

RACCOMANDAZIONI E LINEE GUIDA

Aggiornamento delle linee guida SIPMeL sull'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche sistemiche: metodi per lo screening degli anticorpi anti-antigeni cellulari (ANA)

Updating the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine guidelines on the use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of systemic rheumatic autoimmune diseases: analytical methods for the screening of antibodies to cellular antigens (ANA)

Luigi CINQUANTA¹ *, Maria INFANTINO², Mariangela MANFREDI²,
Massimo DAVES³, Antonella RADICE⁴, Danilo VILLALTA⁵,
Maria Concetta SORRENTINO⁶, Brunetta PORCELLI⁷, Lucia TERZUOLI⁷, Marcello BAGNASCO⁸,
Ignazio BRUSCA⁹, Nicola BIZZARO¹⁰ a nome del Gruppo di Studio in Autoimmunologia
della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

¹Laboratorio centralizzato SDN Spa, Gruppo SYNLAB, Pagani, Salerno, Italia; ²Laboratorio Immunologia Allergologia, Ospedale San Giovanni di Dio, Firenze, Italia; ³Servizio interaziendale di Immunoematologia e Trasfusionale, Ospedale di Bolzano, Italia; ⁴UOC Microbiologia e Virologia, Presidio Ospedaliero San Carlo Borromeo, Milano, Italia; ⁵SSD Immunologia e Allergologia, Presidio Ospedaliero S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italia; ⁶Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Biotecnologie avanzate, Laboratorio di Patologia Clinica, Microbiologia e Virologia, Palermo, Italia; ⁷UOC Laboratorio Patologia Clinica, Policlinico S. Maria alle Scotte, AOU Senese, Siena, Italia; ⁸Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche (DIMI), Università di Genova, Genova, Italia; ⁹Unità Operativa Complessa di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla Fatebenefratelli, Palermo, Italia; ¹⁰Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale San Antonio, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine, Tolmezzo, Italia

*Autore di contatto: Luigi Cinquanta, SDN Spa SYNLAB, Via Mangioni 19, Pagani, Salerno, Italia. E-mail: luigi.cinquanta@alice.it

RIASSUNTO

Alla luce dell'evoluzione delle tecnologie e delle evidenze comparse nella letteratura negli ultimi anni sui metodi analitici per lo screening degli anticorpi antinucleo-citoplasmatici (ANA), il Gruppo di Studio in Autoimmunologia della SIPMeL ha ritenuto opportuno aggiornare le linee guida del 2015 sull'utilizzo dei test anticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche. Revisioni sistematiche e metanalisi hanno infatti evidenziato come, per lo screening degli ANA, alcuni nuovi metodi in fase solida di recente sviluppo siano in grado di fornire complessivamente prestazioni diagnostiche analoghe se non addirittura migliori del metodo di immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2 (IFI HEp-2). Tuttavia, poiché né il metodo

IFI HEP-2 né i metodi in fase solida da soli sono capaci di individuare tutti i soggetti con malattia reumatica autoimmune e poiché in presenza di un risultato positivo di entrambi i test la probabilità di connettivite è estremamente più alta rispetto alla positività di un singolo test, si raccomanda che i nuovi metodi in fase solida vengano impiegati in associazione al metodo IFI HEP-2 in modo da garantire una maggiore sensibilità e specificità al test per lo screening degli ANA.

(Per citare questo articolo: Cinquanta L, Infantino M, Manfredi M, Daves M, Radice A, Villalta D, *et al.* Aggiornamento delle linee guida SIPMeL sull'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche sistemiche: metodi per lo screening degli anticorpi anti-antigeni cellulari (ANA). Riv Ital Med Lab 2019;15:294-9. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00043-4)

Parole chiave: Linee guida; Malattie dei tessuti connettivi; Immunofluorescenza indiretta; Metodi in fase solida; Cellule HEP-2.

ABSTRACT

In view of the evolution of technologies and of the evidence produced in recent years on new analytical methods for the screening of antinucleocytoplasmic antibodies (ANA), the Study Group on Autoimmunology of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) has deemed appropriate to update its 2015 guidelines on the use of antibody tests in the diagnosis and monitoring of rheumatic autoimmune diseases. Actually, systematic reviews and meta-analyses have shown that new recently developed solid-phase assays for the screening of ANA are able to provide overall diagnostic performance that are equivalent, or even better, than those provided by the indirect immunofluorescence method on HEP-2 cells (IIF HEP-2). However, since neither the IFI HEP-2 method nor the solid phase methods alone are capable of identifying all subjects with connective tissue disease and since in the presence of a positive result of both tests the probability of connective tissue disease is much higher compared to the positivity of a single test, it is recommended that the new solid-phase methods are associated with the IIF HEP-2 method in order to ensure higher sensitivity and specificity to the ANA screening test.

