Determinazione quantitativa degli autoanticorpi anti-topoisomerasi e anti-proteina B centromerica (CENP B) mediante l'impiego del sistema analitico automatico ENEA System III

R. Tozzoli[a], A.R. Perosa[a], D. Villalta[b], N. Bizzaro[c], E. Tonutti[d]

[a]*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile, Latisana (Udine)*
[b]*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Immunologia Clinica e Virologia, Az. Ospedaliera, Pordenone*
[c]*Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S. Donà di Piave (Venezia)*
[d]*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Istituto di Chimica Clinica, Azienda Ospedaliera, Udine*

Premessa: Nella diagnosi di sclerodermia rilevante importanza riveste la determinazione degli autoanticorpi specifici, particolarmente anti-topoisomerasi (anti-Topo I) e anti-CENP B.
Scopo del presente lavoro è la valutazione della sensibilità e specificità diagnostiche di un nuovo analizzatore automatico (ENEA System III, BioAllergy, Trieste) nella determinazione quantitativa di questi autoanticorpi in un gruppo di soggetti affetti da sclerodermia.
Materiali e metodi: Sono stati studiati complessivamente 243 pazienti, 39 affetti da sclerodermia e, come controllo, 99 affetti da LES e 104 soggetti sani, i cui campioni di siero sono stati analizzati con il sistema ENEA III.
Risultati:Utilizzando valori soglia di 15 U/mL per anti-CENP B e 20 U/mL per anti-Topo I, determinati con la tecnica delle curve ROC, la sensibilità del metodo è risultata rispettivamente del 100% e del 95.5%, mentre la specificità ha raggiunto rispettivamente il 100% e il 98.5%.
Conclusioni: La determinazione quantitativa mediante curva di calibrazione unica (in U/mL di IgG anti-Ro/SSA) ha consentito: 1) di evidenziare una significativa differenza nella concentrazione autoanticorpale tra soggetti affetti da sclerodermia e non affetti, 2) di dimostrare che nei pazienti affetti da sclerodermia gli anticorpi anti-CENP-B sono presenti a concentrazione elevata e gli anticorpi anti-Topo I a concentrazioni più basse e 3) di affermare l'assoluta specificità diagnostica degli anti-CENP-B e la minore specificità diagnostica degli anticorpi anti-Topo I.
Questa prima esperienza, condotta con un sistema analitico completamente automatico, conferma l'importanza della quantificazione anticorpale nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni sistemiche.

Background: *Quantitative measurement of anti-topoisomerase and anti-centromeric protein B (CENP-B) autoantibodies, using the new automated ENEA System III.*
The detection of specific autoantibodies such as anti-topoisomerase (anti-topo I) and anti-CENP B is very useful for the diagnosis of scleroderma.
This work aimed to evaluate the diagnostic sensitivity and specificity of a new automated analyser (the ENEA System III, BioAllergy, Trieste) for the quantitative measurement of anti-topo I and anti-CENP B autoantibodies in scleroderma patients.
Methods: 243 patients were studied with the ENEA System III: 39 had scleroderma and 203 (99 SLE and 104 healthy subjects) served as control group.
Results: At a cut-off level of 15 U/mL for anti-CENP B and 20 U/mL for anti-topo I, as determined by ROC curve analysis, sensitivity was 100% and 95.5%, and specificity 100% and 98.5%, respectively.
Conclusions: Quantitative autoantibody measurement, expressed as U/mL of anti-Ro/SSA IgG using a single calibration curve, enabled the recognition of several important features: 1) the existence of a significant difference in antibody concentration between scleroderma patients and controls; 2) in scleroderma patients anti-CENP-B antibodies are usually present at high concentration whereas anti-topo I are commonly found at low concentration; 3) the absolute diagnostic specificity of anti-CENP-B antibodies and the lower specificity of anti-topo I antibodies.
The results of this first experience with a new fully automated analyser underline the relevance of quantitative autoantibody measurement in the diagnosis of scleroderma and of connective tissue diseases.

