

L'applicazione di un protocollo combinato per la richiesta e l'esecuzione dei test autoanticorpali migliora l'efficacia clinica nella diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni

M. Tampoia^a, V. Brescia^a, A. Fontana^a, A. Zucano^a, G. Lapadula^b, R. Numo^c, N. Pansini^a

^a Laboratorio Patologia Clinica I, Azienda Policlinico di Bari. ^b Clinica Reumatologica, Università degli Studi di Bari
^c Clinica Reumatologica, Azienda Policlinico di Bari

Riassunto

Premesse. I test di laboratorio di maggiore significato per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni includono la ricerca degli autoanticorpi anti-nucleo (ANA), degli autoanticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA) e degli autoanticorpi anti-DNA a doppia elica (anti-dsDNA). La richiesta di tali test è notevolmente aumentata rispetto a qualche anno fa e linee guida sono state prodotte per l'utilizzo appropriato di questi test. Lo scopo del lavoro è stato di applicare un protocollo, formulato in accordo con le più recenti linee guida internazionali, per la diagnostica delle malattie reumatiche autoimmuni e di valutare i risultati ottenuti in termini di efficacia clinica ed efficienza economica.

Metodi. A partire da gennaio 2004 è stato applicato un protocollo diagnostico per l'esecuzione dei test di II livello (autoanticorpi anti-ENA e anti-dsDNA). L'appropriatezza della richiesta è stata valutata in base ai dati clinici riportati su 685 richieste consecutive, pervenute al Laboratorio di Patologia Clinica del Policlinico di Bari. I pazienti sottoposti alle indagini di laboratorio sono stati seguiti per la durata di 12 mesi dal momento del primo prelievo.

Risultati. L'introduzione del protocollo ha comportato una riduzione significativa del numero di test di II livello (27.9% vs 49.5% per anti-ENA; 27.5% vs 56.6% per anti-dsDNA). Dopo il periodo di osservazione, nessuno dei 163 pazienti, negativi al test di I livello e senza sintomi suggestivi di malattia, che non è stato sottoposto ai test di II livello, è risultato essere affetto da patologia reumatica autoimmune. La conferma clinica di patologia reumatica autoimmune è stata del 90.5% (77 su 85) nei pazienti positivi al test di II livello.

Conclusioni. L'applicazione del protocollo diagnostico non solo ha consentito una riduzione del numero dei test di II livello eseguiti, ma ha permesso di aumentarne la specificità. I nostri dati, pertanto, indicano l'utilità dell'applicazione di linee guida condivise da clinici e laboratoristi, relative alla richiesta e alla esecuzione degli esami per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni.

Summary

The application of a combined protocol for the request and the execution of autoantibodies improves the clinical effectiveness in the diagnosis of the autoimmune rheumatic diseases.

Background. The tests of greater meaning for the diagnosis of the autoimmune rheumatic diseases include anti-nuclear antibodies (ANA), anti-extractable nuclear antigens antibodies (ENA) and anti-double stranded DNA antibodies (anti-dsDNA). As the request of such tests is notably increased in the last years, our objective was to apply a protocol for the appropriate use of laboratory testing according to the most recent international guidelines for the diagnosis of the autoimmune rheumatic diseases, and to appraise the results in terms of clinical effectiveness and economic efficiency.

Methods. Beginning from January 2004, a diagnostic protocol was applied for the execution of second level tests (anti-ENA and anti-dsDNA) according to the clinical data supplied on 685 consecutive requests for antibody testing and the results of first level tests (ANA). The patients were then clinically followed for 12 months and the appropriateness of the protocol was evaluated.

Results. The introduction of the protocol enabled a significant reduction in the number of second level tests (27.9% vs 49.5% for anti-ENA; 27.5% vs 56.6% for anti-dsDNA). At the end of the follow-up, none of the 163 patients who were negative to first level tests and who had no symptoms of rheumatic disease, to whom second level tests were requested but not performed, were found to be affected by an autoimmune rheumatic disease. Conversely, in 77 of the 85 (90.5%) who were positive to the second level tests, the presence or the development of an autoimmune rheumatic disease was clinically confirmed.

Conclusions. The application of the diagnostic protocol has not only decreased the number of second level tests performed, but has enabled an increase of their diagnostic specificity. Our data, therefore, underscore the utility of the application of guidelines shared by clinicians and clinical pathologists.

Key words: appropriateness, guidelines, autoantibody tests, rheumatic diseases.

