

Forum interdisciplinare per la ricerca sulle malattie autoimmuni (F.I.R.M.A.)*

Proposta di linee guida per la determinazione di:

- I. ANTICORPI ANTI-NUCLEO (ANA) IN IMMUNOFLOURESCENZA INDIRETTA (IFI)
- II. AUTOANTICORPI ANTI-ANTIGENI NUCLEARI ESTRABILI (ENA)
- III. AUTOANTICORPI ANTI-DNA
- IV. AUTOANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI
- V. AUTOANTICORPI ANTI-CITOPLASMA DEI NEUTROFILI (ANCA)

Presentazione

Le malattie autoimmuni rappresentano un esempio di patologie che interessano differenti discipline della medicina. La loro diagnosi richiede sia la valutazione dei segni clinici sia l'esecuzione di test di laboratorio specifici. In alcuni casi la positività per determinati test di laboratorio costituisce elemento indispensabile per la diagnosi. La maggior parte delle malattie autoimmuni, sia organo sia non-organo specifiche, include infatti nei criteri classificativi la positività per determinati autoanticorpi. Paradigmatica al riguardo è la ricerca di autoanticorpi per la diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES), di malattia mista del tessuto connettivo (MCTD), di sclerodermia (SSc), di sindrome di Sjogren e di sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS). Inoltre, il corretto monitoraggio dell'attività di malattia è spesso legato alle modificazioni di alcuni parametri di laboratorio, dal momento che i segni clinici di per se non sono sempre specifici (ad esempio anticorpi anti ds-DNA, anti-C1q in corso di malattia lupica).

Nella pratica clinica questo si traduce nella necessità di avere a disposizione un ampio pannello di test di laboratorio specifici.

D'altra parte la prevalenza delle malattie autoimmuni sembra essere aumentata, più forse in seguito all'affinamento della nostra capacità diagnostica che per un reale aumento. In altre parole, un aumento sempre crescente di strutture sanitarie si trova nella necessità di disporre di questa batteria diagnostica.

L'industria è venuta incontro a questa esigenza offrendo un numero sempre crescente di kit diagnostici, anche in assenza di lavori solidi di standardizzazione. Inoltre, la richiesta crescente e la necessità di abbattere i costi hanno spinto all'automatizzazione degli esami di laboratorio. Questo processo, ben adattabile a molte indagini di laboratorio, mal si presta alla diagnostica dell'autoimmunità, almeno per il momento. Un ulteriore problema è rappresentato dal fatto che non è sempre possibile per tutte le strutture procurarsi standard di riferimento affidabili. Nel contempo l'evoluzione delle conoscenze tende a dilatare il numero ed il tipo dei test diagnostici necessari.

Non sorprende quindi come negli ultimi anni siano sorte associazioni o gruppi volti alla risoluzione di alcuni di questi problemi (Subcommittee for Standardization of Rheumatic Tests, IUIS; European APL Forum; International Cooperative Study on the Standardization of ANCA Assays). Si è costituito anche in Italia un gruppo di lavoro specifico: Il Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (F.I.R.M.A.). Il gruppo è struttura aperta ad ogni contributo ed ha nella interdisciplinarietà la sua caratteristica principale. Come riportato nello statuto, obiettivi principali del gruppo sono:

1. stimolare la collaborazione tra esperti appartenenti a varie discipline per la standardizzazione delle metodiche di laboratorio comunemente utilizzate per la determinazione di autoanticorpi utili alla diagnostica e al monitoraggio delle malattie reumatiche sistemiche del connettivo e delle vasculiti sistemiche

2. ricercare e/o validare nuove metodiche o nuovi markers sierologici di malattia

3. stabilire linee guida per la diagnostica clinica e di laboratorio nelle malattie sopra citate, per finalità scientifiche e di classificazione, da proporre come modelli alla comunità scientifica e alle Autorità Sanitarie.

Il primo atto del F.I.R.M.A. è stato quello di redigere una proposta di linee guida di base per l'esecuzione di un primo pannello di test per malattie autoimmuni. Lo scopo è di proporre una base solida comune su cui eventualmente verificare possibili cambiamenti e stratificare le evoluzioni legate alla ricerca biomedica. Questa proposta di linee guida è attualmente in pubblicazione sugli organi competenti delle diverse Società Scientifiche di appartenenza dei Redattori. Contemporaneamente alla proposta di linee guida, il F.I.R.M.A. ha iniziato uno studio per l'identificazione di sieri di riferimento nazionali per differenti autoanticorpi al fine di poterne costituire un pool disponibile per tutte quelle strutture aderenti al F.I.R.M.A. che ne faranno richiesta per la messa appunto delle proprie metodiche. Questa iniziativa si pone come un momento aggregante di Discipline e Specialisti diversi e come una iniziativa volta all'ottimizzazione delle prestazioni delle Strutture Sanitarie.

Indirizzo degli Autori:

Dott. R.A. Sinico
Unità Operativa di Nefrologia e Centro di Immunologia Clinica e Reumatologia
Azienda Ospedaliera Ospedale San Carlo Borromeo
Via Pio II, 3
20153 Milano
e-mail: renato.sinico@oscb.sined.net

I - Proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-nucleo (ANA) in immunofluorescenza indiretta (IFI)

The antinuclear antibody (ANA) test is important in the evaluation of patients with signs and symptoms of a connective tissue disease, in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) and in other clinical situations in which the ANA test is required to establish the diagnosis (i.e. autoimmune hepatitis).

At the moment, indirect immunofluorescence on Hep-2 cells remains the method of choice for the detection of ANA. The sensitivity of the Hep-2 ANA test for SLE is very high (almost 100%) but its specificity and positive predictive value low, since ANA can be present in a number of different clinical conditions and even in normal controls. The specificity of the test can be improved taking into account the antibody titre. Whereas low ANA titres can be detected in a significant percentage of apparently normal subjects, especially in the elderly, titres > 1/160 are found almost exclusively in connective tissue diseases. The serum titre, important from a diagnostic point of view, is not useful for monitoring

1. Indicazioni cliniche

La determinazione degli ANA è utile per la diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES) in accordo con i criteri classificativi dell'America College of Rheumatology (1,2). ANA sono stati descritti in altre malattie autoimmuni sistemiche (Sclerosi sistemica [SSc] (3), Sindrome di Sjogren [SS] (4), malattia mista del connettivo [MCTD] (5), polimiosite/dermatomiosite [PM/DM] e altre (6, 7). Il termine ANA indica un gruppo di anticorpi diretti verso differenti antigeni; la caratterizzazione dei singoli sistemi antigene/anticorpo ha permesso l'identificazione di marker specifici per le varie malattie autoimmuni sistemiche (7). La positività per ANA in IFI ha un diverso peso diagnostico per le differenti malattie autoimmuni sistemiche ed ANA possono essere riscontrati anche in patologie non autoimmuni (Tabella I & II) (7,8).

2. Test disponibili

L'immunofluorescenza indiretta (IFI) è il metodo di riferimento per la determinazione degli ANA.

Sono stati descritti altri metodi che impiegano miscele di antigeni nucleari estrattivi e/o ricombinanti da utilizzare con metodiche ELISA. Al di là della loro più facile esecuzione ed automatizzazione, questi metodi non offrono tuttavia, al momento, la garanzia di poter individuare tutte le specificità autoanticorpali possibili. I motivi alla base della loro sensibilità ridotta rispetto all'IFI sono essenzialmente legati a due ordini di fattori: a) la preparazione di antigeni nucleari – sia estrattivi sia ricombinanti – non permette sempre una completa riproducibilità delle molecole nella forma in cui esse sono presenti nei nuclei delle cellule e b) non tutti i sistemi antigene/anticorpo responsabili di una positività in IFI sono stati al momento identificati (6, 7, 9-13).

3. Requisiti richiesti

I requisiti necessari per l'esecuzione di una corretta determina-

zione degli ANA in IFI sono:

- L'utilizzo di linee cellulari in coltura continua come substrato (più comunemente utilizzate sono le cellule della linea epiteliale di carcinoma laringeo umano - HEp2 – American Type Culture Collection [ATCC] CCL [9, 11]). Le linee cellulari hanno, infatti, una maggiore ricchezza in materiale cromatinico rispetto alle cellule di tessuti differenziati (ad esempio sezioni di tessuto di roditore) e manifestano quindi una migliore sensibilità. L'utilizzo di linee cellulari consente l'espressione di antigeni presenti in tutte le fasi del ciclo cellulare e conseguentemente l'indicazione di specificità autoanticorpali non individuabili in sezioni di tessuto (anti-centromero, anti-fuso mitotico, anti-apparato mitotico, anti-apparato di Golgi, anti-centriolo etc.). L'utilizzo di una linea cellulare consente inoltre la determinazione di autoanticorpi specifici per antigeni nucleari specie-specifici (9-11).
- La fissazione dei substrati in acetone. Questo tipo di fissazione consente, infatti, di evitare l'eluizione di alcuni antigeni nucleari

TABELLA I - ANA POSSONO ESSERE RISCONTRATI IN MALATTIE NON AUTOIMMUNI

- Malattie infettive (ascessi cronici, tubercolosi, endocardite batterica subacuta, malaria, infezioni da virus di Epstein Bar etc.).
- In corso di neoplasie.
- In corso di terapie con farmaci noti per essere in grado di indurre questo tipo di autoanticorpi e non sempre associati con manifestazioni cliniche (procainamide, idralazina, isoniazide, clorpromazina, beta bloccanti etc.).
- Parenti apparentemente sani di pazienti con malattie autoimmuni sistemiche.
- L'incidenza di positività per ANA aumenta dopo i 40 anni. ANA a basso titolo sono rinvenuti in circa il 18% di soggetti normali con età > 65 anni, ma solo nel 4% della popolazione giovane (15).

