

Affidabilità del metodo ELISA come test alternativo al metodo di immunofluorescenza indiretta nella determinazione degli anticorpi antinucleo. Valutazione di 5 kit commerciali

E. Tonutti^a, D. Bassetti^b, A. Piazza^c, D. Visentini^a, M. Poletto^a, F. Bassetto^c, P. Caciagli^b, D. Villalta^d, R. Tozzoli^e, N. Bizzaro^f

^aLaboratorio Analisi Cliniche, Ospedale S. Maria della Misericordia, Udine

^bLaboratorio di Microbiologia e Immunologia, Ospedale di Trento

^cLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico, Padova

^dServizio di Immunologia Clinica e Virologia, Ospedale S. Maria degli Angeli, Pordenone

^eLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Latisana (Udine)

^fLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di S. Donà di Piave (Venezia)

Premessa: La ricerca degli anticorpi anti-nucleo (ANA) è un test di laboratorio fondamentale per l'inquadramento diagnostico delle malattie autoimmuni sistemiche. Il metodo di elezione è attualmente l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su un substrato di cellule HEp-2. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'affidabilità diagnostica di 5 kit immunoenzimatici (EIA) commerciali per la ricerca degli ANA e di verificarne il possibile utilizzo in alternativa al metodo IFI.

Metodi: Sono stati studiati 1513 pazienti: in 315 è stata posta diagnosi di malattia autoimmune sistemica e in 1198 una patologia autoimmune è stata esclusa. Su tutti i sieri è stata eseguita la ricerca degli ANA in IFI e con 5 diversi kit EIA. I risultati sono stati valutati in rapporto alla diagnosi clinica e alla presenza di eventuali specificità autoanticorpali (anti-ENA o anti-dsDNA), e infine comparati con quelli ottenuti con il metodo ANA-IFI di riferimento.

Risultati: La positività del test ANA-IFI in soggetti con malattie autoimmuni sistemiche è stata del 92%, mentre nei 5 kit ANA-EIA si è evidenziata una ampia diversità di risposta con percentuali di positività

variabili dal 74% al 94%. Tutti i kit EIA hanno correttamente rilevato la presenza di anticorpi (anti-dsDNA, anti-RNP, anti-Ro/SSA) responsabili di quadri di fluorescenza omogenea e granulare, ma dimostrato anche una sostanziale difficoltà in presenza del pattern nucleolare, con una sensibilità media in questo caso attorno al 50%. Molto diverso da kit a kit è invece stato il comportamento nell'identificare il pattern anti-Scl70 per il quale si sono osservate sensibilità variabili dal 45% al 91%, e quello centromerico, con differenze comprese tra il 49 e il 100%.

Conclusioni: I risultati ottenuti dimostrano che i kit ANA-EIA presenti in commercio evidenziano differenti livelli di sensibilità e di specificità. Alcuni di questi sono caratterizzati da un livello di accuratezza diagnostica analogo e talvolta superiore a quello del metodo IFI e potrebbero perciò essere impiegati come metodo di screening alternativo all'IFI; altri invece non garantiscono risultati accettabili. Per tale motivo, un'attenta valutazione dei vari kit disponibili in commercio è consigliabile prima di inserire nel percorso clinico-diagnostico uno di questi metodi.

Background: Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence, for the detection of anti-nuclear antibodies. Evaluation of 5 commercial kits
Detection of antinuclear antibodies (ANA) is a fun-

damental laboratory test for diagnosing systemic autoimmune diseases. Currently, the method of choice is indirect immunofluorescence (IIF) on a HEp-2 cell substrate. The goal of this study was to evaluate the diagnostic accuracy of five commercially availa-

ble enzyme immunoassay (EIA) kits for ANA detection and to verify the possibility of using them as an alternative to the IIF method.

Methods: The study involved 1513 patients, 315 of whom were diagnosed with a systemic autoimmune disease and 1198 in whom an autoimmune disorder was excluded. For all sera, ANA detection was performed via IIF and with five different EIA kits. The results were evaluated in relation to clinical diagnosis and the presence of possible specific autoantibodies (anti-ENA or anti-dsDNA); lastly, they were compared with the results obtained using ANA-IIF as the method of reference.