Introduzione

La ricerca di autoanticorpi nel siero è di fondamentale importanza per la diagnosi e la terapia dei pazienti affetti da malattie reumatiche autoimmuni.

I test più comunemente utilizzati sono gli autoanticorpi anti-nucleo (ANA), gli autoanticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (anti-ENA) e gli autoanticorpi anti-dsDNA (anti-dsDNA). La determinazione degli autoanticorpi anti-nucleo (ANA) in immunofluorescenza indiretta (IFI) è il test di I livello da utilizzare nei pazienti con sintomi e segni clinici suggestivi di malattia reumatica autoimmune¹⁻³. In presenza di un risultato ANA-IFI positivo, è necessaria la caratterizzazione delle specificità anticorpali dirette contro i diversi antigeni nucleari (anti-ENA e anti-DNA), che pertanto, costituiscono i test di II livello.

Gli autoanticorpi anti-ENA sono utili per la diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES), di lupus neonatale, di sindrome di Sjögren (SS), di malattia mista del connettivo (MCTD), di polimiosite/dermatomiosite (PM/DM) e di sclerosi sistemica progressiva (SSP), con caratteristiche di sensibilità e specificità variabili⁴. Gli autoanticorpi anti-dsDNA sono utili per la diagnosi e il monitoraggio di LES¹⁻³. Tuttavia in circa l'11% dei pazienti affetti da malattie reumatiche autoimmuni, in particolare SS e DM/PM, il test ANA-IFI può risultare negativo, e pertanto un consistente sospetto clinico potrebbe giustificare comunque la richiesta di indagini di approfondimento⁵⁻⁸.

In questi ultimi anni si è assistito ad un aumento della richiesta di questi test. Purtroppo tra le cause di questo incremento vi è anche un loro inappropriato utilizzo, spesso correlabile ad una insufficiente conoscenza delle caratteristiche analitiche dei test, alla mancanza di compliance con linee guida pubblicate e ad alcuni aspetti organizzativi del laboratorio (modulistica con facilità per le richieste a blocchi di esami, configurazione di profili precostituiti, ritardo nei tempi di risposta, mancanza di comunicazione/condizione delle evidenze disponibili, insufficiente attività di consulenza)^{9,10}.

Molte sono le strategie proposte per governare la domanda e, tra queste, l'educazione continua e la disseminazione di linee guida, le modifiche del formato di richiesta, i cambiamenti di politica economica riguardante la richiesta dei test di laboratorio⁹.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di applicare un algoritmo diagnostico per la diagnosi delle malattie autoimmuni reumatiche, traslato da linee guida condivise a livello internazionale, e di valutarne i vantaggi in termini di efficacia clinica ed efficienza economica.

Infatti, nonostante le numerose strategie proposte per implementare l'appropriatezza della richiesta e della esecuzione dei test di laboratorio, non vi sono dati rilevanti sulla valutazione clinico-diagnostica dell'applicazione di tali strategie a lungo termine.

Materiali e Metodi

Pazienti

A partire da gennaio 2004, si è reso operativo un protocollo diagnostico, formulato sulla base di linee guida validate per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni¹⁻³ e finalizzato alla ottimizzazione dell'esecuzione di test di II livello.

Data prelievo _____	Cod. U.O. _____
Paziente: _____	
(Cognome)	(Nome)
Data di nascita: _____	Sesso M F
<input type="checkbox"/> ANTI- DNA <input type="checkbox"/> ANTI-ENA (SS-A, SS-B, Sm, RPN, Scl-70, Jo1, CENP-B)	
<input type="checkbox"/> SOSPETTO DIAGNOSTICO (LES <input type="checkbox"/> SS <input type="checkbox"/> DM/PM <input type="checkbox"/> SSc <input type="checkbox"/> MCTD <input type="checkbox"/>)	
<input type="checkbox"/> MONITORAGGIO TERAPEUTICO	
NOTIZIE CLINICHE	
Sintomi infiammatori sistemici	<input type="checkbox"/> Pleurite e/o pericardite
Rash cutaneo	<input type="checkbox"/> Interstiziopatia polmonare
Eritema	<input type="checkbox"/> Convulsioni e/o psicosi
Fotosensibilità	<input type="checkbox"/> Citolisi muscolare CPK
F.Raynaud	<input type="checkbox"/> Proteinuria
Artralgie	<input type="checkbox"/> Cilindruria
Mialgie	<input type="checkbox"/> Anemia emolitica
Xerofalmita	<input type="checkbox"/> Leucopenia
Ulcere cavo orale	<input type="checkbox"/> Trombocitopenia
Xerostomia	<input type="checkbox"/> Linfopenia
Medico richiedente _____	Telefono _____

Figura 1. Modulo di richiesta per indagini autoanticorpali di II livello (anti-ENA e anti-dsDNA)

In collaborazione con gli specialisti reumatologi dell'Azienda si è provveduto alla elaborazione di un modulo richiesta aggiuntivo, che è stato distribuito a tutti i clinici committenti interni all'Azienda (Figura 1).

