche antigeno-specifiche (Andrade et al., 2024; Biesen et al., 2024).

Nell'ambito delle IIM, infatti, l'interpretazione dell'ANA test non dovrebbe essere limitata ai soli pattern nucleari, infatti numerosi autoanticorpi associati alle miositi riconoscono antigeni localizzati nel citoplasma e possono pertanto determinare pattern citoplasmatici all'IFI. Tra questi rientrano gli autoanticorpi antisintetasici, gli anti-SRP e gli anti-MDA5, che possono essere associati a differenti configurazioni citoplasmatiche. Al contrario, autoanticorpi quali anti-Mi-2, anti-TIF1γ, anti-SAE e anti-PM/Scl sono più frequentemente associati a pattern nucleari **(Figura 8)**. La correlazione tra pattern e specificità anticorpale non è tuttavia assoluta, poiché differenti autoanticorpi possono

determinare pattern sovrapponibili e, viceversa, alcuni autoanticorpi possono non produrre una colorazione chiaramente riconoscibile mediante IFI. Inoltre, la presenza di un determinato pattern non consente di identificare con certezza il singolo autoanticorpo e deve pertanto essere considerata un'indicazione per la successiva caratterizzazione antigeno-specifica (McMorrow et al., 2024).

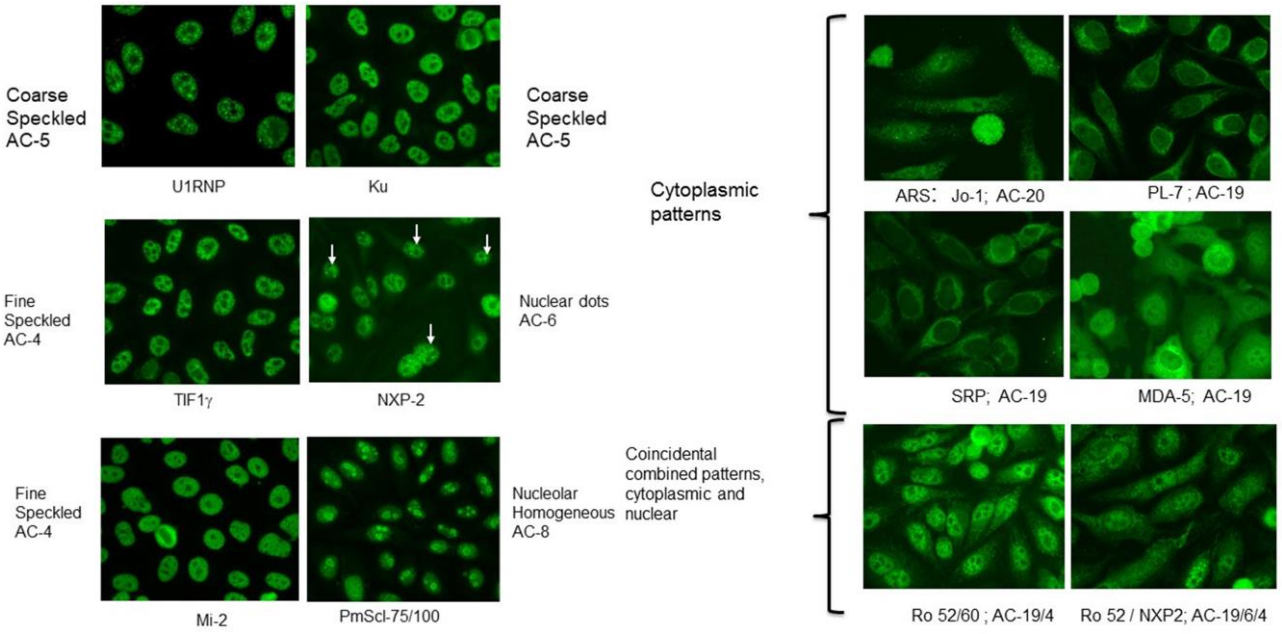


Figura 8. Patterns di colorazione IFI nucleari (a sinistra) e citoplasmatici (a destra) per i principali MSA e MAA con la rispettiva nomenclatura secondo l'International Consensus on Autoantibody Patterns (ICAP) (Stuhlmüller et al., 2019).

L'utilità dell'IFI nell'ambito delle IIM deve quindi essere considerata principalmente in termini di orientamento diagnostico. La presenza di un *pattern* compatibile con una determinata specificità anticorpale può aumentare la plausibilità di un risultato successivamente ottenuto mediante un test antigeno-specifico, mentre un risultato IFI negativo non consente di escludere completamente la presenza di MSA o MAA. Alcuni autoantigeni rilevanti nelle IIM possono infatti essere scarsamente rappresentati o non adeguatamente rilevabili nelle cellule HEp-2, determinando una sensibilità variabile nei confronti delle diverse specificità anticorpali. Inoltre, alcuni autoanticorpi possono determinare una fluorescenza debole o difficilmente riconoscibile. L'interpretazione del risultato può essere ulteriormente condizionata dall'esperienza dell'operatore e dalla variabilità del substrato cellulare. La ricerca degli MSA e degli MAA può essere effettuata mediante differenti metodiche, tradizionalmente distinguibili in test monospecifici e multispecifici. Tra le metodiche monospecifiche rientrano l'immunoprecipitazione (IP), l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e altri immunodosaggi in fase solida, mentre tra quelle multispecifiche sono comprese principalmente il line

immunoassay (LIA), l'addressable laser bead assay (ALBIA) e il dot immunoassay (DIA) (Harvey et al., 2024).

L'IP viene frequentemente utilizzata come metodo comparativo negli studi di validazione dei test commerciali. La metodica presenta il vantaggio di consentire l'identificazione di anticorpi diretti contro differenti componenti antigeniche e di preservare caratteristiche dell'antigene che possono essere alterate nei sistemi di fase solida. Tuttavia, l'IP è una metodica complessa, laboriosa e difficilmente standardizzabile, che richiede competenze e strumentazione specialistiche e il cui impiego rimane pertanto prevalentemente confinato a laboratori di riferimento e di ricerca.

L'ELISA e le altre metodiche immunoenzimatiche in fase solida sono invece maggiormente utilizzabili nella routine diagnostica, grazie alla possibilità di automatizzazione e alla disponibilità di sistemi quantitativi o semiquantitativi. La loro principale limitazione è rappresentata dalla disponibilità di un numero definito di autoantigeni e dalla possibilità che le modalità di preparazione e immobilizzazione dell'antigene ne modifichino la conformazione, influenzando il riconoscimento da parte degli autoanticorpi. Le stesse considerazioni possono essere applicate, con caratteristiche differenti, agli altri immunodosaggi in fase solida. La performance analitica, inoltre, può variare significativamente in funzione dello specifico autoanticorpo ricercato, rendendo necessario valutare separatamente sensibilità e specificità dei singoli sistemi (Gono et al. 2025).

Attualmente, per rispondere alla necessità di effettuare la ricerca contemporanea di numerosi autoanticorpi, sono ampiamente utilizzati test multispecifici semiquantitativi, quale il LIA. In questa metodica, differenti autoantigeni vengono immobilizzati in corrispondenza di specifiche bande su una membrana. Il siero del paziente viene incubato con la strip **(Figura 9)**, consentendo agli eventuali autoanticorpi presenti di legarsi agli antigeni corrispondenti. Dopo l'aggiunta di un anticorpo secondario coniugato con un enzima e di un opportuno substrato, la formazione dei complessi antigene-anticorpo viene evidenziata attraverso una reazione cromogenica; l'intensità delle bande può quindi essere valutata mediante sistemi di lettura automatizzata. Il principale vantaggio di queste metodiche è rappresentato dalla possibilità di ricercare contemporaneamente numerosi MSA e MAA utilizzando una quantità ridotta di siero e con procedure relativamente semplici, rendendole particolarmente adatte alla routine laboratoristica (Ghirardello et al., 2026).

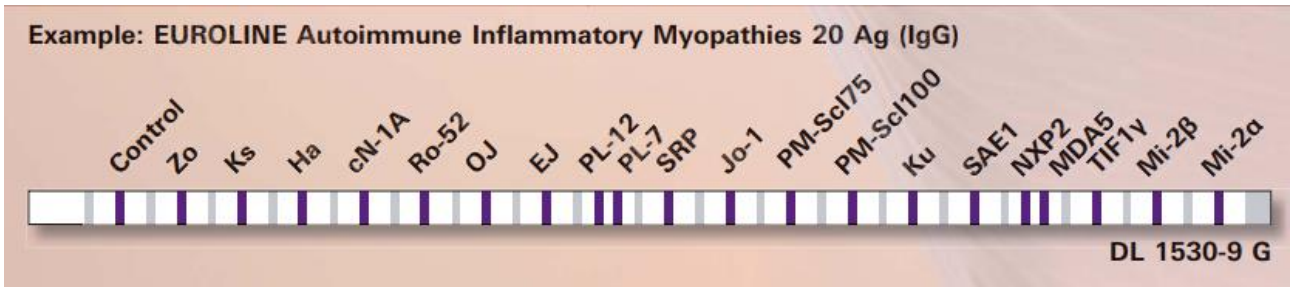


Figura 9. Line blot commerciale con coattati 20 antigeni miosite specifici e miosite associati (EUROIMMUN 2026).

Nonostante la loro diffusione, questi l*ine blot* presentano tuttavia importanti criticità in termini di sensibilità e specificità. Le prestazioni possono infatti variare considerevolmente in funzione dell'autoanticorpo ricercato e del sistema commerciale utilizzato. Una recente revisione ha evidenziato, in particolare, una sensibilità ridotta dei *line blot* per alcuni autoanticorpi clinicamente rilevanti, tra cui anti-TIF1γ e diversi autoanticorpi antisintetasi e la presenza di risultati falsamente positivi, che necessitano quindi un'interpretazione strettamente associata al quadro clinico (He et al., 2022).