Results: The positive rate of the ANA-IIF test in subjects with systemic autoimmune diseases was 92%, whereas in the five ANA-EIA kits there was broad diversity in terms of response, with positive rates ranging from 74% to 94%. All the EIA kits correctly detected the presence of antibodies (anti-dsDNA, anti-RNP, anti-Ro/SSA) responsible for homogeneous and speckled fluorescence pattern, but at

the same time they showed substantial inaccuracy with the nucleolar pattern, with a mean sensitivity of approximately 50% in this case. Instead, there was a large kit-to-kit difference in terms of identification of anti-Scl70 and centromere patterns, for which sensitivities ranged between 45% and 91%, and between 49% and 100% respectively.

Conclusions: The results of the study demonstrate that the commercially available ANA-EIA kits show different levels of sensitivity and specificity. Some of them have a diagnostic accuracy that is comparable and, in some cases, even higher than the IIF method. Consequently, these could be used as an alternative screening test to IIF. However, others do not ensure acceptable results. Therefore, careful evaluation of the various kits on the market is advisable before including any of these methods in the clinical and diagnostic testing.

Key words: ANA, ELISA, connective tissue diseases, sensitivity, specificity.

Introduzione

La determinazione degli anticorpi anti-nucleo (ANA) è un test di laboratorio essenziale per la diagnosi di numerose patologie sistemiche del connettivo quali la sclerodermia (SSc), la sindrome di Sjögren (SS), la polimiosite (PM) e il lupus eritematoso sistemico (LES)^{1,2}. Tale determinazione viene generalmente effettuata con la metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando come substrato linee di cellule HEP-2³. Tuttavia, l'affidabilità di questo metodo è limitata dalla notevole variabilità interlaboratorio dei risultati dovuta alla procedura di esecuzione e alla soggettività d'interpretazione, quest'ultima strettamente legata all'esperienza dell'osservatore. Per questi motivi, negli ultimi anni numerose aziende hanno sviluppato test immunoenzimatici (EIA) alternativi all'IFI che utilizzano diverse metodologie di preparazione del substrato antigenico e per questo presentano diversi gradi di sensibilità e specificità⁴⁻⁹.

Obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare su una ampia casistica l'affidabilità analitica di 5 metodi ANA-EIA che utilizzano procedure diverse di preparazione del coating. I risultati ottenuti sono stati valutati in rapporto alla diagnosi clinica, in rapporto alla presenza di eventuali specificità autoanticorpali (anti-ENA o anti-dsDNA), e infine comparati con quelli ottenuti con il metodo ANA-IFI di riferimento.

Materiali e Metodi

Pazienti

Lo studio è stato condotto su 1513 pazienti consecutivi, inviati da medici specialisti o di medicina

generale ai servizi di Medicina di Laboratorio degli Ospedali di Udine, Trento e Padova Geriatrico, per l'esecuzione di indagini autoanticorpali con il sospetto clinico di malattia autoimmune sistemica (MAIS). Una parte di questi pazienti aveva una diagnosi già definita di MAIS, e una parte veniva studiata per la prima volta. Su tutti i sieri è stata eseguita la ricerca degli ANA con metodo IFI e, in caso di positività del test o di indicazioni cliniche specifiche, la successiva ricerca di anticorpi anti-ENA e anti-dsDNA. I dati clinici e di laboratorio di tutti i pazienti sono stati quindi valutati da specialisti reumatologi e una diagnosi di MAIS secondo i criteri internazionali¹⁰⁻¹⁵ è stata posta o confermata in 315 pazienti, di cui 115 LES, 61 SS, 8 connettiviti miste (MCTD), 30 sclerosi sistemiche con forma limitata (lcSSc), 16 sclerosi sistemiche con forma diffusa (dcSSc), 8 connettiviti indifferenziate (UCTD), 44 artriti reumatoidi (AR), 31 fenomeno di Raynaud isolato, e 2 PM. Nei rimanenti 1198 pazienti, una patologia autoimmune sistemica è stata esclusa oppure non confermata in assenza di un numero sufficiente dei rispettivi criteri diagnostico-classificativi.