Key words: Guideline; Connective tissue diseases; Fluorescent antibody technique, indirect.

Sviluppata 70 anni fa da Coons e Friou,^{1, 2} la determinazione degli anticorpi anti antigeni cellulari (ANA) in immunofluorescenza indiretta (IFI), ancora oggi detiene un ruolo fondamentale nella diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni (MRA).³ Nonostante gli sforzi condotti negli ultimi venti anni, la standardizzazione di questa metodologia analitica non può considerarsi compiuta per via di alcuni suoi limiti intrinseci come la difficoltà di rilevare alcuni autoanticorpi clinicamente rilevanti (anti Ro52, Ro60, ribosomi, PCNA e sintetasi),^{4, 5} la variabilità tra i diversi substrati HEP-2,⁶ la natura semi-quantitativa dei risultati, i tempi di esecuzione relativamente lunghi, e soprattutto la competenza e la soggettività della interpretazione dell'operatore che legge i preparati al microscopio.⁷⁻⁹ I recenti progressi nell'automazione dell'allestimento dei vetrini e nel riconoscimento dei quadri di fluorescenza mediante sistemi esperti, pur avendo notevolmente agevolato e velocizzato l'esecuzione del test, non hanno comportato radicali miglioramenti prestazionali rispetto alla procedura IFI tradizionale.^{10, 11}

Anche la mancanza di omogeneità nella nomenclatura dei quadri fluoroscopici degli ANA ha rappresentato per decenni una variabile importante dell'ANA IFI, negli ultimi anni in via di risoluzione grazie agli sforzi del *International Consensus on ANA Patterns* (ICAP).^{12, 13}

Con l'obiettivo di rendere più automatizzata e standardizzata la ricerca degli ANA, negli anni duemila fu ipotizzata la sostituzione del metodo IFI con metodologie immunometriche in fase solida (SPA) quali, ad esempio, immunoenzimatica (ELISA), fluoroimmunoenzimatica (FEIA), multiple blot assay (MBA), chemiluminescenza (CLIA), addressable laser bead immunoassay (ALBIA).¹⁴⁻¹⁹ La maggior parte di questi test ideati per lo screening degli ANA utilizzava miscele di proteine purificate derivate da fonti native (cellule o tessuti) e/o di sintesi tramite la tecnologia del DNA ricombinante. I risultati ottenuti con questi metodi immunometrici non erano correlati tuttavia con quelli ottenuti con il metodo IFI, essendo caratterizzati da un numero limitato di antigeni e, quindi, da una significativa minore sensibilità diagnostica.²⁰ Nel 2010, a seguito del diffondersi delle suddette tecnologie analitiche alternative all'IFI, l'American College of Rheumatology (ACR) pubblicava un documento di sintesi che confermeva l'IFI su cellule HEP-2 come la metodologia analitica *gold standard* per la ricerca degli ANA.²¹ Pertanto nel 2015, alla stesura della ultima revisione delle linee guida per l'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche sistemiche da parte del Gruppo di Studio di Autoimmunologia (GdS-AI) della SIPMeL,²² le evidenze scientifiche dispo-

nibili non permettevano di introdurre raccomandazioni a favore di metodologie alternative all'IFI, principalmente perché dette metodiche disponevano di pannelli antigenici troppo limitati se paragonati alla numerosità degli autoantigeni target della risposta autoantidipale nelle MRA rilevabili dalla metodica IFI.

Negli ultimi anni, due diversi test per lo screening degli ANA, chiamati CTD (connective tissue disease) screen, sono stati sviluppati su sistemi chiusi completamente automatizzati che utilizzano rispettivamente la metodologia FEIA o CLIA. L'utilizzo di questi metodi diagnostici, entrambi caratterizzati da pannelli antigenici allargati, comprendenti i 15-16 autoantigeni più frequentemente associati alle connettiviti, ha riaperto la discussione verso un nuovo approccio metodologico per la ricerca degli ANA.²³⁻²⁷ Infatti, i nuovi test CTD screen, costituendo l'evoluzione naturale dei tradizionali ENA (antigeni nucleari estraibili) screen, oltre a consentire l'individuazione di un maggior numero di specificità autoantidipali ANA, si contraddistinguono per le elevate performance analitiche e garantiscono risultati obiettivi e quantitativi in tempi rapidi.^{16, 28} Per l'insieme delle loro caratteristiche, i test CTD screen rappresentano più di una suggestione nella individuazione di un test alternativo alla IFI per la ricerca degli ANA, soprattutto nelle realtà dove emergono marcate esigenze di produttività e di efficienza, come i grandi laboratori clinici, sempre più diffusi, nati da processi di consolidamento e impegnati a rispondere alle esigenze diagnostiche di ampi bacini di utenza non selezionata e, quindi, caratterizzati da bassa probabilità pretest per le MRA.^{29, 30}