Corrispondenza a: Dott. Renato Tozzoli - Dipartimento dei Servizi, Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Presidio Ospedaliero, Via Sabbionera, 45 – 33053 Latisana (Ud) - Telefono:0431-529318 - Telefax:0431-520478 – E-mail:r.tozzoli@libero.it

Introduzione

La sclerodermia (sclerosi sistemica, SSc) è una malattia infiammatoria del tessuto connettivo, caratterizzata da una vasculopatia del microcircolo arterioso e da un'iperproduzione delle componenti della matrice connettivale, con conseguente fibrosi della cute e degli organi interni.
La diagnosi di SSc è ancora essenzialmente clinica, dato che i criteri classificativi dell'American College of Rheumatology (ACR)[1] non tengono conto del frequente riscontro di autoanticorpi, caratteristicamente presenti in tutte le forme di malattia, la cui evidenziazione si è affermata largamente nei laboratori clinici a partire dai primi anni '80.
Una recente revisione della classificazione della SSc distingue 2 sottogruppi di malattia[2], localizzata e generalizzata (o sistemica), le cui caratteristiche sono da intendersi come i poli estremi di uno spettro continuo; la forma generalizzata, sulla base dell'interessamento cutaneo può essere distinta in limitata (lcSSc) o diffusa (dcSSc)[2-3].
Gli autoanticorpi più frequentemente rilevabili nel siero di pazienti affetti da SSc generalizzata sono distinguibili in 3 classi principali, gli anti-topoisomerasi I (anti-topo I), gli anti-centromero (ACA) e gli anti-RNA polimerasi I,II,III; ciascuno è presente in circa il 25-30% dei pazienti ed è in genere mutuamente esclusivo[4]. In particolare gli ACA sono più frequentemente associati alla forma limitata, mentre gli altri due sono più frequentemente associati alla forma diffusa[5-10].
E' oggi definitivamente accertato che la DNA-topoisomerasi I è l'autoantigene Scl-70 di precedente denominazione[11] e che gli ACA sono diretti prevalentemente contro 3 maggiori polipeptidi CENP A, B, C[12], il più importante dei quali é rappresentato da CENP B[13].
I metodi di laboratorio impiegati per il dosaggio di queste due classi anticorpali sono in progressiva evoluzione tecnologica, con significativo incremento della loro sensibilità e specificità analitica[14,15].
Il ruolo del laboratorio di autoimmunologia è diventato quindi insostituibile nella diagnosi della sclerodermia e nella definizione dei sottogruppi della malattia e nella prognosi[16].
Per lungo tempo la rilevazione degli autoanticorpi nelle MAIS è stata esclusivamente qualitativa (presenza/assenza), date le caratteristiche dei metodi immunologici di prima generazione (immunodiffusione, controimmunoelettroforesi, westernblot, etc). Vi è accordo in letteratura che, con la sola rilevante eccezione degli anticorpi anti-dsDNA nel lupus eritematoso sistemico (LES) e degli anticorpi anti-U_1RNP nella connettivite mista, la determinazione quantitativa autoanticorpale non fornisce informazioni aggiuntive nella diagnosi e nel monitoraggio di tali malattie[17,18], anche se in verità recenti segnalazioni hanno evidenziato come, proprio per gli anticorpi anti-topo I, variazioni dei livelli anticorpali siano associate a variazioni del decorso clinico[19-21].
Per contro sono relativamente poco frequenti le esperienze condotte con l'impiego di metodi di seconda generazione (prevalentemente ELISA o sue varianti) in grado di effettuare la determinazione quantitativa della concentrazione di autoanticorpi nucleari specifici nelle malattie autoimmuni sistemiche[22-24]; tali metodi, ormai sempre più diffusi presso i laboratori clinici e dotati di affidabilità analitica riconosciuta[25], sono ora disponibili su analizzatori automatici, che impiegano nuove tecniche di purificazione degli autoantigeni e curve di calibrazione uniche per i principali anticorpi.
I nuovi metodi per il dosaggio di anti-topo I e ACA presentano una sempre più elevata sensibilità nosologica, anche se la specificità diagnostica non sembra essere assoluta[26], in quanto rilevano basse concentrazioni anticorpali anche in pazienti affetti da altre malattie autoimmuni sistemiche tra cui il LES e l'artrite reumatoide.
La recente introduzione di reattivi specifici su un sistema analitico completamente automatico (ENEA System III), di uso consolidato[27,28], consente la determinazione quantitativa degli autoanticorpi anti-ENA e in particolare degli anticorpi anti-topoisomerasi I e anti-CENP B.
Scopo del presente studio è la valutazione della specificità e della sensibilità diagnostiche del nuovo sistema su un gruppo di soggetti affetti da sclerodermia.