Tali problematiche sono state confermate da studi comparativi tra *line blot* e immunoprecipitazione. Confrontando le due metodiche in pazienti con IIM, è stata osservata una concordanza sostanziale per gli anticorpi anti-Ku e anti-PM/Scl e moderata per anti-Jo1 e anti-Mi-2, mentre per diversi altri autoanticorpi la concordanza è risultata limitata o non valutabile. Inoltre, la presenza di positività multiple, osservata esclusivamente mediante *line blot* e non mediante immunoprecipitazione, suggerisce che tali positività debbano essere interpretate come falsi positivi (Angeli et al. 2024).

Questi dati sottolineano come il semplice riscontro di una positività sierologica non sia sufficiente a stabilire la presenza di una IIM e come il valore del risultato debba essere ponderato in relazione alla probabilità pre-test, al fenotipo clinico e non possano essere interpretati in maniera isolata, ma debbano essere integrati tra loro e valutati alla luce della storia clinica del paziente (Al Nokhatha et al., 2021).

Un approccio diagnostico efficace richiede pertanto l'integrazione dei dati clinici, sierologici, laboratoristici, strumentali e, quando indicato, istopatologici. La stretta collaborazione tra il laboratorio di medicina diagnostica e il clinico di riferimento risulta di conseguenza fondamentale per ridurre il rischio di interpretazioni errate, migliorare l'accuratezza diagnostica e consentire una

corretta caratterizzazione del fenotipo del singolo paziente con IIM (Bonroy et al., 2022; Tansley et al., 2020).

2. SCOPO DEL LAVORO

L'eterogeneità delle metodiche attualmente impiegate per la rilevazione degli autoanticorpi miosite-specifici e/o miosite-associati, come ampiamente riportato in letteratura, evidenzia una limitata standardizzazione dei protocolli analitici e una significativa variabilità test-dipendente nella capacità di identificare tali marcatori immunologici. Questa variabilità metodologica rappresenta un elemento critico nella corretta interpretazione dei risultati e, di conseguenza, nella definizione del percorso diagnostico delle miositi autoimmuni.

Alla luce di tali considerazioni, il presente studio si propone di effettuare un confronto sistematico tra un Western blot *home-made* di ultima generazione, sviluppato specificamente per l'evidenziazione di antigeni rari, e un *line immunoassay* attualmente utilizzato nella pratica clinica quotidiana. L'obiettivo è quello di valutarne l'accuratezza analitica e la sensibilità diagnostica rispetto a una metodica di riferimento, all'interno di una popolazione selezionata di pazienti con quadro clinico suggestivo di malattia, al fine di contribuire alla definizione di strategie diagnostiche più affidabili e riproducibili.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione oggetto di studio

Lo studio è stato condotto nel periodo compreso tra marzo e settembre 2026 e ha incluso campioni di siero ottenuti da pazienti con manifestazioni cliniche suggestive di miopatia autoimmune. I campioni sono pervenuti al Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, su richiesta dell'Unità Operativa di Reumatologia e degli ambulatori dedicati. Per tutti i pazienti è stato acquisito il consenso informato per l'utilizzo dei dati a fini di ricerca. Sono stati inoltre raccolti retrospettivamente i principali dati demografici, in particolare età e sesso **(Tabella 3)**.

	Totale	**%**	**Età media**
Femmine	37	74	55
Maschi	13	26	67
	50		

Tabella 3. Caratteristiche demografiche della popolazione oggetto di studio.

Su ciascun campione sono state effettuate la ricerca degli anticorpi antinucleo (ANA, antinuclear antibodies), degli anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA, extractable nuclear antigens) e l'analisi mediante *immunoblotting* di un pannello dedicato alla rilevazione di MSA e MAA.

3.2 Esami di laboratorio

La determinazione degli anticorpi antinucleo (ANA) è stata effettuata mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2, considerando positivi i sieri in cui il titolo anticorpale risultava ≥ 1:80. La tecnica prevede l'incubazione del siero del paziente con le cellule precedentemente fissate sul vetrino. Il campione è poi incubato con l'anticorpo secondario coniugato ad un fluorocromo e diretto contro le IgG umane del paziente. Questo legame consente di rilevare la presenza degli autoanticorpi e di determinare uno specifico pattern di colorazione. Gli ANA sono stati eseguiti su preparatore automatico QUANTA-Lyser2 rispettando fedelmente i tempi di esecuzione previsti dalla metodica manuale. La lettura dei quadri fluoroscopici è stata eseguita al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse E200, con valutazione sistematica della morfologia dei pattern e loro classificazione secondo la nomenclatura ICAP **(Figura 10)**.

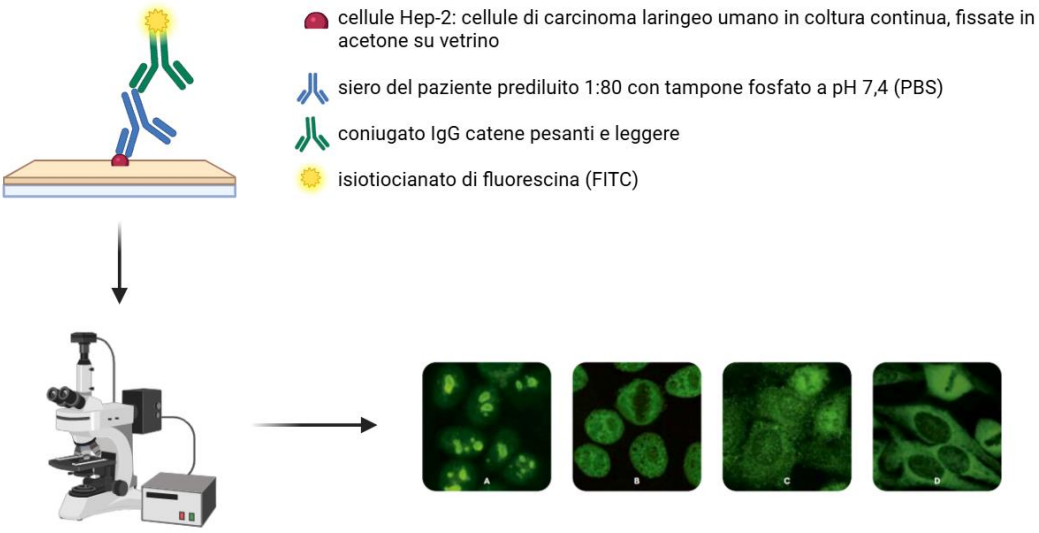


Figura 10. Procedura ANA-test (automatica) e lettura dei risultati secondo nomenclatura ICAP.

Gli anti-ENA, invece, sono stati rilevati mediante test ELiA *SymphonysS*, un *mix* ad alta sensibilità per la determinazione quantitativa di proteine ricombinanti umane costituito da 7 specificità antigeniche (Sms, U1RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Centromero B, Scl70 e Jo1), della ditta *Phadia/Thermo Scientific*. Il test è stato eseguito su un analizzatore automatico con tecnologia Fluorimmunoenzimatica, Phadia Immunocap-250 della medesima ditta **(Figura 11)**.



positività	associazione clinica
U1RNP	connettivite mista, IIM
SS-A/Ro	SjD, LES, IIM
SS-B/La	SjD, LES
CENP-B	SSc limitata
Scl70	SSc diffusa, ILD
Jo1	ASS, ILD, IIM

Negativo: < 0.7 Ratio

equivoco 0.7-1.0 Ratio

Positivo: > 1.0 Ratio

Figura 11. ENA-test (EliA *SymphonyS*) attraverso l'utilizzo di Phadia Immunocap-250 (analizzatore automatico) e le 6 specificità antigeniche (tabella) in grado di analizzare con le relative associazioni cliniche.

La ricerca degli anticorpi MAA e MSA, in particolare, anti Ro52 è stata effettuata con una strumentazione automatica dedicata, EUROBlotOne **(Figura 12)** (Euroimmun, Lübeck, Germany).



Figura 12. EUROBlotOne (analizzatore automatico) per la ricerca di MSA e MAA.

La procedura prevede l'esecuzione dei seguenti passaggi:

1. Pre-trattatmento: estrazione dall'involucro delle *strips* di analisi necessarie e collocamento di esse nei canali di incubazione vuoti all'interno della vaschetta; aggiunta a ciascun canale di 1,5 mL di tampone di diluizione; impostazione dei profili antigenici richiesti seguendo il protocollo di lavoro e incubazione a temperatura ambiente in agitazione per 5 minuti. Al termine, aspirazione del liquido dai canali.
2. Incubazione: deposito di 1,5 mL di campione di siero diluito nei canali e incubazione a temperatura ambiente in agitazione per 30 minuti.
3. Lavaggio: aspirazione del liquido da ciascun canale e lavaggio in agitazione di essi 3 volte per 5 minuti utilizzando 1,5 mL di soluzione di lavaggio correttamente diluito.
4. Incubazione: deposito di 1,5 mL di coniugato enzimatico diluito (anticorpi anti-IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina) e incubazione a temperatura ambiente in agitazione per 30 minuti.
5. Lavaggio: aspirazione del liquido da ciascun canale e lavaggio in agitazione di essi 3 volte per 5 minuti utilizzando 1,5 mL di soluzione di lavaggio correttamente diluito.
6. Incubazione: deposito di 1,5 mL di soluzione di substrato nei canali e incubazione a temperatura ambiente in agitazione per 10 minuti.
7. Arresto: aspirazione del liquido da ciascun canale e lavaggio delle strip 3 volte per 1 minuto con acqua distillata.

8. Lettura dei risultati: posizionamento della strip di analisi sul protocollo di valutazione, asciugatura all'aria e lettura dei risultati attraverso il sistema EUROLineScan (digitale).

Al termine, si procede con l'asciugatura delle *strips* e la conseguente lettura dei risultati mediante l'interpretazione semiquantitativa delle bande di immunoprecipitazione rilevabili attraverso l'utilizzo del software integrato allo strumento EUROLineSCAN (Euroimmun, Lübeck, Germany) secondo le indicazioni del produttore **(Tabella 4)**.

EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG

EUROIMMUN raccomanda di interpretare i risultati in base all'intensità di segnale:

Segnale Valutazione visiva	**Intensità del segnale EUROLineScan Scanner a letto piano**	**Risultato**	
Segnale assente	0-5	o	Negativo
Banda molto debole	6-10	(+)	Borderline
Banda da media a forte	11-25 o 26-50	+, ++	Positivo
Banda molto forte con un'intensità paragonabile alla banda di controllo	>50	+++	Fortemente positivo

Tabella 4. Guida EUROIMMUN per l'interpretazione dei risultati ottenuti.

