

# Il commento interpretativo degli esami autoanticorpali e del risultato autoanticorpale inatteso

E. Tonutti <sup>a</sup>, D. Visentini <sup>a</sup>, N. Bizzaro <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliera S. Maria della Misericordia, Udine (UD)

<sup>b</sup> Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo

## Riassunto

Il laboratorio di immunologia esegue test diagnostici per la identificazione di marcatori autoanticorpali necessari all'inquadramento di patologie complesse, spesso rare e di non facile definizione. La recente introduzione di nuovi markers e l'impiego di metodiche complesse possono creare difficoltà nell'interpretazione dei risultati dei test. Alcune procedure diagnostiche possono inoltre rilevare autoanticorpi non richiesti e quindi non attesi. E'opportuno che tali positività siano segnalate solo quando presentano elevato valore predittivo e quindi strettamente associate a patologie autoimmuni. Il commento interpretativo del risultato dei test autoanticorpali è fondamentale in particolari situazioni: quando vengono rilevati autoanticorpi con rilevante correlazione clinica (elevata specificità); in presenza di risultati non concordanti qualora si siano usati due o più metodi per determinare lo stesso autoanticorpo; in presenza di una positività autoanticorpale inattesa; quando vengono forniti risultati relativi ad esami di approfondimento diagnostico effettuati autonomamente dal laboratorio. Il commento interpretativo deve essere strutturato prendendo in considerazione le caratteristiche anagrafiche del paziente (sesso, età) e gli altri parametri di laboratorio a disposizione; deve specificare il livello di accuratezza diagnostica dei metodi impiegati nell'esecuzione dei test; deve indicare le correlazioni clinico-diagnostiche degli anticorpi risultati positivi; deve inoltre indicare le ulteriori indagini necessarie per completare l'iter diagnostico.

## Summary

**The interpretative comment of autoantibody results.**

The autoimmune laboratory has become an essential part of modern medicine in terms of organizational, interdisciplinary and competency models. The clinical pathologist involved in this diagnostic discipline must possess the necessary competencies in order to choose the most appropriate tests and methods, and to interpret the results in view of the complexity of the diagnostic issues. In autoimmunology, the interpretive comment of the results is an essential tool that provides useful information for both correct data interpretation and diagnostic developments. The value of the interpretive comment is clear in the case of methodologies capable of showing autoantibody plurispecificities evidencing unexpected and non-pertinent markers. An unexpected autoantibody result must always be flagged in case of markers with high specificity and positive predictive value. The interpretive comment is also fundamental in other situations: in the presence of an autoantibodies pattern with scarce diagnostic value or with relevant clinical correlation; in the presence of discordant results when multiple methods are used to determine the same antibody; and in the case of further diagnostic studies conducted independently by the laboratory. The interpretive comment must take into consideration the patient's sex and age in addition to the available laboratory parameters, it must indicate the clinical and diagnostic correlation of positive antibodies and, finally, it must indicate the appropriate follow up procedures needed to complete the diagnostic process.

*Key words:* Autoantibodies, interpretative comment, unexpected autoantibody finding.

## Introduzione

La Medicina di Laboratorio si è proposta in questi ultimi anni come disciplina orientata ad affrontare non solo le problematiche strettamente analitiche ma anche quelle che precedono e seguono l'esecuzione dell'esame, tra cui l'appropriatezza della richiesta e la corretta interpretazione dei risultati forniti dal laboratorio<sup>1</sup>. Le evidenze a supporto di questa impostazione sono sempre più numerose e lo Standard Internazionale ISO 15189:2003 riporta testualmente: "vengono definiti laboratori clinici quei laboratori che forniscono informazioni per la diagnosi, prevenzione o terapia ... e che possono fornire un servizio di consulenza che copra tutti gli aspetti delle indagini di laboratorio inclusa l'interpretazione dei risultati e suggerimenti su ulteriori indagini appropriate"<sup>2</sup>. Il grande sviluppo di settori specialistici nei laboratori clinici ha creato, in particolare tra i medici di medicina generale, difficoltà nel corretto uso di algoritmi diagnostici e nella interpretazione dei test. Per questi motivi, l'attività di consulenza del patologo clinico che si estrinseca attraverso l'inserimento nel referto di un commento interpretativo sul significato diagnostico e prognostico dei risultati ottenuti, risulta in tutti i campi della diagnostica di laboratorio uno strumento che può essere molto utile al medico che ha richiesto l'esame<sup>3</sup>.