Materiali e metodi

Sono stati studiati complessivamente 243 pazienti, 39 affetti da sclerosi sistemica, con diagnosi clinica definita secondo i criteri internazionali[1,2], 23 dei quali positivi alla ricerca di anticorpi anti-topoisomerasi, e 16 positivi alla ricerca di anticorpi anti-CENP-B, e come controllo, 99 soggetti affetti da LES, classificati secondo i criteri ACR[25] e 104 soggetti sani.
I valori attesi di questi campioni sono stati ottenuti in 3 diversi laboratori e mediante l'impiego di due metodi ELISA e un metodo di immunoblot, completamente concordanti[30,31].
Sui campioni di siero è stato effettuato il dosaggio degli anticorpi anti-ENA, con l'utilizzo del sistema analitico automatico ENEA III (BioAllergy, Fiumicino, Roma) e di camere di reazione (Autoimmune ACE) contenenti un pool di autoantigeni (ENA-screen) e i singoli autoantigeni Ro/SSA, La/SSB, topo I, RNP/Sm, Sm, Jo-1, CENP B.
Il sistema ENEA è costituito da un analizzatore ad automazione totale, che provvede a dispensare i campioni dei pazienti e i reagenti, ad espletare le incubazioni, ad effettuare i lavaggi e le letture fotometriche, ad elaborare i dati analitici e a stampare una scheda paziente completa di tutti i risultati, espressi in termini qualitativi e quantitativi.
Le principali caratteristiche tecnologiche del sistema sono rappresentate da:
– una camera di reazione in polistirene, di forma peculiare (a U), che presenta adesi sulla parete gli autoantigeni singoli o in pool;

– gli autoantigeni Ro/SSA, La/SSB, RNP/Sm, Sm, Scl-70, ottenuti per estrazione da timo di vitello e gli autoantigeni CENP-B e Jo-1 ottenuti con tecnica ricombinante (sistema baculovirus - Spodoptera *frugiperda*);
– un anticorpo policlonale anti-lgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP);
– un substrato-indicatore costituito dalla miscela perossido di idrogeno (H_20_2)-tetrametilbenzidina (TMB);
– un sistema di calibrazione unico per tutti gli autoanticorpi, costituito da sieri con concentrazioni note di IgG anti-Ro/SSA e crescenti da 2 a 100 U/mL.

Il dosaggio si fonda su un metodo immunoenzimometrico (IEMA) tipo "sandwich" (o a "due siti"); lo schema prevede:
– la dispensazione del campione in esame all'interno della camera di reazione;
– la formazione di un complesso autoantigene-IgG specifiche (se presenti), durante la prima incubazione (33 min.);
– la successiva addizione di un anticorpo anti-IgG coniugato con HRP;
– l'identificazione del complesso durante la seconda incubazione (33 min.) e la sua rilevazione mediante l'aggiunta di H_20_2-TMB.

La perossidasi, in presenza di H_20_2, ossida la TMB, che vira verso il colore blu (15 min.): l'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgG specifiche per l'autoantigene esaminato presenti nel campione incognito e viene registrata dallo spettrofotometro strumentale a 650 nm.
Il tempo totale medio del saggio è di 200 min.; la capacità analitica dello strumento è di circa 300 test in circa 3 ore, pari a circa 100 test/ora.

