



UNIVERSITÀ DI PISA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

SCUOLA TOSCO-UMBRA DI SPECIALIZZAZIONE IN REUMATOLOGIA

Sede amministrativa dell'Università degli Studi di Pisa

Sede aggregata dell'Università degli Studi di Perugia

Tesi di Specializzazione

**Contributo di ecografia e biopsia delle
ghiandole salivari nella
diagnosi della SS primaria: studio su una
casistica di pazienti
all'esordio di malattia.**

Relatore:

Prof. Roberto Gerli

Coordinatore della sede aggregata di Perugia:

Prof. Roberto Gerli

Direttore della Scuola di Specializzazione:

Prof.ssa Ombretta Di Munno

Candidata

Dott.ssa Giulia Mirabelli

Anno Accademico 2013-2014

INDICE

PARTE I

La sindrome di Sjögren.....	3
1. Epidemiologia.....	3
2. Eziopatogenesi.....	4
2.1. Fattori genetici	4
2.2. Fattori ambientali	5
2.3. Fattori immunologici.....	5
3. Sierologia.....	8
4. Clinica.....	8
5. Indici di malattia.....	13
6. Diagnosi.....	22

PARTE II

Studio Sperimentale	41
1. Introduzione.....	41
2. Materiali e metodi.....	41
2.1. Popolazione studiata	41
2.2. Valutazione clinica e test laboratoristici.....	42
2.3. Esame ultrasonografico delle ghiandole salivari	43
2.4. Valutazione bioptica.....	43
2.5. Analisi statistica	44
3. Risultati.....	44
4. Discussione.....	50
5. Conclusioni.....	54

PARTE I

La sindrome di Sjögren

La SS è una malattia infiammatoria autoimmunitaria sistemica, caratterizzata da una disfunzione delle ghiandole esocrine che genera principalmente secchezza orale ed oculare ed almeno in un terzo dei pazienti si associa un coinvolgimento extraghiandolare con manifestazioni muscolo scheletriche, cutanee, renali, polmonari, neurologiche. Circa il 5% dei pazienti possono inoltre sviluppare una complicanza linfomatosa, principalmente di tipo MALT.

1. Epidemiologia

La SS è forse la connettivite più frequente con una incidenza che oscilla tra circa 4 e 7 casi/anno su 100.000 abitanti ed una prevalenza di circa 61 su 100.000 abitanti, sebbene in letteratura sia riportata una ampia variabilità ascrivibile alle diverse caratteristiche etniche delle popolazioni studiate e ai diversi criteri classificativi

utilizzati. La malattia colpisce prevalentemente il sesso femminile, con un rapporto di circa 9:1. Stratificando infatti i dati epidemiologici per sesso, si ottengono valori di incidenza e prevalenza rispettivamente di 12 casi/anno e 117 casi su 100.000 abitanti per il sesso femminile. L'età media di insorgenza è di circa 55 anni e più in generale la V e VI decade di vita, sebbene quasi nessuna età sia risparmiata, con diagnosi riportate in soggetti in età pediatrica e molto avanzata.¹

2. Eziopatogenesi

Non è stato ancora possibile identificare una precisa eziologia, ma è noto che numerosi fattori genetici e ambientali sono implicati nello sviluppo della malattia. Inoltre molteplici aspetti patogenetici sono responsabili delle manifestazioni cliniche della SS, sebbene anche in questo caso non sia stato identificato un processo univoco che conduce all'espressione della malattia.

2.1.Fattori genetici

L'osservazione di un aumento del rischio di sviluppare la malattia nei parenti di soggetti affetti da SS ha indirizzato l'attenzione dei ricercatori all'individuazione di fattori genetici predisponenti.

È stata dimostrata un'associazione con alcuni aplotipi HLA (HLA-B8, HLA-Dw3 e HLA-DR3), in particolare la larga maggioranza dei soggetti con SS primaria risulta portatrice dell'allele DQA1*0501 che potrebbe avere un ruolo particolarmente importante. È interessante notare come i soggetti con SS portatori di alleli HLA-DQA1 e HLA-DQB1 sembrano avere più alti titoli di auto-anticorpi anti-Ro e anti-La.²

Molte altre molecole sono state associate ad una suscettibilità per SS, sono tuttavia necessari ulteriori studi che confermino queste osservazioni e ne approfondiscano il ruolo patogenetico. L'evidente preferenza della malattia per il sesso femminile – in particolare nel periodo peri-menopausale – ha fatto ipotizzare che l'assetto ormonale possa avere un ruolo importante nello sviluppo della malattia. Le evidenze sono tuttavia contrastanti nei modelli murini e non hanno trovato uniforme riscontro nell'uomo.

2.2.Fattori ambientali

Come per molte malattie autoimmunitarie, si è sospettato che sulla base predisponente genetica possa agire un fattore infettivo ed innescare il processo infiammatorio. In effetti, nelle cellule epiteliali delle ghiandole salivari (SGECs) di pazienti con SS, sono state individuate sequenze genomiche appartenenti a numerosi agenti virali, tra cui EBV, CMV, *Human Herpes Virus* (HHV)-6, HHV-8, *human T Lymphotropic Virus type I* (HTLV-I) e Virus Cocksackie.

È interessante anche osservare che infezioni da HIV e HCV possono causare una sialoadenite cronica con caratteristiche simili a quella in corso di SS, sebbene non associata alla presenza di anticorpi anti-La e anti-Ro in circolo.

Nonostante queste osservazioni, sono necessari ulteriori approfondimenti per tentare di identificare i meccanismi con cui infezioni latenti o la presenza di genoma virale siano in grado di contribuire alla patologia.

2.3.Fattori immunologici

Le principali informazioni sulle caratteristiche del processo infiammatorio derivano

da studi eseguiti su biopsie di ghiandole salivari, considerando la ampia disponibilità di materiale routinariamente prelevato a scopo diagnostico.

Le caratteristiche dell'infiltrato variano in base alla gravità delle lesioni, con una prevalenza di cellule T nelle forme lievi e moderate, B nelle forme più gravi. Meno abbondanti sono gli infiltrati di cellule dendritiche, macrofagi, cellule *natural killer* (NK). Inoltre le caratteristiche dell'infiltrato sembrano modificarsi nel tempo, suggerendo che mentre nelle fasi iniziali la prevalenza di linfociti T è maggiore, nelle fasi successive si sviluppa una progressiva organizzazione linfoide, con reclutamento di linfociti B che culmina con la formazione di centri germinativi ectopici (*GC-like structures*). Tale processo prende il nome di linfoneogenesi ectopica ed accomuna la risposta infiammatoria a carico delle ghiandole esocrine in corso di SS a quella osservata nella sinovia in corso di AR.^{3,4}

Nella figura 1 è possibile osservare l'aspetto istologico caratteristico degli infiltrati linfocitari ghiandolari in corso di SS e la distribuzione dei linfociti T e B nel loro contesto.

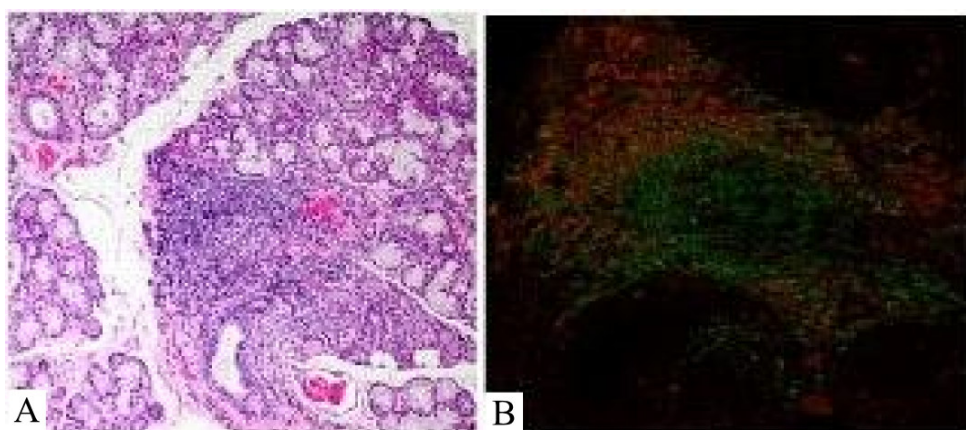


Figura 1. *A) Ematossilina-Eosina, 4x B) Immunofluorescenza per CD3 (rosso) e CD20 (verde), 10x. Modificato da: J Autoimmunity 2014;51:38-4*

Dallo studio delle sotto-popolazioni di cellule T presenti nell'infiltrato è emerso uno *shift* prevalente verso cellule Th1 della memoria con prevalenza di citochine come IL-2 e IFN- γ , sebbene nelle forme di gravità intermedia sembrano avere un ruolo fondamentale le citochine caratteristiche del fenotipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13). In particolare, IFN- γ sembrerebbe contribuire al danno anche attraverso l'induzione della proteasi *plasminogen activator*.⁵

Studi più recenti hanno inoltre fatto emergere l'importante funzione svolta dalle cellule Th17 (sia CD4+ che CD4-CD8-) nella genesi e nel mantenimento della flogosi; i livelli di IL-17, nonché l'entità dell'infiltrato di Th17, sembrano proporzionali alla gravità delle lesioni. L'attività delle cellule Th17 sembra essere mediata anche dalla produzione di IL-22.^{6,7}

Anche l'IL-21, prodotta da cellule Th follicolari (Thf) presenti nei centri germinativi ghiandolari dei pazienti con SS, sembra contribuire al processo, in particolare stimolando la proliferazione e la maturazione delle cellule B.⁸ Le cellule dendritiche presenti negli infiltrati ghiandolari in corso di SS sembrano avere un ruolo centrale nel processo di maturazione e attivazione delle cellule B, attraverso la produzione di IFN- α , che sembrerebbe stimolare la produzione di BAFF/BLyS⁹. Livelli circolanti aumentati di BAFF, nonché la sua sovra-espressione a livello ghiandolare, sono anche stati associati alla formazione dei centri germinativi, alla proliferazione di cellule B e allo sviluppo di linfomi in pazienti con SS. Oltre ai livelli circolanti di BAFF, anche quelli di IL-14 sembrano particolarmente elevati nei soggetti con SS. L'IFN- α , inoltre, è responsabile dell'aumento di produzione di MMPs che contribuiscono al danno cellulare evidente nelle ghiandole dei pazienti con SS.¹⁰ Le cellule B rappresentano l'altro pilastro fondamentale del processo patologico nella

SS, anche alla luce del frequente riscontro di ipergammaglobulinemia, crioglobulinemia, autoanticorpi ed IC circolanti. Alcuni autori hanno evidenziato la presenza di alti livelli di RNA messaggero codificante per numerose citochine (IL-1, IL-6, IL-12, TNF), chemochine (CXCL13, CCL17, CCL21, CCL22) pro-infiammatorie e fattori di crescita come BAFF/BLyS.

3. Sierologia

In circa l'85% dei soggetti con SS primaria è possibile identificare la presenza di ANA a livello sierico, prevalentemente con pattern *speckled*. La positività ANA ad alto titolo (>1:320) è stata peraltro inclusa nei criteri classificativi per la SS recentemente proposti dall'ACR, purché sia associata alla positività per FR.

I marcatori sierologici più specifici di SS sono gli auto-anticorpi anti-Ro e anti-La, la cui sensibilità non è però particolarmente elevata, risultando positivi in non più della metà dei pazienti. Una minoranza dei pazienti presenta anche positività per auto-anticorpi anti-centromero.

Sebbene ancora non utilizzati in ambito clinico, alcuni altri auto-anticorpi sono stati individuati in soggetti con SS.

4. Clinica

La natura eterogenea della patologia giustifica l'ampio spettro di manifestazioni cliniche che amplia dalla sindrome secca a condizioni extraghiandolari più severe. La xeroftalmia rappresenta una delle caratteristiche cliniche cardine della SS, presente nella maggioranza dei pazienti. I meccanismi fisiopatologici alla base della riduzione

della funzione delle ghiandole lacrimali – e potenzialmente di ogni altra ghiandola esocrina dell'organismo – sono probabilmente molteplici: sicuramente il processo infiammatorio cronico è responsabile di danno a carico delle cellule epiteliali, causando una diminuzione del loro numero. Il deficit di funzionalità delle ghiandole lacrimali determina una riduzione della componente acquosa delle lacrime. Le conseguenze più frequenti in corso di xerofthalmia sono la sensazione di corpo estraneo, bruciore, affaticamento della vista, fotofobia, sintomi che possono rappresentare l'epifenomeno di una lesione dell'epitelio congiuntivale o corneale causata dalla scarsa lubrificazione lacrimale. La presenza di queste alterazioni può essere messa facilmente in evidenza instillando un collirio a base di un colorante o di una sostanza fluorescente (sono tre le molecole usate: rosa di bengala, verde di lissamina e fluoresceina). L'altro pilastro delle manifestazioni cliniche della SS è il coinvolgimento delle ghiandole salivari, maggiori e minori, particolarmente evidente a carico delle ghiandole parotidi. Il sintomo principale è la xerostomia, la sensazione di secchezza del cavo orale, che determina sensazione di bruciore, difficoltà di masticazione e deglutizione dei cibi secchi, di eloquio e alterazione del senso del gusto. Queste manifestazioni, se gravi, possono avere un'importante ripercussione sulla qualità della vita del paziente. Aldilà della sintomatologia soggettiva, la ridotta secrezione salivare (o spesso una alterazione della composizione chimica della saliva nel contesto di un volume salivare piuttosto conservato) è responsabile di importanti conseguenze a carico del cavo orale: carie, parodontite e infezioni da candida. Frequenti sono anche gli episodi di tumefazione parotidea (e delle altre ghiandole salivari maggiori) che possono essere dovuti al processo infiammatorio caratteristico della malattia con episodi acuti, sub-acuti o cronici caratterizzati da un aumento della

consistenza della ghiandola e dolenzia e dolorabilità variabili. Tuttavia gli episodi acuti possono essere causati anche dall'ostruzione dei dotti salivari da parte di tappi mucosi densi e tendono a risolvere spontaneamente nel giro di qualche giorno.