TABELLA I - PESO DIAGNOSTICO/PROGNOSTICO DELLA POSITIVITÀ PER ANA (DA KAVANAUGH A ET AL. ARCH PATHOL LAB MED 124: 71; 2000).

Utili per la diagnosi		Talvolta utili per la diagnosi	
Malattia	% Positività	Malattia	% Positività
LES	95-100	SS	40-70
SSc	60-80	PM/DM	30-80
Utili per il monitoraggio o per la prognosi		Parte integrante per la diagnosi	
Malattia	% Positività	Malattia	% Positività
Artrite Reumatoide giovanile (uveite)	20-50	LES da farmaci	100
Fenomeno di Raynaud	20-60	Epatite Autoimm.	100
MCTD	100		
Non utili per la prognosi		Non utili per la diagnosi	
Malattia	% Positività	Malattia	% Positività
AR	30-50	Imp. Silicone	15-25
Scl. Multipla	25	Fibromialgia	15-25
Porpora trombotica autoimm.	10-30		
Parenti di paz. autoimmuni	5-25	M. Tiroide	30-50
M. Infettive	varia	LED	5-25
Neoplasie	varia		

in parte idrosolubili durante i processi di lavaggio dei substrati stessi (6-11).

- L'utilizzo di antisieri anti-Ig umani coniugati con FITC (ratio Fluorocromo/Proteina = 3; ratio Attività anticorpale specifica/Concentrazione proteica > 0.1). Sono usati sia antisieri anti-Ig umane polivalenti (reattivi con IgG, IgM ed IgA) sia antisieri specifici per IgG. In corso di LES, il 96% dei sieri presenta ANA di isotipo IgG (14). L'utilizzo di antisieri specifici per IgG evita l'individuazione di ANA di classe IgM frequentemente associati con l'Artrite Reumatoide, provocati dall'assunzione di farmaci e quelli riscontrabili in soggetti con età avanzata e di scarsa utilità clinica. Tuttavia, circa il 4% dei pazienti con malattie autoimmuni sistemiche possiede ANA di isotipo IgM (6).
- La disponibilità di un sistema ottico efficiente e possibilmente calibrato con standard fluorescenti. Per la lettura dei preparati si raccomanda l'uso di obiettivi con ingrandimento di almeno 400x.
- Modalità di refertazione: il risultato della ricerca di ANA va espresso come positività o negatività alla diluizione di screening utilizzata. Alcuni gruppi di lavoro suggeriscono che anche l'intensità dello staining debba essere segnalata nella risposta. Diluizioni di partenza < a 1/40 presentano una maggiore sensibilità ma una più bassa specificità, diluizioni > 1/160 una minore sensibilità ma una maggiore specificità (15). IL risultato può essere espresso come titolo, riportando l'ultima diluizione in cui il campione permane positivo (end point dilution). Tuttavia è raccomandazione generalmente accettata che la determinazione degli ANA abbia principalmente valore diagnostico ma che non sia altrettanto utile ai fini prognostici o di monitoraggio dell'attività di malattia. L'esito dell'indagine va riportato non solo in termini di positività o negatività ma anche in termini di pattern di reattività secondo la terminologia al momento standardizzata: omogeneo, periferico, nucleolare, punteggiato, anti-centromero). Va tuttavia sottolineato al riguardo che non vi è un'associazione stretta tra tipologia del pattern e specificità anticorpale, l'unica eccezio-

ne al riguardo è rappresentata dagli anti-centromero. Dal momento che l'utilizzo come substrato di linee cellulari permette anche l'identificazione di uno staining citoplasmatico ed in considerazione della localizzazione non solo nucleare ma anche citoplasmatica di alcuni antigeni, un'eventuale colorazione del citoplasma dovrebbe essere riportata nel referto.

- Ciascun laboratorio dovrebbe calcolare il proprio livello di ANA utilizzando sieri di soggetti sani della popolazione generale suddivisi per età (> o < 40 anni) e sesso (15).
- Ciascun laboratorio dovrebbe regolarmente includere un controllo positivo ed uno negativo e controllare il proprio metodo utilizzando i sieri di riferimento disponibili presso il CDC di Atlanta (AF-CDC ANA Reference Lab. Immunology Branch, CID, 1-1202 A25, Centers for Disease Control, Atlanta, GA 30333).

Riassunto

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA) sono importanti nella valutazione di pazienti con sintomi e segni suggestivi di una connettivite sistemica, nella diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES) e in altre situazioni cliniche in cui il test è richiesto per stabilire una diagnosi (per es. epatite autoimmune).

L'immunofluorescenza su cellule HEP-2 rimane, al momento, il metodo di scelta per la determinazione degli ANA. La sensibilità della metodica per una diagnosi di LES è assai elevata, vicino al 100%, ma la sua specificità e il suo valore predittivo positivo bassi, in quanto ANA possono essere presenti in numerose condizioni cliniche e anche in soggetti sani. La specificità del test può essere migliorata tenendo conto del titolo. Mentre titoli bassi sono presenti in un elevato numero di soggetti apparentemente sani, soprattutto con l'aumentare dell'età, titoli > 1/160 si ritrovano quasi esclusivamente nelle connettiviti. Il titolo, importante per la diagnosi di connettivite, non è invece utile per il monitoraggio della malattia.

Bibliografia

1. Tan EM, Cohen AS, Fries Jf et al. The 1982 revised criteria for the classification of SLE. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1272-7.
2. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
3. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and therapeutic criteria committee: preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
4. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 340-7.
5. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M, et al. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue diseases in patients with anti-RNP antibodies. *J Rheumatol* 1996; 23: 2055-62.
6. NCCLS: Quality assurance for the indirect immunofluorescence test for autoantibodies to nuclear antigen (IF-ANA); approved guideline. I/LA2-A, 1996; Vol. 16, No. 11: 1-15.
7. Kavanaugh A, Russel T, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and test for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71-81.
8. Vaile JH; Dike L, Kerani R, et al. Is high titre ANA specific for connective tissue disease? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 4: 433-8.
9. Feltkamp TEW, Janssen MB, Kalleberg CG. Antinuclear determination in daily practice. In: *Antibodies to nuclear antigens*, edited by Kalden JR, Feltkamp TEW. Excerpta Medica, Amsterdam 1982; 11-22.
10. Hollingsworth PN, Pummer SC, Dawkins RL. Antinuclear antibodies. In: *Autoantibodies*, edited by Peter JB & Shoenfeld Y. Elsevier Amsterdam 1996; 74-89.
11. Humbel RL. Detection of nuclear antibodies by immunofluorescence. In: *Manual of Biological Markers of Diseases*, edited by van Venrooij WJ, Maini RN. Kluwer AP Dordrecht 1993; A2: 1-16.
12. Emlen W, O'Neill L. Comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Arthritis Rheum* 1997; 9: 1612-8.
13. Bayer PM, Baurfeind S, Bienvenu J et al. Multicenter evaluation study on a new Hep2 ANA screening enzyme immune assay. *J Autoimmun* 1999; 13: 89-93.
14. Gonzales EN, Rothfield NF. Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1966; 271: 1333-8.
15. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 9: 1601-11.
16. Smolen JS, Butcher B, Fritzler MJ, et al. Reference sera for antinuclear antibodies. II Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and western blotting. *Arthritis Rheum* 1997; 3: 413-8.

II - Proposta di linee guida per la determinazione di autoanticorpi anti-ena

The detection of antibodies to extractable nuclear antigens (ENA) is useful for the diagnosis of autoimmune connective tissue diseases (CTD), in the presence of anti-nuclear antibodies (ANA) positivity, with different sensitivity and specificity according to the various autoantibodies. However, since anti-ENA antibodies can be rarely positive in the absence of ANA, their search can be justified even when ANA test is negative if the clinical suspicion of a CTD is high. In the clinical practice it is sufficient to detect the six autoantibodies of diagnostic usefulness (anti-SSA/Ro, anti-La/SS-B, anti-Sm, anti-U1RNP, anti-Scl-70 and anti-Jo-1). Anti-ENA can be detected with several different methods, none of them ideal. Therefore, it is useful to combine more than one technique, in particular when anti-ENA are negative in the presence of a strong clinical suspicion, or when the laboratory has to rely on a weak positivity obtained with a very sensitive method such as ELISA. The serum titre of anti-ENA antibodies does not add useful information with the exception of anti-U1RNP antibodies for the diagnosis of mixed connective tissue disease where a high titre of the antibody represents a diagnostic criteria.

1. Indicazioni cliniche

La determinazione degli anticorpi anti-nucleo (ANA) in immunofluorescenza indiretta (IFI) costituisce il test di primo livello per la diagnosi di Laboratorio delle malattie reumatiche autoimmuni. In presenza di un risultato ANA-IFI positivo, un maggiore potere diagnostico e prognostico è ottenibile con la caratterizzazione delle specificità anticorpali dirette contro i diversi antigeni nucleari. La determinazione di anticorpi diretti verso i cosiddetti antigeni nucleari estraibili (ENA) è utile per la diagnosi di LES, di lupus neonatale, di sindrome di Sjögren (SS), di malattia mista del tessuto connettivo (MCTD), di polimiosite/dermatomiosite (PM/DM) e di sclerosi sistemica (SSc), con caratteristiche di sensibilità e specificità variabili (Tabelle I e II). Poiché, tuttavia, in circa l'1% dei pazienti affetti da malattie reumatiche, in particolare SS e DM/PM, il test ANA-IFI può risultare negativo (1) pur in presenza di anticorpi anti-ENA, un consistente sospetto clinico per queste particolari malattie dovrebbe giustificare comunque un'indagine di approfondimento per autoanticorpi anti-ENA (2-4).