Determinazione di ANA-IFI, anti-ENA e anti-dsDNA

Il test ANA in IFI è stato eseguito utilizzando un substrato di cellule HEP-2 (Kallestad-Sanofi Pasteur, Mornes-La-Coquette, Francia), con diluizione iniziale 1:40 e con coniugato fluorescinato anti-IgG umane. Sui campioni positivi è stato identificato il pattern di fluorescenza e, con diluizioni successive, il titolo anticorpale. I sieri ANA positivi sono stati quindi analizzati per la ricerca di anticorpi anti-dsDNA (Diastat anti-dsDNA, Bouty, Milano) e per anti-ENA (Ro/SSA, La/SSB, Sm, RNP, Scl70,

Jo1) (ENA profile, Bouty). I sieri sono stati quindi suddivisi in 5 aliquote e congelati a -20 °C per la successiva valutazione con i metodi ANA-EIA.

Determinazione di ANA-EIA

La ricerca degli ANA con metodo EIA è stata eseguita con 5 kit commerciali che utilizzano diverse metodologie nella preparazione del substrato antigenico e del coating e diverse procedure di dosaggio:

- Kit 1: ANA-micropiastre EIA (Sanofi Pasteur). Il kit utilizza come substrato antigenico un estratto nucleare di HEp-2 altamente purificato, e come coniugato un anticorpo monoclonale anti IgG e IgM umane marcato con fosfatasi alcalina.
- Kit 2: ANA-EIA well (Imtec Immunodiagnostika, Berlino, Germania). Il kit utilizza come substrato antigenico nuclei di cellule HeLa adesivi alla superficie dei pozzetti e come coniugato anticorpi anti-IgG e anti-IgM umane, marcati con perossidasi.
- Kit 3: EIAgen ANA-screening (Biochem ImmunoSystem, Bologna). Il kit utilizza un estratto purificato di nuclei di HEp-2 e per coniugato un anticorpo monoclonale anti-IgG umane marcato con perossidasi.
- Kit 4: EL-ANA screen (DiaSorin, Saluggia, VC). Il test prevede l'incubazione di ciascun siero in due pozzetti di diverse micropiastre: una contenente un'estratto nucleare di cellule HEp-2, la seconda costituita da un coat di 4 antigeni purificati: Jo1, SSA/Ro, SSB/La, ssDNA. La seconda incubazione prevede l'utilizzo di un anticorpo anti IgG umane marcato con perossidasi.
- Kit 5: QUANTA LITE ANA ELISA (Inova Diagnostics, San Diego, CA). Il kit utilizza antigeni purificati di nuclei e nucleoli estratti da cellule HEp-2, addizionati con antigeni altamente purificati: ds-DNA, istoni, Sm, RNP, Ro/SSA, La/SSB, Scl70, centromero, Jo1, proteina-P ribosomiale, PCNA e mitocondri (M2). La seconda incubazione prevede l'utilizzo di un anticorpo anti-IgG umane marcato con perossidasi.

I sieri sono stati identificati come positivi o negativi in base ai livelli di cut-off proposti da ciascuna ditta produttrice dei test EIA. Sensibilità e specificità dei metodi IFI ed EIA sono state calcolate valutando per ciascun metodo la percentuale di positivi nei soggetti con diagnosi di MAIS e la percentuale di negativi nei soggetti in cui è stata esclusa una MAIS. I sieri sono stati scongelati una sola volta.

Risultati

Correlazione tra ANA-IFI, ANA-EIA e diagnosi clinica.

Nei 240 pazienti con MAIS (44 pazienti con AR e 31 con fenomeno di Raynaud sono stati esclusi dall'analisi statistica in quanto queste due patologie non sono caratterizzate da una significativa presenza di ANA) la percentuale di positività del test IFI è stata del 92%; la sensibilità dei 5 kit ANA-EIA è

risultata variabile, con percentuali comprese tra il 74 e il 94% (Tab. I).

I 240 pazienti con MAIS sono stati ulteriormente suddivisi in ANA-IFI positivi (n. 220) e in ANA-IFI negativi (n. 20). Nei 220 ANA-IFI positivi le percentuali di positività dei diversi kit ANA-EIA sono state rispettivamente del 93%, 94%, 78%, 97%, e 92%, e del 33%, 67%, 25%, 54%, 39% nei 20 pazienti ANA-IFI negativi (Tab. II).