Il laboratorio di autoimmunologia, in particolare, ha visto in questi ultimi anni una forte crescita dovuta alle nuove conoscenze nel campo della fisiopatologia, alla identificazione di nuovi antigeni target e alla conseguente introduzione di nuovi test diagnostici (per es., gli anticorpi anti-transglutaminasi nella diagnosi di malattia celiaca, gli anticorpi anti-peptidi citrullinati nella diagnosi di artrite reumatoide, etc.). Allo stesso tempo, si è verificato un enorme sviluppo di tecnologie innovative che richiede competenze specialistiche e necessita di personale preparato a gestire ambiti clinico-diagnostici peculiari per interdisciplinarietà e modelli organizzativi.

I test per la determinazione di autoanticorpi comprendono infatti un insieme di procedure molto diverse tra loro in termini di metodo, sensibilità e specificità diagnostica, e correlazione clinica. I test autoanticorpali vengono utilizzati per la diagnosi o il monitoraggio di patologie complesse, in molti casi rare e di difficile definizione. In aggiunta, numerosi marcatori autoanticorpali rientrano nei criteri classificativi di diverse patologie autoimmuni<sup>4,6</sup> e hanno perciò un importante peso nella formulazione della diagnosi. Un aspetto peculiare del laboratorio di autoimmunologia è l'utilizzo di metodiche in grado di identificare plurispecificità autoanticorpali come l'immunofluorescenza indiretta (IFI), le metodiche di blot, i sistemi multiplex. Ciò comporta anche la possibilità, non rara, di rilevare anticorpi non richiesti e di conseguenza non attesi, con la necessità di gestire il dato casualmente riscontrato. Questo aspetto avrà in futuro rilievo e frequenza sempre maggiori allorché verranno introdotti nella diagnostica autoimmune metodi di microarray in grado di determinare un gran numero di autoanticorpi in una stessa analisi<sup>7,8</sup>. In questi casi la presenza nel referto di

un commento interpretativo è di grande importanza in quanto può fornire indicazioni utili per l'interpretazione dei risultati e può avere significative ricadute sul percorso diagnostico e terapeutico. La formulazione di un commento interpretativo richiede una approfondita conoscenza dei meccanismi fisiopatologici del sistema immunitario, delle caratteristiche dei metodi utilizzati, degli aspetti clinici delle malattie autoimmuni e delle modificazioni dei parametri di laboratorio ad esse associate. Qualora venga riscontrato un marcatore autoanticorpale inatteso, il patologo deve valutare l'opportunità di segnalarlo considerandone l'impatto clinico-diagnostico, il valore predittivo, le ricadute in termini di qualità di vita e vantaggi per il paziente.

Rimane tuttavia da definire a quali test e in quali situazioni è opportuno che venga aggiunto un commento interpretativo e che tipo di referto va consegnato al paziente. Cercheremo di rispondere a queste domande affrontando i problemi secondo uno schema che ripercorre modelli organizzativi e diagnostici consolidati nei laboratori di autoimmunologia.

## Il commento interpretativo dei test autoanticorpali

Le situazioni in cui è opportuno che il referto sia accompagnato da un commento interpretativo possono essere schematizzate come segue:

- Riscontro di positività autoanticorpali con scarsa o con rilevante correlazione clinica.
- Riscontro di risultati non concordanti qualora si siano usati due o più metodi per determinare lo stesso anticorpo.
- Esecuzione autonoma da parte del laboratorio di test di approfondimento in base al risultato dei test di screening o in risposta ad un quesito clinico.
- Riscontro casuale di un anticorpo non richiesto.

### *Il commento interpretativo in presenza di un risultato con rilevante (o scarsa) correlazione clinica*

La ricerca degli anticorpi anti-nucleo (ANA) è senza dubbio il test autoanticorpale più richiesto. Il test ANA eseguito in IFI su linea cellulare HEp-2 è in grado di rilevare un gran numero di pattern, alcuni con rilevante correlazione clinico-diagnostica, altri di significato incerto, e altri ancora di scarsa utilità pratica. Inoltre, la presenza di ANA ad alto titolo e la loro persistenza nel tempo è caratteristica delle malattie reumatiche autoimmuni mentre ANA a basso titolo (1:40 - 1:80) possono essere presenti in pazienti affetti da diverse patologie non autoimmuni (infezioni virali, neoplasie, etc.) e in soggetti sani<sup>9</sup>. E' perciò opportuno che nel referto degli ANA, oltre ad indicare il metodo utilizzato, il pattern di fluorescenza e il titolo<sup>10</sup>, venga anche inserito un commento che, in rapporto al pattern e al titolo, fornisca indicazioni sulla possibile patologia correlata o viceversa sulla scarsa possibilità di associazione con una malattia autoimmune. Per esempio, un risultato di un test ANA positivo con pattern centromerico a titolo 1:1280 può orientare verso la diagnosi di patologia sclerodermica, mentre un ANA positivo con