2. Requisiti richiesti

Il requisito per una corretta determinazione di anti-ENA richiede l'utilizzo di sieri di riferimento sia positivi che negativi per la messa a punto delle metodiche (5) e, per quanto riguarda le metodiche immunoenzimatiche, la costruzione di un proprio cut-off con sieri di pazienti normali suddivisi per età (> o < 40 anni) e sesso.

La varietà di autoantigeni riconosciuti dagli autoanticorpi anti-nucleo è estremamente ampia. Nell'ottica di un corretto rapporto costo-beneficio, non è ragionevole tentare in tutti i casi l'individuazione dell'autoanticorpo specifico, ma limitare la ricerca ai 6 autoanticorpi che rivestono importanza diagnostica certa o che vengono utilizzati come criterio di classificazione. Attualmente gli autoanticorpi con queste caratteristiche sono anti-SSA/Ro, anti-La/SS-B, anti-Sm, anti-U1RNP, anti-Scl-70 e anti-Jo-1.

3. Test disponibili

Gli anticorpi anti-ENA nel siero possono essere messi in evidenza con diverse tecniche correntemente utilizzate in laboratorio: immunodiffusione doppia (IDD), contro-immunolettroforesi (CIE), immunoenzimatica (ELISA), immuno line-blot (IB), immunodot (DB) e Westernblot (WB).

La strategia nella scelta delle tecniche e nella sequenza di utilizzo dipendono da situazioni cliniche, dalle caratteristiche del metodo, dal costo dei reagenti, dai tempi di risposta, dall'organizzazione e dall'esperienza del laboratorio. Il metodo ideale dovrebbe rispondere a criteri di sensibilità e specificità clinica, precisione ed accura-

TABELLA I - PRINCIPALI SPECIFICITÀ AUTOANTICORPALI ANTI-ENA

- Anti-Sm: altamente specifici per LES; la sensibilità clinica varia dal 15 al 30%. Titoli elevati hanno maggior significato diagnostico.
- Anti-U1RNP: non specifici. Presenti nel 30-40% dei pazienti con LES; ad alto titolo costituiscono criterio diagnostico irrinunciabile per la diagnosi di MCTD.
- Anti-SSA/Ro: non specifici. Nei pazienti con SS sono presenti fino al 60% se testati con immunodiffusione e fino al 90% se testati con ELISA; si associano più frequentemente a interessamento extraghiandolare. Possono inoltre essere presenti in circa il 30% dei pazienti con LES. Alti titoli in ELISA, soprattutto per anti-Ro 52, sono un fattore di rischio per lupus neonatale.
- Anti-SSB/La: non specifici. Sia nei pazienti con SS che in quelli con LES sono presenti con frequenza inferiore rispetto agli anticorpi anti-SSA/Ro. Si associano ad una maggior incidenza di forme cutanee, vasculite, leucopenia e linfopenia, e a lupus neonatale.
- Anti-centromero: associati a SSc limitata. Sensibilità del 32% in tutti i pazienti con SSc, 57% in SSc limitata; specificità elevata.
- Anti-topoisomerasi I (Scl70): associati a SSc diffusa. Sensibilità clinica variabile, a seconda del metodo, dal 35 al 70%; sensibilità analitica 94-99%. Specificità clinica elevata; specificità analitica variabile dal 70 al 99%, a seconda del metodo.
- Anti-Jo-1: specifici per PM/DM. Sensibilità dal 8 al 40%. Associati ad interstiziopatia polmonare e artrite.

tezza, facilità di esecuzione, limitato impiego di tecnologia, facile reperibilità e costo contenuto; allo stato attuale non esiste metodo in grado da solo di rispondere a tutti questi requisiti. Infatti IDD e CIE, benché dotati di assoluta specificità, non risultano adeguati ad applicazioni routinarie estese, risentono in larga misura dalle modalità di preparazione e di esecuzione, hanno una sensibilità soddisfacente solo nei confronti di alcuni ENA (anti-Ro/SSA) (6,7) e sono metodi qualitativi. Nonostante queste considerazioni, va ricordato che la maggior parte delle correlazioni clinico-sierologiche attualmente accettate si riferiscono a studi condotti con queste metodiche.

ELISA o altri metodi immunometrici presentano un'ottima sensibilità (8) e sono metodi quantitativi. La loro specificità è variabile e legata al tipo di antigene usato sulla fase solida e alla tecnica usata per la sua purificazione; è inoltre necessario eseguire un test per ciascun antigene da indagare (8).

TABELLA II - ULTERIORI SPECIFICITÀ ANTICORPALI (ANTICORPI PRESENTI CON FREQUENZA RIDOTTA O DI SIGNIFICATO INCERTO)

- Anti-PM-Scl: si associa a SSc con miopatia.
- Anti-U3-RNP (fibrillarina): è presente nel 4-8% dei pazienti con SSc.
- Anti-RNA polimerasi I: è più frequente nelle forme progressive di SSc.
- Anti-polimerasi III: comune nella SSc.
- Anti-ThTo: si associa a SSc con coinvolgimento cutaneo limitato.
- Anti-proteina P ribosomiale: si associa a LES e, in particolare con maggior frequenza, alle forme con manifestazioni psicotiche.
- Anti-PCNA: si associa a LES in fase attiva.

IB è un metodo qualitativo, dotato di buona sensibilità e specificità, ma fornisce informazioni limitate agli antigeni selezionati e le proteine utilizzate come antigeni possono risultare modificate nella loro conformazione dalle procedure di SDS-PAGE (9). DB, di recente commercializzazione, è un metodo qualitativo, che utilizza proteine native e risulta di facile esecuzione e interpretazione; tuttavia presenta il limite di offrire un pannello ENA limitato (10).

WB è un metodo qualitativo, fornisce un pattern completo degli anti-ENA e, in particolare, degli autoanticorpi rivolti verso antigeni rari, offre la possibilità di evidenziare anticorpi rivolti verso diversi epitopi di uno stesso antigene, ma presenta le stesse limitazioni tecniche dell'IB (10) oltre a risultare spesso di difficile interpretazione. Recenti esperienze di verifica esterna di qualità (11-14) hanno inoltre evidenziato una significativa variabilità tra i diversi metodi impiegati nei laboratori clinici.

Pertanto, considerata l'attuale affidabilità analitica dei metodi, un corretto iter diagnostico per la ricerca degli anticorpi anti-ENA non può che avvalersi di più approcci metodologici; in particolare, nel caso di un risultato negativo e in presenza di un forte sospetto clinico o in caso di debole positività con metodiche altamente sensibili come l'ELISA, è consigliato l'impiego di 2 metodi, specificando

chiaramente nella refertazione la metodica impiegata e il risultato ottenuto con ciascun metodo.

In tutte le malattie reumatiche la rilevazione della concentrazione degli autoanticorpi anti-ENA non fornisce informazioni aggiuntive per lo studio del decorso e della prognosi della malattia e dell'efficacia della terapia. Il ricorso a determinazioni quantitative non è pertanto indispensabile, con l'unica eccezione della MCTD, nella quale un alto titolo degli autoanticorpi anti-U1RNP rappresenta il principale criterio diagnostico (15). In questo caso, tuttavia, anche una positività per anti-U1RNP in due diverse determinazioni qualitative, associata a positività per ANA con pattern speckled a titolo >1:640, può risultare sufficiente per la diagnosi.

Riassunto

La determinazione di anticorpi diretti verso i cosiddetti antigeni nucleari estraibili (ENA) è utile per la diagnosi delle connettiviti autoimmuni sistemiche, in presenza di positività degli anticorpi anti-nucleo (ANA), con caratteristiche di sensibilità e specificità variabili. Poiché tuttavia, raramente, il test ANA-IFI può risultare negativo pur in presenza di anticorpi anti-ENA, un consistente sospetto clinico può giustificare la loro ricerca anche in caso di negatività degli ANA. La varietà di autoantigeni riconosciuti dagli ANA è estremamente ampia ed è perciò opportuno limitare la ricerca ai 6 autoanticorpi che rivestono importanza diagnostica certa o che vengono utilizzati come criterio di classificazione (anti-SSA/Ro, anti-La/SS-B, anti-Sm, anti-U1RNP, anti-Scl-70 e anti-Jo-1). Gli anticorpi anti-ENA possono essere evidenziati con diverse tecniche, nessuna delle quali ideale. Pertanto, considerata l'attuale affidabilità analitica dei metodi, un corretto iter diagnostico non può che avvalersi di più approcci metodologici; in particolare, nel caso di un risultato negativo e in presenza di un forte sospetto clinico o in caso di debole positività con metodiche altamente sensibili come l'ELISA, è consigliato l'impiego di 2 metodi. La concentrazione serica degli anti-ENA non fornisce informazioni aggiuntive. Il ricorso a determinazioni quantitative non è pertanto indispensabile, con l'unica eccezione della connettivite mista, nella quale un alto titolo degli autoanticorpi anti-U1RNP rappresenta il principale criterio diagnostico.