Il siero, in questo caso appartenente ad uno dei campioni arruolato nello studio, risulta positivo per gli anticorpi anti Ro52, ciò si evince non solo dal profilo densitometrico **(Figura 13)** (si noti il picco importante in corrispondenza dell'antigene Ro52 sulla strip) ma è anche confermato dall'elevata intensità del segnale a cui è stato associato un valore di 151 classificato con +++ **(Figura 14)**.

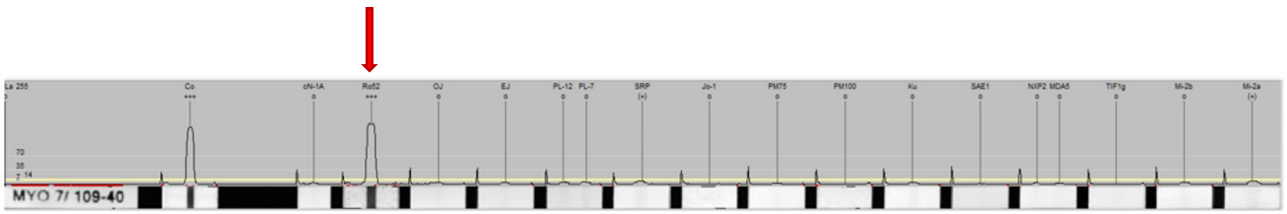


Figura 13. Lettura dei risultati della strip. Particolarmente significativo il picco in corrispondenza dell'antigene Ro52 (freccia).



N...	Abbrev.	Nome	Int.	Classe	Rapporto
1	Mi-2a	Mi-2alfa	8	(+)	0.5
2	Mi-2b	Mi-2beta	5	o	0.3
3	TIF1g	TIF1gamma	1	o	0.1
4	MDA5	MDA5	3	o	0.2
5	NXP2	NXP2	3	o	0.2
6	SAE1	SAE1	2	o	0.1
7	Ku	Ku	5	o	0.3
8	PM100	PM-Scl100	1	o	0.1
9	PM75	PM-Scl75	2	o	0.1
10	Jo-1	Jo-1	1	o	0.1
11	SRP	SRP	8	(+)	0.5
12	PL-7	PL-7	6	o	0.4
13	PL-12	PL-12	6	o	0.4
14	EJ	EJ	3	o	0.2
15	OJ	OJ	4	o	0.3
16	Ro52	Ro52	151	+++	10.1
17	cN-1A	cN-1A	3	o	0.2
18	Co	Controllo	142	+++	-
19	La	Etichetta	-1	o	-

Figura 15. Valori dell'intensità di segnale degli anticorpi analizzati. Particolarmente significativo il valore di 151 classificato con +++ (fortemente positivo).

3.3 Colture cellulari

Per gli esperimenti descritti in questo studio sono state impiegate le linee cellulari umane U251-MG, T98G, HeLa e HEp-2, selezionate per valutare l'espressione della proteina Ro52 (TRIM21) in differenti modelli cellulari. Le cellule sono state mantenute in condizioni standard di coltura, incubate a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO_2, così da garantire un microambiente ottimale per la proliferazione e la vitalità cellulare.

Le colture sono state propagate in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) integrato con il 10% di FBS, L-glutammina (2 mM), amminoacidi non essenziali (NEAA, 1%), piruvato di sodio (1%) e penicillina-streptomicina (100 U/mL). Tutti i reagenti utilizzati per la preparazione e il mantenimento delle colture sono stati forniti da Celbio S.p.A. ed Euroclone S.p.A. (Pero, Milano, Italia).

Le cellule sono state espanse in fiasche T75 fino al raggiungimento di una confluenza pari all'85%. Il terreno è stato quindi rimosso e le cellule distaccate mediante incubazione con soluzione di tripsina-EDTA a 37 °C.

La sospensione cellulare ottenuta è stata infine raccolta e utilizzata per le successive fasi sperimentali.

3.4.1 Preparazione dei lisati proteici

Una volta raccolto il materiale cellulare, la sospensione è stata centrifugata a 1000 RPM per 1 minuto in modo da ottenere il pellet. Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato risospeso in tampone fosfato salino (PBS 1x), quindi sottoposto a una seconda centrifugazione a 1000 RPM. Dopo la rimozione del surnatante, i campioni sono stati lisati a 4 °C mediante un buffer preparato secondo la seguente composizione:

- 10 mM Tris-HCl 1 M;
- 2,5 mM $MgCl_2$ 1 M;
- 1 µL Nonidet 5%;
- 1 mM Ditiotreitolo (DTT) 1 M;
- 10 mM β-glicerofosfato 1 M.

Appena prima dell'utilizzo del buffer sono stati aggiunti:

- PMSF 200 mM: 0,5 µL × 10^6 cellule (50 µL);
- inibitore delle proteasi: 20 µL × 10^6 cellule;
- inibitore delle fosfatasi: 1 µL per 1 × 10^6 cellule.

Il lisato ottenuto è stato quindi centrifugato a 6000 RPM per 1 minuto e il surnatante recuperato è stato utilizzato per le successive fasi sperimentali.

3.4.2 Quantificazione proteica e preparazione dei campioni

La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata mediante il metodo di Bradford, con analisi spettrofotometrica. Per ciascuna cuvetta è stata allestita una miscela composta da 750 µL di reagente Bradford, 22,5 µL di H_2O e 2,5 µL di campione; come riferimento di bianco è stata impiegata acqua distillata.

3.4.3 Dot blot

L'analisi mediante Dot blot è stata eseguita al fine di valutare l'espressione delle proteine di interesse attraverso il loro trasferimento diretto su membrana, senza preventiva separazione elettroforetica. È stata utilizzata una membrana in polivinilidene difluoruro (Polyvinylidene Difluoride, PVDF),

preventivamente attivata mediante immersione in metanolo e successivamente risciacquata con PBS. L'estratto proteico ottenuto è stato diluito in PBS fino a raggiungere una concentrazione finale di 0,5 µg/µL. Per ciascun campione è stato depositato 1 µL di soluzione proteica direttamente sulla membrana, corrispondente a 0,5 µg di proteine totali per *spot*. L'applicazione è stata eseguita lentamente, utilizzando puntali a basso volume, al fine di limitare la diffusione del campione e ottenere *spots* omogenei e ben definiti. Al termine del caricamento, la membrana è stata lasciata asciugare in stufa per 45 minuti, favorendo il completo assorbimento delle proteine. Successivamente, la membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente, in agitazione delicata, con una soluzione di blocco costituita da 5% di latte scremato in polvere disciolto in PBS-Tween20 0,2% (PBS-T), al fine di saturare i siti di legame aspecifici. Al termine del blocco, la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi di 5 minuti ciascuno con PBS-T. L'incubazione con l'anticorpo primario, è stata effettuata preparando la soluzione anticorpale nel medesimo buffer di blocco, secondo la diluizione ottimizzata per ciascun anticorpo impiegato. La membrana è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione delicata, quindi sottoposta a tre ulteriori lavaggi di 10 minuti ciascuno con PBS-T. La membrana è stata poi incubata con il corrispondente anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (Horseradish Peroxidase, HRP), opportunamente diluito (1:200) in PBS, per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione. Al termine dell'incubazione, la membrana è stata nuovamente lavata tre volte con PBS-T, ciascun lavaggio per 5 minuti.

La rivelazione del segnale è stata eseguita mediante incubazione della membrana con un substrato chemiluminescente (Enhanced Chemiluminescence, ECL), preparato secondo le indicazioni del produttore e lasciato reagire per 2–5 minuti. Il substrato in eccesso è stato successivamente rimosso e la membrana è stata acquisita mediante il sistema di imaging per chemiluminescenza AZURE BioSystem, utilizzando tempi di esposizione in funzione dell'intensità del segnale rilevato.

A seguito della valutazione dell'espressione della proteina di interesse mediante Dot blot**,** gli esperimenti di Western blot sono stati eseguiti utilizzando la linea cellulare umana di glioblastoma T98G, selezionata in quanto ha mostrato il livello di espressione più elevato del target proteico oggetto dello studio.

3.4.4 Western Blotting

Per l'identificazione delle proteine di interesse è stata impiegata la tecnica del Western blot, utilizzando gli estratti proteici precedentemente ottenuti dalle cellule T98G.

Al fine di garantire la comparabilità tra i campioni, la quantità di proteine totali caricata per la corsa elettroforetica è stata fissata a 25 µg e mantenuta costante per tutte le condizioni sperimentali analizzate. A ciascun campione è stato aggiunto il buffer di caricamento Laemmli 2x (Cat. n. 1610737, Bio-Rad Laboratories) in rapporto 1:2 rispetto all'estratto proteico. I campioni proteici sono stati denaturati a 90 °C per 5 minuti in Thermoblock e centrifugati a 7000 rpm per 1 minuto. Per seguire l'andamento della corsa proteica e come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato un maractore di peso molecolare (Trident Prestained Protein Ladder High Range, Cat. n. GTX50875, Genetex), di cui sono stati caricati 5µl.

La separazione delle proteine in base al loro peso molecolare è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti contenente sodio dodecil solfato (SDS-PAGE), impiegando gel Mini-PROTEAN® TGX™ Precast (Bio-Rad Laboratories) con concentrazione di acrilammide del 10%**,** 10 pozzetti e capacità massima di caricamento pari a 30 µL per pozzetto (Cat. n. 4561033).

Per permettere la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone di migrazione Tris/Glicina/SDS 10x (Bio-Rad Laboratories, Cat. n. 1610772), diluito 1:10 in acqua distillata fino alla concentrazione di lavoro (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3), versato all'interno della vasca elettroforetica. Quest'ultima è stata successivamente collegata all'alimentatore, impostato secondo il seguente programma:

- P1 (passaggio da stacking a running) 60 V per 30'
- P2 (per la corsa) 100 V per circa 1h e 30'.