pattern speckled a titolo 1:80 ha una bassa probabilità di correlare con una malattia autoimmune sistemica (MAIS). Il riscontro di pattern particolari dovrebbe essere corredato da un commento più esteso: ad un riscontro di un pattern PCNA (proliferative cell nuclear antigen), la cui associazione con patologie autoimmuni sistemiche è molto elevata<sup>11</sup>, il referto deve essere integrato da un commento che specifichi che tali anticorpi, anche a basso titolo, si riscontrano in pazienti con MAIS e in particolare nel lupus eritematoso sistemico (LES)<sup>12</sup>. Tale nozione infatti, se è nota al reumatologo, non lo è per il medico generico. D'altro canto si possono osservare delle positività ANA, anche a titolo significativo, la cui associazione con MAIS non è dimostrata, come nel caso degli anticorpi anti-DFS70, caratterizzati da un pattern nucleare dense fine speckled e fluorescenza anche delle regioni cromosomiche delle cellule in mitosi<sup>13</sup>. In questo caso è necessario che il patologo indichi che tale riscontro non correla generalmente con malattie autoimmuni ma eventualmente con patologie allergiche o neoplastiche.

Un'ulteriore indicazione per l'inserimento di un commento esplicativo è l'esecuzione di un test per la ricerca degli ANCA (anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili) in IFI in un soggetto che ha un titolo elevato di ANA con pattern omogeneo. In questo caso infatti, la presenza di ANA viene evidenziata anche sui granulociti e può essere erroneamente confusa con un pattern P-ANCA. Quando ciò si verifica, il referto deve indicare che la presenza di ANA con pattern omogeneo non consente la corretta interpretazione del risultato per cui è necessaria l'esecuzione di test specifici per anticorpi anti-mieloperossidasi (anti-MPO) e anti-proteinasi 3 (anti-PR3)<sup>14,15</sup>.

#### *Il commento interpretativo in caso di discordanza nel risultato tra più metodi analitici*

L'accurata identificazione di un singolo marcatore può talora richiedere l'esecuzione di più metodiche. Quando i risultati ottenuti utilizzando metodiche diverse non sono concordanti, il referto deve essere accompagnato da un commento in grado di spiegare i risultati ottenuti con i diversi metodi e le possibili cause analitiche e cliniche di discrepanza.

In molti laboratori, soprattutto in quelli con elevato numero di esami, gli anticorpi anti-dsDNA vengono identificati inizialmente con un test immunoenzimatico (ELISA) automatizzato e quantitativo; i sieri risultati positivi vengono successivamente confermati col più specifico metodo IFI su *Crithidia luciliae*<sup>10</sup>. Tutti i casi che presentano un risultato non concordante tra i due metodi (in genere, positivo in ELISA e negativo in IFI) devono essere integrati da un commento con l'indicazione che il risultato può essere dovuto alla presenza di anticorpi anti-dsDNA a bassa affinità di legame (di dubbia rilevanza clinica) e che solo gli anticorpi anti-dsDNA ad alta affinità correlano con il coinvolgimento renale in corso di LES<sup>16</sup>.

La ricerca degli ANCA viene generalmente eseguita in prima battuta con il metodo IFI su granulociti fissati

in etanolo e i sieri che risultano positivi vengono successivamente testati con metodo ELISA o di blot per l'identificazione delle specificità anti-MPO o anti-PR3<sup>17</sup>. Le vasculiti ANCA associate presentano dei pattern di fluorescenza caratteristici (C-ANCA o P-ANCA) a cui corrispondono titoli significativi di anticorpi anti-PR3 o anti-MPO. Alcune patologie croniche (epatiti, rettocolite ulcerosa, morbo di Crohn, linfomi, etc.) presentano delle positività ANCA da anticorpi che identificano strutture antigeniche diverse da MPO e PR3 e in molti casi ancora non identificate<sup>17-20</sup>. Il risultato del test ANCA positivo in IFI deve pertanto essere refertato assieme al risultato ELISA (o blot) per anti-MPO e anti-PR3; in caso di positività degli ANCA IFI e di anti-MPO o anti-PR3, deve essere sottolineata la stretta correlazione tra questo riscontro e la diagnosi clinica di vasculiti ANCA associate. In caso di positività per ANCA IFI e negatività dei test anti-MPO o anti-PR3 deve invece essere indicato che tale riscontro non è suggestivo di vasculite ANCA associata<sup>15</sup>.