Bibliografia

1. Bylund DJ, Nakamura RM. Importance of detection of SS-A/Ro autoantibody screening immunofluorescence tests for autoantibodies to nuclear antigens. *J Clin Lab Anal* 1991; 5: 212-17.
2. Vaile JH, Dike L, Kerani R, et al. Is high titre ANA specific for connective tissue disease? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 4: 433-8.
3. Menard H.A. Antinuclear antibodies: the medium is the message. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 4: 429-30.
4. LeMing H, Nakamura RM. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997; 34: 275-311.
5. Smolen JS, Butcher B, Fritzler MJ, et al. Reference sera for antinuclear antibodies. II Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and western blotting. *Arthritis Rheum* 1997; 3: 413-8.
6. Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, et al. Detection of anti-Ro(SS-A) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 449-55.
7. Reichlin M, Scofield H. SS-A (Ro) autoantibodies. In: *Autoantibodies*, edited by Peter JB & Shoenfeld Y. Elsevier Amsterdam 1996; pp. 783-88.
8. van Venrooij WJ. Autoantigens in connective tissue disease. In: *Immunology of the connective tissue diseases*, edited by Panayi GS. Dordrecht Kluwer 1994; 305-34.
9. Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods* 1991; 119: 153-87.
10. Boire G, Lopez Longo FJ, Lapointe S, et al. Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kD Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 722-30.
11. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, et al. Sensitivity and specificity of immunological methods for the detection of anti-topoisomerase I (Scl70) autoantibodies: Results of a multicenter study. *Clin Chem* 2000; 46: 1681-5.
12. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN, et al. The consensus workshop for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods* 1991; 140: 181-89.
13. Charles PJ, van Venrooij WJ, Maini RN, et al. The Consensus Workshop for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 507-11.
14. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E et al. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J Immunol Methods* 1998; 219: 99-107.
15. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, et al. Variabilità analitica nella determinazione degli autoanticorpi anti-ENA. Risultati preliminari di un'esperienza di VEQ. *Med Lab* 1998; 2: 161-5.
16. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M, et al. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue diseases in patients with anti-RNP antibodies. *J Rheumatol* 1996; 23: 2055-62.

III - Proposta di linee guida per la determinazione di autoanticorpi anti-DNA

Antibodies to dsDNA (native) are highly specific for Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and present in a high proportion (40-80%) of SLE patients. Their measurement is therefore indicated in case of clinical suspicion of SLE (especially when anti-nuclear antibody (ANA) test is positive). The methods more commonly used for anti-dsDNA detection are Farr assay, indirect immunofluorescence (IIF) on Crithidia luciliae and ELISA. The method of choice for diagnosis of SLE is the Farr assay; however, the necessity of using radioactive material decreases its applicability. As an alternative, IIF on Crithidia luciliae can be used. On the contrary, it is not advisable to use ELISA in the diagnostic phase. The quantitative determination of anti-dsDNA is useful for monitoring patients, in particular in the presence of nephritis. Therefore, for monitoring, a quantitative method should be used (Farr assay or ELISA) and the results expressed as UI/mL.

1. Indicazioni cliniche

L'esistenza di autoanticorpi anti-DNA in pazienti con LES è nota fin dagli anni cinquanta. Ben presto è risultato evidente che la molecola di DNA presentava numerosi epitopi e di conseguenza gli anticorpi anti-DNA comprendevano un gruppo eterogeneo di immunoglobuline con differenti specificità.

Gli anticorpi identificati più comunemente sono quelli diretti verso il DNA a singola elica (ssDNA), i cui determinanti antigenici sembrano essere localizzati nelle sequenze basiche puriniche e pirimidiniche; gli anticorpi rivolti verso il DNA nativo a doppia elica (dsDNA), riconoscono invece epitopi localizzati lungo lo scheletro deossiribosio-fosfato (1).

A fronte di una notevole aspecificità degli anticorpi anti-ssDNA, gli anticorpi anti-dsDNA sono risultati altamente specifici per il LES e presenti nei soggetti affetti con prevalenza variabile tra 40 e 80%, così da costituire il 10° criterio classificativo di LES, secondo l'American College of Rheumatology (ACR) (2).

Peraltro, la presenza di anticorpi anti-dsDNA in un paziente asintomatico è suggestiva di un LES subclinico, essendo negativa la ricerca di tali anticorpi nel LES indotto da farmaci ed essendo positiva in meno del 2% dei casi in altre patologie autoimmuni (3).

Gli autoanticorpi anti-dsDNA e anti-cromatina sono i principali responsabili del quadro fluoroscopico nucleare di tipo omogeneo/periferico, ma alle volte possono associarsi ad un quadro di tipo speckled o anche citoplasmatico, probabilmente legato ad anticorpi anti-DNA cross-reagenti con RNA.

- La ricerca degli autoanticorpi anti-dsDNA è consigliata solo in caso di sospetto clinico di LES e in caso di positività degli ANA in IFI. Benché sia rara la presenza degli anti-dsDNA in caso di ANA negatività, si consiglia comunque la determinazione degli autoanticorpi anti ds-DNA qualora sussista un forte sospetto diagnostico di LES -

2. Test disponibili

L'utilità diagnostica e prognostica del dosaggio degli autoanticorpi anti-dsDNA ha portato allo sviluppo di numerose tecniche per la loro quantificazione. Tra queste le più comunemente usate sono le tecniche di radiobinding (tra cui la tecnica originale di Farr) (4), l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su Crithidia luciliae (5) e l'ELISA (6).

La tecnica di Farr rileva prevalentemente autoanticorpi anti-dsDNA ad alta avidità, presenta maggiore specificità nella diagnostica del LES e maggiore utilità nel monitoraggio del decorso clinico della malattia lupica.

L'IFI su Crithidia luciliae è una metodica altamente specifica, ha una discreta sensibilità, una relativa precisione, evidenzia anticorpi ad alta e intermedia avidità, permette l'individuazione delle varie classi autoanticorpali e la loro capacità di fissare il complemento, ma non consente una determinazione quantitativa accurata.

Le tecniche ELISA sono automatizzabili, possono evidenziare le diverse classi immunoglobuliniche, sono quantitative e generalmen-

te sensibili, ma hanno una minore specificità rispetto alle metodiche precedentemente descritte; possono rilevare anticorpi a bassa avidità di incerto valore clinico e il dosaggio può essere inficiato da legami aspecifici.

Per la diagnosi di LES la tecnica di Farr rappresenta il metodo di elezione; tuttavia la necessità di processare e misurare materiale radiomarcato ne limita l'applicazione. Un'alternativa è rappresentata dalla tecnica IFI, la quale, pur essendo generalmente meno sensibile è dotata di elevata specificità (7).

- In fase diagnostica, per la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA, si consiglia il metodo radioimmunologico (tecnica di Farr) per la sua elevata specificità. In alternativa è consigliata la ricerca in IFI su Crithidia luciliae alla diluizione iniziale del siero di 1:10. In fase diagnostica di LES non è consigliato l'utilizzo del metodo ELISA -

La determinazione quantitativa degli anticorpi anti-dsDNA rientra tra i parametri oggetto di monitoraggio nel follow up della malattia lupica. Numerosi studi hanno documentato una stretta relazione tra titolo anticorpale e attività della malattia, in modo particolare nella nefropatia lupica (8,9); un aumento del titolo anticorpale può precedere di qualche settimana l'esacerbazione clinica (9).

Quindi, nella fase di monitoraggio del decorso e della terapia del LES, si raccomanda la determinazione quantitativa degli anti-dsDNA, utilizzando il metodo RIA o, in subordine, un metodo ELISA, in cui i risultati siano espressi in UI/mL (WHO/ISP Wo/80).

3. Requisiti richiesti:

È raccomandabile che:

- i campioni per la metodica di Farr e per l'ELISA siano esaminati in duplicato;
- ciascun laboratorio determini il proprio valore di cut-off, prendendo in esame un adeguato numero di controlli patologici affetti da LES, connettiviti non LES, malattie autoimmuni non connettiviti, malattie oncologiche e infettive e di soggetti scelti fra la popolazione generale, paragonabili per età e sesso. Il cut-off dovrà essere scelto in base al miglior compromesso tra sensibilità e specificità, mediante utilizzo delle receiver operating characteristic curves (curve ROC).
- siano utilizzati, al fine di controllare lo stato di doppia elica dell'antigene, sieri monospecifici per ss-DNA, o corrispettivi anticorpi monoclonali, reperibili in commercio, testandoli periodicamente e ogniqualvolta ci sia un cambio di metodo o di lotto.

Riassunto

Gli anticorpi anti-dsDNA (nativo) sono altamente specifici per il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e presenti nei soggetti affetti con prevalenza variabile tra 40 e 80%, così da costituire uno dei criteri classificativi di LES. La loro ricerca è pertanto consigliata in caso di sospetto clinico di LES e in caso di positività degli ANA. Benché sia rara la presenza degli anti-dsDNA in caso di ANA nega-

tività, si consiglia comunque la loro determinazione anche in pazienti ANA negativi nel caso di un forte sospetto clinico di LES. Le metodiche più comunemente usate per la determinazione degli anti-dsDNA sono le tecniche di radiobinding (tra cui la tecnica originale di Farr), l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su *Crithidia luciliae* e l'ELISA. Per la diagnosi di LES la tecnica di Farr rappresenta il metodo di elezione; tuttavia la necessità di processare e misurare materiale radiomarcato ne limita l'applicazione. Un'alternativa è rappresentata dalla tecnica IFI, la quale, pur essendo generalmente meno sensibile, è dotata di elevata specificità. Pertanto, in

fase diagnostica si consiglia il metodo radioimmunologico (tecnica di Farr). In alternativa è consigliata la ricerca in IFI su *Crithidia luciliae*. In fase diagnostica non è consigliato l'utilizzo del metodo ELISA. La determinazione quantitativa degli anticorpi anti-dsDNA rientra tra i parametri utili nel monitoraggio, in modo particolare nella nefropatia lupica. Quindi, nella fase di monitoraggio, si raccomanda la determinazione quantitativa degli anti-dsDNA, utilizzando il metodo RIA o, in subordine, un metodo ELISA, in cui i risultati siano espressi in UI/mL.