Le performances dei test EIA nei soggetti con MAIS suddivisi per patologia (LES, SS, MCTD, lcSSc e dcSSc) sono risultate eccellenti e in alcuni casi superiori allo stesso test ANA-IFI. Il solo kit 3 è risultato scarsamente sensibile in tutti i gruppi considerati (Tab. III). Per quanto riguarda la correlazione tra positività del test EIA e il titolo anticorpale in IFI, nei 206 soggetti con MAIS che presentavano un titolo $\geq 1:160$, le percentuali di positività dei 5 kit EIA sono state rispettivamente del 95%, 95%, 81%, 98%, e 94%, mentre nei 14 soggetti con MAIS e titolo $< 1:160$ sono state del 62%, 94%, 50%, 87%, e 64% (Tab. IV). Nei 1198 pazienti in cui è stata esclusa una patologia autoimmune sistemica, le percentuali di positivi-

Tabella I. Percentuale di positività del test ANA-IFI e dei 5 kit ANA-EIA nei pazienti con MAIS e nei pazienti in cui è stata esclusa una patologia autoimmune sistemica (• dall'analisi statistica sono stati esclusi 44 pazienti con artrite reumatoide e 31 pazienti con Raynaud isolato).

Diagnosi	n.	IFI %	Kit 1 %	Kit 2 %	Kit 3 %	Kit 4 %	Kit 5 %
MAIS •	240	92	88	93	74	94	88
Non MAIS	1198	25	34	44	21	46	22

Tabella II. Percentuale di positività dei 5 kit ANA-EIA nei soggetti con MAIS ANA-IFI positivi e ANA-IFI negativi.

	n.	Kit 1 %	Kit 2 %	Kit 3 %	Kit 4 %	Kit 5 %
MAIS ANA-IFI pos	220	93	94	78	97	92
MAIS ANA-IFI neg	20	33	67	25	54	39

Tabella III. Percentuale di positività del test ANA-IFI e dei kit ANA-EIA nei sieri di soggetti con MAIS suddivisi per patologia.

Patologia	n.	IFI %	Kit 1 %	Kit 2 %	Kit 3 %	Kit 4 %	Kit 5 %
LES	115	95	87	94	79	94	87
SS	61	84	87	93	80	93	88
MCTD	8	100	100	100	87	100	100
lcSSc	30	97	100	90	47	93	100
dcSSc	16	100	94	100	69	100	87
AR	44	67	56	50	41	63	42
Raynaud	31	45	45	45	45	58	50
UCTD	8	87	75	62	75	87	75
PM	2	0	50	100	50	50	50

Tabella IV. Percentuale di positività dei 5 kit ANA-EIA in rapporto al titolo anticorpale ottenuto col metodo IFI.

Pazienti	n.	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4	Kit 5
		%	%	%	%	%
MAIS titolo \geq 1:160	206	95	95	81	98	94
MAIS titolo <1:160	14	62	94	50	87	64

tà del test ANA-IFI e dei 5 kit ANA-EIA sono state rispettivamente del 25% e del 34%, 44%, 21%, 46% e 22% (Tab. I).

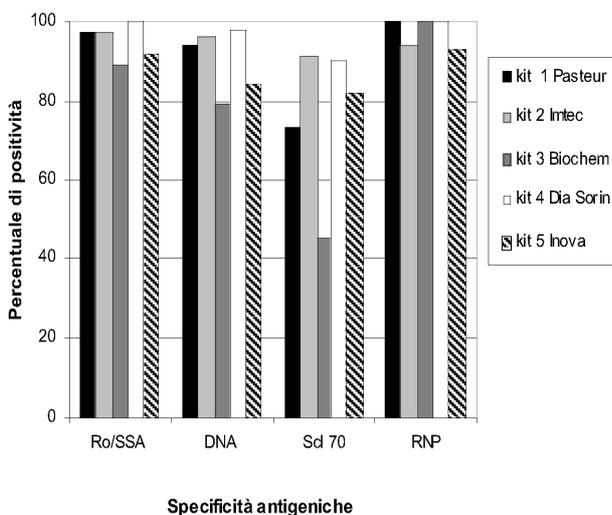
Correlazione tra ANA-EIA e specificità anticorpali.