Nel caso degli anticorpi anti-fosfolipidi, vi possono talora essere risultati discordanti tra i dati ottenuti nella misurazione degli anticorpi anti-cardiolipina e degli anti- $\beta$ 2glicoproteina I<sup>21</sup>. In queste situazioni, sarà opportuno segnalare la discordanza del dato, sottolineando la maggiore sensibilità diagnostica degli anti-cardiolipina e la maggior specificità degli anti- $\beta$ 2glicoproteina I e indicando la necessità di ripetere il test a distanza di qualche mese.

#### *Il commento interpretativo di esami di approfondimento eseguiti autonomamente dal laboratorio*

Per la diagnosi di alcune patologie autoimmuni il risultato positivo di un test di primo livello richiede in genere l'esecuzione di altri test autoanticorpali. In questi casi, il laboratorio, anche attraverso un autonomo percorso diagnostico che prevede la scelta dei test e dei metodi più appropriati per proseguire l'indagine, ha un ruolo fondamentale nella risposta al quesito clinico<sup>9,22,23</sup>. E' questo il caso ad esempio di un test ANA in IFI positivo con pattern omogeneo o speckled, per il quale si impone la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA e anti-antigeni nucleari specifici (ENA), il risultato dei quali può avere implicazioni diagnostiche e rilevanza clinica.

Un altro esempio è quello relativo alla diagnosi di malattia celiaca (MC). La MC è una patologia su base autoimmune per la quale il Laboratorio può utilizzare dei marcatori altamente sensibili e specifici in grado di identificare la quasi totalità dei casi. Di norma viene eseguita come test d'ingresso la ricerca degli anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) IgA assieme alla determinazione delle IgA totali (per la identificazione dei soggetti con deficit di IgA). I sieri risultati anti-tTG IgA positivi possono essere confermati con il test più specifico per gli anticorpi anti-endomisio (EMA) IgA (anti-tTG ed EMA identificano lo stesso antigene su substrati e con metodiche diverse)<sup>24</sup>. Nella maggior parte dei casi la positività per anti-tTG IgA è confer-

mata anche dagli EMA IgA, ma non sono pochi i casi in cui un siero positivo per anti-tTG IgA risulta negativo per EMA IgA<sup>25</sup>. Se il test anti-tTG IgA è negativo ma è presente anche un deficit di IgA sarà necessario eseguire il test anti-tTG IgG. Inoltre sotto i 5 anni di età è consigliata la determinazione anche degli anticorpi anti-gliadina (AGA) in relazione ai modelli di sieroconversione in grado di dimostrare che la risposta (auto)immune verso la tTG avviene generalmente tra i 4 e i 5 anni di età<sup>26</sup>. La refertazione di questi test, la cui esecuzione viene decisa in laboratorio sulla base dei risultati ottenuti nei test di ingresso, comporta la necessità di un commento, in particolare in tutti i casi in cui i risultati non siano univoci. Inoltre, il patologo deve fornire indicazioni precise sui test supplementari da eseguire (molto spesso nei casi dubbi si deve proporre la determinazione dell'aplotipo HLA DQ2/DQ8), sulla eventuale ripetizione dei test di laboratorio e, ove necessario, deve porre l'indicazione per la esecuzione della biopsia duodenale come test diagnostico definitivo. Un interessante lavoro di Sinclair e collaboratori ha recentemente dimostrato come la mancanza di un commento interpretativo ai test per intolleranza al glutine porta una percentuale molto elevata di casi ad una non-diagnosi<sup>27</sup>.

#### *Il commento interpretativo del dato autoanticorpale inatteso*

Un risultato inatteso può essere definito come il casuale riscontro di una positività autoanticorpale durante l'esecuzione di test a scopo diagnostico o in corso di test di screening in soggetti asintomatici. Questo evento non è infrequente quando si utilizzano metodiche in grado di evidenziare plurispecificità anticorpali. Il patologo deve in questi casi valutare il significato prognostico e predittivo di malattia di ciascun autoanticorpo occasionalmente riscontrato, in un contesto che prenda in considerazione il quesito diagnostico, l'età e il sesso del paziente, le altre patologie eventualmente associate e i risultati di tutti gli altri parametri di laboratorio disponibili.