Bibliografia

1. Reeves WN, Satoh M, Wang J et al. Antibodies to DNA, DNA binding proteins, and histones. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 1-28.
2. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
3. Ballou SP, Kushner I. Anti native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. An improved guide to the diagnosis and clinical management of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 321-7.
4. Wold ET, Young FE, Tan EM et al. Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect primary interaction with deoxyribonucleic acid. *Science* 1968; 161: 806-7.
5. Crowe W, Kushner I. An immunofluorescent method using *Crithidia luciliae* to detect antibodies to double stranded DNA. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 811-4.
6. Smeenk RJ. Measurement of antibodies to DNA. In: *Manual of biological markers of disease*, edited by van Venrooij WJ, Maini RN. Dordrecht Kluwer Academic Publishers 1993; A8: 1-12.
7. Smeenk RJ, Berden JHM, Swaak AJ. DsDNA autoantibodies. In: *Autoantibodies*, edited by Peter JB, Shoenfeld Y. Elsevier Science BV Amsterdam 1996; 227-36.
8. Ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ et al. Measurement of increases in anti-double stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 634-43.9. Bootsma H, Spronk P, Derksen R et al. Prevention of relapse in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1995; 345: 1595-9.

III - Proposta di linee guida per la determinazione di autoanticorpi anti-DNA

Anti-phospholipid antibodies (aPL) should be detected in patients with the following signs and symptoms: recurrent fetal losses, venous and/or arterial thrombosis, thrombocytopenia, leg ulcers, livedo reticularis. The presence of aPL is also one of the classification criteria for Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and therefore they should be determined in patients with SLE or with suspected SLE. Among the different tests described, the only ones considered, up to now, as diagnostic criteria for the anti-phospholipid syndrome are Lupus Anticoagulant (LAC) and medium or high titre of b2 glycoprotein I-dependent anti-cardiolipin antibodies of IgG and/or IgM isotype. The presence of LAC should be evaluated with the following steps: ability of plasma sample to prolong phospholipid-dependent in vitro clotting tests (KCT, aPTT, DRVVT, etc.); failure to correct the prolonged coagulation time by mixing the patient plasma with normal plasma; confirmation of the presence of LAC by shortening or correction of the prolonged coagulation time after the addition of excess phospholipid or platelets that have frozen and then thawed; exclusion of other coagulopathies. Anti-cardiolipin antibody ELISA must detect b2 glycoprotein I-dependent anti-cardiolipin antibodies of IgG and/or IgM isotype. In order to facilitate comparisons, the results should be expressed as GPL o MPL units. It is also advisable to define ranges (negative, low positive, medium positive, high positive).

1. Indicazioni cliniche

In base alla significatività della associazione (1, 2), i sintomi clinici che giustificano la ricerca di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) sono:

- Perdite fetali ricorrenti
- Trombosi venose
- Trombosi arteriose
- Trombocitopenia
- Ulcere agli arti inferiori
- Livedo reticularis

Altre condizioni, la cui associazione con aPL, che necessita però di validazione, è stata riportata in alcuni studi, sono la malattia valvolare cardiaca (nodulazioni sui lembi valvolari mitralici e/o aortici) e un certo numero di manifestazioni neurologiche quali l'ischemia cerebrale transitoria, la mielite trasversa, la corea, l'emicrania.

La presenza di aPL è anche uno dei criteri di classificazione del LES (3), ragione per cui la loro ricerca rientra nella routine di inquadramento di questa malattia.

A fronte delle numerose condizioni cliniche associate agli aPL, i criteri di classificazione della sindrome da (APS), recentemente introdotti e condivisi a livello internazionale (4, Tab. I), restringono

le manifestazioni cliniche della sindrome alla patologia trombotica ed abortiva, pur incoraggiando ricerche sperimentali e cliniche che definiscano la associazione fra aPL e le altre manifestazioni cliniche sopraelencate.

I primi dati epidemiologici oggi disponibili (5, Tab. II), evidenzianti una significativa frequenza della Sindrome da Antifosfolipidi (APS), sia primaria, sia secondaria, giustificano pienamente l'attuale diffusione dei tests per la determinazione di aPL.

2. Test disponibili

Malgrado siano sempre più numerosi i tests ELISA per la rilevazione di aPL (anti-cardiolipina, anti-miscela di differenti fosfolipidi a carica elettrica negativa, anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidiletanolamina, etc.) o di anticorpi verso proteine in grado di legare i fosfolipidi (anti-b2-glicoproteina I, anti-protrombina, etc.), con la possibilità di evidenziare anticorpi di classe IgG, IgM e IgA, gli attuali criteri di classificazione della sindrome da APS (Tab. I) considerano, per ora, significativi solo la positività al test del Lupus Anticoagulant e la dimostrazione di anticorpi a medio o alto titolo anti-cardiolipina b2-dipendenti, di classe IgG e/o IgM.

L'attribuzione di un preciso significato ad anticorpi anti-cardiolipina a basso titolo, ad anticorpi di classe IgA o ad anticorpi diretti verso la b2-glicoproteina I (b2-GPI) o la protrombina necessita di ulteriori studi e di standardizzazione delle metodiche.

3. Requisiti minimi dei test di più comune utilizzo

a) Lupus Anticoagulant

Le linee guida per la esecuzione del lupus anticoagulant (6) sono state delineate dal un apposito sottocomitato internazionale (International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific Subcommittee on Lupus Anticoagulants/phospholipids dependent antibodies).

Praticamente il test, eseguito su plasma, si articola in:

- valutazione del tempo di coagulazione con un test fosfolipidi-dipendente (KCT, aPTT, DRVVT, etc.);
- mancata correzione dell'eventuale prolungamento con mixing di plasma normale;
- correzione ottenuta con aggiunta di fosfolipidi;
- esclusione di altre coagulopatie.

b) Test aCL - ELISA

La standardizzazione di questo test, eseguibile su siero o su plasma, è stata ed è oggetto di numerosi studi (ref. 7); essa è comunque ancora non completata e solo scarsamente condivisa a livello internazionale.

Ci si limita quindi ad esporre taluni punti ritenuti di rilevante importanza:

- i campioni si debbono testare in duplicato;
- in accordo con i criteri di classificazione, già citati, il test ELISA degli anticorpi anticardiolipina deve rilevare anticorpi b2GPI-dipendenti di classe IgG o IgM. Per avere nel sistema la quantità idonea di b2GPI, è opportuno che il tampone di bloccaggio, di diluizione dei sieri e di lavaggio contengano 10% di siero bovino (fetale o adulto). L'introduzione di siero bovino nei tamponi di lavaggio garantisce che il livello di b2GPI si mantenga costante nel sistema durante tutta la procedura;
- il cut-off deve essere determinato in ogni laboratorio testando un numero adeguato (100 o più) di sieri da soggetti normali, distribuiti per età e sesso. La distribuzione dei valori non risulta di solito normale, per cui il calcolo del cut-off deve utilizzare il sistema dei percentili. Dal momento che il metodo ELISA è molto sensibile, è consigliabile utilizzare il 99° percentile;
- per necessità di confronto, i risultati devono essere espressi in unità GPL o MPL (mg/ml di anticorpo), introducendo in ogni test una curva di calibrazione di almeno 5 punti, creata usualmente con gli standard di Harris o con standard secondari, calibrati su questi. Sono attualmente in valutazione come standard internazio-

TABELLA I - CRITERI CLASSIFICATIVI DELLA SINDROME DA ANTIFOSFOLIPIDI (4)

Criteri clinici

1. Trombosi vascolari: uno o più episodi di trombosi arteriose, venose o dei piccoli vasi, in qualsiasi organo o tessuto, confermate da tecniche di imaging, doppler o dall'istopatologia.
2. Patologia ostetrica;
 - a) Una o più morti fetali oltre la 10^a settimana;
 - b) Uno o più parti prima della 34^a settimana, accompagnati da preeclampsia o severa insufficienza placentare;
 - c) Tre o più aborti prima della 10^a settimana.

Criteri laboratoristici

1. Anticorpi anticardiolipina (aCL) b2 dipendenti di classe IgG e/o IgM a titolo medio-alto, misurati con metodiche ELISA standardizzata, in due o più occasioni ad almeno 8 settimane di distanza;
- a) Lupus Anticoagulant positivo in due rilevazioni a 8 o più settimane di distanza, rilevato secondo il metodo raccomandato dal Sottocomitato del Lupus Anticoagulant/Phospholipid Dependent Antibodies

Necessari per la diagnosi almeno 1 criterio clinico ed 1 laboratoristico.