Risultati

Con l'impiego di curve ROC dei risultati ottenuti sui campioni oggetto dello studio, i valori soglia sono stati fissati a 15.0 U/mL per anti-CENP-B e 20.0 U/mL per anti-topo I (tabella I).
La sensibilità del metodo, determinata nei pazienti con SSc, è stata 100% per ACA e 95.6% per anti-topo I.
La specificità del metodo, determinata nei pazienti con LES e nei controlli sani è stata del 100% per anti-CENP-B e 98.5% per anti-topo I.
La concentrazione degli anticorpi anti-topoisomerasi (in U/ml) nei quattro gruppi di pazienti (sclerodermici anti-topo I positivi, sclerodermici CENP-positivi, LES, controlli sani) è stata rispettivamente di 63.6, 3.0, 5.9, 2.3 (tabella II) e quella degli anticorpi anti-CENP-B (in U/ml) di 81.0, 1.7, 3.7, 2.3 (tabella III).
Nelle figure 1 e 2 è rappresentata la distribuzione dei valori delle due classi anticorpali in tutti i pazienti considerati.

Figura 1. Distribuzione della concentrazione degli Anticorpi anti-topoisomerasi I nei diversi gruppi di pazienti

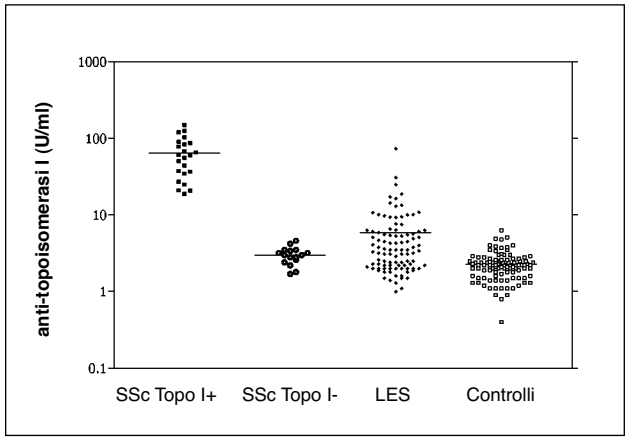

Figura 2. Distribuzione della concentrazione degli Anticorpi anti-CENP B nei diversi gruppi di pazienti

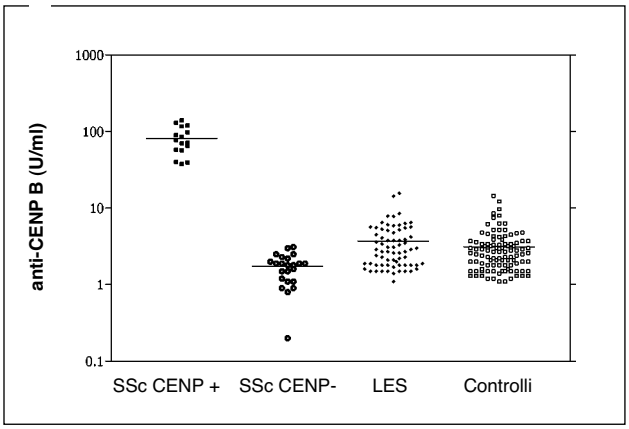

Tabella I. Sensibilità nosografica e specificità diagnostica del sistema ENEA.

Test	Valore soglia (U/mL)	Positivi/Totale (n)	Sensibilità (%)	Negativi/Totale (n)	Specificità (%)
Anti-CENP B	15	23/23	100	203/203	100
Anti-Topo I	20	22/23	95.6	200/203	98.5

Tabella II. Concentrazione di anticorpi anti-topoisomerasi I nei pazienti considerati e nei controlli sani.
(SSc: sclerodermia; LES: lupus eritematoso sistemico)

Pazienti	SSc anti-Topo I +	SSc CENP +	LES	Controlli sani
Media (U/ml)	63.6	3.0	5.9	2.3
DS (U/mL)	36.4	0.8	8.4	0.9
CV (%)	57.2	26.1	143,0	41.8
p		<0.01	<0.01	<0.01

Tabella III. Concentrazione di anticorpi anti-CENP-B nei pazienti considerati e nei controlli sani.