La capacità dei 5 test ANA-EIA di identificare le singole specificità autoanticorpali è risultata più che soddisfacente per almeno 4 dei 5 kit utilizzati nel nostro studio. Nei 64 sierosi con specificità per Ro/SSA abbiamo evidenziato una positività rispettivamente del 97%, 97%, 89%, 100% e 92%; nei 47 sierosi con reattività per anti-dsDNA del 94%, 96%, 79%, 98% e 84%; negli 11 sierosi anti-Scl70 positivi la sensibilità è stata del 73%, 91%, 45%, 90% e 82%. Nei 16 sierosi positivi per anti-RNP la risposta è stata del 100%, 94%, 100%, 100% e 93% (Fig.1). La scarsa numerosità di sierosi con specificità per Jo-1 (1 siero), La/SSB (1 siero) e Sm (2 sierosi) non ci ha permesso di valutare le performance analitiche dei 5 kit ANA-EIA per questi anticorpi.

Infine, appaiono particolarmente interessanti i risultati ottenuti dai 5 kit ANA-EIA in 11 sierosi risultati ANA-IFI negativi ma anti-ENA positivi (8 per Ro/SSA, 2 per Scl70 e 1 siero ENA-screening positivo ad alto titolo in cui non è stata identificata la specificità), in cui la percentuale di positività è stata rispettivamente del 64%, 82%, 45%, 91% e 54% (Tab. V).

Correlazione tra ANA-EIA e pattern di fluorescenza.

La sensibilità dei 5 kit ANA-EIA presenta un'ampia variabilità in relazione al pattern evidenziato in IFI

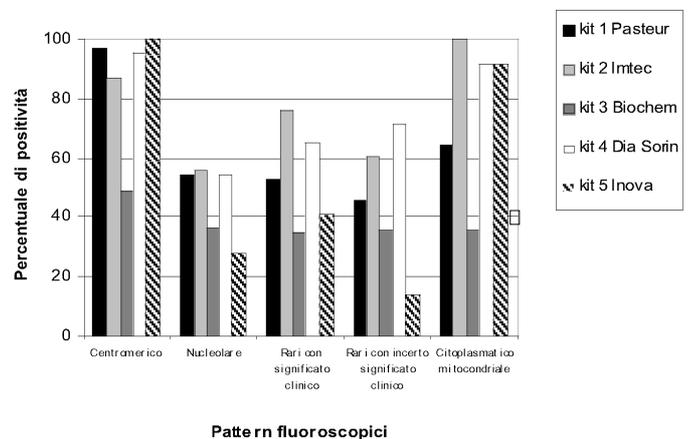
Figura 1. Sensibilità dei 5 kit ANA-EIA nei sierosi caratterizzati da singola specificità autoanticorpale.**Tabella V.** Percentuale di positività dei 5 kit ANA-EIA nei campioni ANA-IFI negativi anti-ENA positivi (8 Ro/SSA, 2 Scl70, e 1 ENA screening positivo ad alto titolo in cui non è stata identificata la specificità).

Pazienti	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4	Kit 5
ANA-IFI negativi/ ENA positivi (n. 11)	64%	82%	45%	91%	54%

(Fig.2). Nei pattern di più frequente riscontro, come l'omogeneo e il granulare, la sensibilità dei metodi EIA è stata uniformemente molto buona quando tale positività era determinata dalla presenza di anticorpi anti-dsDNA, anti-Ro/SSA e anti-RNP. Per quanto riguarda il pattern centromerico, si sono osservate percentuali di positività accettabili (dal 87% al 100%) per i kit 1, 2, 4 e 5, mentre un risultato di gran lunga inferiore si è osservato con il kit 3 che è risultato positivo solo nel 49% dei casi. I sierosi con pattern nucleolare sono quelli che hanno evidenziato i maggiori problemi per i test EIA, con sensibilità analitica rispettivamente nel 54%, 56%, 37%, 54%, e 28%; è d'altra parte importante sottolineare come solo 4 di questi sierosi su un totale di 50 con pattern nucleolare appartenessero a soggetti con MAIS.