TABELLA II - EPIDEMIOLOGIA DELLA SINDROME DA ANTIFOSFOLIPIDI (5)

Frequenza degli antifosfolipidi	
Condizione clinica	Frequenza (%)
Trombosi venosa	24
Ictus cerebrale	6-29
Malattia coronarica	3-80
Poliabortività idiopatica	10-20
Lupus Eritematoso Sistemico	22 - 54

nali presso le Organizzazioni preposte anticorpi monoclonali umani o umanizzati;

- consigliabile infine una valutazione semi-quantitativa dei risultati, cioè in range, secondo lo schema: - negativo, se sotto il cut-off, - basso positivo, se <30 GPL/MPL; - medio positivo, se > 30 e < 80 GPL/MPL; - alto positivo, se > 80 GPL/MPL.

Allo stato attuale è raccomandato ai laboratori che testano routinariamente gli aCL di controllare periodicamente, almeno ogni 6 mesi, l'accuratezza e la riproducibilità della metodica tramite scambio di sieri con altri laboratori impegnati nel settore.

Riassunto

Gli anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) andrebbero ricercati in pazienti con i seguenti sintomi e segni: perdite fetali ricorrenti, trombosi venose e/o arteriose, trombocitopenia, ulcere agli arti inferiori, livedo reticularis. La presenza di aPL è anche uno dei criteri di classificazione del Lupus Eritematoso Sistemico, ragione per cui la loro ricerca rientra nella routine di inquadramento di questa malattia. Malgrado siano sempre più numerosi i test ELISA per la rilevazione di aPL (oltre gli anti-cardiolipina) o di anticorpi verso proteine in grado di legare i fosfolipidi, gli attuali criteri di classificazione della sindrome da antifosfolipidi considerano, per ora, significativi solo la positività al test del Lupus Anticoagulant (LAC) e/o la dimo-

zione di anticorpi a medio o alto titolo anti-cardiolipina b2glicoproteina I-dipendenti, di classe IgG e/o IgM. Per quel che riguarda il LAC, il test, eseguito su plasma, si articola in: valutazione del tempo di coagulazione con un test fosfolipidi-dipendente (KCT, aPTT, DRVVT, etc.); mancata correzione dell'eventuale prolungamento con mixing di plasma normale; correzione ottenuta con

aggiunta di fosfolipidi; esclusione di altre coagulopatie. Il test ELISA degli anticorpi anticardiolipina deve rilevare anticorpi b2glicoproteina I (che deve perciò essere presente nei tamponi utilizzati)-dipendenti di classe IgG o IgM. Per necessità di confronto, i risultati devono essere espressi in unità GPL o MPL. Consigliabile infine una valutazione semi-quantitativa dei risultati, cioè in range.

Bibliografia

1. Harris EN, Chan IKH, Asherson RA et al. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. Arch Int Med 1986; 146: 2153-6.
2. Alarcón Segovia D, Perez-Vasquez ME, Villa AR et al. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. Sem Arthritis Rheum 1992; 21: 275-85.
3. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1725.
4. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum 1999; 42: 1309-11.
5. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid syndrome. In: The Antiphospholipid Syndrome, edited by Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y. CRC Press, Boca raton 1996; 13-28.
6. Brandt JT, Triplett DA, Alving B et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. Thromb Haemost 1995; 74: 1185-90.
7. Tincani A, Balestrieri G, Allegri F et al. Overview on Anticardiolipin ELISA Standardization. J Autoimmun 2000; 15(2): 195-7.1.

V - Proposta di linee guida per la determinazione di autoanticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA)

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are considered a serologic diagnostic marker for some forms of necrotising vasculitis. In the presence of clinical manifestations suggestive for Wegener's granulomatosis (WG) and/or microscopic polyangiitis (MPA), such as pulmonary-renal syndrome, rapidly progressive glomerulonephritis, skin vasculitis, lung nodules, tracheal stenosis, destructive upper airways lesions, orbital pseudotumor, multiple mononeuritis, the demonstration of ANCA has a high sensitivity (>90%), specificity (>90%) and positive predictive value. In different clinical conditions, such as inflammatory bowel diseases, autoimmune hepatitis and connective tissue diseases, the diagnostic usefulness of ANCA is low or doubtful. The European project for ANCA assays standardisation has demonstrated that ANCA are more correctly detected with a combination of indirect immunofluorescence (IIF) on neutrophils and antigen specific ELISA for proteinase 3 (PR3) and myeloperoxidase (MPO). ANCA positive sera from vasculitis patients show by IIF two main staining patterns:

C-ANCA: a diffuse cytoplasmic staining due to antibodies to PR3.

P-ANCA: perinuclear and/or nuclear staining mainly due to antibodies to MPO.

Most patients with active and generalised WG have C-ANCA with specificity for PR3 whereas patients with MPA have P-ANCA with specificity for MPO.

1. Indicazioni cliniche

Gli ANCA sono degli autoanticorpi diretti verso costituenti citoplasmatici dei granulociti neutrofili (e monociti); sono considerati un utile marker sierologico per la diagnostica delle vasculiti primarie sistemiche, quali in particolare la granulomatosi di Wegener (GW) e la poliangioite microscopica (PAM), inclusa la sua variante limitata al rene (la glomerulonefrite necrotizzante extracapillare "pauci-immune") e, in misura minore, la sindrome di Churg-Strauss (SCS) (1, 2) (Tab I).

Le ragioni più frequenti per la richiesta di una determinazione degli ANCA sono appunto la diagnosi e/o il monitoraggio delle vasculiti sistemiche primitive (Tab. II) (3).

In presenza di manifestazioni cliniche che suggeriscono una diagnosi di GW o PAM, quali una sindrome rene-polmone, un quadro

di glomerulonefrite rapidamente progressiva, una vasculite cutanea con sintomi sistemici, noduli polmonari multipli, stenosi tracheale, lesioni destruenti a carico delle alte vie respiratorie, masse retro-orbitarie, mononeurite multipla, la dimostrazione degli ANCA nel siero del paziente ha un'elevata sensibilità (> 90%) e specificità (> 90%) e, di conseguenza, un alto valore predittivo per queste malattie (4-7). In altre situazioni cliniche ANCA-associate (es. malattie infiammatorie intestinali croniche, epatiti e colangiti autoimmuni, connettiviti), l'utilità diagnostica è inferiore (8,9). L'identificazione degli ANCA potrebbe, tuttavia, rivestire un ruolo significativo nella diagnosi differenziale tra rettocolite ulcerosa (RCU) e morbo di Crohn (MC).

Nelle vasculiti ANCA-associate il titolo degli ANCA correla, in genere, con l'attività della malattia, anche se non sono rare le eccezioni (10).

2. Test disponibili

Lo studio europeo di standardizzazione delle metodiche ha dimostrato che gli ANCA sono più correttamente rilevati, mediante l'uso combinato di una metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) su leucociti umani normali fissati in etanolo e di tecniche ELISA per il dosaggio degli ANCA specifici per la proteinasi 3 (PR3) e la mieloperossidasi (MPO) (6) (Tab. III). Nella fase di screening è consigliabile l'esecuzione di entrambe le metodiche, poiché esistono campioni positivi soltanto in uno dei due test (5%). Qualora non sia possibile eseguire sistematicamente entrambi i test, il loro uso combinato è comunque indispensabile nei casi con un forte sospetto clinico di vasculite ANCA-associata.

I sieri ANCA positivi da pazienti affetti da vasculiti sistemiche primitive producono all'IFI due patterns caratteristici:

C-ANCA: colorazione citoplasmatica granulare diffusa, spesso con accentuazione dell'intensità della fluorescenza tra i lobi nucleari. Questo pattern è associato nel 90-95% dei casi alla presenza di autoanticorpi specifici per la PR3.

P-ANCA: colorazione perinucleare e/o nucleare, causata nell'80% circa dei casi dalla presenza di MPO-ANCA (include i cosiddetti GS-ANA).

Nella maggior parte dei pazienti affetti da GW in forma attiva e generalizzata si riscontrano C-ANCA con specificità per la PR3, in circa il 20-30% si trovano invece P-ANCA con specificità per la MPO.

Circa il 70-80% dei pazienti affetti da poliangioite microscopica (PAM) o glomerulonefrite extracapillare necrotizzante pauci-immune presenta P-ANCA specifici per la MPO mentre il 30% ha C-ANCA specifici per la PR3. Occasionalmente sono stati descritti quadri C-ANCA/MPO-ANCA e P-ANCA/PR3-ANCA (11, 12).

ANCA (sia C che P) sono presenti anche nel 40-60% dei pazienti affetti da sindrome di Churg-Strauss (SCS).

P-ANCA o patterns fluoroscopici atipici sono descritti, con diversa prevalenza, in pazienti affetti da malattie intestinali infiammatorie croniche, epatopatie e malattie reumatologiche (8,9). Sono causati da anticorpi diretti contro antigeni (lattoferrina, elastasi, battericidal/permeability increasing protein, beta-glicuronidasi, catepsina G, azurocidina, lisozima, high mobility group proteins, alfa-enolasi, actina, catalasi e altri non ancora identificati) diversi da quelli generalmente associati alle vasculiti (PR3 e MPO), il cui ruolo patogenetico e/o significato clinico sono ignoti.

P-ANCA e ANCA atipici possono essere rilevati in corso di alcune vasculiti iatrogeniche.

Deve essere ribadito che il solo riscontro di positività ANCA, in assenza di dati clinici indicativi, non può essere considerato diagnostico e motivare l'inizio di un trattamento terapeutico.