Pazienti	SSc CENP +	SSc anti-Topo I +	LES	Controlli sani
Media (U/ml)	81.0	1,7	3.7	2.3
DS (U/mL)	32.6	0,7	2.7	0.9
CV (%)	40.2	41.1	73.0	39.1
p		<0.01	<0.01	<0.01

Tabella IV. Sensibilità e specificità di anti-Topo I e anti-CENP-B nella sclerodermia (SSc: sclerodermia; MAIS: malattie autoimmuni sistemiche; AITD: tireopatie autoimmuni; MI: malattie infettive; LES: lupus eritematoso sistemico).

Studio	Sensibilità			Specificità			
	n. pazienti	anti-topo I (%)	anti-CENP-B (%)	n. pazienti	tipo	anti-topo I (%)	anti-CENP-B (%)
Bizzaro et al[32], 2002	123 SSc	98.8	100	165	49 Sani 72 MAIS 10 AITD 34 MI	99	100
Presente studio	39 SSc	95.6	100	203	104 Sani 99 LES	98.5	100

Discussione

I test di laboratorio per la rilevazione degli autoanticorpi associati alla sclerosi sistemica costituiscono uno strumento sempre più importante per la diagnosi e per la classificazione dei sottogruppi di malattia.
La disponibilità di metodi sensibili e specifici rappresenta per il laboratorio un obiettivo primario, per fornire risultati adeguati alla spesso difficile diagnosi clinica; sebbene in un recente studio del nostro gruppo[30,31], sia stato dimostrato che la maggior parte dei metodi commerciali presentano sufficienti caratteristiche di affidabilità, molti di essi presentano una procedura manuale, lunga e tediosa per la routine di laboratorio.
Il sistema analitico ENEA presenta un approccio originale alla rilevazione degli anticorpi anti-ENA: consente infatti una determinazione automatica quantitativa, con una produttività molto elevata.
La possibilità di disporre nella stessa seduta di un sistema di screening consente di controllare l'accuratezza dei risultati ottenuti con le determinazioni singole, oppure di far precedere lo screening su tutti i campioni in esame e di indagare le singole positività nei soli campioni risultati positivi allo screening; nella nostra esperienza la correlazione dei risultati tra lo screening e le singole determinazioni è risultata assoluta (100%).
Il dosaggio quantitativo in U/mL di IgG anti-Ro/SSA rappresenta il primo tentativo riuscito di standardizzare i risultati ottenuti per tutti gli autoanticorpi nucleari specifici e consente, mediante l'impiego di tecniche statistiche quali il 99 %ile e le curve ROC, di superare le incertezze nella definizione dei valori soglia di positività, connesse con le determinazioni qualitative per lungo tempo impiegate nelle tecniche immunologiche manuali meno recenti (DID, CIE, WB, ELISA); tale incertezza è alla base delle rilevanti differenze in termini di sensibilità e specificità che hanno per lungo tempo caratterizzato l'autoimmunologia diagnostica.
La sensibilità analitica del sistema ENEA risulta ottimale, dato che è superiore al 95% per anti-topo I e del 100% per ACA. I risultati ottenuti sono in linea con quelli di un precedente studio multicentrico, relativi ai sistemi immunoenzimatici commerciali[30,31] e confermano sostanzialmente le performance di un altro sistema analitico automatizzato, i cui dati sono stati pubblicati recentemente dal nostro gruppo[32] (tabella IV).