Un tipico esempio è il riscontro di una fluorescenza nucleare durante l'esecuzione di un test per la ricerca di anticorpi organo-specifici su tessuto murino o di ANCA su granulociti. Tale riscontro non giustifica di per sé la segnalazione di positività per ANA; sarà a discrezione del patologo effettuare un test su HEp-2 e, in presenza di pattern e titolo significativi, indicare nel referto la positività degli ANA.

Il riscontro casuale di auto-anticorpi di elevato impatto diagnostico deve sempre essere segnalato. La presenza di un pattern anti-mitochondriale (AMA) su HEp-2 è un evento non infrequente; in questa situazione il dato deve necessariamente essere confermato con un test in IFI su sezioni di fegato e rene murino ed eseguendo quindi un test ELISA o blot in grado di identificare la specificità AMA M2. La specificità AMA M2 si associa infatti a cirrosi biliare primitiva con una specificità molto elevata, e in alcuni pazienti il riscontro di questo autoanticorpo può precedere di molti anni

l'esordio clinico della malattia<sup>28,29</sup>. Il referto in questo caso dovrà indicare il dato occasionalmente riscontrato, i test eseguiti in laboratorio e la correlazione del marcatore autoanticorpale con la patologia epatica.

Un ulteriore esempio è il riscontro di anticorpi antireticolina R1<sup>30</sup>, la cui ricerca per la diagnosi di MC è stata abbandonata a favore del più accurato test anti-tTG; questo marcatore può essere occasionalmente evidenziato in IFI su tessuti murini utilizzati per l'identificazione di autoanticorpi anti-muscolo liscio, mucosa gastrica, anti-mitochondri, anti-LKM<sup>31</sup>. In questo caso sarà necessaria l'esecuzione del test di conferma anti-tTG IgA. Qualora gli anti-tTG IgA siano positivi e siano stati confermati con il test per gli EMA IgA, deve essere impostato un referto che sia esplicativo del dato occasionalmente riscontrato e dei test eseguiti successivamente; deve inoltre essere indicato che la positività per anti-tTG e EMA IgA è suggestiva di intolleranza al glutine per cui è indicata l'esecuzione della biopsia duodenale.

Un esempio di quanto possa essere importante la valutazione di tutti i dati di Laboratorio per una corretta interpretazione di un risultato autoanticorpale è costituito dal riscontro di un titolo elevato di anti-tTG IgA (confermato da EMA IgA) e della contestuale positività per anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA). È noto che nel 30%-50% dei casi di MC gli ASCA IgA e/o IgG possono risultare positivi ad alto titolo<sup>32-34</sup>. In questa situazione il patologo, valutando anche i parametri di flogosi (in genere normali in corso di celiachia), deve indicare nel referto che la positività per ASCA deve essere considerata come un risultato non specifico. Ciò suggerisce al medico curante di richiedere in prima battuta una gastro-duodenoscopia piuttosto che una colonscopia.

#### **Conclusioni**

Il commento interpretativo nel referto degli esami autoanticorpali è l'atto conclusivo del percorso diagnostico di laboratorio. In molti casi, un referto accompagnato da chiare indicazioni sul significato dei risultati ottenuti e da suggerimenti sul migliore prosieguo dell'iter diagnostico può essere di grande aiuto per i medici non specialisti e per i colleghi più giovani e meno esperti. Per produrre un corretto ed efficace referto il patologo deve conoscere non solo le caratteristiche dei test utilizzati ma anche la clinica e la fisiopatologia delle malattie autoimmuni. Da una stretta collaborazione tra medici clinici e medici di laboratorio, in grado questi ultimi di trasformare i risultati degli esami in informazioni cliniche, il paziente trarrà il vantaggio maggiore.