3. Requisiti

a) Immunofluorescenza indiretta (IFI)

Requisiti minimi da rispettare per una corretta diagnostica:

- Esecuzione del test IFI su tutti i sieri dei pazienti nuovi (circa il 10% degli ANCA nelle vasculiti è dimostrabile solo mediante questa metodica).
- Campioni di pazienti noti, positivi solo in IFI, possono essere successivamente testati solo con questa metodica anche se, talvolta, gli autoanticorpi possono diventare rilevabili anche in ELISA in un secondo tempo. Sieri che sono risultati positivi o nel PR3 o nel MPO-ELISA possono essere testati successivamente solo per l'antigene rilevante, dal momento che è un'evenienza assai rara un cambio di specificità antigenica.
- È opportuno utilizzare come substrato per l'IFI una preparazione contenente sia neutrofili che linfociti. P-ANCA e ANCA atipici reagiscono solo con neutrofili e monociti mentre gli ANA reagiscono con i nuclei di tutte le cellule (per questo la presenza di linfociti nei citocentrifugati aiuta a discriminare tra ANCA e ANA). Talvolta, in presenza di un quadro P-ANCA, si può notare

TABELLA I - MALATTIE ANCA-ASSOCIATE

	ANCA positività		Antigene bersaglio
Vasculiti sistemiche			
1. Granulomatosi di Wegener (forme generalizzate)	C-ANCA P-ANCA	(80-90%)	PR3 (70-80%) MPO (20-30%)
2. Poliangioite microscopica	C-ANCA P-ANCA	(80-85%)	PR3 (20-30%) MPO (70-80%)
3. Sindrome di Churg Strauss	C-ANCA P-ANCA	(50%)	PR3 (30-40%) MPO (60-70%)
4. Poliarterite nodosa classica	P-ANCA	(10%)	MPO (90%)
Glomerulonefrite necrosante	C-ANCA	(80%)	PR3 (20%)
pauci-immune idiopatica	P-ANCA		MPO (80%)
Malattie Reumatiche			
1. Artrite Reumatoide	P-ANCA ANCA atipici	(30% ?)	LF, sconosciuto
2. Lupus Eritematoso Sistemico	P-ANCA	(<20%)	LF, ELA, MPO

PR3= proteinasi 3; MPO=mieloperoxidasi; LF= lattoferrina; ELA= elastasi; GS-ANA= anticorpi anti-nucleo granulocita-specifici

TABELLA II - PRINCIPALI INDICAZIONI CLINICHE PER LA RICERCA DEGLI ANCA

- sindrome polmonare-renale / emorragia polmonare
- glomerulonefrite rapidamente progressiva
- vasculite cutanea con sintomi sistemici
- noduli polmonari / lesioni croniche destruenti delle alte vie aeree
- sinusiti e otiti croniche
- stenosi tracheale subglottica / massa retro-orbitaria
- mononeuriti multiple

TABELLA III - DETERMINAZIONE DEGLI ANCA

- Immunofluorescenza indiretta su leucociti fissati in etanolo
- ELISA Ag specifici per anticorpi anti-PR3 e anti-MPO
- l'associazione dei 2 metodi consente una specificità > 95% (EC/BCR study)

TABELLA IV - REFERTAZIONE RISULTATI IFI

- C-ANCA: classica fluorescenza granulare citoplasmatica con accentuazione centrale o interlobulare.
- C-ANCA (atipico o omogeneo): fluorescenza diffusa omogenea senza accentuazione interlobulare.
- P-ANCA: fluorescenza perinucleare con o senza estensione nucleare; include gli ANA granulocita specifici.
- ANCA atipico: include tutte le altre fluorescenze granulocita o monocita-specifiche.

una fluorescenza nucleare dei linfociti vicini ai neutrofili positivi a causa del leakage (causato dal fissativo) di componenti citoplasmatiche dei granulociti che aderiscono successivamente ai nuclei dei linfociti vicini.

Suggerimenti per una diagnostica ottimale:

- Tutti i campioni positivi in IFI e negativi nei test ELISA specifici per la PR3 e la MPO dovrebbero essere titolati.
- Titolare i sieri se, oltre agli ANCA, sono presenti ANA o altre positività non meglio caratterizzate, potenzialmente interferenti. In questi casi può essere utile testare e titolare, nella stessa seduta di IFI, il campione nuovo ed il positivo precedente dello stesso paziente. Se le uniche cellule fluorescenti sono granulociti e monociti (linfociti negativi quando presenti nel substrato) non è indispensabile la titolazione dei sieri.
- L'utilizzo di substrati cellulari fissati con formalina può essere utile in alcune circostanze sia per discriminare tra diverse condizioni patologiche che per descriverle in modo più esauriente. I P-ANCA mostrano un pattern citoplasmatico su vetrini fissati con formalina mentre gli ANA perdono in genere la loro reattività; gli ANCA atipici, che sono un gruppo molto eterogeneo, possono mostrare pattern citoplasmatico o diventare negativi (13).

Commenti

- I campioni di siero da testare non devono essere inattivati al calore; questa pratica può procurare risultati falsi-positivi.
- La diluizione ottimale dei sieri va stabilita in ogni laboratorio in base alle diverse variabili analitiche; generalmente essa varia tra 1:20 e 1:40.
- L'aggiunta di HSA all'1% nel tampone di diluizione e lavaggio (generalmente PBS), può contribuire ad eliminare la fluorescenza di fondo.
- È preferibile utilizzare un antisiero secondario anti-IgG piuttosto che anti-Ig totali, perché soddisfa le esigenze diagnostiche e riduce la fluorescenza di fondo, evitando risultati falsamente positivi.
- L'uso di controcoloranti quali l'Evans blue diminuisce l'intensità della fluorescenza e può mascherare i deboli positivi.
- È indispensabile la disponibilità di un sistema ottico efficiente, possibilmente calibrato con standards a diversa intensità di fluorescenza.

b) ELISA

ANTIGENI

Requisiti minimi:

- I produttori dei Kit commerciali devono sempre specificare la metodica di purificazione; se gli antigeni sono purificati "in house", deve essere scelta una procedura che causi la minore denaturazione delle proteine antigeniche.
- Antigeni nativi (estrattivi) sono a tutt'oggi da preferire a quelli ricombinanti, la cui validità e utilità deve essere ancora verificata.
- Quando si utilizzano preparazioni antigeniche nuove, si cambiano le caratteristiche o la marca dei kit commerciali in uso, i risultati devono essere confrontati e validati in rapporto alla "vecchia preparazione".

Requisiti ottimali:

La purezza degli antigeni preparati in laboratorio dovrebbe essere controllata in ELISA e/o Western-blot, con l'ausilio di antisieri policlonali e monoclonali specifici, per verificare un'eventuale contaminazione di antigeni ANCA minori, in particolare la lattoferrina.

TEST

Requisiti minimi per una corretta diagnostica:

- I campioni devono essere esaminati in duplicato.
- I campioni positivi per ANCA in IFI, con fluorescenza tipica o

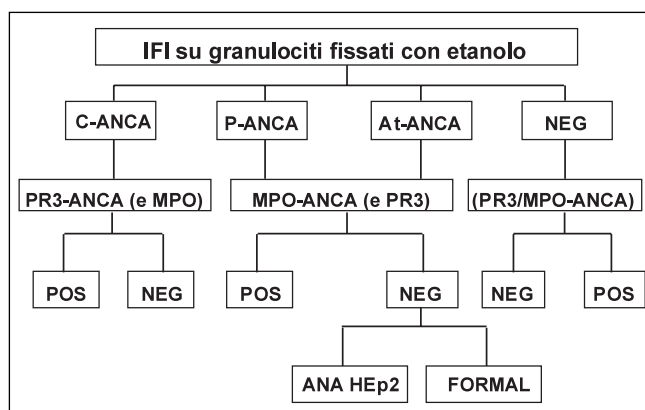


Fig. 1 - Algoritmo per la determinazione degli ANCA.

atipica e tutti i sieri con ANA positività devono essere testati in fase solida per la ricerca di PR3-ANCA e MPO-ANCA.

- I campioni precedentemente positivi per PR3-ANCA o MPO-ANCA possono essere testati successivamente soltanto nell'appropriato ELISA (PR3-ANCA o MPO-ANCA) dal momento che un cambiamento della specificità antigenica bersaglio degli ANCA in pazienti affetti da GW o PAM è evenienza eccezionale.
- In ogni piastra devono essere sempre inclusi controlli positivi e negativi, eventuali controlli interni e "bianchi"; i risultati devono essere calcolati per estrapolazione da una curva costruita mediante diluizioni scalari degli standard (almeno 5 punti).
Suggerimenti per una diagnostica ottimale:
- Tutti i campioni di siero (anche quelli negativi all'IFI), in presenza di fondato sospetto clinico, dovrebbero essere testati in ELISA Ag-specifici per la ricerca di PR3-ANCA e MPO-ANCA poiché il 5% dei sieri di pazienti affetti da vasculiti ANCA-associate sono positivi soltanto nei test in fase solida.
- I test devono consentire determinazioni quantitative e con coefficienti di variabilità intra e inter-assay inferiori al 20%.
- La scelta del cut-off deve essere sempre verificata in ciascun laboratorio (anche per i kit commerciali); il valore deve essere calcolato dopo avere valutato un adeguato numero di controlli sani e patologici. Idealmente, per assicurare una sensibilità e specificità ottimali, dovrebbero essere calcolate le receiver operating characteristic curves (ROC) per ciascun test ELISA, considerando almeno una specificità del 90% verso le patologie di controllo. In alternativa si può considerare un range di normalità calcolato come la media delle u.a. + /- 2 (3) deviazioni standard.
- Talvolta può essere utile confrontare, nella stessa seduta analitica, campioni precedentemente positivi e campione nuovo positivi dello stesso paziente.