Le principali manifestazioni cutanee sono legate alla riduzione della funzionalità delle ghiandole esocrine con conseguente xerosi cutanea e prurito. È stata descritta anche la presenza di vitiligo, anetodermia (detta anche elastolisi e caratterizzata da atrofia cutanea maculare) e alopecia. La cute è l'organo più spesso coinvolto da vasculite, che oltre ai quadri descritti in seguito, può assumere anche caratteristiche di vasculite orticarioide (confermabile istologicamente), con la presenza di pomfi di morfologia variabile che permangono per tempi superiori alle 24h. In circa 15-30% dei casi di SS è presente il fenomeno di Raynaud, che non esita però nella formazione di ulcere digitali.

Le manifestazioni articolari sono state descritte sin dai primi casi classificati come SS. Sono piuttosto frequenti (sebbene i dati di prevalenza riportati in letteratura siano molto variabili: 15-90%) e spesso sono sintomi già presenti alla diagnosi, talvolta anche antecedenti la secchezza oculare ed orale.

Focalizzando l'attenzione sul coinvolgimento del singolo organo sicuramente il coinvolgimento renale, neurologico e cardiovascolare assumono particolare importanza.

La SS colpisce frequentemente il sistema nervoso periferico (SNP), più raramente il SNC. Sebbene neuropatie periferiche siano presenti in circa un quarto dei soggetti affetti da SS, lo spettro di manifestazioni cliniche che possono essere incluse in questo gruppo è piuttosto ampio. La forma più frequente è una neuropatia sensoriale delle piccole fibre (fibre C amieliniche e fibre A δ scarsamente mieliniche),

caratterizzata da iperestesia, parestesie dolorose e urenti, riferite soprattutto alle estremità. Neuropatie a carico del nervo ottico e del midollo spinale, convulsioni, sindromi cerebellari, emiparesi e TIA sono le manifestazioni che più frequentemente insorgono in seguito al coinvolgimento del SNC. Molto frequenti sono invece manifestazioni più vaghe di interessamento del SNC come astenia, disturbi dell'umore (soprattutto di tipo depressivo), ansia, disturbi cognitivi, deficit attentivi, mnesici e delle funzioni esecutive. La scarsa specificità di queste manifestazioni rende estremamente difficile l'identificazione e l'attribuzione del sintomo alla malattia piuttosto che ad una condizione indipendente da essa. Questo spiegherebbe l'ampia variabilità di frequenza riportata in letteratura.

Si può verificare anche un coinvolgimento renale sia con una nefrite tubulo-interstiziale (NTI) sia con una GN, talvolta entrambe. In particolare i pazienti con GN hanno una sopravvivenza significativamente ridotta.

L'apparato cardiovascolare è coinvolto piuttosto frequentemente in corso di SS e le manifestazioni cliniche possono essere molto variabili. In particolare è noto che i pazienti con SS, in modo del tutto simile ad altre patologie autoimmuni, hanno un rischio aumentato di eventi cerebrovascolari e cardiaci rispetto ai soggetti sani e tale dato sembra essere correlato ad una elevata attività di malattia.¹¹

Alcuni studi hanno indagato la presenza di alterazioni cardiache nei pazienti con SS evidenziando una maggiore frequenza rispetto ai controlli sani di valvulopatie (rigurgito mitralico, aortico, tricuspide), iperecogenicità pericardica asintomatica e non emodinamicamente influente (presumibilmente segno di pericardite sub-clinica) e segni ecografici di disfunzione diastolica (indipendente dalle alterazioni pericardiche).

La prevalenza di manifestazioni respiratorie nei pazienti con SS varia molto tra gli studi, con valori che oscillano tra 9 e 75%. Una delle forme più comunemente riportate è legata alla ipofunzionalità delle ghiandole a carico dell'albero respiratorio che determinano secchezza delle mucose, dal naso alle basse vie (xerotrachea, xerobronchite) che può manifestarsi con epistassi, sinusite, disosmia e tosse non produttiva. A livello del parenchima polmonare, la condizione patologica più frequentemente riscontrata è una polmonite interstiziale linfocitaria (LIP), ma può essere riscontrata la polmonite interstiziale non specifica (NSIP), mentre più rara è la presenza di polmonite interstiziale comune (*Usual Interstitial Pneumonia*, UIP), e alveolite. Non raro è inoltre il riscontro di ipertensione polmonare, sebbene solo raramente abbia un impatto clinico importante.

I pazienti con SS riferiscono frequentemente disfagia, che ha probabilmente una origine multifattoriale, legata sia ai disturbi della motilità che alla scarsa presenza di saliva che rende più difficoltosa la progressione del bolo alimentare. Alcuni studi hanno anche mostrato una maggiore prevalenza di malattia celiaca nei pazienti con SS, sebbene questa informazione non sia stata confermata da altri.

Parallelamente a quanto descritto per il LES, la presenza di anticorpi anti-Ro in donne gravide con SS o anche asintomatiche è associata all'insorgenza di blocchi della conduzione cardiaca del feto e del neonato, rischio che va sempre considerato nella gestione clinica delle pazienti in età riproduttiva.¹²

Di grande impatto clinico è invece la presenza di fenomeni vasculitici, con una prevalenza che oscilla tra il 5 e il 10% nei pazienti con SS. Si tratta essenzialmente di una vasculite da immunocomplessi che può coinvolgere vasi di piccolo e medio calibro con espressione clinica variabile. Più rari sono gli episodi di vasculite acuta

necrotizzante, che assume caratteristiche simili alla poliarterite nodosa. In corso di SS è piuttosto frequente il riscontro di ipotiroidismo, probabilmente di origine autoimmune. La stessa associazione è vera in senso inverso: tra i soggetti con tiroidite autoimmune la SS ha una prevalenza di circa 10%.

Anche nella SS – al pari delle altre malattie autoimmunitarie infiammatorie sistemiche – le alterazioni a livello ematologico sono di riscontro assai frequente.

Gli elementi più comuni sono l'anemia da disordine cronico, la leucopenia e l'ipergammaglobulinemia, spesso associata alla presenza di auto-anticorpi circolanti e probabile espressione della iperattività delle cellule B. È spesso presente anche crioglobulinemia, generalmente di tipo II e III che sembra associata allo sviluppo di fenomeni vasculitici, alla presenza di linfadenosplenomegalia e al fenomeno di Raynaud. Molto più rara, ma non eccezionale, è la presenza di citopenie immuno-mediate, soprattutto anemia emolitica.

La principale problematica ematologica cui sono esposti i pazienti con SS, tuttavia, è l'aumentato rischio (da 6 a 44 volte rispetto alla popolazione generale) di sviluppare un linfoma non-Hodgkin (NHL) che rappresenta, peraltro, la principale complicanza della malattia nonché causa di morte. Diversi istotipi sono stati descritti, tra cui i più frequenti sono il linfoma marginale a cellule B e soprattutto il sottotipo linfoma *mucosa-associated lymphoid tissue* (MALT), linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma follicolare e linfoma linfoplasmacitoide.

5. Indici di malattia

Al fine di attuare una corretta valutazione dell'attività di malattia sono stati definiti

degli indici di valutazione dei sintomi e degli indici di attività. Il primo ad essere proposto è stato lo *Sicca Symptoms Inventory* (SSI), pubblicato nel 2002, poco tempo dopo è stato pubblicato un altro indice (*Profile of Fatigue and Discomfort - PROFAD*). Il principale punto di debolezza di questi indici è che a ciascuno dei domini è assegnato un peso analogo agli altri, sebbene questo non rispecchi le caratteristiche della malattia, rischiando perciò di mascherare l'effetto di elementi sintomatologici più rilevanti. Per tentare di superare questi limiti, nonché di creare un unico indice che potesse racchiudere tutte le principali caratteristiche sintomatologiche della malattia, la *European League Against Rheumatism* (EULAR), ha sviluppato lo *EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index* (ESSPRI), valutando pazienti su scala mondiale.

Tra gli indici di malattia il primo ad essere sviluppato è stato lo *Sjögren's Syndrome Disease Activity Index* (SSDAI) (Tabella 1), grazie alla collaborazione di diversi centri italiani. L'indice è composto da 11 elementi classificati in 8 domini, e comprende sia elementi clinici che laboratoristici. Ad ogni elemento è attribuito un punteggio e la loro somma costituisce lo *score* finale (max. 21). Si è dimostrato valido nella stima dell'attività di malattia e correla bene con il PGA, sebbene la sua semplicità determini una scarsa sensibilità nel distinguere differenze tra soggetti con attività di malattia lieve: alcuni autori riportano che oltre la metà dei pazienti con SS hanno punteggi SSDAI di 0 o 1.^{13,14}

Score	Item	Definizione
	Sintomi costituzionali	
1	<i>Febbre</i>	≥ 38 °C, non infettiva
1	<i>Astenia</i>	Abbastanza grave da compromettere l'attività

		quotidiana.
1	<i>Variazione dell'astenia</i>	Insorgenza o peggioramento dell'astenia
3	Variazione della tumefazione delle ghiandole salivari	Insorgenza o peggioramento della tumefazione delle ghiandole salivari maggiori, non causata da infezioni o litiasi
2	Sintomi articolari (almeno uno)	
	<i>Artrite</i>	Dolore infiammatorio in ≥ 1 articolazione
	<i>Artralgie ingravescenti</i>	Insorgenza o peggioramento di dolore articolare in assenza di segni di infiammazione*
	Caratteristiche ematologiche	
1	<i>Leucopenia / linfopenia</i>	$< 3500/\text{mm}^3$ / $< 1000/\text{mm}^3$
2	<i>Linfoadenomegalia o splenomegalia</i>	Linfonodi o milza clinicamente palpabili
4	Sintomi pleuropolmonari (almeno uno)	
	<i>Pleurite</i>	Confermata radiologicamente, non infettiva
	<i>Polmonite (segmentale o interstiziale)</i>	Aspetto a vetro smerigliato alla TC, non infettiva
3	Variazioni della vasculite	Insorgenza, peggioramento o riacutizzazioni ricorrenti di porpora palpabile
2	Coinvolgimento renale attivo (almeno uno)	
	<i>Insorgenza o peggioramento della proteinuria</i>	$> 0,5$ g/die
	<i>Creatininemia in aumento</i>	Superiore ai limiti di riferimento
	<i>Insorgenza o esordio di nefrite</i>	Glomerulare o interstiziale, definita istologicamente
1	Neuropatia periferica	Recente insorgenza (< 6 mesi), confermata da studi di conduzione nervosa
* <i>Escludere altre cause di dolore muscolare e articolare come artrosi o fibromialgia.</i>		

Tabella 1. Sjögren's syndrome disease activity index (SSDAI)

Mutuando il BILAG, utilizzato per il LES, è stato sviluppato un indice con caratteristiche sostanzialmente sovrapponibili anche per la SS, chiamato *Sjogren's Systemic Clinical Activity Index (SCAI)*. Lo stesso gruppo dedicatosi allo sviluppo dell'ESSPRI ha sviluppato anche un indice di attività di malattia, chiamato *EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI)* (Tabella 2). È strutturato in 12 domini a ciascuno dei quali è attribuito un peso, in base all'importanza del suo coinvolgimento nell'attività di malattia. Ogni dominio è inoltre suddiviso in 3 o 4 livelli in base al grado di attività e ad ognuno di essi è attribuito un punteggio da 0 a 2/3. Ogni punteggio ottenuto in ciascun dominio è moltiplicato per il peso del dominio stesso e la somma dei prodotti restituisce lo *score* totale che oscilla tra 0 (assenza di attività di malattia) a 123 (massima attività di malattia). Lo ESSDAI si è dimostrato molto efficace e più sensibile rispetto all'SSDAI ed è allo stesso tempo di più rapido utilizzo rispetto allo SCAI, caratteristiche che lo rendono l'indice di attività di malattia più diffuso al momento.¹³

Dominio [peso]	Attività	Descrizione
Costituzionale [3] Escludere febbre di origine infettiva e calo ponderale volontario	Assente = 0	Assenza dei sintomi seguenti
	Lieve = 1	Febbre lieve o intermittente (37,5 °C – 38,5 °C), sudorazioni notturne e/o calo ponderale involontario dal 5 al 10% del peso corporeo
	Moderata = 2	Febbre alta (> 38,5 °C), sudorazioni notturne e/o calo ponderale involontario > 10% del peso corporeo
Linfoadenopatia [4] Escludere infezione	Assente = 0	Assenza delle caratteristiche seguenti
	Lieve = 1	Linfoadenopatia ≥ 1 cm in qualsiasi regione o ≥ 2 cm in regione inguinale