Risultati significativi per la nostra realtà nazionale sono quelli ottenuti nel 2018 da uno studio multicentrico real-life condotto dal GdS-AI SIPMeL.³¹ Esaminando oltre 5.000 campioni raccolti in 15 centri italiani, Bizzaro *et al.*,

nel confrontare l'accuratezza diagnostica della ANA-IFI rispetto ai due test CTD screen, FEIA e CLIA, non evidenziavano alcuna differenza significativa tra le prestazioni delle due metodiche "alternative" e confermavano la maggiore specificità (98% vs. 64,6%) e la minore sensibilità (87,1% vs. 89,2%) dei test immunometrici in fase solida rispetto all'IFI. Lo stesso studio del GdS-AI, allo scopo di valutare il valore aggiunto dell'implementazione nella routine di laboratorio di un nuovo algoritmo per lo screening degli ANA basato sulla esecuzione combinata di ANA-IFI e CTD screen, ha evidenziato come la sensibilità dei due test combinati ANA-IFI + CTD Screen passava dall'89% al 97% e la specificità dal 65% al 98% rispetto al tradizionale approccio basato sulla esecuzione della sola metodica ANA-IFI.

In una recente revisione sistematica degli studi che confrontavano l'accuratezza diagnostica (sensibilità, specificità ed efficienza) dei test CTD screen con quelli IFI sia in gruppi selezionati di pazienti affetti da malattie

TABELLA II.—I metodi analitici con le migliori prestazioni nelle diverse malattie reumatiche autoimmuni associate agli ANA, secondo i diversi studi.

Autore/anno	LES	SJS	SSc	MIA
Op de Beeck (2011) ¹⁶	SPA	SPA	IFI	SPA
Robier (2015) ³²	IFI	SPA	IFI	-
Bentow (2015) ^{24 *}	IFI	SPA	SPA	-
Otten (2016) ²⁵	IFI	SPA	Uguale	IFI
van der Pol (2018) ^{26 †}	SPA	SPA	Uguale	Uguale
Claessens (2018) ^{27 *†}	IFI	SPA	Uguale	SPA
Bizzaro (2018) ^{32†}	IFI	SPA	IFI	SPA

MIA: miopatie infiammatorie autoimmuni; ANA: anticorpi antinucleo; LES: lupus eritematoso sistemico; SSc: sclerosi sistemica; SJS: sindrome di Sjögren.
*In questo studio, la lettura dei preparati ANA-IFI è stata effettuata con un sistema computer-assistito (Nova View, Inova Diagnostics); †questi studi confrontano IFI con due metodologie SPA (chemiluminescenza e fluorimmunoenzimatica); i risultati ottenuti con le metodologie SPA sono cumulati.

TABELLA I.—Accuratezza diagnostica ed efficienza complessiva (percentuale di MRA correttamente classificate) del metodo IFI (immuno fluorescenza indiretta) per la ricerca degli ANA rispetto ai saggi immunometrici in fase solida (SPA).

Autore/anno	Sensibilità %		Specificità %		Efficienza %	
	ANA-IFI	SPA	ANA-IFI	SPA	ANA-IFI	SPA
Op de Beeck (2011) ¹⁶	87.2	73.0	86.3	96.9	86.6	88.6
Robier (2015) ³²	98.7	82.7	85.8	98.2	81.1	90.7
Bentow (2015) ^{24 *}	84.8	78.1	64.7	94.1	81.0	86.6
Otten (2016) ²⁵	81.7	78.9	88.6	95.1	72.8	77.1
van der Pol (2018) ^{26 †}	90.0	95.1	76.0	80.0	78.9	83.4
Claessens (2018) ^{27 *†}	95.2	83.1	61.0	92.9	69.8	89.1
Bizzaro (2018) ^{32†}	89.2	87.1	64.6	98.0	69.9	96.0