Distribuzione delle concentrazioni anticorpali. Analogamente al precedente studio la distribuzione dei risultati in termini quantitativi evidenzia un'elevata differenza di concentrazioni anticorpali tra soggetti affetti dalla malattia e soggetti sani o affetti da malattie diverse, autoimmuni e non, con spiccata significatività statistica; la rilevazione autoanticorpale quantitativa consente quindi di superare le incertezze relative ai valori soglia di positività e una corretta diagnosi e classificazione dei pazienti. Al riguardo va sottolineato come la sclerodermia, in particolare la forma diffusa, sia una patologia grave e la dimostrazione della presenza di anticorpi specifici rappresenta un criterio internazionale di diagnosi, che spesso precede i sintomi clinici e quindi deve essere affidabile dal punto di vista analitico.

Ampiezza delle concentrazioni anticorpali. L'impiego di una curva di calibrazione unica (espres-

sa in U/mL di IgG anti-SSA) consente il confronto tra le concentrazioni dei due tipi di autoanticorpi; gli anticorpi anti-topo I nei pazienti anti-topo I positivi risultano sempre meno elevati e con maggiore dispersione tra pazienti, rispetto agli anticorpi anti-CENP-B nei pazienti ACA positivi: tale osservazione è attestata dall'elevato CV% riscontrato nei primi pazienti rispetti ai secondi (57.2 vs 40).
Le elevate concentrazioni di anticorpi anti-CENP B sono strettamente correlate con gli elevati titoli ACA rilevabili comunemente nei pazienti sclerodermici con l'immunofluorescenza indiretta (IFI).

Specificità diagnostica degli autoanticorpi. Nel presente studio gli autoanticorpi anti-CENP B sono presenti in concentrazioni normali nel siero di pazienti con LES e tale dato conferisce alla rilevazione di questo tipo di anticorpi un'alta specificità per la sclerodermia limitata: in questo senso non vengono confermati i risultati di uno studio recente di Russo, che evidenza una positività del 4% di anticorpi anti-CENP-B nei pazienti affetti da LES[26].
Gli autoanticorpi anti-topo I, diversamente dallo studio precedente del nostro gruppo, presentano una concentrazione mediamente più elevata nei pazienti affetti da LES rispetto ai soggetti sani, con valori medi differenti statisticamente, e una distribuzione che tende a sovrapporsi con quella dei soggetti sclerodermici anti-topo I-positivi (figura 2); tale osservazione conferisce alla determinazione quantitativa una specificità non assoluta.
Tuttavia non trova conferma in questo studio l'incremento delle concentrazioni di anticorpi anti-topoisomerasi nei pazienti sclerodermici anti-CENP positivi, come da noi rilevato in un precedente studio [32]: tale dato è invece in linea con recenti segnalazioni sulla rarità della doppia positività anti-topo I e anti-CENP B nei pazienti con SSc (<1%)[33].

Conclusioni

Questa esperienza, condotta con l'impiego di un sistema analitico quantitativo automatizzato, è la prima a fornire risultati quantitativi della concentrazione di anticorpi anti-topoisomerasi e anti-CENP-B in (U/mL) nella sclerodermia. La determinazione quantitativa degli autoanticorpi nucleari specifici rappresenta un nuovo approccio alla diagnostica delle malattie autoimmuni sistemiche, con possibili ripercussioni sul monitoraggio della terapia di queste patologie croniche, qualora venga dimostrata una correlazione tra variazioni di concentrazione ed efficacia del trattamento terapeutico.