	Moderata = 2	Linfoadenopatia ≥ 2 cm in qualsiasi regione o ≥ 3 cm in regione inguinale e/o splenomegalia (palpabile clinicamente o evidente all'imaging)
	Alta = 3	Patologia proliferativa maligna a cellule B in atto
Ghiandolare [2] Escludere litiasi e infezione	Assente = 0	Tumefazione ghiandolare assente
	Lieve = 1	Tumefazione ghiandolare lieve con aumento volumetrico della parotide (≤ 3 cm), o tumefazione limitata delle ghiandole sottomandibolari o lacrimali
	Moderata = 2	Tumefazione ghiandolare importante con aumento volumetrico della parotide (> 3 cm), o tumefazione importante delle ghiandole sottomandibolari o lacrimali
Articolare [2] Escludere artrosi	Assente = 0	Coinvolgimento articolare in atto assente
	Lieve = 1	Artralgie a mani, polsi, caviglie e piedi accompagnate da rigidità mattutina (> 30 min)
	Moderata = 2	Sinovite di 1-5 articolazioni (su un totale di 28)
	Alta = 3	Sinovite di ≥ 6 articolazioni (su un totale di 28)
Cutaneo [3] Considerare <i>assente</i> la presenza di lesioni stabili da lungo tempo ed espressione di danno	Assente = 0	Coinvolgimento cutaneo in atto assente
	Lieve = 1	Eritema multiforme
	Moderata = 2	Vasculite cutanea limitata, incluse vasculite orticarioide o porpora limitata a piedi e caviglie o lupus cutaneo subacuto
	Alta = 3	Vasculite cutanea diffusa, incluse vasculite orticarioide, porpora diffusa o ulcere vasculitiche
Polmonare [5] Considerare <i>assente</i> la presenza di caratteristiche stabili espressione di danno o condizioni respiratorie non riferibili alla	Assente = 0	Coinvolgimento polmonare in atto assente
	Lieve = 1	Tosse persistente o coinvolgimento bronchiale senza alterazioni evidenti all'Rx-torace o evidenza di patologia interstiziale polmonare all'Rx o alla HRCT in assenza di dispnea e con test di funzionalità respiratoria normali.

malattia (es. fumo di tabacco, etc.)	Moderata = 2	Coinvolgimento polmonare moderatamente attivo, come patologia interstiziale polmonare evidente all'HRCT con dispnea da sforzo (NYHA II) o test di funzionalità respiratoria anormali limitatamente a: 70% > DLCO ≥ 40% o 80% > FVC ≥ 60%
	Alta = 3	Coinvolgimento polmonare molto attivo, come patologia interstiziale polmonare evidente all'HRCT con dispnea a riposo (NYHA III, IV) o test di funzionalità respiratoria anormali: DLCO < 40% o FVC < 60%
Renale [5] Considerare <i>assente</i> la presenza di caratteristiche stabili espressione di danno e coinvolgimento renale non riferibile alla malattia. Se è stata eseguita una biopsia valutare prima l'attività in base alle caratteristiche istologiche	Assente = 0	Coinvolgimento renale in atto assente, con proteinuria < 0,5 g/die, assenza di ematuria, leucocituria, acidosi o proteinuria causata da danno, stabile da tempo
	Lieve = 1	Evidenza di coinvolgimento renale lieve in atto, limitatamente ad acidosi tubulare senza insufficienza renale o coinvolgimento glomerulare con proteinuria (tra 0,5 e 1 g/die) e assenza di ematuria e insufficienza renale (GFR ≥ 60 ml/min)
	Moderata = 2	Coinvolgimento renale moderatamente attivo, come acidosi tubulare con insufficienza renale (GFR < 60 ml/min) o coinvolgimento glomerulare con proteinuria tra 1 e 1,5 g/die in assenza di ematuria e insufficienza renale (GFR ≥ 60 ml/min) o evidenza istologica di glomerulonefrite extra-membranosa o importante infiltrato linfoide interstiziale
	Alta = 3	Coinvolgimento renale molto attivo, come coinvolgimento glomerulare con proteinuria > 1,5 g/die o ematuria o insufficienza renale (GFR < 60 ml/min), o evidenza istologica di glomerulonefrite proliferativa o coinvolgimento renale crioglobulinemico.
Muscolare [6] Escludere ipostenia da corticosteroidi	Assente = 0	Coinvolgimento muscolare in atto assente
	Lieve = 1	Miosite attiva lieve evidenziata da alterazioni dell'EMG o alla biopsia in assenza di debolezza ed elevazione della creatin-chinasi (N < CPK ≤ 2N)

	Moderata = 2	Miosite moderatamente attiva dimostrata da EMG anormale o biopsia con debolezza (massimo deficit 4/5) o elevazione della creatin-chinasi ($2N < CPK \leq 4N$)
	Alta = 3	Miosite altamente attiva dimostrata da EMG anormale o biopsia con debolezza (deficit $\leq 3/5$) o elevazione della creatin-chinasi ($> 4N$)
<p>SNP [5] Considerare <i>assente</i> la presenza di caratteristiche stabili espressione di danno o coinvolgimento del SNP non riferibile alla malattia</p>	Assente = 0	Coinvolgimento del SNP in atto assente
	Lieve = 1	Coinvolgimento attivo lieve del SNP, come polineuropatia assonale sensitiva pura dimostrata da studi di conduzione nervosa o nevralgia del trigemino
	Moderata = 2	Coinvolgimento del SNP moderatamente attivo, dimostrato da studi di conduzione nervosa, come neuropatia assonale sensitivo-motoria con deficit motorio massimo di 4/5, neuropatia sensitiva pura con presenza di vasculite crioglobulinemica, gangliopatia con sintomi limitati ad atassia lieve/moderata, polineuropatia infiammatoria demielinizzante (CIDP) con lieve alterazione funzionale (deficit motorio massimo di 4/5 o atassia lieve), o coinvolgimento periferico dei nervi cranici (eccetto nevralgia del trigemino)
	Alta = 3	Coinvolgimento del SNP altamente attivo, dimostrato da studi di conduzione nervosa, come neuropatia sensitivo-motoria con deficit motorio $\leq 3/5$, coinvolgimento nervoso periferico da vasculite (mononeurite multipla, etc.), atassia grave da gangliopatia, polineuropatia infiammatoria demielinizzante (CIDP) con grave alterazione funzionale: deficit motorio $\leq 3/5$ o atassia grave
<p>SNC [5] Considerare <i>assente</i> la presenza di caratteristiche stabili espressione di danno o coinvolgimento del SNC non riferibile alla malattia</p>	Assente = 0	Coinvolgimento del SNP in atto assente
	Lieve = 1	Coinvolgimento del SNC moderatamente attivo, come coinvolgimento di nervi cranici con caratteristiche di lunga durata e origine centrale, neurite ottica o sindrome simil-sclerosi multipla con sintomi limitati a disturbi puramente sensitivi o dimostrati disturbi cognitivi.

	Alta = 3	Coinvolgimento del SNC altamente attivo, come vasculite cerebrale con accidenti cerebro-vascolari o attacchi ischemici transitori, convulsioni, mielite trasversa, meningite linfocitica, sindrome simil-sclerosi multipla con deficit motorio
Ematologico [2] Nell'ambito di anemia, neutropenia e trombocitopenia, devono essere considerate solo le forme autoimmuni. Escludere deficit vitaminici, marziali e citopenie farmaco-indotte	Assente = 0	Assenza di citopenie autoimmuni
	Lieve = 1	Citopenia di origine autoimmune con neutropenia ($1000 < \text{neutrofili} < 1500/\text{mm}^3$), e/o anemia ($10 < \text{Hb} < 12 \text{ g/dL}$), e/o trombocitopenia ($100.000 < \text{piastrine} < 150.000/\text{mm}^3$); o linfocitopenia ($< 500 \text{ linfociti} < 1000/\text{mm}^3$)
	Moderata = 2	Citopenia di origine autoimmune con neutropenia ($500 < \text{neutrofili} < 1000/\text{mm}^3$), e/o anemia ($8 < \text{Hb} < 10 \text{ g/dL}$), e/o trombocitopenia ($50.000 < \text{piastrine} < 100.000/\text{mm}^3$); o linfocitopenia ($< 500/\text{mm}^3$)
	Alta = 3	Citopenia di origine autoimmune con neutropenia ($\text{neutrofili} < 500/\text{mm}^3$), e/o anemia ($\text{Hb} < 8\text{g/dL}$) e/o trombocitopenia ($\text{piastrine} < 50.000/\text{mm}^3$)
Biologico [1]	Assente = 0	Assenza delle caratteristiche biologiche seguenti
	Lieve = 1	Componente clonale e/o ipocomplementemia (bassi livelli di C4 o C3 o CH50) e/o ipergammaglobulinemia o alti livelli di IgG tra 16 e 20 g/L
	Moderata = 2	Presenza di crioglobulinemia e/o ipergammaglobulinemia o alti livelli di IgG $> 20 \text{ g/L}$, e/o ipogammaglobulinemia di recente esordio o recente riduzione dei livelli di IgG ($< 5 \text{ g/L}$)
<p><i>CIDP: polineuropatia infiammatoria demielinizzante cronica, CPK: creatin-fosfochinasi, SNP: sistema nervoso periferico, SNC: sistema nervoso centrale, DLCO: capacità di diffusione polmonare del CO, EMG: elettromiografia, FVC: capacità vitale forzata, GFR: velocità di filtrazione glomerulare, Hb: emoglobina, HRCT: tomografia computerizzata ad alta risoluzione, IgG: immunoglobulina G, NYHA: New York Heart Association</i></p>		

Tabella 2. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI)

Alla pari di altre connettiviti anche la SS, sebbene in genere con minore frequenza e gravità, può esitare il lesioni irreversibili a carico delle strutture colpite e pertanto oltre alla misurazione dell'attività di malattia è fondamentale dotarsi anche di uno strumento in grado di quantificare gli esiti a distanza del processo patologico, soprattutto in funzione della valutazione dell'effetto di determinati interventi terapeutici. Non a caso lo stesso gruppo che ha sviluppato l'indice di attività SSDAI ha parallelamente lavorato e proposto un indice di danno, lo *Sjögren's Syndrome Disease Damage Index* (SSDDI) (Tabella 3) strutturato in modo abbastanza simile allo SSDAI.

L'unico altro indice di valutazione del danno è lo *Sjogren's Syndrome Damage Index* (SSDI), con caratteristiche piuttosto simili allo SSDAI.

Score	Item	Definizione
	Danno orale/salivare	
1	<i>Alterazioni del flusso salivare</i>	Raccolta di saliva non stimolata < 1,5 ml/15 min, con metodo standard
1	<i>Perdita di denti</i>	Completa o quasi completa
	Danno oculare	
1	<i>Alterazioni del flusso lacrimale</i>	Test di Schirmer I < 5mm in 5 minuti, con metodo standard
1	<i>Lesioni strutturali</i>	Ulcere corneali, cataratte, blefarite cronica
	Danno neurologico	
2	<i>Coinvolgimento del SNC</i>	Coinvolgimento del SNC da lungo tempo e stabile
1	<i>Neuropatia periferica</i>	Disturbo del sistema nervoso periferico o autonomico da lungo tempo e stabile
2	Danno pleuropolmonare (almeno uno)	
	<i>Fibrosi pleurica</i>	Confermata all'imaging

	<i>Fibrosi interstiziale</i>	Confermata all'imaging
	<i>Danno funzionale irreversibile significativo</i>	Confermato alla spirometria
2	Alterazioni renali (almeno uno)	
	<i>Aumento della creatininemia o riduzione della GFR</i>	Alterazioni da lungo tempo e stabili
	<i>Acidosi tubulare</i>	pH urinario > 6 e bicarbonato serico < 15 mmol/L in 2 test consecutivi
	<i>Nefrocalcinosi</i>	Confermata all'imaging
5	Patologie linfoproliferative (almeno una)	
	<i>Linfoma a cellule B</i>	Confermato clinicamente ed istologicamente
	<i>Mieloma multiplo</i>	Confermato clinicamente ed istologicamente
	<i>Macroglobulinemia di Waldenström</i>	Confermato clinicamente ed istologicamente
<i>SNC: sistema nervoso centrale, GFR: velocità di filtrazione glomerulare</i>		

Tabella 3. Sjögren's Syndrome Disease Damage Index (SSDDI)

La cronicità della condizione morbosa e le lesioni transitorie e permanenti che è in grado di procurare a chi ne è affetto possono avere un importante impatto sulla qualità di vita del soggetto. Avere un indice che possa quantificarla è pertanto di grande utilità nel contesto di studi clinici; al momento il più utilizzato è il generico SF-36.

6. Diagnosi

Porre diagnosi di SS è piuttosto semplice nei casi in cui il paziente si presenti con i classici sintomi e segni di secchezza oculare e orale e risulti sieropositivo per anticorpi anti-Ro e/o anti-La. Il problema si pone con i non pochi pazienti in cui non

è possibile riscontrare la presenza di auto-anticorpi circolanti o eventualmente solo una positività ANA a titolo significativo. In questi casi è la valutazione del quadro complessivo da parte del clinico, con il ricorso alle opportune indagini laboratoristiche e strumentali, che permette di giungere ad una diagnosi di SS o di definire una o più condizioni diverse che possano spiegare i segni e i sintomi che il paziente presenta e riferisce.

L'ampio ventaglio di caratteristiche cliniche, di condizioni confondenti e di possibili comorbilità associate alla SS ha reso necessario lo sviluppo di criteri classificativi che permettano di uniformare quanto più possibile i soggetti reclutati nell'ambito di studi epidemiologici e clinici, in modo da rendere i risultati internamente validi e confrontabili con quelli di studi diversi. Prima del 1993 molteplici criteri erano stati proposti e variamente utilizzati da diversi gruppi di ricerca nel mondo, senza che ci fosse alcun accordo tra di essi. Questo ha generato risultati scientifici estremamente eterogenei e non confrontabili in alcun modo.