#### **Bibliografia**

1. Plebani M. What information on quality specifications should be communicated to clinicians, and how? Clin Chim Acta 2004; 346:25-35.
2. ISO 15189: 2003. Medical laboratories. Particular requirements for quality and competence.
3. Lim EM, Sikaris KA, Gill J, Calleja J, Hickman PE, Beilby J, et al. Quality assessment of interpretative commenting

- in clinical chemistry. *Clin Chem* 2004; 50:632-7.
4. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JCP, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1309-11.
  5. Hochberg MC. The American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
  6. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, et al. Assessment of the European classification criteria for Sjögren syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. *Ann Rheum Dis* 1993; 55:116-21.
  7. Oertelt S, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME. Genes and goals: an approach to microarray analysis in autoimmunity. *Autoimmunity Rev* 2005; 4:414-22.
  8. Utz PJ. Protein arrays for studying blood cells and their secreted products. *Immunol Rev* 2005; 204:264-82.
  9. Bizzaro N, Wiik A. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:349-55.
  10. 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.
  11. Takasaky Y, Kogure T, Takeuchi K, Kaneda K, Yano T, Hirokawa K, et al. Reactivity of anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) murine monoclonal antibodies and human autoantibodies to the PCNA multiple protein complexes involved in cell proliferation. *J Immunol* 2001; 166:4780-7.
  12. Kogure T, Takasaky Y, Takeuchi K, Yamada H, Nawata M, Ikeda K, et al. Autoimmune responses to PCNA multi-protein complexes involved in cell proliferation are strongly associated with their structure and biological function in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2946-56.
  13. Ganapathy V, Casiano CA. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us? *Arthritis Rheum* 2004; 50:684-8.
  14. Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC, et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:312-8.
  15. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity* 2005; 38:93-103.
  16. Wellmann U, Letz K, Herrmann M, Angermuller S, Kalden, JR, Winkler TH. The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9258-63.
  17. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111:507-13.
  18. Terjung B, Spengler U, Sauerbruch T, Worman HJ. Atypical p-ANCA in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50Kd nuclear envelop protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 2000; 119:310-22.
  19. Mulder AHL, Horst G, Haagsma EB, Kleibeuker JH, Kaltenberg CG. Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993; 17:411-7.
  20. Coremans IEM, Hagen EC, van der Voort EAM, van der Woude FJ, Daha MR, Breedveld FC. Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic enzymes in Felty's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11:255-62.
  21. Micheloud D, Sanchez-Ramon D, Carbone J, Rodriguez-Molina JJ, Fernandez-Cruz E, Lopez-Longo FJ, et al. Discordance between anti-beta2-glycoprotein-I and anti-cardiolipin antibodies in patients with clinical criteria of antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23:525-8.
  22. Wiik A. Granulocyte-specific antinuclear antibodies: possible significance for the pathogenesis, clinical features and diagnosis of rheumatoid arthritis *Allergy* 1980; 35:263-89.
  23. Laposata M. Patient-specific narrative interpretations of complex clinical laboratory evaluations: who is competent to provide them? *Clin Chem* 2004; 50:471-2.
  24. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Villalta D, Bagnasco M, Tozzoli R, et al. Linee guida per la diagnosi di laboratorio e istologica della malattia celiaca. *Riv It Med Lab* 2005; 2:110-22.
  25. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al. The role of antitissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of celiac disease: a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56:389-93.
  26. Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, Eisembarth GS, Bao F, Haas JE, et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr* 2003; 143:308-14.
  27. Sinclair D, Duncan H. What happens to patients with positive tissue transglutaminase and endomysium antibody results in general practice? *J Clin Pathol* 2004; 57:943-5.
  28. Neuberger J, Bradwell AR. Anti-mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 37:712-6.
  29. Koulentaki M, Moscardrea J, Dimoulios P, Chatzicostas C, Kouroumalis EA. Survival of anti-mitochondrial antibody-positive and -negative primary biliary cirrhosis patients on urodeoxycholic acid treatment. *Dig Dis Sci* 2004; 49:1190-5.
  30. Lock RJ, Gilmour JE, Unsworth DJ. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies; the antibody trinity of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:258-62.
  31. Ascher H, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Kilander AF, Nilsson LA, Tlaskalova H. Value of serologic markers for clinical diagnosis and population studies of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 3:61-7.
  32. Sandborn WJ. Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art. *Rev Gastroenterol Disord* 2004; 4:167-74.
  33. Damoiseaux JG, Bouten B, Linders AM, Austen J, Roozendaal C, Russel MG, et al. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies for inflammatory bowel disease: high prevalence in patients with celiac disease. *J Clin Immunol* 2002; 22:281-8.
  34. Berta Z, Czipo I, Szabo GG, Szegedi G. Seroreactivity against Saccharomyces cerevisiae in patients with Crohn's disease and celiac disease. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2308-12.