Tale modulo riportava, oltre alle specifiche per l'identificazione del campione e la motivazione della richiesta (diagnosi o monitoraggio di malattia), la formulazione di un quesito clinico attraverso la segnalazione di segni e sintomi inclusi nei criteri clinici classificativi per le principali patologie reumatiche autoimmuni: SS¹¹, LES¹², SSP¹³, MCTD¹⁴, DM/PM¹⁵.

Il protocollo prevedeva l'esecuzione di test di II livello (anti-DNA e anti-ENA) a tutti i campioni risultati positivi al test di I livello (ANA) e ai campioni negativi purché pervenuti con il modulo di richiesta aggiuntivo riportante le notizie cliniche. Non prevedeva l'esecuzione di test di II livello nei campioni risultati negativi al test ANA e privi di modulo aggiuntivo e/o con modulo indicante solo sintomi e segni infiammatori sistemici.

E' stata valutata l'appropriatezza della richiesta di esami di II livello su 685 moduli/richieste di pazienti alla diagnosi, pervenuti consecutivamente in Laboratorio dal gennaio 2004 a giugno 2004 e provenienti sia da reparti a specialità reumatologica (cliniche reumatologiche universitarie e ospedaliere, reparti di medicina interna a caratterizzazione immunologica) e sia da reparti a specialità non reumatologica (dermatologia, nefrologia, neurologia, gastroenterologia, oftalmologia, pneumologia, ematologia).

Dalla valutazione dei sintomi e segni riportati sono stati individuati tre gruppi di richieste:

a) richieste riportanti solo sintomi e segni infiammatori sistemici; b) richieste riportanti solo un sintomo o segno incluso nei criteri classificativi; c) richieste riportanti due o più sintomi e/o segni inclusi nei criteri classificativi.

E' stato possibile valutare come la frequenza di indagini di II livello eseguiti nel corso di tutto l'anno 2004, sia stata modificata dall'applicazione del protocollo, rispetto all'anno 2002.

Infine, dopo un anno di osservazione, è stato possibile

rivalutare i dati di laboratorio e clinici dei pazienti ai quali non sono stati eseguiti i test di approfondimento e verificare l'eventuale insorgenza di malattia reumatica autoimmune.

Metodi

La ricerca degli ANA è stata condotta con metodologia di immunofluorescenza indiretta, utilizzando preparatore di vetrini API –Plus e cellule HEp-2 come substrato (Euroimmun, Lubeca, Germania), partendo da una diluizione iniziale di 1:80 e con un coniugato fluoresceinato anti-IgG umane.

La ricerca degli autoanticorpi anti-dsDNA è stata eseguita con metodica immunofluoroenzimatica, completamente automatizzata su analizzatore UNICAP 100 (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germania), che utilizza micropozzetti di polistirene sensibilizzati con antigene DNA plasmidico a doppia elica circolare ricombinante.

La ricerca degli autoanticorpi anti-ENA è stata eseguita con metodica immunoenzimatica, su analizzatore ETI-MAX 3000 (DiaSorin, Saluggia), che utilizza micropiastre rivestite con gli antigeni SSA, SSB, Sm, RNP/Sm, Scl-70 e Jo1 estratti da timo di vitello e CENP-B ricombinante da baculovirus.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il χ^2 test per la comparazione tra gruppi e l'ANOVA test. Sono state considerate significative differenze con $p < .05$.

Risultati

L'analisi dei dati clinici riportati sui 685 moduli di richiesta pervenuti, ha mostrato che i sintomi più frequentemente indicati sono stati le artralgie (34%) e i sintomi infiammatori sistemici (32%) (Tabella I).

Tabella I. Frequenza sintomi e segni riportati su 685 moduli richiesta.