3.4.5 Trasferimento su membrana di nitrocellulosa

In seguito alla separazione elettroforetica delle proteine, è stato eseguito il trasferimento *semi-dry* su membrana in PVDF con porosità di 0,2 µm, utilizzando il sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Le condizioni di trasferimento sono state 25 V (volt) costanti per 30 minuti.

Prima del trasferimento, la membrana in PVDF è stata attivata mediante immersione in metanolo e successivamente equilibrata nel tampone di trasferimento. Contestualmente, i fogli di carta da filtro sono stati immersi nello stesso tampone. È stato quindi assemblato il *sandwich* di trasferimento assicurando la perfetta aderenza tra gel e membrana e rimuovendo accuratamente eventuali bolle d'aria, al fine di garantire un trasferimento uniforme delle proteine.

Per la verifica del corretto trasferimento, la membrana è stata colorata con colorante Ponceau (0,05g Ponceau, 2,5mL di acido acetico e 47,5 mL H2Od) e, in seguito, è stata imbevuta in soluzione bloccante di Milk 5% (1,5g di Latte in polvere Plasmon diluito in 30 ml di PBS 1x) per 30', in modo da saturare tutti i siti di legame della membrana e impedire un legame aspecifico dell'anticorpo. In seguito, sono stati effettuati due sciacqui in PBS-Tween 0,2% (Tween in PBS 1x2:1) per 5 minuti e, infine, incubati con gli anticorpi primari d'interesse (rappresentati dai sieri dei pazienti e dall'anticorpo anti Ro52, Proteintech, Cat. n. 12108-1-AP, Rabbit) overnight.

Dopo l'incubazione, sono stati effettuati tre ulteriori sciacqui in PBS-T di 5 minuti ciascuno, in modo da incubare in seguito le membrane con gli anticorpi secondari coniugati con HRP (Polyclonal Goat anti-Rabbit HRP, Dako usato come anticorpo secondario per la rilevazione di Ro52 e anti human IgG (H+L) secondary HRP, Bio-Techne, usato per la rilevazione dei sieri), opportunamente diluito (1:200) in PBS, per 1 ora a temperatura ambiente, dopo ulteriori sciacqui in PBS si è proceduti con la visualizzazione delle bande.

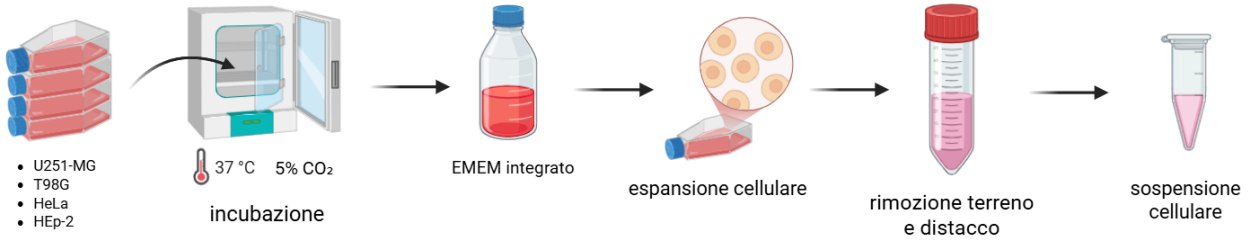
3.4.6 Rivelazione e acquisizione

Per la visualizzazione delle bande proteiche ottenute, è stata impiegata la tecnica di chemioluminiscenza potenziata (ECL), applicando sulla membrana la soluzione a base di luminolo (Luminol/enhancer solution) e il reagente a base di perossido (Peroxide solution), miscelati in rapporto 1:1 secondo le istruzioni fornite dal produttore. Il segnale chemioluminescente è stato acquisito con il sistema AZURE.

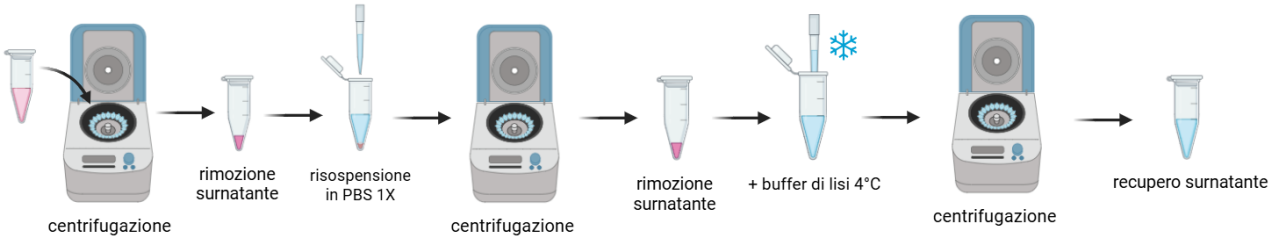
3.4.7 Analisi statistica

La quantifica dei risultati ottenuti mediante Dot o Western blot è stata eseguita utilizzando il software ImageJ. L'intensità del segnale è stata determinata tramite analisi densitometrica, previa sottrazione del segnale di background, e successivamente normalizzata rispetto al controllo di carico ove applicabile. I dati ottenuti sono stati elaborati mediante GraphPad Prism. I risultati sono espressi come media ± deviazione standard (SD).

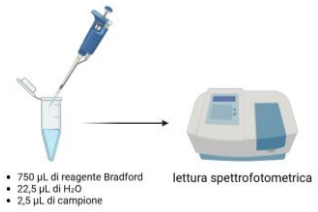
- Colture cellulari:



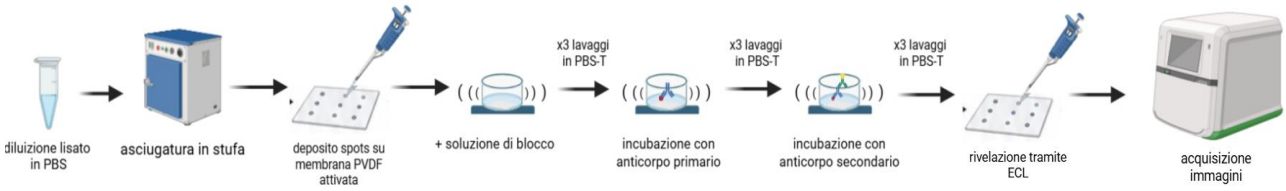
- Preparazione lisati proteici:



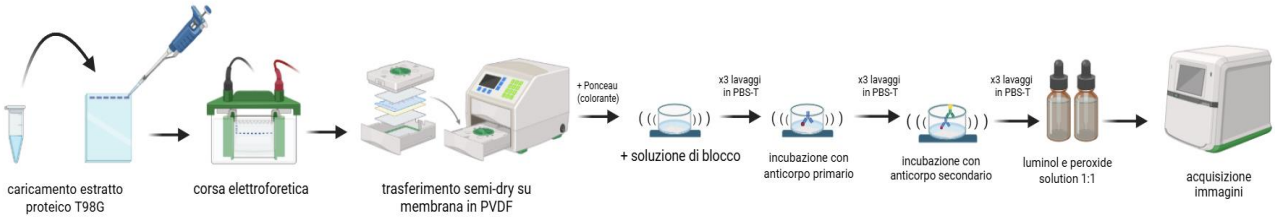
- Quantificazione proteica:



- Dot blot:



- Western blotting e trasferimento semi-dry:



- Analisi statistica:

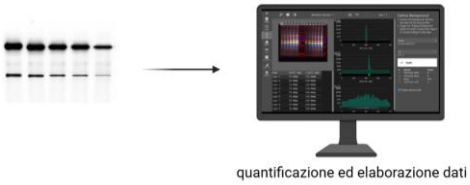


Figura 15: rappresentazione grafica del processo sperimentale in tutte le sue fasi (ottenuta con biorander).

4. RISULTATI

4.1 Selezione della linea cellulare per la preparazione del lisato antigenico

Al fine di individuare il substrato con l'adeguata espressione di Ro52 in modo da massimizzare il rapporto segnale/rumore e aumentare la sensibilità delle successive procedure di *immunoblotting*, è stata valutata l'espressione della proteina target Ro52 in diverse linee cellulari.

Sono stati pertanto analizzati lisati proteici ottenuti dalle linee cellulari U251, T98G, HeLa e HEp-2. I lisati sono stati immobilizzati su membrana e incubati con 1 mL di anticorpo anti-Ro52 commerciale diluito 1:20.000. L'intensità del segnale immunoreattivo è stata quindi utilizzata come misura indiretta della disponibilità dell'antigene Ro52 nel lisato.

Tra le linee cellulari analizzate, T98G ha mostrato il segnale più elevato, suggerendo una maggiore disponibilità del target antigenico rispetto alle altre linee valutate **(Figura 16)**.

L'analisi statistica eseguita mediante test di comparazioni multiple di Holm-Sidak ha evidenziato una differenza significativa tra T98G e U251 (*mean difference* = 59,99; *p value* = 0,0370) e tra T98G e HEp-2 (*mean difference* = 89,10; *p value* = 0,0071). Non è stata invece osservata una differenza statisticamente significativa tra T98G e HeLa (*mean difference* = 12,18; *p value* = 0,5670).

Considerata la maggiore intensità del segnale immunoreattivo medio, la linea cellulare T98G è stata pertanto selezionata come fonte di lisato proteico per gli esperimenti successivi.

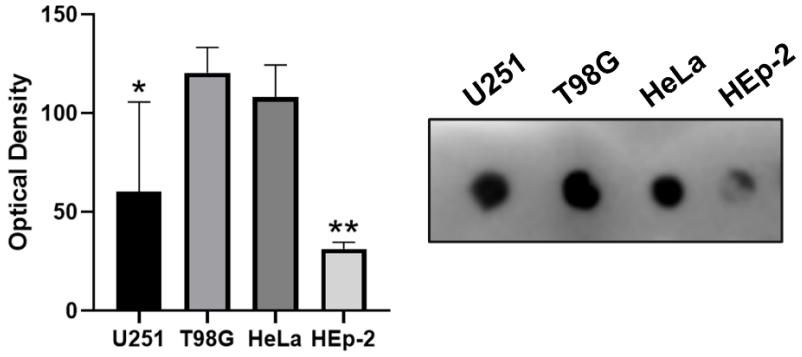


Figura 16. Confronto dell'espressione proteica nelle linee cellulari U251, T98G, HeLa e HEp-2: il grafico mostra variazioni di densità ottica e significatività statistica, confermate dal corrispondente Dot Blot.