MIA: miopatie infiammatorie autoimmuni; ANA: anticorpi antinucleo; LES: lupus eritematoso sistemico; SSc: sclerosi sistemica; SJS: sindrome di Sjögren.
*In questo studio, la lettura dei preparati ANA-IFI è stata effettuata con un sistema computer-assistito (Nova View, Inova Diagnostics); †questi studi confrontano IFI con due metodologie SPA (chemiluminescenza e fluorimmunoenzimatica); i risultati ottenuti con le metodologie SPA sono cumulati.

autoimmuni reumatiche che nella routine quotidiana si è dimostrato che l'IFI ha una sensibilità più elevata ma una specificità inferiore rispetto ai test CTD screen (Tabella I, II),^{16, 24-27, 32, 33} Tuttavia, quando questi dati sono stati analizzati con l'uso delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic) è risultato evidente che, a pari valori di specificità, anche la sensibilità diagnostica dei metodi in fase solida risulta superiore a quella dell'IFI. Tuttavia, in relazione alle singole connettiviti è importante osservare che le due tecnologie analitiche a confronto mostrano diversa accuratezza diagnostica. Dagli studi inclusi nella revisione sistematica è emerso che l'IFI risulta leggermente superiore a FEIA e CLIA nella identificazione di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) e sclerodermia, mentre i metodi immunometrici in fase solida garantiscono risultati più accurati nella diagnosi della sindrome di Sjögren e delle miositi infiammatorie autoimmuni. Quindi, nessuno dei due metodi (IFI e CTD screen) da solo era in grado di identificare tutti i pazienti affetti da MRA.

In una metanalisi recentemente pubblicata, sono stati esaminati i dati ottenuti da 18 studi (18.889 risultati di test) eseguiti dal 2010 al 2018.³⁴ Due erano gli obiettivi della metanalisi: 1) il confronto tra le metodologie analitiche IFI e FEIA per lo screening degli ANA; 2) la valutazione dell'accuratezza diagnostica dell'approccio combinato ANA-IFI e FEIA nella ricerca degli ANA rispetto a quello impostato su una singola metodologia analitica. L'insieme di tutti i dati raccolti conferma che la sensibilità di FEIA è inferiore a quella di IFI e che FEIA mostra una maggiore specificità rispetto a IFI, sia alla diluizione di cut-off di 1/80 che a quella di 1/160. Relativamente alle singole connettiviti la metanalisi non mostra alcuna significativa differenza tra le diverse metodiche analitiche nella diagnosi di LES, sindrome di Sjögren, miositi infiammatorie autoimmuni e malattia mista del connettivo ($P > 0.05$). La sensibilità di IFI risultava invece significativamente più alta rispetto a quella di FEIA solo nei pazienti affetti da sclerosi sistemica ($P < 0.001$).

Per quanto riguarda la valutazione dei possibili vantaggi derivanti dall'uso combinato di FEIA e ANA-IFI nello screening iniziale degli ANA, emerge che in presenza di un doppio risultato negativo ANA-IFI e FEIA la probabilità di connettivite è estremamente bassa (<1%) e che un doppio risultato positivo ANA-IFI e FEIA è associato a un rapporto di verosimiglianza significativamente più alto per connettivite rispetto alla positività di un singolo test.³⁵ In sintesi, risultati concordanti delle due metodiche analitiche classificano correttamente la stra-

grande maggioranza (96,8%) degli individui esaminati, riducendo in modo significativo il numero di falsi negativi e di falsi positivi, confermando quanto riportato anche da altri studi.^{32, 33, 36}

Un'apertura verso l'uso di tecnologie analitiche diverse dall'IFI è stata inserita anche nelle più recenti raccomandazioni internazionali. Nel 2019 sono stati infatti definiti, congiuntamente da ACR e da European League Against Rheumatism (EULAR), i nuovi criteri di classificazione per il LES che includono come criterio iniziale e obbligatorio un risultato ANA positivo almeno in una occasione. È interessante rilevare che nello stesso documento, relativamente ai requisiti tecnici indispensabili, si raccomanda l'utilizzo del test IFI su cellule HEP-2 per la ricerca degli ANA (il test è positivo a un titolo $\geq 1: 80$) o di un test immunometrico in fase solida caratterizzato da prestazioni diagnostiche equivalenti a quelle del test IFI.³⁷ Tuttavia, come già evidenziato da alcuni autori,^{38, 39} il significato di equivalente è ambiguo e può ingenerare confusione negli utilizzatori dando adito all'utilizzo arbitrario di metodi ad elevata sensibilità ma insufficiente specificità.