Sintomi	n.	%
Infiammatori sistemici	218	32%
Artralgie	229	34%
F.Raynaud	115	17%
Rash cutaneo	86	13%
Eritema	59	9%
Xerostomia	49	7,2%
Xeroftalmia	49	7,2%
Fotosensibilità	40	6%
Proteinuria	34	5%
Interstiziopatia polmonare	21	3%
Pleurite/Pericardite	12	1,7%
Leucopenia	8	1,1%
Ulcere cavo orale	8	1,1%
Psicosi	7	1,0%
Trombocitopenia	5	0,7%
Anemia Emolitica	5	0,7%
Citolisi Muscolare	4	0,6%
Cilindruria	3	0,4%
Piastrinopenia	2	0,3%
Linfopenia	2	0,3%

Distribuzione della differente tipologia di richiesta

È stata osservata una differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei tre gruppi di richieste (a, solo sintomi e segni infiammatori sistemici; b, un solo sintomo o segno specifico; c, due o più sintomi e/o segni specifici di malattia reumatica autoimmune), in riferimento alla differente tipologia di reparto richiedente. Infatti, dai reparti a specialità reumatologica è pervenuta, rispetto ai reparti a specialità non reumatologica, una più bassa percentuale di richieste indicanti solo sintomi e segni infiammatori sistemici (16% vs 53%; $p < .001$) (Figura 2a) e una più elevata percentuale di richieste indicanti due o più sintomi e/o segni specifici (62% vs 20%; $p < .001$) (Figura 2c); nessuna significativa differenza è stata riscontrata tra le due tipologie di reparto per quanto attiene le richieste indicanti un solo sintomo o segno specifico (20% vs 27%; $p = .24$, ns) (Figura 2b).

Positività dei test di I e II livello

La percentuale di positività al test di I livello (ANA) non ha dimostrato significative differenze a seconda del gruppo di richiesta ($p = 0.43$, ns), se proveniente dai reparti a specialità reumatologica; è risultata invece significativamente più elevata nelle richieste riportanti due o più sintomi e/o segni specifici ($p = .002$), provenienti dai reparti a specialità non reumatologica (Figura 3a).

La percentuale di positività al test di II livello è aumentata significativamente nelle richieste indicanti due o più sintomi e/o segni specifici, provenienti sia dai reparti a specialità reumatologica ($p = .001$) che dai reparti a specialità non reumatologica ($p < .001$) (Figura 3b).

La valutazione delle 685 richieste considerate ha evidenziato che la percentuale di positività del test di I livello (ANA) è più elevata nelle richieste riportanti due o più sintomi e/o segni specifici (53.6%), più bassa nelle richieste indicanti un solo sintomo specifico (33.3%) o indicanti solo sintomi e segni infiammatori sistemici (30%) (Figura 4).

Anche la percentuale di positività ai test di II livello ha mostrato analoga distribuzione (49.6% di positività per le richieste con due o più sintomi e/o segni specifici, 34.5% per le richieste con un solo segno o sintomo specifico e 35.7% per le richieste con sintomi infiammatori sistemici) (Figura 4).

Riduzione del numero dei test

L'applicazione del protocollo diagnostico ha comportato un decremento del numero dei test di II livello eseguiti, lasciando immutato il numero dei test di I livello (Figura 5). Infatti, prima dell'introduzione del protocollo (anno 2002), i test ANA eseguiti rappresentavano il 99.1% dei test richiesti, i test anti-ENA il 49.5% e i test anti-dsDNA il 56.6%; con l'introduzione del protocollo diagnostico (anno 2004), a fronte di un numero immutato di test ANA (98.9%; $p = 0.56$, ns), si è osservata una significativa riduzione dei test anti-ENA (27.9%; $p = .0014$) e anti-dsDNA (27.5%; $p = .001$) (Figura 5).

Follow-up clinico

Nessuno dei 163 pazienti negativi al test di I livello e senza sintomi suggestivi di patologia, sottoposti a follow-up cli-