4.2 Relazione tra concentrazione dell'anticorpo anti-Ro52 e segnale nel Dot Blot

Una volta identificata T98G come substrato cellulare più adatto, è stata valutata la possibilità di discriminare quantitativamente differenti concentrazioni di anticorpo anti-Ro52 mediante Dot Blot.

L'anticorpo commerciale, avente una concentrazione dichiarata dal produttore pari a 650 µg/mL, è stato analizzato attraverso una serie di diluizioni comprese tra 1:10.000 e 1:30.000, corrispondenti a concentrazioni comprese tra 0.065 e 0.022 µg/mL.

Per ciascuna concentrazione analizzata è stato misurato il segnale ottico medio (*mean optical density*, OD). I valori sperimentali ottenuti sono stati successivamente rappresentati graficamente in funzione della concentrazione dell'anticorpo, al fine di caratterizzare la relazione tra quantità di anticorpo e intensità del segnale. Sono stati quindi confrontati differenti modelli di regressione, con l'obiettivo di individuare quello in grado di descrivere più adeguatamente l'andamento dei dati sperimentali.

Il modello lineare $y=1869.3x+91.032$ ha mostrato un coefficiente di determinazione pari a $R^2=0.9443$; al contrario, il modello logaritmico $y=76.442\ln(x)+418.05$ ha fornito un adattamento migliore ai dati sperimentali, con $R^2=0.9921$. La maggiore capacità descrittiva del modello logaritmico suggerisce che, nell'intervallo di concentrazioni analizzato, l'aumento del segnale non sia proporzionale in modo lineare all'aumento della concentrazione dell'anticorpo. Il segnale sembra infatti aumentare maggiormente alle concentrazioni più basse e tendere progressivamente a una riduzione della risposta incrementale all'aumentare della concentrazione. Questo risultato è coerente con il comportamento atteso di una metodica immunologica, nella quale la relazione tra quantità di analita e intensità del segnale può essere influenzata da fenomeni quali disponibilità limitata all'antigene, saturazione dei siti di legame e non linearità intrinseca del sistema di rilevazione **(Figura 17)**.

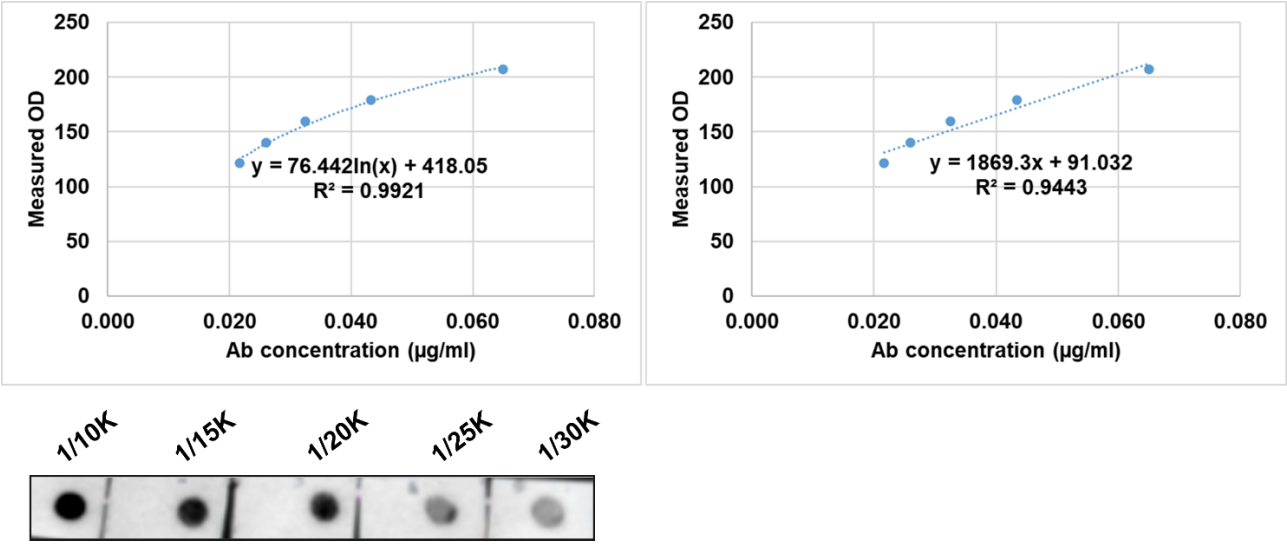


Figura 17. Confronto tra modello di regressione logaritmico (a sinistra) e lineare (a destra) nella relazione tra concentrazione dell'anticorpo e segnale sperimentale nel Dot Blot. Progressiva riduzione dell'intensità alle diluizioni 1:10.000 – 1:30.000.

4.3 Valutazione della relazione tra concentrazione dell'anticorpo e segnale nel Western blot

Il sistema è quindi stato trasferito al Western blot, tecnica utilizzata per ottenere una valutazione quantitativa dell'intensità delle bande immunoreattive. Il lisato proteico di T98G è stato caricato su gel, separato mediante elettroforesi e trasferito su membrana. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo anti-Ro52 commerciale a diluizioni comprese tra 1:40.000 e 1:160.000. Considerando la concentrazione dichiarata dell'anticorpo di 650 µg/mL, tali diluizioni corrispondevano a un intervallo di concentrazioni compreso tra: 0.01625 µg/mL e 0.0040625 µg/mL.

L'intensità delle bande corrispondenti a Ro52 è stata quantificata mediante calcolo dell'area *under the curve* (AUC). I valori medi di AUC sono stati rappresentati in funzione della concentrazione nota dell'anticorpo e sono stati confrontati diversi modelli di regressione.

Il modello lineare y=2E+06x-4958.2 ha mostrato R^2=0.9307, mentre il modello logaritmico y=20499ln(x)+114697 ha invece mostrato un adattamento superiore, con R^2=0.9942. Anche nel Western blot, pertanto, la relazione tra concentrazione nota dell'anticorpo e segnale sperimentale non è risultata adeguatamente descritta da una relazione direttamente lineare, il modello logaritmico ha invece spiegato oltre il 99% della variabilità osservata nei dati utilizzati per il *fitting* **(Figura 18)**.

Questo risultato dimostra, come *proof-of-concept*, la possibilità di associare quantitativamente l'intensità della banda immunoreattiva alla quantità di anticorpo presente nel campione.

L'equazione può essere invertita per ottenere una stima della concentrazione a partire dall'AUC misurata: AUC=20499ln(C)+114697

da cui: C=exp((AUC−114697)/20499)

dove C rappresenta la concentrazione stimata dell'anticorpo.

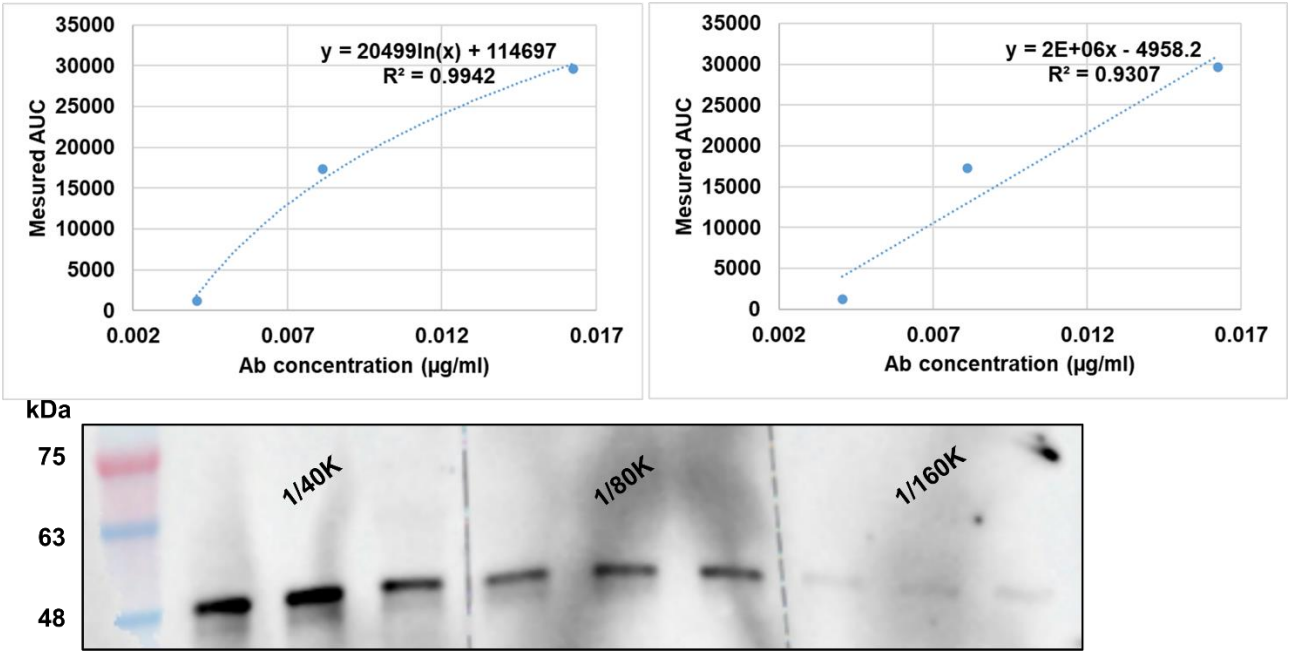


Figura 18. Analisi del segnale sperimentale tramite fitting logaritmico e lineare dell'AUC rispetto alla concentrazione anticorpale; in basso, il Western blot evidenzia la progressiva riduzione del segnale nelle diluizioni 1/40.000, 1/80.000 e 1/160.000.

4.4 Applicazione del workflow a campioni sierici e confronto esplorativo con FEIA

Una volta definito il comportamento quantitativo del sistema Western blot, il *workflow* è stato applicato a un campione sierico afferente al *pool* di pazienti precedentemente analizzati mediante FEIA (*Fluorescence Enzyme Immunoassay*) per la ricerca di autoanticorpi anti-Ro52.