Il primo vero tentativo di unificazione risale alla fine degli anni '80 del secolo scorso da parte dello *European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome* che ha dato vita, dopo alcuni anni ai criteri classificativi europei preliminari. Questi si basano su 6 elementi soggettivi e oggettivi, clinici, laboratoristici e strumentali: sintomi oculari, sintomi orali, segni oculari (test di Schirmer I o colorazione con rosa bengala positivi), segni di coinvolgimento delle ghiandole salivari (scialografia, scintigrafia o flusso salivare non stimolato), aspetto istologico delle ghiandole salivari compatibile e auto-anticorpi circolanti (ANA, FR e/o anti-Ro e anti-La). La presenza di 4 criteri dei 6 è compatibile con la SS primaria, escludendo tuttavia i soggetti con pregresso linfoma, sindrome da immunodeficienza

acquisita (AIDS), sarcoidosi, scialoadenosi, *graft-versus-host disease* (GVHD) e i soggetti che assumono farmaci antidepressivi, antipertensivi, antipsicotici e parasimpaticolitici, tutte condizioni che possono determinare caratteristiche cliniche simili a quelle presenti in corso di SS. Nel contesto di un'altra connettivite definita, la presenza di 3 criteri tra i primi 5 (escluso, quindi, il criterio sierologico) definisce una SS secondaria.

Questi criteri sono stati ampiamente utilizzati in ambito di ricerca e si sono dimostrati anche abbastanza validi. Non si è tuttavia comunque riuscito a raggiungere un ampio accordo sul loro uso e negli anni sono emersi diversi elementi di debolezza. In primo luogo è possibile soddisfare i criteri in assenza sia di autoanticorpi circolanti che di un riscontro istologico positivo: questo determina l'inclusione tra i pazienti con SS di molti soggetti affetti da xerostomia e xeroftalmia che non mostrano alcun segno della presenza di un processo autoimmunitario in corso. Altra critica emersa riguarda la presenza di 2 criteri soggettivi su 6, che rende più probabile una errata classificazione di soggetti effettivamente affetti da SS ma privi di sintomatologia rilevante. Per superare queste criticità, grazie al lavoro di un gruppo di ricercatori europei e americani (*American-European Consensus Group*, AECG), sono stati pubblicati i criteri europeo-americani (Tabella 4), per gran parte sovrapponibili a quelli europei ma con alcune importanti modifiche. Una delle principali differenze consiste nell'aggiunta di diversi dettagli che definiscono con maggiore precisione le procedure di esecuzione dei test diagnostici. Sono stati inoltre definiti i parametri di positività della scialografia e della scintigrafia e modificati alcuni criteri di esclusione, aggiungendo l'infezione da HCV, la pregressa radioterapia del distretto testa-collo, sostituendo i vari farmaci con “anticolinergici”

ed eliminando il termine “scialoadenosi”. La principale novità è però rappresentata dalla necessaria presenza del criterio istologico (IV) o sierologico (VI) per la definizione di SS, che supera una delle maggiori critiche nei confronti dei criteri europei.

Criteri classificativi
<p>1. Sintomi oculari – una risposta positiva ad almeno una delle seguenti domande:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ha una sensazione giornaliera e fastidiosa di secchezza oculare da oltre 3 mesi? - Ha una sensazione ricorrente di sabbia o ghiaia negli occhi? - Utilizza lacrime artificiali più di 3 volte al giorno?
<p>2. Sintomi orali - una risposta positiva ad almeno una delle seguenti domande:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ha una sensazione giornaliera di secchezza del cavo orale da oltre 3 mesi? - Ha avuto in età adulta episodi ricorrenti o persistenti di tumefazione delle ghiandole salivari? - Ha bisogno di bere frequentemente per deglutire meglio cibi secchi?
<p>3. Segni oculari – evidenza di coinvolgimento oculare definita come risultato positivo ad almeno uno dei seguenti esami:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Test di Schirmer I, eseguito senza anestesia (< 5mm in 5 min) - Test al rosa di bengala o altro colorante oculare (> 4 secondo il sistema di punteggio di van Bijsterveld)
<p>4. Istopatologia: scialoadenite focale linfocitaria su biopsia delle ghiandole salivari minori (eseguita su mucosa apparentemente normale), valutata da un patologo esperto, con un <i>focus score</i> > 1, definito come il numero di foci linfocitari (adiacenti ad acini mucosi di aspetto normale e contenenti più di 50 linfociti) per 4 mm² di tessuto ghiandolare</p>
<p>5. Coinvolgimento delle ghiandole salivari – evidenza di coinvolgimento delle ghiandole salivari documentata dalla positività di almeno uno dei seguenti test diagnostici:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Flusso salivare non stimolato (< 1,5 ml in 15 min) - Scialografia parotidea che mostra la presenza di scialectasie diffuse (pattern puntato, cavitario o distruttivo), senza evidenza di ostruzioni dei dotti principali - Scintigrafia salivaria che mostra ritardo dell'uptake, ridotta concentrazione e/o ridotta escrezione del tracciante
<p>6. Auto-anticorpi – presenza nel siero dei seguenti auto-anticorpi:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anticorpi rivolti verso gli antigeni Ro(SSA) e/o La(SSB)

Regole per la classificazione
<p><i>SS primaria:</i> In pazienti senza altra malattia potenzialmente associata, la SS primaria può essere definita nel modo seguente:</p> <p style="padding-left: 40px;">La presenza di 4 su 6 elementi è indicativa di SS primaria, a condizione che l'elemento IV (istopatologia) o l'elemento VI (sierologia) sia positivo</p> <p style="padding-left: 40px;">La presenza di 3 dei 4 criteri oggettivi (III, IV, V, VI)</p> <p style="padding-left: 40px;">La procedura di classificazione ad albero rappresenta una valida alternativa metodologica, sebbene ne sia preferibile l'uso in ambito clinico-epidemiologico</p>
<p><i>SS secondaria:</i> Nei pazienti con un'altra malattia potenzialmente associata (ad esempio, un'altra connettivite ben definita), la presenza dell'elemento I o dell'elemento II più altri due elementi tra III, IV e V può essere considerata indicativa di SS secondaria</p>
<p><i>Criteri di esclusione:</i> Pregresso trattamento radioterapico di testa e collo Infezione da HCV Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) Pregresso linfoma Sarcoidosi Graft-versus-host disease (GVHD) Uso di anticolinergici (da un tempo minore del quadruplo dell'emivita del farmaco)</p>

Tabella 4. *Criteri classificativi della Sindrome di Sjögren: American-European Consensus Group (AECG) (2002)*

Proprio questa differenza potrebbe rappresentare allo stesso tempo il punto forte e debole dei nuovi criteri. Sicuramente la necessità della positività del IV o VI criterio li rende più specifici: diversi studi hanno dimostrato che l'applicazione dei criteri europei e di quelli europeo-americani alla stessa coorte di pazienti con diagnosi di SS determina una differenza classificativa di circa un terzo dei pazienti, che soddisfano i primi ma non i secondi. Alcuni autori hanno osservato che diversi pazienti con biopsia e sierologia negative hanno in realtà un andamento clinico sovrapponibile a coloro che invece soddisfano i criteri europeo-americani, pertanto la loro applicazione escluderebbe questi soggetti da studi sperimentali. Altri autori hanno

inoltre affermato che i criteri IV e VI potrebbero non essere variabili indipendenti, aumentando quindi il rischio di escludere soggetti effettivamente affetti da SS. Inoltre un altro limite dei criteri AECG risiede nell'impiego di tecniche strumentali obsolete quali la scialografia e la scintigrafia. In tale contesto negli ultimi anni si è sviluppata una crescente attenzione nei confronti dell'indagine ecotomografica delle ghiandole salivari, al fine di comprendere se l'aggiunta di tale esame possa migliorare i criteri classificativi.

Nel 2012 l'*American College of Rheumatology* ha proposto una nuova serie di criteri classificativi (Tabella 5). Sebbene non siano ancora ampiamente utilizzati, diversi sono gli studi che li hanno posti a confronto con i criteri europeo-americani, fornendo risultati ancora piuttosto discordanti. Tali criteri differiscono fondamentalmente dai precedenti per tre caratteristiche: a) non includono la sintomatologia soggettiva oculare o orale né alcuna valutazione morfologica o funzionale per le ghiandole salivari; b) usano un nuovo score per valutare il coinvolgimento oculare; c) considerano l'associazione della positività ANA $1 \geq 320$ e Fattore reumatoide equivalente alla positività anti-SSA/SSB. L'assenza di criteri soggettivi di manifestazioni oculari e orali determina una esclusione di soggetti che lamentano xerostomia e xeroftalmia, anche in presenza di sierologia o istologia compatibili con la SS (sebbene gli autori specificano che i criteri si applicano a soggetti con sintomatologia suggestiva di SS, senza tuttavia specificare ulteriormente): questo potrebbe quindi avere possibili ripercussioni sulla sensibilità dei nuovi criteri. Vantaggiosa potrebbe invece essere l'introduzione della positività di ANA e del FR (contemporaneamente) come criterio: questa caratteristica renderebbe i criteri ACR più efficaci rispetto a quelli europeo-americani nel classificare i

pazienti con sierologia per anticorpi anti-Ro e anti-La negativa.¹⁶

<p>La classificazione di Sindrome di Sjögren, che si applica a soggetti con segni/sintomi che possono essere suggestivi di SS, sarà soddisfatta nei pazienti con almeno due delle seguenti tre caratteristiche:</p> <ul style="list-style-type: none">- Positività sierica per anti-Ro e/o anti-La o [positività di fattore reumatoide e ANA > 1:320]- Biopsia delle ghiandole salivari labiali che mostra scialoadenite* linfocitaria focale con <i>focus score</i> ≥ 1 focus / 4 mm²- Cheratocongiuntivite secca con <i>score</i> alla colorazione oculare ≥ 3 (in soggetto che non fa attualmente uso di colliri per glaucoma e non ha subito interventi chirurgici alla cornea o interventi estetici palpebrali negli ultimi 5 anni)**
<p>La precedente diagnosi di una qualunque delle seguenti condizioni determinerebbe l'esclusione in studi o trial terapeutici per la Sindrome di Sjögren a causa delle caratteristiche cliniche simili o di interferenze con i test inclusi nei criteri:</p> <ul style="list-style-type: none">- Storia di trattamento radioterapico di testa e collo- Infezione da HCV- Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS)- Sarcoidosi- Amiloidosi- Graft-versus-host disease (GVHD)- Malattia IgG4-correlata
<p>* Utilizzando le definizioni istopatologiche e metodi di valutazione del <i>focus score</i> descritto⁹². ** Utilizzando lo <i>score</i> per la colorazione oculare descritto⁹³.</p>

Tabella 5. Criteri classificativi della Sindrome di Sjögren: American College of Rheumatology (ACR) (2012)

Il riscontro di cheratocongiuntivite secca rappresenta uno dei principali elementi che identificano il paziente con SS. In presenza di una tale sintomatologia, o in generale nel sospetto di una SS, è essenziale oggettivare l'eventuale riduzione del flusso lacrimale, valutare le caratteristiche del film ed identificare le eventuali complicanze a carico dell'occhio. Il più utilizzato test è il test di Schirmer che si esegue inserendo una strisciolina di carta bibula nel fornice congiuntivale inferiore ad una distanza di circa 1/3 della lunghezza della rima palpebrale verso il canto esterno, si invita il paziente a chiudere gli occhi e dopo 5 minuti si misura la lunghezza della porzione di

carta impregnata di lacrime: il test è considerato positivo quando questa è ≤ 5 mm. Solo in una minoranza dei pazienti che lamentano xerostomia è possibile obiettivare una riduzione significativa del flusso salivare. L'esame più semplice per fare ciò è la scialometria, misurando il flusso salivare non stimolato: si pone il paziente con il capo esteso in avanti, si invita a deglutire e si attendono 15 minuti, trascorsi i quali il soggetto elimina la saliva accumulata in una fiala di massa nota, si pesa poi la fiala, calcolando per differenza la massa di saliva prodotta, da cui si ricava il volume. Il test è considerato positivo nel caso in cui il volume di saliva sia $\leq 1,5$ mL.

La molteplicità e le notevoli difficoltà diagnostiche delle diverse affezioni che colpiscono una struttura in esame rendono, spesso, necessaria l'integrazione delle diverse tecniche di imaging. La scialografia è stata la prima tecnica diagnostica ad essere stata introdotta; ad essa si sono aggiunti l'esame radiologico diretto, la teletermografia, la scintigrafia, l'ecografia, la tomografia computerizzata (TC) e più recentemente la risonanza magnetica (RM) e la RM-scialografia, ognuna delle quali ha ormai assunto un ruolo ben definito nell'iter diagnostico.

La scialografia consiste nell'iniezione di mezzo di contrasto (preferibilmente idrosolubile) per via retrograda attraverso il dotto ghiandolare principale, seguita dalla esecuzione di immagini radiografiche. Nei pazienti sani si evidenzia la struttura ad albero dei dotti salivari, mentre i pazienti con processi infiammatori mostrano alterazioni più o meno gravi della struttura della ghiandola, con formazione di lacune più o meno ampie e numerose, contenenti mezzo di contrasto più o meno ampie e numerose, conseguenza della distruzione del tessuto ghiandolare.