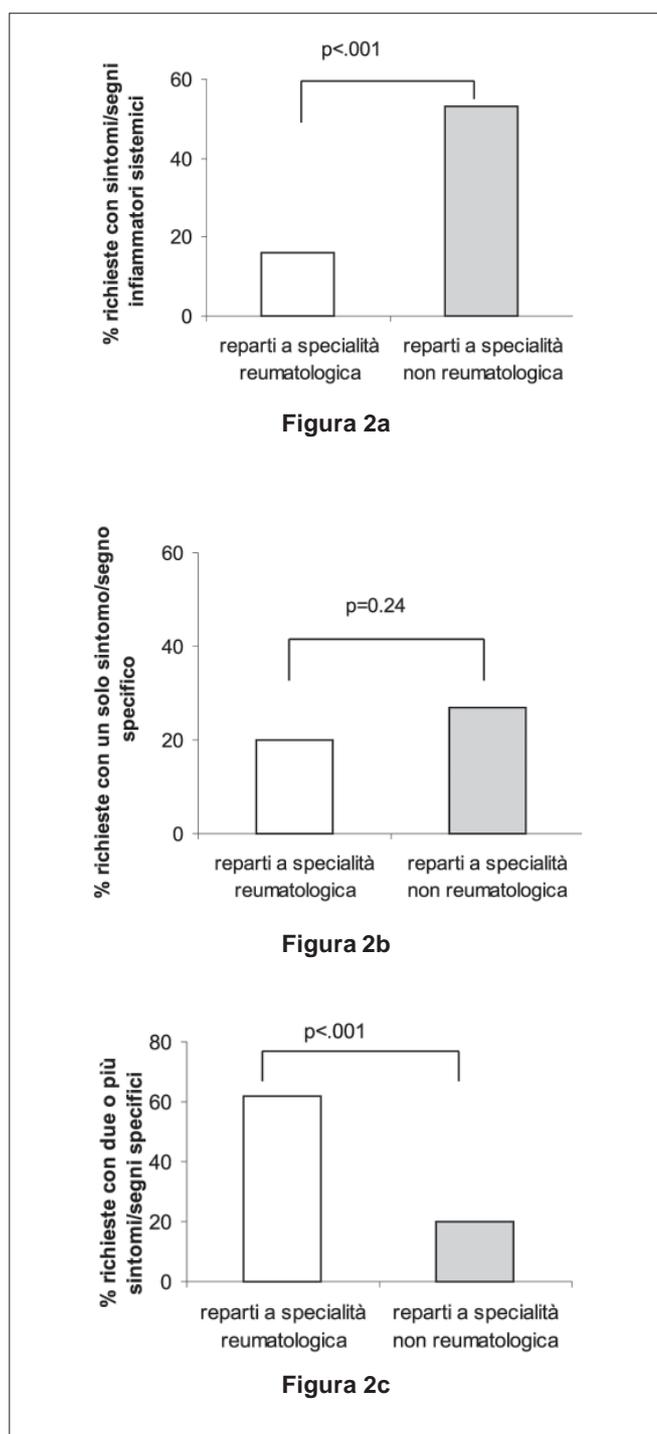


Figura 2. Differente percentuale di distribuzione delle richieste relative a pazienti con soli sintomi o segni infiammatori sistemici (Fig. 2a), con solo un sintomo e segno incluso nei criteri classificativi (Fig. 2b), con due o più sintomi e/o segni inclusi nei criteri classificativi (Fig. 2c) nelle due tipologie di reparto considerate (reparti a specializzazione reumatologica e non reumatologica).

nico, ha sviluppato sintomi e/o segni specifici di malattia reumatica autoimmune per il periodo di osservazione della durata di un anno. Dei 194 pazienti positivi al test di I livello e negativi ai test di II livello, 50 (25.7%) hanno avuto diagnosi di patologia reumatica autoimmune [14 LES, 9 SS, 10 SSP, 3 DM, 14 malattia indifferenziata del connettivo (UCTD)], 4 (2%) di artrite reumatoide (AR) e 11 (5.6%) di