Per ciascun campione, il segnale ottenuto mediante Western blot è stato quantificato come AUC **(Figura 19)** e la concentrazione apparente dell'anticorpo è stata stimata utilizzando la curva di calibrazione generata nello stesso esperimento.

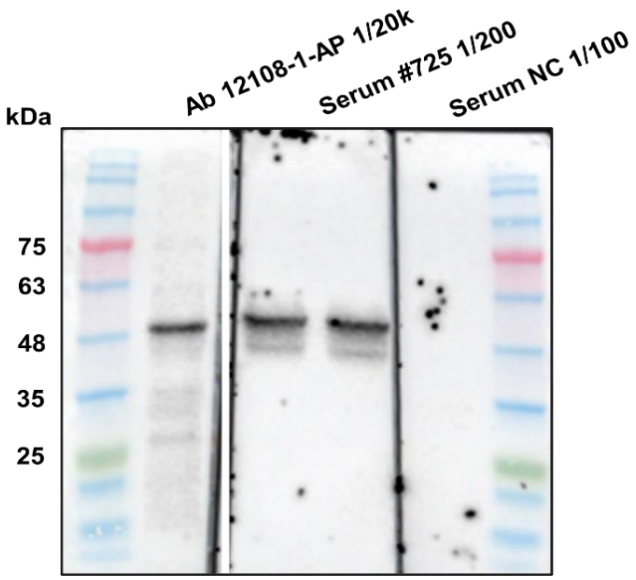


Figura 19. Risultato della corsa elettroforetica. L'ordine di caricamento è il seguente: marker di peso molecolare noto, lisato cellulare incubato con l'anticorpo Ro52 commerciale diluito 1:20.000, lisato cellulare incubato con il siero di un paziente (le due bande corrispondono al duplicato tecnico) positivo per Ro52 diluito 1:200 e, infine, il lisato incubato con il controllo negativo (paziente negativo per gli autoanticorpi anti Ro52).

I valori ottenuti sono stati quindi confrontati con i corrispondenti risultati FEIA. L'analisi grafica della relazione tra concentrazione stimata mediante Western blot e valore FEIA ha tuttavia evidenziato un andamento non lineare **(Figura 20)**. In particolare, i risultati ottenuti mostrano una maggiore coerenza tra le due metodiche nel *range* di valori FEIA compreso approssimativamente tra 20 e 90, all'interno del quale all'aumentare del valore FEIA corrisponde un incremento coerente della concentrazione stimata mediante Western blot. Al di sotto e al di sopra di tale intervallo, la relazione tende invece a un apparente *plateau*, evidenziando una ridotta capacità di entrambe le metodiche, o di una delle due, di discriminare ulteriori variazioni quantitative della concentrazione di anticorpi anti-Ro52.

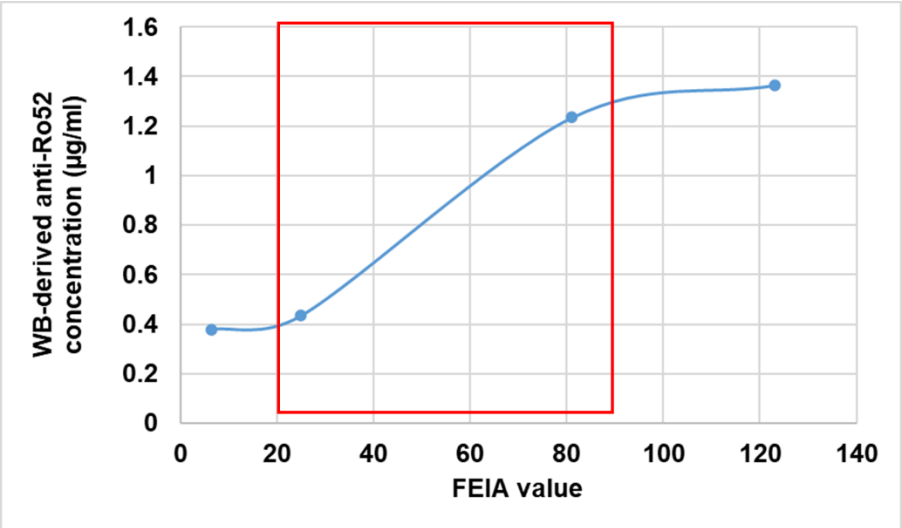


Figura 20. Andamento non lineare che intercorre nella relazione tra la concentrazione dei sieri stimata mediante Western Blot e il loro valore FEIA.

5. DISCUSSIONE

La scelta di utilizzare Ro52 come antigene di riferimento nasce dall'esigenza di individuare un autoantigene che consentisse una prima valutazione della possibilità di definire un riferimento quantitativo interno applicabile nelle corse del *line blot*. L'obiettivo dello studio è stato verificare se l'intensità del segnale ottenuto mediante Western blot potesse essere correlato, in condizioni sperimentali controllate, con una quantità nota di anticorpo anti-Ro52. Tale correlazione avrebbe permesso di impiegare il segnale come riferimento semiquantitativo, riducendo la dipendenza dell'interpretazione delle bande dall'operatore e dalle variabili analitiche, soprattutto nei casi in cui la reattività risulti debole o intermedia. Tuttavia, affinché un antigene possa essere utilizzato come standard interno, è necessario che il segnale associato alla sua reattività presenti caratteristiche di stabilità, riproducibilità e comparabilità tra differenti esperimenti.

L'osservazione delle bande mediante Western blot ha dimostrato la possibilità di rilevare la reattività nei confronti del target d'interesse rappresentando quindi un *proof-of-concept* della possibilità di trasformare un parametro densitometrico in una misura quantitativa. Tuttavia, il segnale ottenuto non ha consentito di ricavare una misura quantitativa direttamente sovrapponibile tra i diversi pazienti. La concentrazione apparente stimata è risultata infatti dipendente dalle specifiche caratteristiche del campione e dalle condizioni sperimentali adottate. La curva ottenuta deriva infatti da un anticorpo commerciale a concentrazione nota e da condizioni sperimentali definite, mentre la risposta di un campione sierico può essere influenzata da caratteristiche differenti dell'anticorpo presente nel campione, dalla matrice biologica e dalla composizione complessiva del siero. Di conseguenza, il segnale di Ro52 non può pertanto essere considerato, al momento, come *standard* interno per discriminare la positività degli altri antigeni rari presenti nel *line immunoassay* commerciale.

Il confronto con i risultati ottenuti mediante FEIA ha evidenziato una relazione non lineare tra la concentrazione apparente stimata mediante Western blot e il valore FEIA. L'andamento osservato suggerisce che la corrispondenza tra le due metodiche non sia costante lungo l'intero intervallo di valori considerato. In particolare, la maggiore coerenza osservata nel range FEIA compreso approssimativamente tra 20 e 90 indica l'esistenza di un intervallo nel quale le variazioni del valore FEIA risultano accompagnate da variazioni della concentrazione stimata mediante Western blot. Al di fuori di tale intervallo, l'andamento tende invece a un *plateau*, indicando una ridotta capacità di discriminare ulteriori differenze quantitative.

Nel complesso, i risultati ottenuti non supportano l'utilizzo di Ro52, allo stato attuale, come *standard* interno per la normalizzazione della reattività degli altri autoanticorpi presenti nel *line blot*. Tuttavia,

l'approccio sviluppato ha consentito di raggiungere un risultato metodologico significativo, dimostrando la fattibilità di un *workflow* utile per caratterizzare il comportamento di uno specifico sistema antigene-anticorpo. Pertanto, la sua applicazione non può essere estesa automaticamente ad antigeni differenti in quanto l'utilizzo di un unico *cut-off* quantitativo come riferimento per tutti gli autoanticorpi del *line immunoassay* risulta metodologicamente inadeguato sulla base dei dati ottenuti.

Sebbene l'obiettivo iniziale di individuare in Ro52 uno *standard* interno applicabile alla normalizzazione dei diversi autoanticorpi non sia stato completamente raggiunto, il lavoro ha permesso di definire i principali fattori che ne limitano l'impiego e, parallelamente, di sviluppare un approccio sperimentale con potenziale valore complementare avvalorando l'accuratezza clinico-diagnostica delle metodiche immunologiche di routine.

6. CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha evidenziato come l'evoluzione delle metodiche di diagnostica di laboratorio abbia messo a disposizione del clinico strumenti sempre più specifici per il supporto diagnostico delle miopatie infiammatorie idiopatiche (IIM), tra cui il *line blot* dedicato alla ricerca degli autoanticorpi associati a tali patologie. Informazioni che in precedenza erano prevalentemente disponibili nell'ambito della ricerca di base possono oggi essere ottenute anche presso laboratori diagnostici qualificati e con tempi di risposta più contenuti, contribuendo a una più accurata caratterizzazione del profilo autoanticorpale del paziente e, di conseguenza, a un più completo inquadramento clinico.

Parallelamente, i risultati ottenuti evidenziano come il progresso tecnologico si accompagni a una crescente complessità nella corretta interpretazione e gestione del dato analitico. Il confronto tra il *line blot* commerciale e il Western blot *home made* di ultima generazione, sviluppato nell'ambito della ricerca di base, ha mostrato la capacità del sistema commerciale di rilevare le bande corrispondenti anche agli antigeni meno frequentemente associati alle IIM, evidenziandone l'utilità come strumento di supporto alla caratterizzazione sierologica. Permangono tuttavia alcune criticità nell'interpretazione dei risultati caratterizzati da una debole reattività, in particolare quando il segnale si colloca in una cosiddetta *zona grigia*, prossima alla soglia di positività. In tali condizioni, la distinzione tra una reale reattività anticorpale e un possibile risultato falsamente positivo può risultare difficoltosa e richiedere un'ulteriore valutazione mediante metodiche complementari.