La funzionalità ghiandolare può essere misurata anche con metodiche medico-nucleari come la scintigrafia salivare: si inietta in una vena periferica del paziente

tecnezio pertecnetato che viene assorbito dalle ghiandole salivari e secreto con la saliva. Valutando l'attività residua nella saliva stessa è possibile stimare il flusso con buona accuratezza.

Tra le diverse metodiche di *imaging* impiegate per lo studio delle ghiandole salivari l'esame ultrasonografico (*SGUS, Salivary Gland Ultrasonography*) rappresenta, per la sua non invasività, l'ampia diffusione, l'ottima accettabilità da parte del paziente, nonché per il basso costo, la metodica di più frequente impiego e di più rapida e facile esecuzione. Essa consente la dettagliata valutazione morfologica delle ghiandole salivari maggiori ed è divenuta un'indagine elettiva, complementare all'esame clinico, nello studio sia della patologia infiammatoria che delle forme espansive, non solo per confermare la presenza ed il numero delle lesioni e la localizzazione topografica, ma anche, nella maggioranza dei casi, per definirne la natura. L'integrazione con il color power Doppler, l'analisi spettrale e l'impiego dei mezzi di contrasto (m.d.c.) ecografici permette di aggiungere utili informazioni a carattere funzionale all'immagine anatomica e di discriminare le diverse patologie, tracciando per ciascuna di esse un "pattern" vascolare dettagliato e completo. Le ghiandole salivari di maggior interesse ecografico sono le cosiddette «maggiori», ossia le parotidi, le sottomandibolari e le sottolinguali; le ghiandole «minori» non sono ben esplorabili ecograficamente. Come per tutti gli organi superficiali, lo studio delle ghiandole salivari va effettuato con sonde dotate di trasduttori ad alta frequenza (7.5 o 10 MHz). L'esame viene eseguito con paziente in decubito supino, con collo leggermente iperesteso e, per lo studio delle parotidi, con capo ruotato controlateralmente al lato in esame. Ecograficamente la parotide appare costituita da echi fini e disomogenei, di intensità superiore rispetto ai muscoli circostanti, tra cui

sono facilmente riconoscibili, specie nelle scansioni assiali, il massetere, lo sternocleidomastoideo ed il digastrico. L'ecostruttura della parotide è simile a quella della tiroide, rispetto alla quale, tuttavia, mostra maggior assorbimento acustico posteriore che rende difficoltosa la visualizzazione delle porzioni più profonde. Nonostante la sua delimitazione capsulare, agli ultrasuoni i margini ghiandolari non sono ben definiti, specie nell'anziano, in seguito alla progressiva sostituzione adiposa del parenchima ghiandolare. Occorre tener presente, inoltre, che la parotide presenta un processo anteriore (masseterino) e due processi posteriori, dei quali uno si estende tra la mastoide ed il muscolo sternocleidomastoideo e l'altro nello spazio retrofaringeo. Quest'ultima porzione non è esplorabile ecograficamente. Nel contesto della ghiandola parotidea possono essere apprezzati linfonodi sottocapsulari o intraparenchimali. Con sonde ad alta frequenza da 10-13 MHz è possibile visualizzare la porzione intraghiandolare del nervo faciale in circa il 30% dei soggetti, come una sottile stria iperecogena o con aspetto a «binario». Esso divide la ghiandola, da un punto di vista anatomico-chirurgico, in un lobo superficiale ed uno profondo. Le ghiandole sottomandibolari sono situate dietro il corpo della mandibola (porzione superficiale) e si estendono in profondità tra il muscolo miloioideo in basso e lateralmente, ed i muscoli ipoglosso e stilo ioideo medialmente (parte profonda). Presenta un'ecostruttura simile a quella della parotide, ma senza assorbimento acustico posteriore. Il dotto di Wharton ha un calibro maggiore del dotto di Stenone e sbocca in corrispondenza della papilla salivare sublinguale; a tale livello, in condizioni di normalità, il dotto di Wharton non è visualizzabile ecograficamente.

Le principali alterazioni eco strutturali evidenziabili all'ecografia sono rappresentate dalla disomogeneità parenchimale, per la presenza di aree ipoecogene di dimensioni

variabili, di multiple formazioni cistiche e calcificazioni, l'ecogenicità ridotta rispetto alle strutture circostanti, il volume ghiandolare che può essere aumentato o ridotto, l'irregolarità dei margini e la presenza di linfonodi peri o intraghiandolari. Le multiple bande iperecogene evidenziabili nelle fasi più tardive, possono essere espressione del grave sovvertimento parenchimale con sostituzione di tessuto fibroso connettivale. L'ecografia consente inoltre un'analisi semiquantitativa delle alterazioni strutturali, mediante l'impiego di metodi di "scoring" diversi. Esiste in realtà grande ed aperto dibattito su quale sia lo score più sensibile e specifico non raggiungendo al momento un accordo comune.^{18, 19, 20, 21, 22}(Tabella 6,7,8) Lo score proposto nel 1992 da De Vita¹⁹ et al. presenta un range 0-6, comprendendo la somma dei punteggi 0-3 per ogni paio di ghiandole. La sensibilità raggiunta per le parotidi è pari al 53,8% e la specificità è pari al 92,2%; per quanto riguarda le ghiandole sottomandibolari lo score ha una sensibilità analoga ed una specificità pari al 93,8%. Recentemente alcuni autori²⁰ facendo riferimento allo score sopra descritto hanno proposto un nuovo metodo di valutazione dell'ecostruttura di ogni ghiandola semplificandolo su una scala 0-4. Per ogni paziente viene ottenuto un grado per ogni ghiandola e il più alto grado scaturisce dalla somma dei 4 gradi. Il cut-off ottimale emerso è pari a 2 e si associa ad una specificità del 95%, ad una sensibilità del 62,8%, ad un valore predittivo positivo (PPV) pari al 92,5% ed infine ad un valore predittivo negativo (NPV) pari al 72,4%.

G. PAROTIDE moderata disomogeneità	Punteggio 1
G.PAROTIDE/SOTTOMANDIBOLARE evidente disomogeneità grossolana disomogeneità	Punteggio 2 Punteggio 3

Tabella 6. Grading ecografico nella sindrome di Sjogren De Vita S et al. *Clin Exp Rheumatol* 1992, 10 (54):351-6

GRADO 0	Ghiandola normale
GRADO 1	Contorni regolari, piccole aree ipoecogene, assenza di bande iperecogene, volume ghiandolare regolare o aumentato (valore medio 20± 3mm per le parotidi, 13±2 mm per le sottomandibolari) bordi ghiandolari posteriori ben definiti.
GRADO 2	Contorni regolari, evidenti aree ipoecogene di area ≤ 2mm, non uniformemente distribuite, assenza di bande iperecogene, volume ghiandolare regolare o aumentato, bordo posteriore ben definito.
GRADO 3	Contorni irregolari, multiple aree ipoecogene grandi o confluenti di area 2-6 mm, e/o cisti multiple, presenza di bande iperecogene, volume ghiandolare regolare o diminuito, bordo posteriore non visibile.
GRADO 4	Contorni irregolari, multiple aree ipoecogene grandi o confluenti di area > 6 mm, e/o cisti multiple o multiple calcificazioni, presenza di bande iperecogene, risultanti in severo danno dell'architettura ghiandolare, volume ghiandolare diminuito, bordo posteriore non visibile.

Tabella 7. Grading ecografico nella sindrome di Sjogren (Salaffi F et al. *J Rheumatol.* 2000; 27(5):1229-36)

GRADO 0	Ghiandola normale
GRADO 1	Piccole aree ipoecogene senza bande ecogene
GRADO 2	Multiple aree ipoecogene del diametro <2 mm con aree ipoecogene
GRADO 3	Multiple aree ipoecogene del diametro 2-6 mm con aree ipoecogene
GRADO 4	Multiple aree ipoecogene del diametro >6 mm con aree ipoecogene o multiple calcificazioni

Tabella 8. Grading ecografico nella sindrome di Sjogren (Cornec D et al. *Arthritis Rheumat.* 2013; 65 (1):216-25)

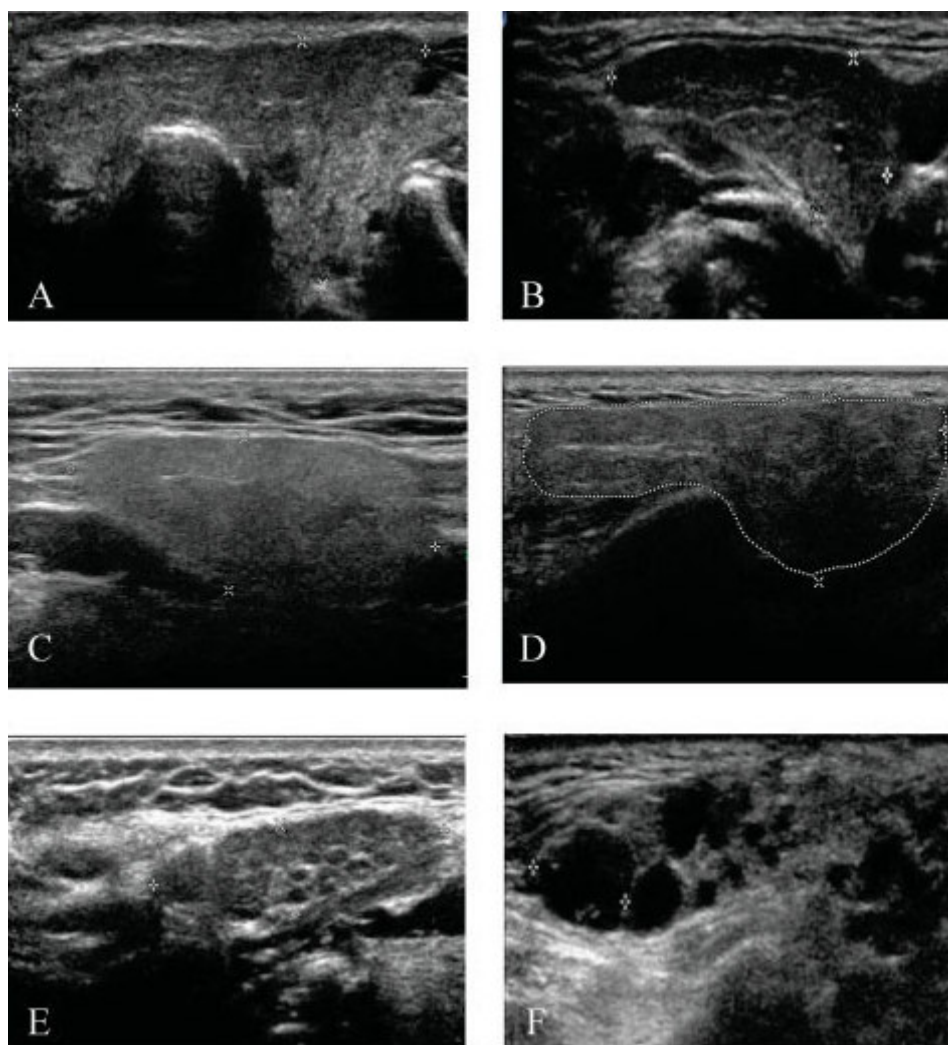


Figura 2. Immagini rappresentative della valutazione dell'ecostruttura ghiandolare. A. ghiandola parotide grado 0; B. ghiandola sottomandibolare grado 0; C. ghiandola sottomandibolare grado 1; D. ghiandola parotide grado 2; E. ghiandola sottomandibolare grado 3; F. ghiandola parotide grado 4.

Esaminando i criteri classificativi AECG 2002 e i criteri ACR 2012 è evidente il ruolo chiave occupato dall'indagine istologica. Il prelievo si esegue attraverso una piccola incisione sul versante mucoso del labbro ed il campione è considerato idoneo se contiene almeno quattro lobuli ghiandolari. La biopsia viene valutata contando il numero di *cluster* composti da almeno 50 linfociti, presenti ogni 4 mm² di tessuto: questo valore è detto *focus score* e perché la biopsia sia considerata positiva deve

essere almeno pari ad 1, ovvero un cluster ogni 4 mm², configurando una scialo adenite linfocitica focale. Lo spettro delle alterazioni istopatologiche osservate è molto ampio, comprendendo sia quadri più lievi che una ampia disorganizzazione della ghiandola in esame. Anche l'infiltrato infiammatorio varia comprendendo cellule T nelle lesioni meno gravi e cellule B nelle forme avanzate insieme ad un decremento dei macrofagi ed un aumento dei macrofagi. Gli infiltrati linfocitari possono organizzarsi a formare strutture linfoidi ectopiche del tutto simili ai centri germinativi (*GC Germinative Centre structures*). Diversi score istologici sono riportati in letteratura per descrivere l'infiltrato infiammatorio, al di là della presenza del caratteristico focus score. Il Chisholm and Mason score considera 4 quadri istologici: 0) architettura normale, 1e 2) infiltrato lieve e moderato, 3) presenza di 1 focus, 4) più di 1 focus per mm². Il Tarpley score sottolinea unicamente la presenza (grado 1-4) o l'assenza (grado 0) dei foci per mm²; gli score più elevati identificano le ghiandole con più foci e quindi quelle con maggiore disorganizzazione del tessuto ghiandolare. Recenti dati pubblicati in letteratura^{23,24} hanno dimostrato che differenti pattern istologici riflettono il diverso assetto citochinico e soprattutto differenti subsets clinici e l'integrazione tra le diverse metodiche può avere un fondamentale ruolo prognostico. In particolare i pazienti con il numero di foci infiammatori maggiore aveva anche il Chisholm and Mason score più alto; interessante inoltre da notare che la presenza del GC era correlato ad un elevato Chisholm and Mason score come anche ad un più elevato Tarpley score. Da un punto di vista clinico il riscontro del GC è stato correlato ad una maggiore frequenza di sviluppare manifestazioni extra-ghiandolari, all'ipergammaglobulinemia, ad elevati livelli circolanti di fattore reumatoide, e ad una elevata frequenza di rinvenire nel siero dei pazienti con SS

anticorpi anti-SSA e anti-SSB. La presenza di bassi livelli di C4, di crioglobulinemia, di leucopenia e di anti-LA/SSB sono notoriamente associati allo sviluppo di linfoma B.²⁶ ed alla stessa maniera anche la presenza di GC si inserisce in tale rischio.²⁵ Inoltre ulteriori dati a supporto emergono da un recente lavoro²⁴ in cui anche la presenza di un focus score elevato appare essere correlato non solo a tali variabili ma anche alla presenza di ipergammaglobulinemia, di componente monoclonale sierica e della doppia associazione ANTI-Ro/SSa e anti-La/SSB. Pertanto emerge il valore non solo diagnostico ma anche prognostico assunto dall'esame istologico capace di identificare quei pazienti che già alla diagnosi presentano delle caratteristiche cliniche-sierologiche ed istologiche predittive di una prognosi più grave.