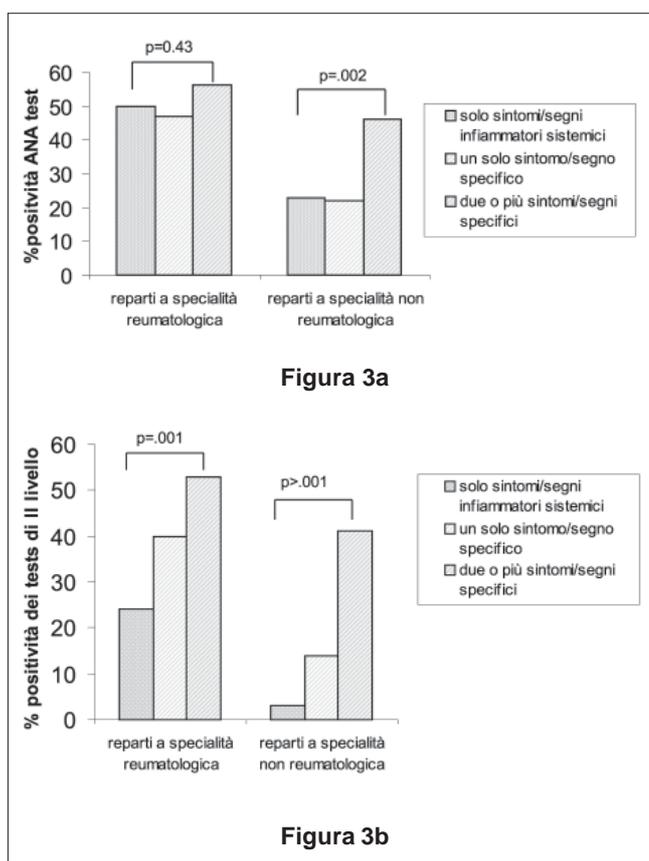


Figura 3. Percentuale di positività a seconda del gruppo di richiesta e della tipologia di reparto del test ANA (Fig. 3a) e dei test di II livello in campioni ANA positivi (Fig. 3b).

patologia autoimmune organo specifica (1 tiroidite autoimmune, 5 epatiti autoimmuni di tipo 1, 5 cirrosi biliari primitive).

Una diagnosi di patologia reumatica autoimmune, invece, è stata posta nel 90.5% (77 di 85) dei pazienti risultati positivi sia ai test di I che di II livello (27 LES, 17 SS, 28 SSP, 4 MCTD) o al solo test di II livello (1 DM) (Tabella II). Quest'ultimo è stato l'unico paziente (0.41%) dei 243 pazienti negativi al test di I livello e sottoposti ad indagini di II livello, a risultare positivo per anti-ENA (anti-Jo1). I rimanenti pazienti negativi al test di II livello, sono stati sottoposti a follow-up clinico (Figura 4).

Discussione

Numerosi studi sono stati pubblicati sulla valutazione di metodologie finalizzate ad ottenere un utilizzo più appropriato dei test di laboratorio e a contenerne l'eccesso di richiesta.

Sembra evidente che una delle strade da percorrere, per ridurre i test non necessari, sia quella di promuovere l'appropriatezza della richiesta attraverso la comunicazione tra clinici e laboratoristi, lo sviluppo di sistemi di supporto alle decisioni mediante l'uso di regole condivise, l'educazione continua¹⁶.

Il nostro studio ha valutato i vantaggi clinico-gestionali dell'applicazione di un protocollo diagnostico, sviluppato implementando le linee guida presenti in letteratura, riguardo l'uso appropriato dei test di laboratorio per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni.