Bibliografia

1. 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.
2. Le Roy EC, Krieg T, Black C, Medsger TA Jr, Fleischmajer R, Rowell N, et al. Scleroderma (Systemic Sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15: 202-5.
3. Humbel RL. Auto-immunité, auto-anticorps et maladie auto-immunes. In: Humbel RL, ed. Autoanticorps et maladies autoimmunes, Paris: Elsevier; 1997. p. 71-3.
4. Vazquez-Abad D, Rothfield NF. Autoantibodies in systemic sclerosis. Int Rev Immunol 1995; 12:145-57.
5. Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 1627-31.
6. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1980; 23: 617-25.
7. Steen VP, Ziegler GL, Rodnan GP, Medgser TA. Clinical and laboratory associations of anti-centromere antibodies (ACA) in patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum 1984; 27: 125-31.
8. Steen VP, Powell VD, Medgser TA. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1988; 31: 196-203.
9. Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies of topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. Science 1986; 231: 737-40.
10. Fanning GC, Welsh KI, Bunn C, Du Bois R, Black CM. HLA associations in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. Brit J Rheumatol 1998; 37: 201-7.
11. Douvas AS. Achten M, Tan EM. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. J Biol Chem 1979; 254: 10514-22.
12. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anticentromere antibodies. J Clin Invest 1986; 77: 426-30.
13. Earnshaw WC, Machlin PS, Bordwell BL, Rothfield NF, Cleveland DW. Analysis of anticentromere autoantibodies using cloned autoantigen CENP-B. Immunology 1987; 84: 4979-83.
14. Whyte J, Soriano E, Earnshaw WC, McHugh NJ. Frequency of autoantibodies to a major epitope on the carboxyl terminal fragment of CENP-B in patients with autoimmune disease. Brit J Rheumatol 1995; 34: 407-12.
15. McHugh MJ. Centromere antibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier; 1996. p. 161-7.
16. Weimer ES, Hildebrandt S, Senecal J, Daniels L, Noell S, Joyal F, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. Arthritis Rheum 1991; 34: 68-77.
17. 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 diseases. Am J Clin Pathol 2002; 117: 316-24.

18. Reveille JD, Solomon DH, and The American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: Anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. Arthritis Care & Res 2003; 49:399-412.
19. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of antibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2000; 43: 1074-84.
20. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. Rheumatology 2001; 40: 1135-40.
21. Hu PQ, Fertin N, Medsger TA, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2003; 48: 1363-73.
22. Veldhoven CH, Meilof JF, Huisman JG, Smeenk RJ. The development of a quantitative assay for the detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibodies using purified recombinant proteins. J Immunol Methods 1992; 151: 177-89.
23. Wahren M, Tengner P, Gunnarsson I, Lundberg I, Ringertz NR, Pettersson I. Ro/SS-A and La/SS-B antibody level variation in patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. J Autoimmun 1998; 11: 29-38.
24. Yamamoto AM, Amoura Z, Johannet C, Jeronimo AL, Campos H, Koutouzov S, et al. Quantitative radioligand assays using de novo-synthesized recombinant autoantigens in connective tissue diseases: new tools to approach the pathogenic significance of anti-RNP antibodies in rheumatic diseases. Arthritis Rheum 2000; 43: 689-98.
25. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassay kits for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. II. Potential for quantitation of antibody content. J Rheumatol 2002; 29: 68-74.
26. Russo K, Hoch S, Dima C, Varga J, Teodorescu M. Circulating anticentromere CENP-A and CENP-B antibodies in patients with diffuse and limited systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2000; 27: 142-8.
27. Plebani M, Faggian D, Borghesan F. Fully automation in allergy testing: measurement of specific IgE by the ENEA System. Allergy 1995; 50: 229-33.
28. Tozzoli R, Perosa A, Formentini V, Kodermaz G, Gobbato L. Valutazione di un sistema automatico a determinazione multipla nello screening delle allergie da inalazione. Ligand Assay 1997; 2: 39-42
29. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1725-34.
30. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Manoni F, Bassetti D, et al. Evaluation of commercial ELISA, CIE and IB assays for the detection of anti-topoisomerase I antibodies: results of a multicentric study. Clin Chem 1999; 45(S):A152.
31. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Tozzoli R, Manoni F, 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.
32. Bizzaro N, Bonelli F, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Autoantibody detection in scleroderma patients. Diagnostic and analytical performances of a new coupled particle light scattering immunoassay. Clin Exp Rheumatol 2002; 24: 45-51.
33. Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, Alavi M, Stoyanova-Scholz M, Kindler J, et al. Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2002; 61: 121-7.