Scaturisce in letteratura un vivace dibattito per comprendere quali siano le metodiche migliori per la valutazione del coinvolgimento delle ghiandole salivari in corso di SS, al fine poi di migliorare i criteri classificativi. In tale contesto diversi studi condotti negli anni hanno dimostrato il valore diagnostico dell'esame ecografico delle ghiandole salivari (*SGUS*), confrontandolo con altre metodiche di imaging e metodiche istologiche nell'ottica di inserirlo nei criteri classificativi.

Precedenti osservazioni¹⁸ hanno dimostrato il valore diagnostico dell'ecografia nello "screening" e nella valutazione prospettica dell'interessamento salivare in corso di SS. La comparazione della sensibilità e della specificità attuata mediante l'impiego delle curve operative caratteristiche (curve ROC) dello score ecografico (score semiquantitativo compreso fra 0 e 16) e del rilievo istologico su ghiandole salivari minori prelevate al labbro inferiore ha dimostrato l'accuratezza diagnostica di tale metodica di imaging. Al cutoff ottimale (optimal cutoff point), corrispondente ad uno score di 8, la sensibilità diagnostica dell'ecografia è risultata pari al 76,7 % e la

specificità pari al 83,3%. Nel confronto con il rilievo istologico (valutazione semiquantitativa mediante “focus score” e valutazione quantitativa sul volume percentuale delle cellule infiammatorie) non è emersa alcuna significativa differenza. A conferma della validità di tale metodo di “scoring” ecografico, l’analisi di regressione ha dimostrato una significativa correlazione dello “score ecografico totale”, sia con la percentuale volumetrica di cellule infiammatorie ($p = 0.02$) che con la percentuale volumetrica dei dotti ($p = 0.03$). Anche nella comparazione con la scialografia e la scintigrafia²⁷ e con un il cutoff ottimale (optimal cutoff point), corrispondente ad uno score di 6, la sensibilità diagnostica dell’ecografia è risultata pari al 75,3 % e la specificità pari al 83,5%, rappresentando pertanto un’ottima opzione diagnostica. Diversi altri scoring ecografici sono stati proposti, ottimizzando i valori di cut-off al fine di migliorarne la sensibilità e specificità non giungendo tuttavia ad una validazione ufficiale²⁸. Recentemente anche nel lavoro di Takagi et al²⁹ viene confermata l’utilità clinica delle ecografia delle ghiandole salivari per classificare i pazienti con SS; tali dati dimostrano che sostituendo uno dei tre items dei criteri classificativi ACR con l’esame ecografico viene comunque mantenuta la stessa sensibilità e specificità. La classificazione ACR ha l’intento di semplificare i criteri AECG, rispettandone l’accuratezza diagnostica; tuttavia qualora non sia possibile l’esecuzione della biopsia delle ghiandole salivari e non vengano soddisfatti i criteri ACR emerge una seria difficoltà medica e al paziente possono essere negati efficaci trattamenti. Un altro problema riguarda la classificazione di pazienti con malattia all’esordio: l’assenza di criteri soggettivi di manifestazioni oculari e orali determina una esclusione di soggetti che lamentano xerostomia e xeroftalmia, anche in presenza di sierologia o istologia compatibili con la SS. In tale

ottica gli autori pertanto propongono l'introduzione nei criteri ACR dell'ecografia delle ghiandole salivari quale metodo strumentale, non invasivo e poco costoso. Nel lavoro di Cornec et al ²⁰. è stato dimostrato peraltro che l'inserimento di tale metodica migliora la performance dei criteri classificativi AECG. Utilizzando un approccio del tutto simile a quello impiegato per la costruzione dei criteri ACR/EULAR 2010 per l'artrite reumatoide, gli autori infatti hanno costruito un nuovo score assegnando un coefficiente diverso ad ognuno dei 5 items considerati (flusso salivare, test di Shirmer, biopsia delle ghiandole salivari, valutazione degli anticorpi anti SSA/SSB, ecografia delle ghiandole salivari). Non vengono inseriti nel nuovo calcolo i test soggettivi perché tali valutazioni non permettono di differenziare i pazienti con SS da quelli con sindrome secca di altra natura. Ad un cut-off ottimale corrispondente ad uno punteggio di 5, il nuovo score mantiene la stessa sensibilità dei criteri AECG, perdendo però di specificità (sensibilità 85,7 % vs 77,9%; specificità 94,9% vs 98,7%). Successivamente gli autori hanno verificato se l'ecografia delle ghiandole salivari potesse sostituire efficacemente la biopsia delle ghiandole salivari nella pratica clinica, superando i classici limiti dell'esame bioptico, notando tuttavia una diminuzione della sensibilità dei criteri stessi. In effetti tra i 158 pazienti analizzati il 20,3 % avevano un risultato positivo alla biopsia, ma l'esame ecografico non evidenziava reperti patologici concludendo per un basso agreement tra le due metodiche. Sulla base di tali osservazioni gli autori propongono l'inserimento dell'esame ecografico tra i criteri AECG e l'esecuzione dell'esame bioptico solo in caso di esame ecografico negativo. Comunque pur considerando tutte le valutazioni fin'ora discusse numerosi altri passi dovrebbero essere compiuti prima di includere la metodica ecografica nei criteri classificativi per diverse

motivazioni.³⁰In primo luogo non esiste una concordanza tra gli items ecografici da valutare: la caratteristica più importante sembra essere la eterogeneità parenchimale delle ghiandole, ma è necessario considerare anche la grandezza della ghiandola, la presenza delle bande iperecogene, le calcificazioni intraghiandolari, la presenza di power doppler e le anomalie vascolari testimoniate dal color doppler. Inoltre va sempre ribadito che l'ecografia è comunque una metodica operatore-dipendente e al momento solo scarsi dati sono disponibili riguardo la riproducibilità dell'esame stesso. Infine la grande maggioranza degli studi pubblicati è effettuata su casistiche di pazienti con SS confrontati con popolazioni sane; non esistono dati di confronto con altre condizioni infiammatorie che possono colpire le ghiandole salivari e che devono essere poste in diagnosi differenziale ecografica con la SS. Sulla scorta di tali considerazioni nel 2012 è stata costituita una task force internazionale per validare l'esame ecografico con la metodica OMERACT.

Come per la maggior parte delle patologie autoimmunitarie, le indagini di laboratorio rivestono un ruolo fondamentale nell'iter diagnostico.

Nel caso di sospetta SS (considerata anche nell'ambito della diagnostica differenziale delle malattie autoimmunitarie), è fondamentale eseguire una serie di indagini volte all'identificazione del substrato infiammatorio ed autoimmunitario della condizione in esame: emocromo e formula leucocitaria, GOT/GPT, bilirubinemia, creatinemia, azotemia, sierologia per HCV, ANA, anti-ENA, FR, anti-CCP, VES, PCR, C3, C4, IgG, IgA, IgM, crioglobuline, elettroforesi delle sieroproteine (ed eventualmente immunofissazione serica per caratterizzare la componente monoclonale), esame delle urine e del sedimento rappresentano indagini già molto informative della condizione del paziente e che permettono di indirizzare il processo di diagnosi differenziale.

Questa lista rappresenta tuttavia solo una indicazione generale in quanto la scelta su eventuali indagini da riservare ad un approfondimento di secondo livello e su altre da eseguire in prima istanza dipende essenzialmente dalle caratteristiche cliniche del soggetto e dagli eventuali dubbi o sospetti diagnostici che il clinico ritiene opportuno indagare. Un aspetto interessante da sottolineare è che nei soggetti che risultano sieronegativi per gli anticorpi anti-Ro (in realtà sono due frazioni proteiche: Ro52 e Ro60, che vengono dosate indipendentemente ed hanno peraltro diversa sensibilità, maggiore per gli anti-Ro60) e anti-La, marker principali della SS, è di grande utilità riscontrare una positività ANA, magari associata ad altri segni di autoimmunità, come la presenza di FR o di ipergammaglobulinemia, che permettono, nell'ambito di una clinica compatibile – e magari anche di elementi istopatologici –, di porre comunque diagnosi di SS, difficilmente giustificabile in assenza di elementi indicativi di un processo autoimmunitario in atto.

PARTE II

Studio Sperimentale

1. Introduzione

Sulla base delle considerazioni sopra riportate ed in particolare riferimento al dibattito scientifico riguardante i criteri classificativi della SS scaturisce la volontà di comprendere quale contributo possano effettivamente fornire l'esame istologico e l'esame ultrasonografico delle ghiandole salivari nella diagnosi di SS primaria, esaminando quindi pazienti all'esordio di malattia.

2. Materiali e metodi

2.1. Popolazione studiata

Lo studio ha coinvolto 20 pazienti con SS primaria, classificata secondo i criteri

Europeo-Americani AECG 2002, afferenti alla SSD di Reumatologia dell'Università degli studi di Perugia dal 2013 al 2015.

2.2.Valutazione clinica e test laboratoristici

Al momento del reclutamento sono stati raccolti i seguenti dati clinici e sierologici e registrati utilizzando un database elettronico: dati anagrafici, anno della diagnosi, durata del follow-up, xerostomia, xeroftalmia, Test Shirmer, tumefazioni parotidiche, coinvolgimento extraghiandolare, manifestazioni ematologiche, articolari, porpora, fenomeno di Raynaud, impegno viscerale, fibrosi, ipocomplementemia, leucopenia, ipergammaglobulinemia, componente monoclonale, ANA; anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB.

L'attività di malattia è stata calcolata con l'ESSDAI ¹³

Inoltre ciascun paziente è stato sottoposto, previo consenso informato, al prelievo di 8 cc di sangue venoso periferico centrifugato a 2000 rpm per 5 minuti per estrarre il siero che veniva poi aliquotato e stoccato a -20°C fino ad utilizzo. E' stata quindi eseguita la determinazione degli anticorpi anti-nucleo, degli anti-SSA e degli anti-SSB, dell'emocromo, del fattore reumatoide, delle Ig plasmatiche, delle frazioni C3 e C4. Si procedeva a determinazione delle citochine su siero secondo la metodica CBA (CYTOKINE BEAD ARRAY), utilizzando il kit human TH1-TH2-TH17 che determina contemporaneamente le seguenti citochine: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF, IFN γ . I campioni sono stati quindi acquisiti con citofluorimetro FACScalibur ed analizzati con software FCAParray (Becton Dickinson).

2.3. Esame ultrasonografico delle ghiandole salivari

Lo stesso giorno della valutazione clinica e sierologica, ogni paziente è stato sottoposto all'esame ultrasonografico. Tutte le valutazioni ultrasonografiche sono state eseguite da un reumatologo esperto tramite Esaote Mylab provvisto di sonda lineare 7-10MHz.

Ogni paziente è stato posizionato in decubito supino, con collo leggermente iperesteso e, per lo studio delle parotidi, con capo ruotato controlateralmente al lato in esame. Le ghiandole parotidi sono state studiate sia sul piano coronale che assiale, le ghiandole sottomandibolari solo sul piano coronale. Sono valutati i seguenti parametri^{19,20}: omogeneità parenchimale, presenza e dimensione delle bande iperecogene, eventuali calcificazioni. In accordo agli score precedentemente descritti²⁰ secondo l'ecostruttura ghiandolare per ogni paziente sono stati ottenuti 4 gradi (1 grado per ogni ghiandola; score 0-4); il punteggio più alto è stato ottenuto sia come somma dei gradi delle 4 ghiandole sia come grado più alto tra le 4 ghiandole.²⁰

In accordo ai dati presenti in letteratura riportati da Cornec et al.²⁰ il più elevato punteggio calcolato corrisponde al miglior valore diagnostico e il cut-off di 2 si associa ad una sensibilità pari al 62,8 %, ad una specificità pari al 95% , ad un valore predittivo positivo pari al 92,5% e ad un valore predittivo negativo pari al 72,4%.