Abbiamo inoltre considerato pattern di più raro riscontro suddividendoli in due gruppi: nel primo abbiamo incluso 17 sierosi con pattern a cui viene attribuito una correlazione con le MAIS (11 nuclear dots, 1 lamina nucleare, 1 lamina nucleare e nuclear_dots, 2 P-ribosomiale e 2 PCNA) rispetto ai quali la percentuale di positivi con i 5 kit EIA variava da un minimo del 35% ad un massimo del 76%; nel secondo gruppo abbiamo selezionato 28 sierosi con pattern di fluorescenza a dubbia correlazione clinica (20 matrice nucleare, 4 centriolo, 4 fuso mitotico) nei quali la positività dei 5 kit EIA è stata rispettivamente del 46%, 61%, 36%, 71% e 14%.

Abbiamo infine valutato le performance dei kit EIA

Figura 2. Percentuale di sensibilità dei 5 kit ANA-EIA nei sierosi caratterizzati dai pattern centromerico (n. 39), nucleolare (n. 50), rari con correlazione clinica (11 nuclear dots, 1 lamina nucleare, 1 nuclear dots e lamina nucleare, 2 P-ribosomiale e 2 PCNA), rari con indefinita correlazione clinica (20 matrice nucleare, 4 centriolo, 4 fuso mitotico), e citoplasmatico mitocondriale (n. 11).

in presenza di un pattern anti-mitochondriale, per il quale i kit 2, 4 e 5 hanno ottenuto risultati di positività superiori al 90%.

Discussione

Negli ultimi anni sono apparsi in letteratura numerosi studi di valutazione di metodi EIA per la ricerca di ANA, come possibile alternativa al metodo ANA-IFI¹⁷⁻¹⁹. I risultati di queste valutazioni differiscono tuttavia notevolmente sia per quanto riguarda sensibilità e specificità che per la loro correlazione con il metodo ANA-IFI^{5, 6, 20-22}.

Tali differenze possono derivare da diversi fattori: la casistica selezionata, le diverse metodologie analitiche e la scelta dei livelli di cut-off, sia per i metodi ANA-EIA che per il metodo ANA-IFI^{23,24}.

La ricerca degli ANA è stata introdotta nei primi anni 70 come supporto alla diagnosi delle MAIS e in particolare del LES, per il quale la presenza degli ANA costituisce uno dei criteri classificativi²⁵. Ne consegue quindi che nella scelta di un test per la ricerca degli ANA deve essere considerata prioritaria la sensibilità diagnostica rispetto a quella analitica. Quest'ultima, caratterizzata da notevole aspecificità, viene infatti troppo spesso enfatizzata in studi sull'accuratezza dei test anticorpali⁶, ma ha invece scarso rilievo pratico.

In questo studio ci siamo posti tre obiettivi: primo, definire i livelli di sensibilità dei metodi ANA-EIA in rapporto alla diagnosi clinica (sensibilità diagnostica); secondo, verificare la capacità dei test ANA-EIA di identificare specificità anticorpali corrispondenti a quadri morfologici ben definiti, evidenziabili con il metodo IFI su cellule HEp-2 (sensibilità analitica); terzo, correlare i risultati ottenuti con i diversi metodi EIA con la specificità (anti-ENA o anti-dsDNA) presente nei sieri in esame.

I risultati hanno evidenziato come su 240 sieri di soggetti con diagnosi definita di MAIS, la sensibilità diagnostica di alcuni metodi ANA-EIA sia del tutto sovrapponibile a quella del test ANA-IFI (93% e 94% dei kit EIA 2 e 4 vs 93% IFI) e perciò in grado di essere utilizzati in alternativa al metodo IFI. È importante sottolineare inoltre che i test ANA-EIA hanno ottenuto significative percentuali di positività anche nei 20 sieri che erano risultati ANA-IFI negativi, confermando perciò che, in alcuni casi, il metodo EIA è dotato di una sensibilità diagnostica superiore all'IFI. È noto infatti che alcuni autoanticorpi diretti contro antigeni ad elevata solubilità o scarsamente rappresentati sui substrati cellulari, come Ro/SSA e Jo-1, risultano essere più facilmente evidenziabili dai test su fase solida^{26,27}. All'interno dei 240 soggetti con MAIS abbiamo inoltre osservato come le patologie che più frequentemente si associano ad una positività antinucleare (LES, SS, MCTD, lcSSc, dcSSc) sono anche quelle maggiormente responsive ai test ANA-EIA; in