Alla luce di quanto esposto, l'introduzione dei nuovi test immunometrici in fase solida (FEIA e CLIA), denominati CTD screen, ha mutato lo scenario di conoscenze ed evidenze scientifiche all'interno del quale erano state elaborate le nostre ultime linee guida e ci spinge oggi a rivedere il contenuto di esse. In particolare, la raccomandazione relativa al quesito 2e che testualmente recitava: "Per la ricerca degli ANA si raccomanda l'utilizzo della metodologia di immunofluorescenza indiretta, usando cellule HEP-2 come substrato, in quanto le procedure analitiche alternative (ELISA, MBA, CLIA, FEIA, ALBIA ecc.), non sono al momento in possesso di analoga sensibilità diagnostica" va sostituita con il seguente testo: "Per la ricerca degli ANA si raccomanda l'utilizzo della metodologia di immunofluorescenza indiretta, usando cellule HEP-2 come substrato, associata a test immunometrici in fase solida caratterizzati dalla presenza di non meno di 15-16 specificità antigeniche intracellulari correlate alle principali malattie autoimmuni reumatiche sistemiche. Altre procedure analitiche immunometriche in fase solida (caratterizzate da un numero minore di antigeni specifici), non sono in possesso di sufficiente sensibilità diagnostica. Per la ricerca degli ANA, l'uso combinato di metodologia IFI e immunometrica in fase solida classifica correttamente gran parte della popolazione esaminata".

Qualità globale delle evidenze: alta. Forza della raccomandazione: forte.