2.4. Valutazione bioptica

Contestualmente alle valutazioni sopra descritte ogni paziente, previa acquisizione del consenso informato scritto è stato sottoposto ad esame bioptico delle ghiandole salivari minori. Il campione biopistico è stato fissato con formaldeide, inclusi in

paraffina quindi sono state ricavate 2 sezioni consecutive di 3 μ m. Una sezione è stata colorata con ematossilina/eosina e valutate per determinare il focus score (numero di foci, ovvero aggregati di almeno 50 linfociti localizzati in sede periduttale e/o perivascolare in 4mm² di tessuto) e il Tarpley score.³¹ Lo score di Tarpley [voce bibliografica] è un punteggio da 0 a 5 che oltre a considerare il numero di foci considera anche l'entità del danno del tessuto circostante. La sezione consecutiva, processata per immunohistochimica standard, è stata utilizzata per determinare la presenza di centri germinativi (GC). In particolare, il campione veniva definito GC+ in relazione alla presenza del network di cellule dendritiche follicolari (FDC) positive per CD21 nel contesto dei foci linfocitari.

2.5. Analisi statistica

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata tramite il software IBM SPSS versione 21. Secondo necessità sono stati utilizzati i seguenti test: t Student per dati indipendenti, χ^2 , coefficiente di correlazione secondo Pearson, regressione logistica binaria. I valori di p a due code sono stati considerati significativi se $\leq 0,05$.

3. Risultati

Sono stati arruolati consecutivamente 20 pazienti secondo i criteri AECG 2002 per la SS primaria. Le caratteristiche della popolazione esaminata sono riassunte nella tabella 9. La valutazione ecografica (SGUS) delle ghiandole salivari maggiori in accordo agli score precedentemente descritti ha permesso di ottenere 4 gradi (1 grado per ogni ghiandola; score 0-4); il punteggio più alto è stato ottenuto sia come somma dei gradi delle 4 ghiandole sia come grado più alto tra le 4 ghiandole, rispettando il

cut-off di 2. I risultati sono semplificati nella tabella 10, 11, 12. In particolare rispettando il cut-off ottimale di 2, 13 pazienti su 20 (65%) avevano un esame ultrasonografico con score ≥ 2 .

CARATTERISTICHE	TOTALE n=20, n (%)
ETA' alla DIAGNOSI (<i>media\pmDS</i>)	55,7 \pm 2,87
DURATA di MALATTIA (<i>media\pmDS</i>)	1,85 \pm 0,19
ESSDAI (<i>mediana; min-max</i>)	1 (0-7)
SESSO F	20 (100)
XEROSTOMIA	18 (90)
XEROFTALMIA	15 (75)
TEST SHIRMER	14/19 (73,7)
TUMEFAZ.PAROTIDEA	2 (10)
COINV. EXTRAGHIANDOLARE	12 (60)
COINV. ARTICOLARE	7 (35)
PORPORA	2 (10)
FENOMENO DI RAYNAUD	3 (15)
FIBROMIALGIA	1 (5)
IPOCOMPLEMENTEMIA	0
LEUCOPENIA	1 (5)
IPERGAMMAGLOBULINEMIA	7 (35)
C.MONOCLONALE	2 (10)
ANA	18 (90)
anti-SSA	7 (35)
anti-SSB	1 (5)
nessun anticorpo	3 (15)
anti-SSA+ anti-SSB+	9 (45)
FR	11 (55)
CRIOGLOBULINE	1 (5)

Tabella 9. Caratteristiche della popolazione in studio

SGUS score 0-4	n= 20 (%)
0	7 (35)
1	1 (5)
2	4 (20)
3	2 (10)
4	6 (30)

Tabella 10. Risultati della valutazione ecografica delle ghiandole salivari maggiori (SGUS)

SGUS score	n= 20 (%)
0-1	7 (35)
2-4	13 (65)

Tabella 11. Risultati della valutazione ecografica (SGUS) al cut-off 2

SGUS score 0-16	n= 20 (%)
16	3 (15)
15	1 (5)
10	2 (10)
8	4 (20)
7	1 (5)
4	2 (10)
2	1 (5)
0	6 (30)

Tabella 12. Risultati della valutazione ecografica (SGUS) range 0-16

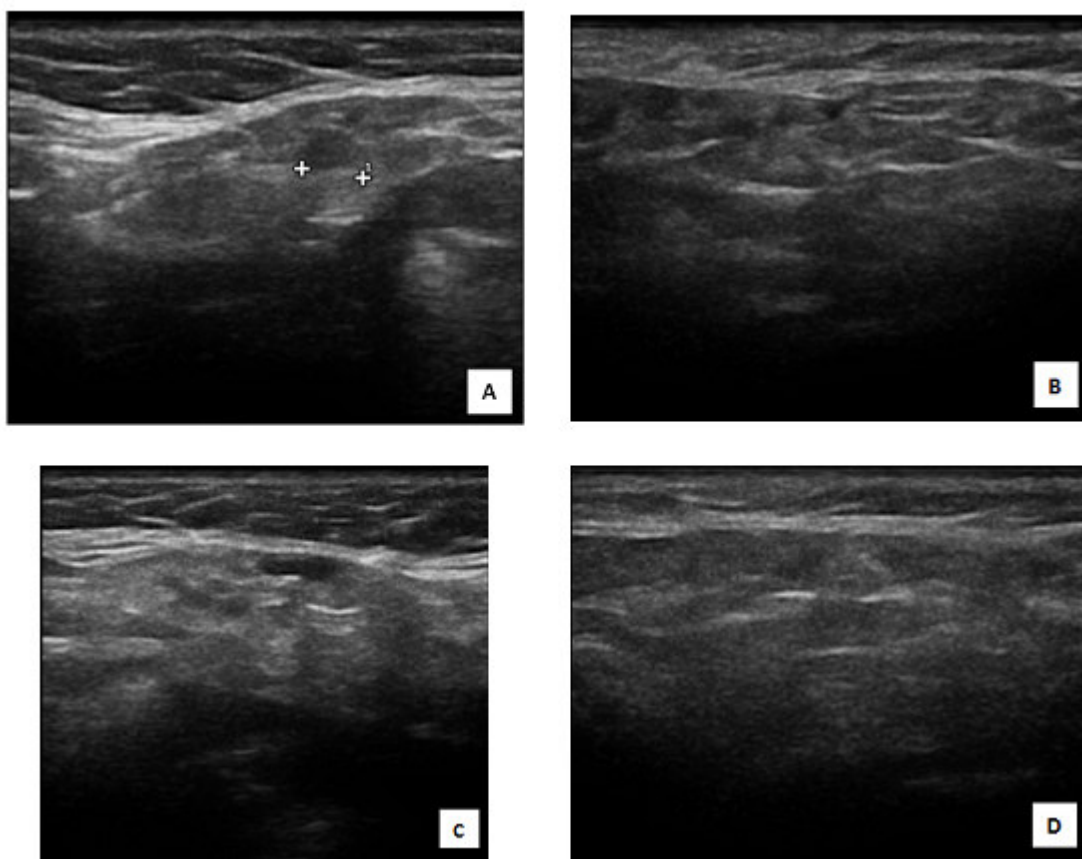


Figura 3. Immagini rappresentative della valutazione dell'ecostruttura ghiandolare. A. ghiandola sottomandibolare grado 3; B. ghiandola parotide grado 3; C. ghiandola sottomandibolare grado 2; D. ghiandola parotide grado 2.

La valutazione dei preparati istologici ha permesso di identificare la presenza del focus score ottenendo una mediana di 1,84 con un range compreso tra 0 e 15; il GC è stato riscontrato in 12 sezioni su 20, corrispondente al 60%. Infine in accordo allo score Tarpley sono stati evidenziati i risultati riportati nella tabella 13. Si segnala che una paziente che soddisfaceva i criteri clinici, strumentali e sierologica aveva una biopsia non diagnostica con focus score <1 e Tapley score=0.

TARPLEY SCORE	TOTALE n=20, n (%)
0	1 (5)
1	7 (35)
2	7 (35)
3	4 (20)
4	1 (5)

Tabella 13. Risultati della valutazione istologica secondo Tarpley score

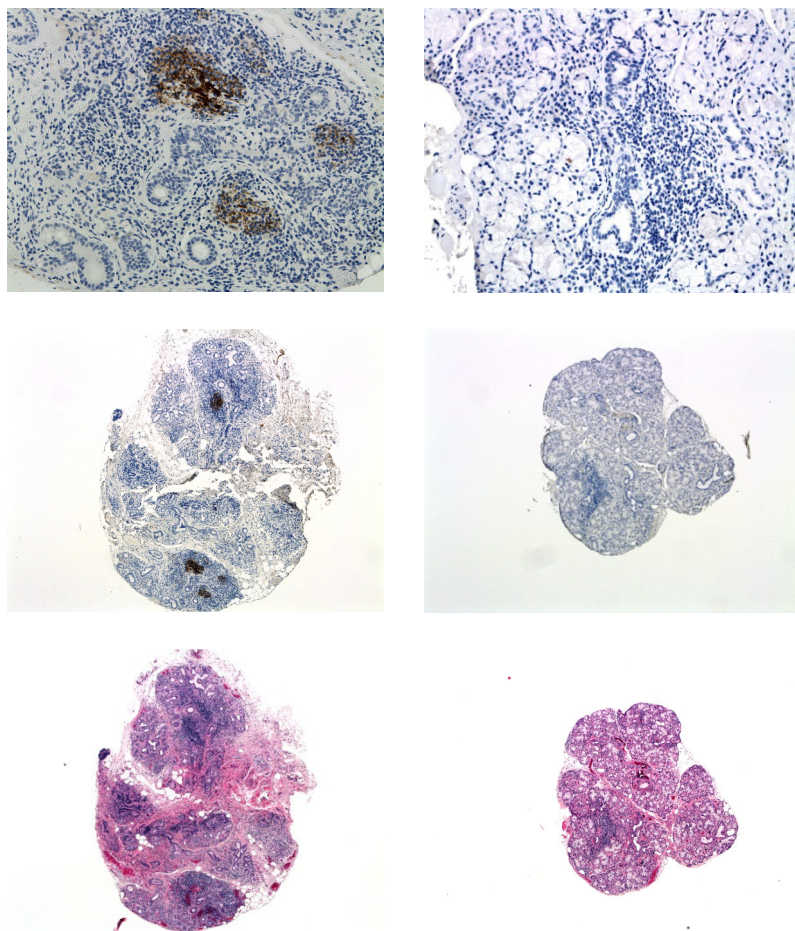


Figura 4. Preparati istologici di ghiandole salivari con ingrandimenti 4X in ematossilina eosina e immunohistochemica per CD21a 20X.

Al fine di comprendere se la differenza dell'ecostruttura ghiandolare potesse riflettere i diversi pattern istologici espressi in termini di focus score, Tarpley score e

presenza/assenza di GC, la popolazione in studio è stata suddivisa in due categorie in accordo al cut-off ecografico di 2 precedentemente esposto. Non è stata riscontrata una differenza significativa negli score istologici tra il gruppo con ecografia positiva (score 2-4) e il gruppo con ecografia negativa (score 0-1). Analizzando tali dati e rispettando il cut-off di 2 è emerso che 13 pazienti su 20 mostravano sia l'esame istologico (in termini di presenza di focus score >1) che l'esame ecografico positivo, 6 pazienti su 20 avevano invece soltanto l'esame biptico positivo (score ecografico pari a 0) e in 1 paziente vi era soltanto l'esame ecografico positivo. Inoltre, l'esame ecografico non era in grado di discriminare i pazienti con focus score più alto associato pertanto ad un danno ghiandolare maggiore. Stratificando la popolazione in base alla presenza/assenza del GC è stata riscontrata la presenza di tale struttura simil-linfoide in 12 preparati su 20 e 9 tra questi avevano anche l'esame ecografico positivo. Da notare che, seppur in un solo paziente, è stata riscontrata la biopsia positiva con elevato Tarpley score e presenza di GC, ma in assenza di alterazioni ultrasonografiche.

Analoga valutazione è stata effettuata in merito alle manifestazioni cliniche e alle caratteristiche sierologiche; anche in questo caso lo score ecografico non presenta una correlazione significativa con tali parametri.

Infine si procedeva a determinazione delle citochine su siero secondo la metodica CBA (CYTOKINE BEAD ARRAY), utilizzando il kit human TH1-TH2-TH17 che determina contemporaneamente le seguenti citochine: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17.

In linea con una precedente osservazione del nostro gruppo, pazienti con SS di recente insorgenza non presentano livelli determinabili di IL-17 nel siero ³¹In tale studio, peraltro, lo stesso dato è stato evidenziato anche per tutte le altre citochine ad

eccezione dell'IL-6.