Commenti:

- È disponibile un siero di riferimento per C-ANCA specifico per la PR3 (contattare Dr. A. Wiik. Statens Seruminstitut, Denmark, e-mail aw@ssi.dk).
- Un legame aspecifico dovrebbe essere sospettato quando nello stesso campione sono rilevati contemporaneamente PR3-ANCA e MPO-ANCA a basso titolo. Non ci sono standard per PR3 e MPO-ANCA, i risultati devono perciò essere espressi in unità arbitrarie.
- Nella routine diagnostica delle vasculiti ANCA-associate è necessario e sufficiente testare i sieri in sistemi ELISA PR3 e MPO-specifici, in quanto sono questi gli antigeni clinicamente rilevanti in termini di prevalenza e significato diagnostico. Non è consigliato l'utilizzo di test diagnostici per l'identificazione delle specificità minori ANCA-correlate (LF, LYS, ELA, BPI ed altre), in quanto non è stata dimostrata finora una correlazione con patologie o quadri clinici peculiari.

Refertazione dei risultati degli ANCA

- Per una corretta interpretazione dei risultati complessivi, i risultati ottenuti nei test IFI ed ELISA dovrebbero essere comunicati contemporaneamente; se ciò non fosse praticabile, i risultati degli ELISA dovrebbero seguire il prima possibile i risultati dell'IFI.
- I risultati dei test ELISA vanno riportati in termini quantitativi come unità arbitrarie. Può essere utile una definizione qualitativa-discreta dei risultati, cioè in range, secondo lo schema: negativo, basso positivo, medio positivo e alto positivo.

Nomenclatura (vedi Tabella IV) (14)

- C-ANCA: classica fluorescenza granulare citoplasmatica con accentuazione centrale o interlobulare.
- C-ANCA (atipico o omogeneo): fluorescenza diffusa omogenea senza accentuazione interlobulare.
- P-ANCA: fluorescenza perinucleare con o senza estensione nucleare; include gli ANA granulocita specifici.
- ANCA atipico: include tutte le altre fluorescenze granulocita o monocita-specifiche.

Commenti

- L'utilizzo dei termini C-ANCA e P-ANCA invece di cANCA e pANCA è da preferire in quanto in conformità con lo stile utilizzato per la descrizione delle specificità antigeniche (PR3-ANCA e MPO-ANCA).
- L'intensità della fluorescenza dovrebbe essere riportata come negativa, debolmente positiva, positiva o fortemente positiva solo sulla base della diluizione di screening.

Riassunto

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono considerati un utile marker sierologico per la diagnostica di alcune vasculiti necrotizzanti. In presenza di manifestazioni cliniche che suggeriscono una diagnosi di granulomatosi di Wegener (GW) o di poliangioite microscopica (PAM), quali una sindrome rene-polmone, un quadro di glomerulonefrite rapidamente progressiva, una vasculite cutanea con sintomi sistemici, noduli polmonari multipli, stenosi tracheale, lesioni destruenti a carico delle alte vie respiratorie, masse retro-orbitarie, mononeurite multipla, la dimostrazione degli ANCA nel siero del paziente ha un'elevata sensibilità (> 90%) e specificità (> 90%). In altre situazioni cliniche ANCA-associate (es. malattie infiammatorie intestinali croniche, epatiti e colangiti autoimmuni, connettiviti), l'utilità diagnostica è inferiore o dubbia. Lo studio europeo di standardizzazione delle metodiche ha dimostrato che gli ANCA sono più correttamente rilevati, mediante l'uso combinato di una metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) e di tecniche ELISA per il dosaggio degli ANCA specifici per la proteinasi 3 (PR3) e la mieloperossidasi (MPO). I sieri ANCA positivi da pazienti affetti da vasculiti sistemiche primitive producono all'IFI due patterns caratteristici:

C-ANCA: colorazione citoplasmatica granulare diffusa. Questo pattern è associato nel 90-95% dei casi alla presenza di autoanticorpi specifici per la PR3.

P-ANCA: colorazione perinucleare e/o nucleare, causata nell'80% circa dei casi dalla presenza di MPO-ANCA.

Nella maggior parte dei pazienti affetti da GW in forma attiva e generalizzata si riscontrano C-ANCA con specificità per la PR3. Circa il 70-80% dei pazienti affetti da PAM presenta P-ANCA specifici per la MPO.

Bibliografia

- Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: a review. *Am J Kidney Dis* 1990; 15: 517-29.
- Kallemberg CGM, Cohen Tervaert JW. What is new with antineutrophil cytoplasmic antibodies: diagnostic, pathogenetic and therapeutic implications. *Curr Opin Nephrology Hypertension* 1999; 8: 307-15.
- Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 629-35.
- Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, et al. The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection. A report on the first phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Meth* 1993; 159: 1-16.
- Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, et al. Development and standardization of solid phase assays for the detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Meth* 1996; 196: 1-15.
- Hagen EC, Daha MR, Hermans J, et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 1998; 53: 743-53.
- Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int* 1998; 53: 796-8.
- Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, et al. Antibodies to Neutrophil Cytoplasm in Italian Patients with Ulcerative Colitis: Sensitivity, Specificity and Recognition of Putative Antigens. *Digestion* 1994; 55: 34-9.
- Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, et al. Prevalence of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Disease. *Ann Int Med* 1997; 126(11): 866-73.
- Bootsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, et al. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9): 2025-33.
- Segelmark M, Baslund B, Wieslander J, et al. Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 458-65.
- Ruffatti A, Sinico RA, Radice A, et al. Antibodies to proteinase 3 and myeloperoxidase in systemic sclerosis. *J Rheumatol* (in corso di stampa).
- Radice A, Vecchi M, Bianchi MB, et al. Contribution of immunofluorescence to the identification and characterization of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. The role of different fixatives. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 707-12.
- Savice J, Gillis D, Benson E, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(4): 507-13.

Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle malattie Autoimmuni (F.I.R.M.A.)

Direttore: Prof. ROBERTO MARCOLONGO

Istituto di Reumatologia, Policlinico Le Scotte, V.le Bracci- 53100 Siena

tel. 0577 233342, segreteria: 233343; fax : 40450

e-mail: marcolongo@unisi.it

MERONI Prof. PIER LUIGI,

Unità di Immunologia Clinica e Allergologia- IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano

RIZZOTTI Dr. PAOLO, Laboratorio di analisi cliniche, chimiche ed ematologiche, Ospedale Civile Maggiore Azienda Ospedaliera, Verona

SINICO Dr. RENATO ALBERTO, Unità Operativa di Nefrologia e Centro di Immunologia Clinica e reumatologia, Azienda Ospedaliera Ospedale San Carlo Borromeo, Milano

BIZZARO Dr. NICOLA, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S.Dona' di Piave, Venezia

RUFFATTI Dr. AMELIA, Divisione e Cattedra di Reumatologia, Policlinico, Padova

DE PITA' Dr. ORNELLA, Laboratorio Immunologia e Allergologia IDI-IRB, Roma

TOZZOLI Dr. RENATO, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia. Ospedale civile Latisana, Udine

SEBASTIANI Dr. GIAN DOMENICO, Unità Operativa di Reumatologia, Dipartimento Scienze Mediche, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma

MONTECUCCO Prof. CARLO MAURIZIO, Servizio e Cattedra di Reumatologia
Policlinico S. Matteo, Pavia

RADICE Dr.ssa ANTONELLA, Centro di Immunologia Nefrologica, Unità Operativa di Nefrologia, Azienda Ospedaliera Ospedale San Carlo Borromeo, Milano

VILLALTA Dr. DANILO, Servizio di Microbiologia-Immunologia, Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli, Pordenone

TINCANI Dr. ANGELA, Servizio di Allergologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili, Brescia

BOMBARDIERI Prof. STEFANO, Unità Operativa di Immunologia Clinica, Azienda Ospedaliera Pisana, Pisa

MATHIEU Prof. ALESSANDRO, II Cattedra di Reumatologia, Istituto di Clinica Medica, Università di Cagliari, Cagliari

MOROZZI Dr.ssa GABRIELLA, Istituto di Reumatologia, Policlinico Le Scotte, Siena

GALEAZZI Prof. MAURO, Istituto di Reumatologia, Policlinico Le Scotte, Siena

VALESINI Prof. GUIDO, Cattedra di Reumatologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma

BALESTRIERI Dr. GENESIO, Servizio di Allergologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili, Brescia

RICCIERI Dr.ssa VALERIA Cattedra di Reumatologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma

GIRARDI Dr.ssa ANNA MARIA, Laboratorio di Autoimmunità, Ospedale San Raffaele, Milano

PINI Prof. CARLO, Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

DORIA Dr. ANDREA, Cattedra e Divisione di Reumatologia, Università di Padova, Padova

GERLI Dr. ROBERTO, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Centro per lo studio delle malattie reumatiche. Policlinico di Montelucre, Perugia

MIGLIORINI Dr.ssa PAOLA, Unità Operativa di Immunologia Clinica, Azienda Ospedaliera Pisana, Pisa

PUDDU Dr. PIETRO, Laboratorio Immunologia ed Allergologia IDI-IRB, Roma