Bibliografia

1. Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950;91:1–13.
2. Friou GJ. Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using the fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957;36:890–3.
3. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, *et al.* International recommendations for the assessment of auto-antibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17–23.
4. Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples. *Clin Chem* 2005;51:2426–7.
5. Mahler M, Ngo JT, Schulte-Pelkum J, Luettich T, Fritzler MJ. Limited reliability of the indirect immunofluorescence technique for the detection of anti-Rib-P antibodies. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R131.
6. Infantino M, Meacci F, Grossi V, Manfredi M, Benucci M, Merone M, *et al.* The burden of the variability introduced by the HEP-2 assay kit and the CAD system in ANA indirect immunofluorescence test. *Immunol Res* 2017;65:345–54.
7. Rigon A, Infantino M, Merone M, Iannello G, Tincani A, Cavazzana I, *et al.* The inter-observer reading variability in anti-nuclear antibodies indirect (ANA) immunofluorescence test: A multicenter evaluation and a review of the literature. *Autoimmun Rev* 2017;16:1224–9.
8. Mahler M. Lack of standardisation of ANA and implications for drug development and precision medicine. *Ann Rheum Dis* 2019;78:e33.
9. Infantino M, Manfredi M, Soda P, Merone M, Afeltra A, Rigon A. ANA testing in 'real life'. *Ann Rheum Dis* 2020;79:e3.
10. Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassetti D, Pesente F, *et al.*; Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Laboratory Medicine, Italy. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmun Rev* 2014;13:292–8.
11. Daves M, Blecken J, Matthias T, Frey A, Perkmann V, Dall'Acqua A, *et al.* New automated indirect immunofluorescent antinuclear antibody testing compares well with established manual immunofluorescent screening and titration for antinuclear antibody on HEP-2 cell. *Immunol Res* 2017;65:370–4.
12. Chan EK, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PL, *et al.* Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus* 2016;25:797–804.
13. Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, *et al.* International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto Immun Highlights* 2016;7:1.
14. Nossent H, Rekvig OP. Antinuclear antibody screening in this new millennium: farewell to the microscope? *Scand J Rheumatol* 2001;30:123–6, discussion 127–8.
15. Fritzler MJ. The antinuclear antibody test: last or lasting gasp? *Arthritis Rheum* 2011;63:19–22.
16. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, *et al.* Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev* 2011;10:801–8.
17. Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?—the routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab* 2007;53:183–91.
18. López-Hoyos M, Rodriguez-Valverde V, Martinez-Taboada V. Performance of antinuclear antibody connective tissue disease screen. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:322–9.
19. Ghillani P, Rouquette AM, Desgruelles C, Hauguel N, Le Pendeven C, Piette JC, *et al.* Evaluation of the LIAISON ANA screen assay for antinuclear antibody testing in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:407–13.
20. Tonutti E, Bassetti D, Piazza A, Visentini D, Poletto M, Bassetto F, *et al.* Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity* 2004;37:171–6.
21. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1420–2.
22. Cinquanta L, Bizzaro N, Villalta D, Morozzi G, Tonutti E, Bagnasco M, *et al.*; per il Gruppo di Studio in Autoimmunologia della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio. Linee guida per l'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche sistemiche. Revisione 2015. *Riv Ital Med Lab* 2015;11:205–24.
23. Bossuyt X, Fieueus S. Detection of antinuclear antibodies: added value of solid phase assay? *Ann Rheum Dis* 2014;73:e10.
24. Bentow C, Lakos G, Rosenblum R, Bryant C, Seaman A, Mahler M. Clinical performance evaluation of a novel, automated chemiluminescent immunoassay, QUANTA Flash CTD Screen Plus. *Immunol Res* 2015;61:110–6.
25. Otten HG, Brummelhuis WJ, Fritsch-Stork R, Leavis HL, Wisse BW, van Laar JM, *et al.* Measurement of antinuclear antibodies and their fine specificities: time for a change in strategy? *Clin Exp Rheumatol* 2017;35:462–70.
26. van der Pol P, Bakker-Jonges LE, Kuijpers JH, Schreurs MW. Analytical and clinical comparison of two fully automated immunoassay systems for the detection of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Chim Acta* 2018;476:154–9.
27. Claessens J, Belmondo T, De Langhe E, Westhovens R, Poesen K, Hüe S, *et al.* Solid phase assays versus automated indirect immunofluorescence for detection of antinuclear antibodies. *Autoimmun Rev* 2018;17:533–40.
28. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto Immun Highlights* 2017;8:9.
29. Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D, Bizzaro N. Automation, consolidation, and integration in autoimmune diagnostics. *Auto Immun Highlights* 2015;6:1–6.
30. Pérez D, Gilburd B, Azoulay D, Shovman O, Bizzaro N, Shoenfeld Y. Antinuclear antibodies: is the indirect immunofluorescence still the gold standard or should be replaced by solid phase assays? *Autoimmun Rev* 2018;17:548–52.
31. Bizzaro N, Brusca I, Previtali G, Alessio MG, Daves M, Platzgummer S, *et al.* The association of solid-phase assays to immunofluorescence increases the diagnostic accuracy for ANA screening in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2018;17:541–7.
32. Bizzaro N. Can solid-phase assays replace immunofluorescence for ANA screening? *Ann Rheum Dis* 2018;pii:annrheumdis-2018-214805.
33. Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay versus indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018;32:521–34.
34. Bossuyt X, Claessens J, De Langhe E, Belmondo T, Westhovens R, Hue S, *et al.* Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and solid phase assays. *Ann Rheum Dis* 2019;pii:annrheumdis-2019-215443.
35. Meroni PL, Chan EK, Damoiseaux J, Andrade LE, Bossuyt X, Conrad K, *et al.*; members of the committees. Unending story of the indirect immunofluorescence assay on HEP-2 cells: old problems and new solutions? *Ann Rheum Dis* 2019;78:e46.
36. Robier C, Amouzadeh-Ghadikolai O, Stettin M, Reich G. Comparison of the Clinical Utility in the Detection of Anti-Nuclear Antibodies Between the Elia CTD Screen and Indirect Immunofluorescence on Hep-2 Cells: A Review of the Literature. *Isr Med Assoc J* 2018;20:700–2.

37. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2019;71:1400-12.

38. Pisetsky DS, Bossuyt X, Meroni PL. ANA as an entry criterion for the classification of SLE. *Autoimmun Rev* 2019;18:102400.

39. Infantino M, Manfredi M, Bizzaro N; *Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine*. European League against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus: the laboratory immunologist's point of view. *Ann Rheum Dis* 2019;pii:anrheumdis-2019-216591.

Conflitti di interesse.—Nicola Bizzaro ha percepito compensi per attività di consulenza dalla ditta Werfen. Gli altri autori dichiarano di non avere conflitti di interesse con alcuna ditta legata al contenuto del manoscritto.

Studi condotti su esseri umani e animali.—Per questo tipo di studio non è richiesto l'inserimento di alcuna dichiarazione relativa agli studi effettuati su esseri umani e animali.

Consenso informato.—Per questo tipo di studio non è richiesto il consenso informato.

Publicato online: 16 dicembre 2019. - Accettato: 13 dicembre 2019. - Ricevuto 12 dicembre 2019.