Nonostante gli sforzi condotti nel corso dello studio, non è stato possibile definire un sistema *hom emade* sufficientemente robusto da poter essere utilizzato come *cut-off* interno per la discriminazione univoca dei risultati positivi e negativi nell'intero spettro degli antigeni presenti nel *line blot*. Tale risultato sottolinea come l'interpretazione del dato ottenuto mediante metodiche immunologiche non possa basarsi esclusivamente sull'intensità del segnale, ma debba essere integrata con le caratteristiche analitiche della metodica, con la specificità dell'antigene riconosciuto e con il contesto clinico e sierologico del paziente.

Al fine di ottenere ulteriori elementi di conferma e approfondire le criticità emerse nel corso dello studio, è attualmente in corso la preparazione di un saggio di immunoprecipitazione associato alla quantificazione dell'mRNA, che sarà successivamente applicato ai sieri appartenenti alla popolazione oggetto di studio. L'integrazione dei risultati ottenuti mediante tale approccio con quelli già disponibili potrà contribuire a una più approfondita valutazione dei dati sperimentali e a una migliore definizione delle reattività osservate nei campioni caratterizzati da bassa intensità del segnale.

Nel complesso, i risultati ottenuti confermano come il *line blot* rappresenti uno strumento diagnostico aggiuntivo di rilevante utilità nel percorso di caratterizzazione delle IIM, consentendo di ottenere

informazioni relative al profilo autoanticorpale del paziente attraverso una metodica standardizzata e applicabile alla routine diagnostica. Allo stesso tempo, la complessità dei risultati ottenibili e la presenza di reattività *borderline* sottolineano l'importanza di un'interpretazione integrata del dato laboratoristico, evitando che la sola intensità del segnale venga considerata determinante ai fini dell'interpretazione diagnostica.

In questo contesto, il confronto continuo tra il professionista di laboratorio e il clinico di riferimento rimane fondamentale per correlare il profilo autoanticorpale con il quadro clinico del paziente, integrare le informazioni provenienti da differenti metodiche analitiche e garantire una corretta interpretazione del risultato. L'approccio integrato tra diagnostica laboratoristica e valutazione clinica rappresenta pertanto un elemento essenziale per valorizzare le potenzialità delle metodiche immunologiche attualmente disponibili e, al contempo, per riconoscerne i limiti nei casi caratterizzati da reattività deboli o borderline.

7. BIBLIOGRAFIA

Acosta I et al. Idiopathic inflammatory myopathies. A review. Rev Med Chil. 2019;147(3):342-355.

Ahsan H. Origins and History of Autoimmunity—A Brief Review. Rheumatol Autoimmun. 2023;3(1):9-14.

Al Nokhatha SA et al. Association of extended myositis panel results, clinical features, and diagnoses: a single-center retrospective observational study. Rheumatol Int. 2021;41(12):2133-2146.

Andrade LEC et al. Reflecting on a decade of the international consensus on ANA patterns (ICAP): Accomplishments and challenges from the perspective of the 7th ICAP workshop. Autoimmun Rev. 2024;23(9):103608.

Angeli F et al. Comparison of Lineblot and Immunoprecipitation Methods in the Detection of Myositis-Specific and Myositis-Associated Antibodies in Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies: Consistency with Clinical Diagnoses. Diagnostics. 2024;14(19):2192.

Ashton C et al. Idiopathic Inflammatory Myopathies: A Review. Intern Med J. 2021;51(6):845-852.

Aussy A et al. Dermatomyositis and Immune-Mediated Necrotizing Myopathies: A Window on Autoimmunity and Cancer. Front Immunol. 2017;8:992.

Barbosa RDA, Shinjo SK. Patients with Anti-PM/Scl-Positive and Idiopathic Inflammatory Myopathy Resemble Anti-Synthetase Syndrome. Adv Rheumatol (London). 2025;65(1):9.

Biesen R et al. Autoantikörperdiagnostik bei idiopathisch inflammatorischen Myopathien. Z Rheumatol. 2024;83(3):242-249.

Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis. N Engl J Med. 1975;292(7):344-347.

Bonroy C et al. Positioning of myositis-specific and associated autoantibody (MSA/MAA) testing in disease criteria and routine diagnostic work-up. J Transl Autoimmun. 2022;5:100148.

Campanilho-Marques R et al. Treatment of Idiopathic Inflammatory Myopathies. Joint Bone Spine. 2025;92(6):105932.

Casal-Dominguez M et al. Muscular and extramuscular features of myositis patients with anti-U1-RNP autoantibodies. Neurology. 2019;92(13):e1416-e1426.

Casal-Dominguez M et al. The Phenotype of Myositis Patients with Anti-Ku Autoantibodies. Semin Arthritis Rheum. 2021;51(4):728-734.

Cavazzana I et al. Systemic Sclerosis-Specific Antibodies: Novel and Classical Biomarkers. Clin Rev Allergy Immunol. 2023;64(3):412-430.

Chan EKL. Anti-Ro52 Autoantibody Is Common in Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases and Correlating with Worse Outcome When Associated with Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis and Autoimmune Myositis. Clin Rev Allergy Immunol. 2022;63(2):178-193.

Chung MP et al. Calcinosis Biomarkers in Adult and Juvenile Dermatomyositis. Autoimmun Rev. 2020;19(6):102533.

Clark KEN et al. Clinical Phenotypes and Long-Term Outcomes of Anti-SRP versus Anti-HMGCR Immune-Mediated Necrotising Myopathy: A 13-Year Single-Centre Study. Clin Exp Rheumatol. 2026;44(2):247-254.

Cui B et al. Identification of Clinical Subgroups in Anti-SRP Positive Immune-Mediated Necrotizing Myopathy Patients Using Cluster Analysis. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2025;17:1759720X251314697.

Daniel E et al. Current biomarkers in inclusion body myositis. J Neuromuscul Dis. 2024;11(6):1165-1179.

Decker P et al. An Updated Review of Anti-Ro52 (TRIM21) Antibodies Impact in Connective Tissue Diseases Clinical Management. Autoimmun Rev. 2022;21(3):103013.

Demortier J et al. Anti-SAE Autoantibody in Dermatomyositis: Original Comparative Study and Review of the Literature. Rheumatology (Oxford). 2023;62(12):3932-3939.

Depascale R et al. Patients with Anti-SAE+ Dermatomyositis Display Refractory and Difficult-to-Treat Skin Manifestations: Case Series from Two Italian Cohorts and Review of Literature. Front Immunol. 2025;16:1597282.

Diomedi M et al. Idiopathic Inflammatory Myopathies: One Year in Review 2025. Clin Exp Rheumatol. 2026;44(2):167-177.

van Dooren SHJ et al. Myositis-Specific Autoantibodies: Detection and Clinical Associations. Autoimmun Highlights. 2011;2(1):5-20.

Fasano S et al. Current Pharmacological Treatment of Idiopathic Inflammatory Myopathies. Expert Rev Clin Pharmacol. 2016;9(4):547-558.

Flashner BM et al. Anti-Mi-2 Positive Interstitial Lung Disease (ILD): A Progressive Disease Comparable to Other Myositis-ILD. Respir Med Res. 2025;88:101176.

Fornaro M et al. Anti-SAE Dermatomyositis: Clinical and Histologic Characteristics from a Monocentric Italian Cohort. Clin Exp Rheumatol. 2024;42(2):295-301.

Fredi M et al. An Italian Multicenter Study on Anti-NXP2 Antibodies: Clinical and Serological Associations. Clin Rev Allergy Immunol. 2022;63(2):240-250.

Fuzzi E et al. Anti-MDA5 Dermatomyositis: An Update from Bench to Bedside. Curr Opin Rheumatol. 2022;34(6):365-373.

Galindo-Feria AS et al. Aminoacyl-tRNA Synthetases: On Anti-Synthetase Syndrome and Beyond. Front Immunol. 2022;13:866087.

Ge Y et al. Clinical characteristics of myositis patients with isolated anti-U1 ribonucleoprotein antibody resemble immune-mediated necrotizing myopathy. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2023;15:1759720X231181336.

Ghirardello A et al. Performance of the Line Blot Immunoassay for Detecting Myositis Autoantibodies in Real-Life Laboratory Settings: An Italian Multicenter Study. Ann Lab Med. 2026.

Giannini M et al. In Immune-Mediated Necrotising Myopathy, Anti-HMGCR Antibodies Inhibit HMGCR Activity, Leading to the Sarcoplasmic Accumulation of Lipid Droplets and Myofibres Necrosis. Ann Rheum Dis. 2025;84(10):1752-1755.

Gono T et al. Analytical performance of commercial myositis-specific autoantibody tests evaluated against immunoprecipitation assays as a reference standard: a systematic review and meta-analysis. Semin Arthritis Rheum. 2025;75:152858.

Gordon P et al. Epidemiology of idiopathic inflammatory myopathies: a population-based cohort in England, 2002–2021. RMD Open. 2026;12(3):e006966.

Guel T et al. Dermatomyositis Autoantigen CHD4 Forms Immune Stimulatory Complexes with Endogenous DNA. Exp Dermatol. 2023;32(7):965-974.

Harvey GR et al. Newer Autoantibodies and Laboratory Assessments in Myositis. Curr Rheumatol Rep. 2024;27(1):5.

He J et al. Concordance between myositis autoantibodies and anti-nuclear antibody patterns in a real-world, Australian cohort. Rheumatology (Oxford). 2022;61(9):3792-3798.

Holwek E et al. Ro52/TRIM21 - From Host Defense to Autoimmunity. Cell Immunol. 2023;393-394:104776.

Hu H et al. Pathogenesis of Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Antibody-Positive Dermatomyositis: A Concise Review With an Emphasis on Type I Interferon System. Front Med. 2021;8:833114.

Hum RM et al. Comparison of Clinical Features between Patients with Anti-Synthetase Syndrome and Dermatomyositis: Results from the MYONET Registry. Rheumatology (Oxford). 2024;63(8):2093-2100.

Jin Q et al. Peripheral Lymphocyte Count Defines the Clinical Phenotypes and Prognosis in Patients with Anti-MDA5-Positive Dermatomyositis. J Intern Med. 2023;293(4):494-507.

Jones EL et al. TRIM21/Ro52 - Roles in Innate Immunity and Autoimmune Disease. Front Immunol. 2021;12:738473.

Junior AGD et al. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. Trends Microbiol. 2019;27(1):75-85.