4. Discussione

I criteri classificativi sono stati designati principalmente per scopi di ricerca ma spesso vengono utilizzati anche per fini diagnostici. Diversi criteri sono stati proposti negli ultimi decenni ma i più utilizzati sono sicuramente quelli AECG 2002 con una sensibilità pari all'89,5% e una specificità pari al 95,2%. Essi sono stati sviluppati in una coorte di pazienti in cui la diagnosi di SS era stata già posta, suggerendo quindi che il loro reale utilizzo possa essere solo come supporto nella pratica clinica. Il loro ruolo nella diagnosi di SS primaria all'esordio non è stato ben chiarito. In particolare la diagnosi risulta più complicata proprio in fase precoce quando le secrezioni orali e lacrimali possono essere ancora normali o in pazienti in cui la malattia è caratterizzata principalmente da manifestazioni extraghiandolari. Pertanto da tali considerazioni scaturisce la necessità di valutare eventuali altri strumenti diagnostici ed aggiungerli ai criteri attualmente in uso. Secondo i criteri AECG il coinvolgimento delle ghiandole salivari maggiori può essere valutato tramite il flusso salivare, la scintigrafia salivare, la scialografia. Tali metodiche hanno dei limiti legati alla scarsa riproducibilità, all'invasività, all'esposizione a sostanze radianti. In tale contesto sono state valutate procedure alternative, come ad esempio l'esame ultrasonografico delle ghiandole salivari maggiori (*SGUS*). Diversi dati riportati in letteratura hanno approfondito la reale utilità della *SGUS*. Tuttavia essi sono difficilmente confrontabili¹⁸⁻²² a causa dei differenti disegni, dei diversi criteri classificativi e dei diversi sistemi di score ecografico, mostrando pertanto dei valori differenti di sensibilità e specificità. In tale contesto è stata proposta l'introduzione

nei criteri AECG dell'ecografia delle ghiandole salivari quale metodo strumentale, non invasivo e poco costoso, migliorandone la performance.²⁰ Tuttavia non sarebbe corretto sostituire la valutazione bioptica con l'esame ultrasonografico in quanto la concordanza tra i due esami è bassa e ne scaturirebbe una perdita di sensibilità. Gli autori propongono quindi l'inserimento dell'esame ecografico tra i criteri AECG e l'esecuzione dell'esame bioptico solo in caso di esame ecografico negativo. In relazione alla valutazione istologica recenti dati pubblicati in letteratura^{23,24} hanno dimostrato che differenti pattern istologici riflettono il diverso assetto citochinico e soprattutto differenti subsets clinici e l'integrazione tra le diverse metodiche può avere un fondamentale ruolo prognostico. La presenza del GC è stata correlata ad un elevato Chisholm and Mason score come anche ad un più elevato Tarpley score. Da un punto di vista clinico il riscontro del GC è stato correlato ad una maggiore frequenza di sviluppare manifestazioni extra-ghiandolari, all'ipergammaglobulinemia, ad elevati livelli circolanti di fattore reumatoide, e ad una elevata frequenza di rinvenire nel siero dei pazienti con SS anticorpi anti-SSA e anti-SSB. Considerando la correlazione con lo sviluppo a lungo termine di linfoma è naturale sottolineare la importante valenza prognostica assunta dal riscontro di tali strutture²⁵ Inoltre ulteriori dati a supporto emergono da un recente lavoro²⁴ in cui anche la presenza di un focus score elevato appare essere correlato non solo a tali variabili ma anche alla presenza di ipergammaglobulinemia, di componente monoclonale sierica e della doppia associazione Anti-Ro/SSa e anti-La/SSB.

I dati emersi dal nostro studio, seppur provenienti da una casistica limitata e in assenza di una popolazione di controllo, hanno evidenziato che, rispettando il grading ecografico precedentemente esposto e al cut-off ottimale di 2²⁰, all'esordio

di malattia (durata di malattia anni, $media \pm ds = 1,85 \pm 0,19$) il 65% dei pazienti esaminati presentano già in fase precoce un coinvolgimento ghiandolare avanzato, testimoniato dalla presenza di uno score ecografico 2-4. Tuttavia non è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra la presenza delle alterazioni strutturali presenti all'esame ultrasonografico e i diversi pattern istologici espressi in termini di focus score, Tarpley score e presenza/assenza di centro germinativo. In termini descrittivi va comunque segnalato che analizzando tali dati e rispettando il cut-off di 2 è emerso che 13 pazienti su 20 mostravano sia l'esame istologico (in termini di presenza di focus score >1) che l'esame ecografico positivo, 6 pazienti su 20 avevano invece soltanto l'esame bioptico positivo (score ecografico pari a 0) e solo in 1 paziente vi era soltanto l'esame ecografico positivo. In relazione alla presenza/assenza del centro germinativo già in fase *early* di malattia è stata riscontrata la presenza di tale struttura simil linfoide in 12 preparati su 20 e 9 tra questi avevano anche l'esame ecografico positivo. A causa della scarsa numerosità e della mancanza di un gruppo di controllo non è possibile estrapolare dei dati di concordanza tra le due metodiche diagnostiche mediante i coefficienti statistici di comune utilizzo quali la k di Cohen. Scaturisce tuttavia l'osservazione che la presenza delle alterazioni istologiche non necessariamente trova una corrispondenza in termini ecografici; viceversa, ad eccezione di una paziente con esame bioptico negativo, tutti i pazienti con score ecografico ≥ 2 hanno un corrispettivo istologico positivo. Del resto tali dati, seppur preliminari, trovano concordanza anche con le più recenti evidenze riportate in letteratura, secondo cui può essere ragionevole introdurre l'esame ultrasonografico al posto delle ormai datate scintigrafia e scialografia^{18,21}, ma a causa di una bassa concordanza tra le due metodiche appare

ancora prematura l'idea di sostituire l'esame bioptico con l'esame ultrasonografico²⁰. Inoltre la presenza già all'esordio di malattia di GC rappresenta un dato molto importante: è noto che la presenza di focus score e Tarpley score elevato sono indici di danno ghiandolare maggiore ed unitamente alla formazione di GC già in fase precoce assumono un valore prognostico fondamentale. Tali pazienti avranno infatti un rischio più elevato di sviluppare manifestazioni extraghiandolari e linfomi.²³ Da notare che, seppur in un solo paziente, è stata riscontrata biopsia positiva con elevato Tarpley score e presenza di GC, ma in assenza di alterazioni ultrasonografiche. .

Anche in merito alle manifestazioni cliniche e alle caratteristiche sierologiche; lo score ecografico non presenta una correlazione significativa.

Infine la determinazione delle citochine su siero ha evidenziato che in fase early di malattia non è dosabile IL-17, cruciale nella patogenesi della SS ed espressa solo nelle fasi tardive.³¹ Come già precedentemente dimostrato tra le cellule T CD4⁺Th17, un piccolo subset di cellule T , mancanti della molecola di superficie CD4 e CD8 (DN double negative) è capace di produrre IL-17; è espanso nel siero di pazienti affetti da SS ed infiltra le ghiandole salivari maggiori. Il numero di tali cellule DN , produttrici di IL-17 è particolarmente incrementato solo in una fase tardiva di malattia, contrariamente alle cellule CD4⁺Th17. Pertanto anche nella nostra popolazione può essere confermata l'ipotesi secondo cui l'assenza di IL-17 dosabile nel siero di pazienti all'esordio di malattia potrebbe suggerire che siano proprio le cellule DN, piuttosto che le altre, a rendere conto dei livelli sierici incrementati.³²

L'unica citochina che risulta dosabile è invece IL-6 che, com'è ben noto, è una delle citochine responsabili della polarizzazione delle cellule T naive verso un fenotipo

Th17, pertanto la sua presenza nel siero dei pazienti con SS all'esordio è verosimilmente da imputarsi all'attiva differenziazione delle cellule Th17 che avviene in tale fase di malattia mentre l'assenza di IL-17 riflette il rapido reclutamento di tale cellule a livello ghiandolare dove rilasciano elevate quantità di tale citochina.³³

5. Conclusioni

Questo studio, considerando i limiti derivanti dalla scarsa numerosità e dall'assenza di una popolazione di controllo, conferma i dati presenti al momento in letteratura in merito alla necessità di rivedere ed unificare i metodi di scoring ecografico delle ghiandole salivari. Se è vero infatti che l'esame ultrasonografico è un metodo non invasivo, facilmente accessibile e poco costoso, dotato di buone capacità diagnostiche, per poter essere validato ed inserito nei criteri classificativi è necessario raggiungere un accordo internazionale in modo da poter confrontare i dati. Inoltre visti i dati emersi dagli studi e da noi confermati l'esame istologico non può essere sostituito dall'esame ultrasonografico perché in grado di fornire informazioni fondamentali in termini non solo diagnostici ma anche prognostici. Studi prospettici su ampie casistiche di pazienti non selezionati con sindrome sicca sia dovuta a SS che ad altre condizioni (gruppo di controllo) potranno determinare con precisione agreement e disagreement tra le metodiche e confrontare l'eventuale valore prognostico dell'ecografia con quello, già noto, della biopsia delle ghiandole salivari.

BIBLIOGRAFIA

1. Qin B, Wang J, Yang Z, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2014;
2. Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: what we know and what we should learn. *J Autoimmun* 2012;39(1-2):4–8.
3. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: a forty-year scientific journey. *J Autoimmun* 2014;51:1–9.
4. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34(4):400–7.
5. Mavragani CP, Nezos A, Moutsopoulos HM. New advances in the classification, pathogenesis and treatment of Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25(5):623–9.
6. Alunno A, Bistoni O, Bartoloni E, et al. IL-17-producing CD4-CD8- T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2013;72(2):286–92.
7. Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM, Pillemer S, Wahl SM. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol* 2009;175(3):1167–77.
8. Mariette X, Gottenberg J-E. Pathogenesis of Sjögren's syndrome and therapeutic consequences. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22(5):471–7.

9. Eloranta M-L, Alm GV, Rönnblom L. Disease mechanisms in rheumatology--tools and pathways: plasmacytoid dendritic cells and their role in autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2013;65(4):853–63.
10. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet* 2005;366(9482):321–31.
11. Bartoloni E, Baldini C, Schillaci G et al. Cardiovascular disease risk burden in primary Sjögren's syndrome: results of a population-based multicentre cohort study. *J Intern Med*. 2015 Jan 13
12. Vassiliou VA, Moysakis I, Boki KA, Moutsopoulos HM. Is the heart affected in primary Sjögren's syndrome? An echocardiographic study. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26(1):109–12.
13. Seror R, Bootsma H, Bowman SJ, et al. Outcome measures for primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2012;39(1-2):97–102.
14. Vitali C, Palombi G, Baldini C, et al. Sjögren's Syndrome Disease Damage Index and disease activity index: scoring systems for the assessment of disease damage and disease activity in Sjögren's syndrome, derived from an analysis of a cohort of Italian patients. *Arthritis Rheum* 2007;56(7):2223–31.
15. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61(6):554–8.
16. Baldini C, Talarico R, Tzioufas AG, Bombardieri S. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a critical review. *J Autoimmun* 2012;39(1-2):9–14.
17. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus

- approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(4):475–87.
18. Salaffi F, Argalia G, Carotti M, Giannini FB, Palombi C. Salivary gland ultrasonography in the evaluation of primary Sjögren's syndrome. Comparison with minor salivary gland biopsy. *J Rheumatol.* 2000; 27(5):1229-36
 19. De Vita S, Lorenzon G, Rossi G et al. Salivary gland echography in primary and secondary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1992, 10 (54):351-6
 20. Cornec D, Jousse-Joulin S, Pers JO et al. Contribution of salivary gland ultrasonography to the diagnosis of Sjögren's syndrome: toward new diagnostic criteria? *Arthritis Rheumat.* 2013 Jan; 65 (1):216-25
 21. Milic VD, Petrovic RR, Boricic IV et al. Diagnostic value of salivary gland ultrasonographic scoring system in primary Sjogren's syndrome: a comparison with scintigraphy and biopsy. *J Rheumatol* 2009 Jul; 36 (7); 1945-500
 22. Theander E et al. Diagnostic utility and prognostic value of parotid gland ultrasonography in primary sjögren's syndrome: the classical hypoechogenic pattern of parenchymal abnormality is highly specific, associated with higher disease activity and systemic disease. *Annals of rheum dis* 2012 S3:16,302.
 23. Carubbi F, Alunno A, Cipriani P et al. Is minor salivary gland biopsy more than a diagnostic tool in primary Sjögren's syndrome? Association between clinical, histopathological, and molecular features: a retrospective study. *Semin Arthritis Rheum.* 2014 Dec;44(3):314-24.
 24. Carubbi F, Alunno A, Cipriani P et al. A retrospective, multicenter study evaluating the prognostic value of minor salivary gland histology in a large cohort of patients with

- primary Sjögren's syndrome. *Lupus*. 2015 Mar;24(3):315-20.
25. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug;70(8):1363-8.
 26. Quartuccio L, Isola M, Baldini C et al. Biomarkers of lymphoma in Sjögren's syndrome and evaluation of the lymphoma risk in prelymphomatous conditions: results of a multicenter study. *J Autoimmun*. 2014 Jun;51:75-80.
 27. Salaffi F, Carotti M, Iagnocco A, et al. Ultrasonography of salivary glands in primary Sjögren's syndrome: a comparison with contrast sialography and scintigraphy. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Aug;47(8):1244-9.
 28. Jousse-Joulin S, Jonsson MV, Theander E et al. Is ultrasonography of salivary gland a validate tool in Sjogren Syndrome? Study 1: interobserver reliability. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 (Suppl 3):479
 29. Yukinori Takagi, Misa Sumi, Hideki Nakamura et al. Ultrasonography as an additional item in the American College of Rheumatology classification of Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2014;53:1977-1983
 30. Cornec D, Jousse-Joulin S, Saraux A et al. Salivary gland ultrasound to diagnose Sjögren's syndrome: a claim to standardize the procedure. *Rheumatology* 2015 Jan;54(1):199-200.
 31. Tarpley TM; Anderson LG, White CL. Minor salivary gland involvement in Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37:64-74.
 32. Alunno A, Bistoni O, Caterbi S et al. Serum interleukin-17 in primary Sjögren's syndrome: association with disease duration and parotid gland swelling. *Clin Exp*

Rheumatol. 2015 Jan-Feb;33(1):129.

33. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A et al. Rituximab modulates IL-17 expression in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jul;53(7):1313-20.)