particolare, 4 kit su 5 nei 61 sieri di pazienti con SS, e tutti 5 i kit nei 2 pazienti con PM, hanno ottenuto una percentuale di reattività superiore al test ANA-IFI.

Nella valutazione della sensibilità dei test ANA-EIA in rapporto ai dati ottenuti col metodo IFI, è necessario considerare il tipo e la rilevanza clinica del pattern e il titolo anticorpale. Per quanto riguarda i pattern ad elevata correlazione clinica, la sensibilità della maggior parte dei kit ANA-EIA è risultata molto buona per i quadri di fluorescenza omogenea e granulare ed eccellente in presenza di un pattern centromerico (caratterizzato per lo più da livelli anticorpali elevati). Per i pattern a bassa o moderata correlazione clinica (nucleolare, matrice nucleare, etc.) caratterizzati in genere da titoli anticorpali medio-bassi²⁸, la percentuale di reattività è stata invece molto inferiore. Questo dato era tuttavia atteso in quanto è risaputo che positività anti-nucleolo o anti-nucleo a basso titolo sono riscontrabili frequentemente sia in soggetti sani che in soggetti affetti da patologie non autoimmuni²⁹.

Più complessa è stata l'analisi dei risultati nei pattern infrequenti: ci saremmo aspettati infatti un risultato più soddisfacente da parte del kit 5, costituito da un substrato antigenico arricchito con antigeni come PCNA e P-ribosomiale, mentre dobbiamo rimarcare l'eccellente performance dei kit 2 e 4 nei confronti di anticorpi che riconoscono antigeni scarsamente espressi (nuclear dots) o presenti solamente in alcune fasi del ciclo cellulare (fuso mitotico). Da ciò si possono trarre delle conclusioni relative all'utilizzo di diversi substrati antigenici e differenti procedure di coating nei diversi kit: infatti il kit 2 che presenta ottime performance in tutti i diversi livelli di comparazione, utilizza un substrato antigenico particolare e cioè il nucleo intero di cellule HeLa adsorbite al pozzetto, permettendo probabilmente una migliore conservazione degli epitopi conformazionali riconosciuti dagli anticorpi anti-nucleo. La complessità invece del substrato antigenico del kit 5 (numerosi antigeni purificati aggiunti alla miscela di antigeni nucleari) non corrisponde alle aspettative di sensibilità che si potevano a priori presumere in rapporto alla composizione multiantigenica del kit stesso (competizione antigenica? alterazione degli epitopi conformazionali?).

Un ulteriore rilevante aspetto è l'ottimo comportamento dei kit ANA-EIA nell'analisi dei sieri in cui erano presenti singole specificità anti-ENA o anti-dsDNA, la cui identificazione è in grado di fornire importanti informazioni diagnostiche, dal momento che la maggior parte ha prodotto risultati positivi in presenza di tali specificità anticorpali.

I risultati di questo studio suggeriscono infine alcune considerazioni conclusive: non tutti i kit ANA-EIA presenti in commercio hanno gli stessi livelli di sensibilità e specificità e ciò è dovuto verosimilmente al tipo di substrato antigenico, alle modalità di coating e al coniugato utilizzati. Alcuni di questi sono caratterizzati da un livello di accuratezza diagnostica analogo e talvolta superiore a quello del metodo IFI e po-

trebbero perciò essere impiegati come metodo di screening alternativo all'IFI; altri invece non garantiscono risultati accettabili. Pertanto, prima di inserire nel percorso clinico diagnostico uno di questi metodi è sempre necessario procedere ad un'attenta validazione clinica. E' inoltre opportuno che il laboratorista sia a conoscenza del tipo di substrato antigenico e delle procedure di coating utilizzati dal produttore, non dimenticando però che la complessità del substrato antigenico non è una garanzia assoluta di buona performance del test.