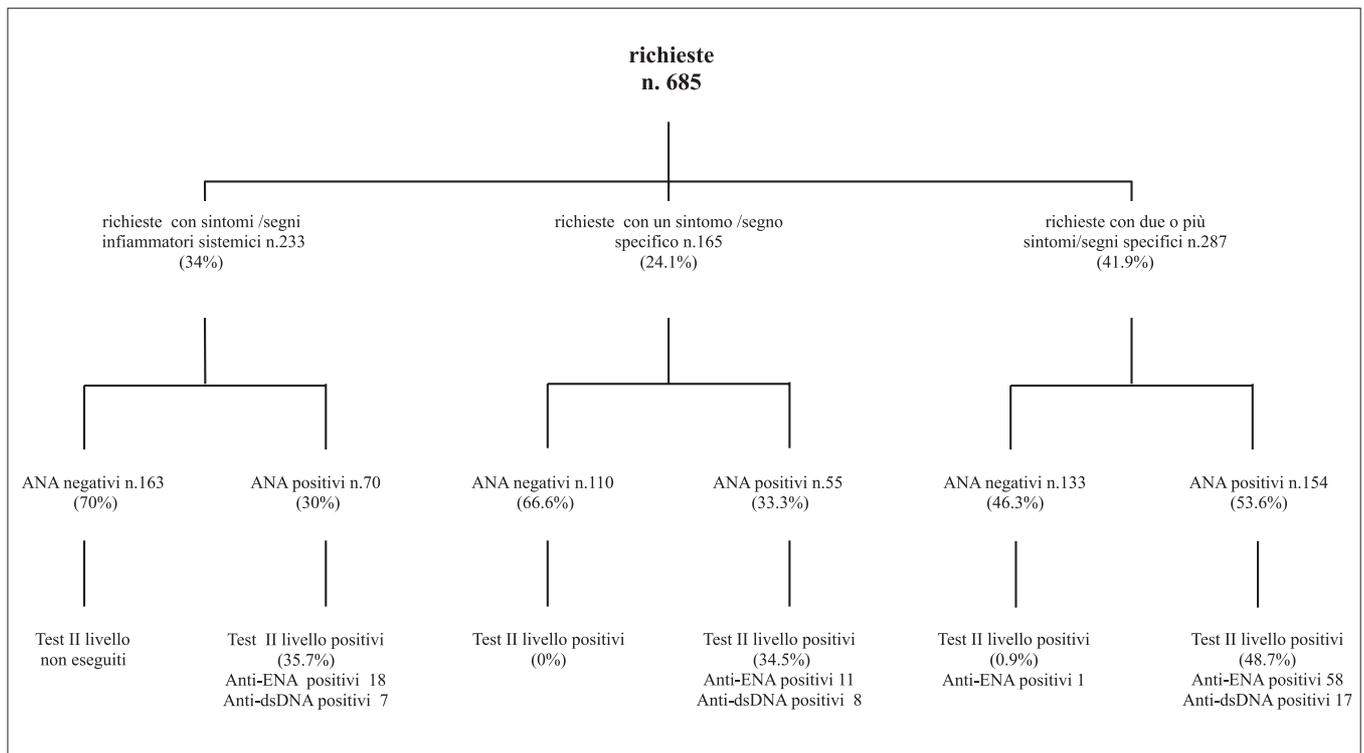


Figura 4. Diagramma operativo con i risultati ottenuti nei test di I e II livello, in rapporto ai dati clinici inclusi nelle richieste.

L'applicazione del protocollo ha previsto l'utilizzo dei dati clinici del paziente riportati su un modulo di richiesta per selezionare i campioni a cui eseguire i test di II livello (anti-ENA e anti-dsDNA).

Dalla valutazione dei moduli richiesta è emerso che i clinici di reparti a specialità non reumatologica richiedono indagini autoanticorpali di I e II livello, pur trovandosi di fronte pazienti che presentano solo segni infiammatori sistemici, non sempre correlabili a malattie reumatiche autoimmuni. Questo atteggiamento potrebbe essere interpretato come volontà da parte dei clinici di non sottovalutare eventuali sintomi e segni di esordio di patologie importanti, come le malattie autoimmuni.

D'altronde, la valutazione dei risultati ha evidenziato che se la percentuale di positività del test ANA (I livello) non ha presentato significative differenze a seconda del gruppo di richiesta, la percentuale di positività dei test anti-ENA e anti-dsDNA (II livello), nei pazienti già positivi al test di I livello, è aumentata significativamente nel gruppo di richieste indicanti la presenza di due o più sintomi e/o segni di malattia indipendentemente dai reparti di provenienza. Pertanto, se è corretto eseguire un test di I livello anche a pazienti che presentano sintomi sfumati o incerti di patologia reumatica autoimmune, l'approfondimento diagnostico deve tener conto sia delle caratteristiche analitiche dei test (sensibilità e specificità) sia della clinica e della preva-

Tabella II. Diagnosi di malattia reumatica autoimmune e distribuzione delle positività anticorpali sugli 85 pazienti positivi ai test di II livello (84 ANA positivi e 1 ANA negativo), suddivisi per reparto di provenienza (reparto a, specialità reumatologica, reparto b, specialità non reumatologica).

Patologia	no.	Reparto a	Reparto b	Anti-ENA						Anti-DNA	
				SS-A/SS-B	Sm	Sm-RNP	Scl-70	CENP-B	Jo-1	EIA	IFI
LES	27	20	7	10	4	8	0	0	0	25	8
SS	17	15	2	17	0	0	0	0	0	2	1
MCTD	4	4	0	0	0	4	0	0	0	1	0
SSP	28	24	4	0	0	0	13	15	0	2	0
PM	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ND	8	8	0	6	0	1	0	0	0	2	0

(LES, lupus eritematoso sistemico; SS, sindrome di Sjögren; MCTD, malattia mista del tessuto connettivo; SSP, sclerosi sistemica progressiva; PM, polimiosite; ND, non definita).