Kattah NH et al. The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. Immunol Rev. 2010;233(1):126-145.

Khoo T, Chinoy H. Anti-HMGCR Immune-Mediated Necrotising Myopathy: Addressing the Remaining Issues. Autoimmun Rev. 2023;22(12):103468.

Khoo T et al. Epidemiology of the Idiopathic Inflammatory Myopathies. Nat Rev Rheumatol. 2023;19(11):695-712.

Khoo T et al. The Incidence of Anti-HMGCR Immune-Mediated Necrotizing Myopathy: An Australian and UK Retrospective Multi-Site Cohort Study. Rheumatology (Oxford). 2025;64(9):4995-5003.

Kono M et al. Anti-Ku Antibody-Positive Myositis Presenting as a Wide Range of Axial Myopathies and Myocarditis: A Case Report and Review of the Literature. Mod Rheumatol Case Rep. 2022;6(1):64-68.

Kotobuki Y et al. Transcriptional Intermediary Factor 1 (TIF1) and Anti-TIF1γ Antibody-Positive Dermatomyositis. Immunol Med. 2021;44(1):23-29.

La Rocca G et al. Targeting Intracellular Pathways in Idiopathic Inflammatory Myopathies: A Narrative Review. Front Med. 2023;10:1158768.

Leclair V, Lundberg IE. New Myositis Classification Criteria—What We Have Learned Since Bohan and Peter. Curr Rheumatol Rep. 2018;20(4):18.

Lee AYS et al. Anti-Ro60 and Anti-Ro52/TRIM21: Two Distinct Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. J Autoimmun. 2021;124:102724.

Li C et al. Immune-Mediated Necrotizing Myopathy: A Comprehensive Review of the Pathogenesis, Clinical Features, and Treatments. J Autoimmun. 2024;148:103286.

Liu Y et al. Beyond Skin and Muscle: The Unexplored Territory of Interstitial Lung Disease in Anti-NXP2-Positive Myositis. Int J Rheum Dis. 2023;26(9):1660-1662.

Lu X et al. Anti-MDA5 Antibody-Positive Dermatomyositis: Pathogenesis and Clinical Progress. Nat Rev Rheumatol. 2024;20(1):48-62.

Lucchini M et al. Anti-cN1A Antibodies Are Associated with More Severe Dysphagia in Sporadic Inclusion Body Myositis. Cells. 2021;10(5):1146.

Lundberg IE et al. Diagnosis and classification of Idiopathic Inflammatory Myopathies. J Intern Med. 2016;280(1):39-51.

Ma X, Bu BT. Anti-SRP Immune-Mediated Necrotizing Myopathy: A Critical Review of Current Concepts. Front Immunol. 2022;13:1019972.

Mahla RS et al. Ro60—Roles in RNA Processing, Inflammation, and Rheumatic Autoimmune Diseases. Int J Mol Sci. 2024;25(14):7705.

Mahler M, Raijmakers R. Novel Aspects of Autoantibodies to the PM/Scl Complex: Clinical, Genetic and Diagnostic Insights. Autoimmun Rev. 2007;6(7):432-437.

Mandel DE et al. Idiopathic Inflammatory Myopathies: A Review of the Classification and Impact of Pathogenesis. Int J Mol Sci. 2017;18(5):1084.

Marco JL, Collins BF. Clinical Manifestations and Treatment of Antisynthetase Syndrome. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2020;34(4):101503.

Mariampillai K et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. JAMA Neurol. 2018;75(12):1528-1537.

McHugh NJ, Tansley SL. Autoantibodies in Myositis. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(5):290-302.

McMorrow FK et al. Autoantibody Testing in Myositis: An Update. Curr Opin Rheumatol. 2024;36(6):481-487.

Miller FW. The Increasing Prevalence of Autoimmunity and Autoimmune Diseases: An Urgent Call to Action for Improved Understanding, Diagnosis, Treatment, and Prevention. Curr Opin Immunol. 2023;80:102266.

Muro Y et al. Two Novel Anti-Aminoacyl tRNA Synthetase Antibodies: Autoantibodies against Cysteinyl-tRNA Synthetase and Valyl-tRNA Synthetase. Autoimmun Rev. 2022;21(12):103204.

Nikolic RPA et al. International Expert Consensus Recommendations on Standardised Nomenclature of SSA/Ro (TROVE2/Ro60 and TRIM21/Ro52) Autoantibodies in Autoimmune Diseases. Ann Rheum Dis. 2026.

Nuño-Nuño L et al. Overlap Myositis, a Distinct Entity beyond Primary Inflammatory Myositis: A Retrospective Analysis of a Large Cohort from the REMICAM Registry. Int J Rheum Dis. 2019;22(8):1393-1401.

Ogawa-Momohara M, Muro Y. Myositis-specific and myositis-associated autoantibodies: their clinical characteristics and potential pathogenic roles. Immunol Med. 2025;48(2):104-116.

Oldroyd AGS et al. A Systematic Review and Meta-Analysis to Inform Cancer Screening Guidelines in Idiopathic Inflammatory Myopathies. Rheumatology (Oxford). 2021;60(6):2615-2628.

Oldroyd A et al. Idiopathic inflammatory myopathies – a guide to subtypes, diagnostic approach and treatment. Clin Med (Lond). 2017;17(4):322-328.

Oyama M et al. Pathologic Features of Anti-Ku Myositis. Neurology. 2024;102(8):e209268.

Pathania YS. Dermatomyositis and Polymyositis: Are Both Ends of a Same Spectrum? J Cosmet Dermatol. 2026;25(1):e70676.

Pisetsky DS. Antinuclear Antibody Testing — Misunderstood or Misbegotten? Nat Rev Rheumatol. 2017;13(8):495-502.

Ribatti D, Crivellato E. Chapter 2 - From horror autotoxicus to autoimmunity. An historical note. In: Rezaei N, editor. Translational Autoimmunity. Vol 5. Translational Immunology. Academic Press; 2023.

Robbins A et al. Diagnostic Utility of Separate Anti-Ro60 and Anti-Ro52/TRIM21 Antibody Detection in Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2019;10:444.

Salam S et al. Diagnostic and Prognostic Value of Anti-cN1A Antibodies in Inclusion Body Myositis. Clin Exp Rheumatol. 2022;40(2):384-393.

Sato S et al. Autoantibodies to a 140-Kd Polypeptide, CADM-140, in Japanese Patients with Clinically Amyopathic Dermatomyositis. Arthritis Rheum. 2005;52(5):1571-1576.

Sato S et al. RNA Helicase Encoded by Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Is a Major Autoantigen in Patients with Clinically Amyopathic Dermatomyositis: Association with Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease. Arthritis Rheum. 2009;60(7):2193-2200.

Shan X et al. Predictive Factors and Clinical Outcomes of Progressive Pulmonary Fibrosis in Anti-Threonyl (PL7) Positive Anti-Synthetase Syndrome. Rheumatology (Oxford). 2025;64(10):5379-5387.

So H et al. Seasonal Effect on Disease Onset and Presentation in Anti-MDA5 Positive Dermatomyositis. Front Med. 2022;9:837024.

Stuhlmüller B et al. Disease Specific Autoantibodies in Idiopathic Inflammatory Myopathies. Front Neurol. 2019;10:438.

Sundaresan B et al. The Role of Viral Infections in the Onset of Autoimmune Diseases. Viruses. 2023;15(3):782.

Tang HS et al. Clinical heterogeneity and prognostic factors of anti-synthetase syndrome: a multi-centred retrospective cohort study. Rheumatology. 2025;64(1):212-220.

Tang KY et al. Clinical and Laboratory Features between Anti-TIF1γ Dermatomyositis with and without Malignancy: 37 Case Series and a Review. J Dermatol. 2024;51(12):1646-1657.

Tansley SL et al. The Reliability of Immunoassays to Detect Autoantibodies in Patients with Myositis Is Dependent on Autoantibody Specificity. Rheumatology (Oxford). 2020;59(8):2109-2114.

Uruha A et al. Diagnostic Potential of Sarcoplasmic Myxovirus Resistance Protein A Expression in Subsets of Dermatomyositis. Neuropathol Appl Neurobiol. 2019;45(5):513-522.

Ver LS et al. The Cellular Factor NXP2/MORC3 Is a Positive Regulator of Influenza Virus Multiplication. J Virol. 2015;89(19):10023-10030.

Wang K et al. RNA-Containing Immune Complexes Formed by Anti-Melanoma Differentiation Associated Gene 5 Autoantibody Are Potent Inducers of IFN-α. Front Immunol. 2021;12:743704.

Weng CT et al. Association of Anti-Ro-52 Antibodies with Occurrence of Interstitial Lung Disease in Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathy. Arthritis Res Ther. 2024;26(1):152.

Xing C et al. Myxovirus Resistance Protein A (MxA) Expression in Myositides: Sarcoplasmic Expression Is Common in Both Dermatomyositis and Lupus Myositis. Muscle Nerve. 2024;69(5):548-555.

Yang H et al. Clinical Significance of Anti-Transcriptional Intermediary Factor 1-γ Antibody in Patients with Dermatomyositis: A Monocentric Cross-Sectional Study. Clin Rheumatol. 2022;41(8):2439-2448.

Yasmeen F et al. Understanding Autoimmunity: Mechanisms, Predisposing Factors, and Cytokine Therapies. Int J Mol Sci. 2024;25(14):7666.

Yoshida K et al. Combination of Cytoplasmic and Nuclear Patterns on Hep-2 Antinuclear Antibody Is Useful as a Screening Test for Anti-Synthetase Syndrome. Rheumatology (Oxford). 2024;63(9):2590-2596.

Zaizen Y et al. Enhanced Immune Complex Formation in the Lungs of Patients with Dermatomyositis. Respir Res. 2023;24(1):86.

Zandee van Rilland ED et al. Myositis and Its Mimics: Guideline Updates, MRI Characteristics, and New Horizons. AJR Am J Roentgenol. 2024;223(2):e2431359.

Zhang Y et al. Longitudinal Study of Patients with Anti-SAE Antibody-Positive Dermatomyositis: A Multicenter Cohort Study in China. Rheumatology (Oxford). 2025;64(3):1377-1385.