L'elevata sensibilità clinica dei metodi EIA suggerisce che nell'algoritmo diagnostico delle MAIS, i test ANA-EIA dovrebbero essere utilizzati come test di primo accesso e il test ANA-IFI come test di conferma dei risultati positivi e per l'identificazione del pattern. Inoltre, in considerazione della superiore sensibilità del metodo EIA rispetto al metodo IFI nell'identificazione degli anticorpi anti-ENA, il risultato negativo del test ANA-EIA consentirebbe di refertare anche la negatività per anti-ENA.

Bibliografia

- Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:316-24.
- Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:71-81.
- NCCLS. Quality Assurance for the Indirect Immunofluorescence Test for Autoantibodies to Nuclear Antigen (IF-ANA); Approved Guideline 1/LA2-A. Wayne, PA: NCCLS; 1996. Vol 16.
- Bayer PM, Bauerfeind S, Bienvenu J, Fabien N, Frei PC, Gilburd B, et al. Multicenter evaluation study on a new HEp2 ANA screening enzyme immune assay. *J Autoimmunity* 1999; 13:89-93.
- Emlen W, O'Neill L. Clinical significance of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1612-8.
- Jaskowski TD, Schroder C, Maertins TB, Mouritsen CL, Litwin CM, Hill HR. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol* 1996; 105:468-73.
- Reisner BS, Di Blasi J, Goel N. Comparison of an enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of antinuclear antibodies. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:503-6.
- Hayashi N, Kawamoto T, Mukai M, Morinobu A, Koshiha M, Kondo S, et al. Detection of antinuclear antibodies by use of an enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: comparison with immunofluorescence assay in 307 patients. *Clin Chem* 2001; 47, 9:1649-59.
- Gonzalez C, Guevara P, Alarcon I, Hernando M, Navajo JA, Gonzalez-Buitrago JM. Antinuclear antibodies (ANA) screening by enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: analytical and clinical evaluation. *Clin Biochem* 2002; 35:463-9.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
- Leroy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15:202-5.
- Alarcon-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 1989; 16:328-34.
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292:344-7.
- Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli AA, Berstein RM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren syndrome: results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340-7.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 31:315-24.
- Humbel RL, Kadusch P. Use of HEp-2 cells in the IF test for detection of antinuclear antibodies. In: Peeters H, ed. *Protides of the Biological Fluids*. New York, NY: Pergamon Press; 1985: 385-7.
- Keren DF. Antinuclear antibody testing. *Clin Lab Med* 2002; 22:447-74.
- Lehmann HP, Fuhling I, Ott C, Hudepohl B, Haass M. HEp-2 ANA EIA: a new fully automated assay for the screen of antinuclear antibodies. *Isr Med Assoc J* 2000; 2:646-8.
- Bossuyt X. Evaluation of two automated enzyme immunoassay for detection of antinuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:1033-7.
- Kumagai S, Hayashi N. Immunofluorescence - still the 'gold standard' in ANA testing? *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 235:77-83.
- Lehmann HP, Block D, Markert-Hahn C, Zolg JW. New concepts in systemic autoimmunity testing. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 235:84-90.
- Rondeel JM, van Gelder W, van del Leeden H, Dinkelaar RB. Different strategies in the laboratory diagnosis of autoimmune disease: immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay or both? *Ann Clin Biochem* 1999; 36:189-95.
- Alem M, Moghadam S, Malki J, Zaidi A, Nayak N, Li TM. Detection of autoantibodies to nuclear antigens by EIA and IF techniques. *Allerg Immunol* 1997; 29:191-4.
- Homburger HA, Cahen YD, Griffiths J, Jacob GL. Detection of antinuclear antibodies: comparative evaluation enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence methods. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:993-9.
- Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725-34.
- Homburger HA. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease. *Mayo Clin Proc* 1995; 70:183-4.
- 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; 5:212-7.
- LeMing H, Nakamura RM. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997; 34: 275-311.
- Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1601-11.