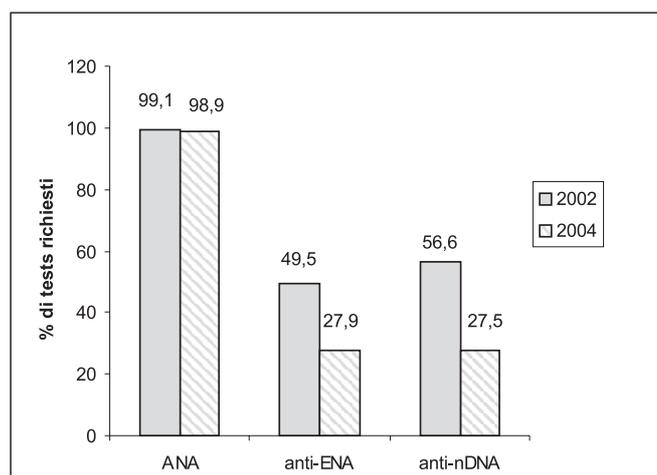


Figura 5. Confronto tra la numerosità dei test effettuati per la diagnostica delle malattie autoimmuni reumatiche prima (anno 2002) e dopo (anno 2004) l'applicazione del protocollo.

lenza della malattia.

Se le notizie cliniche riportate sul modulo non hanno condizionato l'esecuzione dei test di I livello eseguiti (open door testing service¹⁷), tuttavia, sono risultate necessarie ad omogenizzare il comportamento diagnostico nella selezione del paziente da sottoporre ai test di approfondimento. In assenza di clinica suggestiva di malattia e negatività al test di I livello, infatti, l'esecuzione dei test anti-ENA e anti-dsDNA non è stata ritenuta appropriata (gate testing service¹⁸). Nei pazienti ANA negativi per i quali, invece, è stata segnalata la presenza di sintomi e segni clinici suggestivi di malattia reumatica autoimmune, l'esecuzione di test di II livello ha consentito il riscontro di una positività per anti-Jo1, che ha orientato la diagnosi di dermatopolimiosite.

L'applicazione del protocollo ha prodotto una diminuzione del numero dei test di II livello, con vantaggi apprezzabili per il budget del laboratorio sia in termini di costo dei reattivi che di staff time, senza diminuirne l'efficacia diagnostica.

La revisione dei casi clinici, a distanza di un anno, non ha documentato insorgenza di malattia reumatica autoimmune in nessuno dei pazienti ANA negativi, ai quali non sono stati eseguiti indagini di II livello.

In accordo con quanto riportato in letteratura^{9,19}, abbiamo dimostrato che la combinazione di più fattori (implementazione di linee guida, modifica delle modalità di richiesta dei test, evidenza di vantaggi economici) rappresenta la strategia più efficace per migliorare l'appropriatezza dei test di laboratorio.

L'accurata preselezione del paziente da sottoporre ad indagini di approfondimento, non solo è stata in grado di modificare la numerosità dei test di II livello, ma ha permesso di aumentarne la specificità. L'interpretazione e la valutazione delle informazioni cliniche fornite al laboratorista devono essere considerate come attività di "clinical-laboratory interface" che incrementano la qualità e gli outcome medici.

Bibliografia

1. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger H. Guidelines for clinical use of the anti-nuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:71-81.
2. 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 Pathol* 2002;117: 316-24.
3. Linee Guida del Forum Interdisciplinare per la ricerca sulle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Reumatismo* 2003; 55, suppl.3:10-17.
4. Bizzaro N, Wiik A. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:349-55.
5. 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: 212-8.
6. Vaile JH, Dyke L, Kherani R, Johnston C, Higgins T, Russell AS. Is high titre ANA specific for connective tissue disease? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18:433-8.
7. Menard HA. Antinuclear antibodies: the medium is the message. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18: 429-30.
8. Hang LM, Nakamura RM. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997; 34: 275-311.
9. van Walraven C, Naylor CD. Do we know what inappropriate Laboratory utilization is? *JAMA* 1998; 280: 550-8.
10. Hindmarsh JT, Lyon AW. Strategies to promote rational clinical chemistry test utilization. *Clin Biochem* 1996; 29:291-9.
11. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, 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.
12. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
13. 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.
14. Kahn MF. Occupational exposure and connective tissue diseases. *Ann Med Interne (Paris)* 1991; 142:407-8.
15. Tanimoto K, Nakano K, Kano S, Mori S, Ueki H, Nishitani H, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol* 1995; 22: 668-74.
16. Plebani M. The clinical importance of laboratory reasoning. *Clin Chim Acta* 1999; 280:35-45.

17. Lock RJ. Rational requesting or rationing testing. *J Clin Pathol* 2004; 57:121-2.
18. Sinclair D, Saas M, Stevens JM. The effect of a symptom related "gating policy" on ANCA requests in routine clinical practice. *J Clin Pathol* 2004; 57: 131-4.
19. Solomon DH, Hashimoto H, Daltroy L, Liang MH. Techniques to improve physicians' use of diagnostic tests. A new conceptual framework. *JAMA* 1998; 280:2020-7.