

Diagnosi di laboratorio delle malattie autoimmuni: è ora di cambiare?

D. Villalta^a, R. Tozzoli^b, E. Tonutti^c, N. Bizzaro^d

^aImmunologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. "S. Maria degli Angeli", Pordenone

^bLaboratorio Analisi e Microbiologia, Ospedale Civile, Latisana (UD)

^cAllergologia e Immunopatologia, A.O. "S. Maria della Misericordia", Udine

^dLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, Tolmezzo (UD)

Riassunto

Le tecnologie basate sugli array e la proteomica stanno per aprire l'era dei test multipli in autoimmunologia. La possibilità di rilevare simultaneamente numerosi autoanticorpi e, come conseguenza, di definire ampi profili autoanticorpali, potrebbe facilitare la diagnosi, la stadiazione, la prognosi e la terapia delle malattie autoimmuni. Tuttavia, tali tecnologie, seppur molto promettenti, muovono solo ora i loro primi passi e dovranno pertanto essere sottoposte a rigorosi processi di validazione sia analitica che clinica. Quest'ultima dovrà coinvolgere clinici e patologi in studi prospettici, multicentrici, condotti su ampie casistiche con l'obiettivo di definire lo specifico significato dei diversi profili autoanticorpali, non prima però di aver stabilito standard comuni su come condurre e pubblicare i dati generati dall'utilizzo dei microarray. Solo quando questi percorsi saranno completati, tali tecnologie potranno trovare impiego nei laboratori clinici. Se da un lato, quindi, stiamo entrando in una decade che con molta probabilità ci condurrà ad un radicale cambio nell'approccio diagnostico delle malattie autoimmuni, dall'altra non abbiamo ancora le conoscenze sufficienti per l'applicazione delle tecnologie proteomiche su vasta scala e quindi, per il momento, è opportuno continuare a seguire approcci e algoritmi diagnostici già ampiamente consolidati, quali quelli riportati nelle linee guida internazionali, preparate secondo i principi della appropriatezza e della medicina basata sull'evidenza.

Summary

Laboratory Diagnosis of Autoimmune Diseases: Time for a Change?

Array and proteomic technologies have given birth to an era of multiple autoantibody tests. The possibility of simultaneously tracking various antibodies and, consequently, of defining wide autoantibody profiles could facilitate the diagnosis, stage, prognosis and therapy of autoimmune diseases. However, such promising technologies are just in their infancy, and will need to undergo rigorous analytical and critical evaluations. Specifically, after having established the general standards on how to conduct and publish the microarray generated data, the clinical aspect will need to involve clinicians and pathologists in prospective, multicentric studies involving numerous cases, with the objective of defining the specific significance of the various autoantibody profiles. Only when this process has been completed will it be possible to utilize such technologies in clinical laboratories. On one hand we are at the beginning of a time that is likely to lead us toward a radical change in the way autoimmune diseases are diagnosed, on the other hand, we don't have enough experience yet in the large scale application of proteomic technologies. So, at least for the moment, it is appropriate to follow proven diagnostic algorithms, such as those based on international guidelines and evidence-based medicine.

Key words: Proteomics, microarrays, autoantibodies, appropriateness, autoimmune diseases.

Introduzione

Le malattie autoimmuni sono un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate da una risposta immunitaria, umorale e cellulo-mediata, contro diversi costituenti del self e dalla presenza di autoanticorpi circolanti ad alta avidità¹.

La presenza di specifici autoanticorpi è un parametro fondamentale per la diagnosi delle malattie autoimmuni organo specifiche e rientra tra i criteri classificativi di molte malattie autoimmuni sistemiche. Come esempio possono essere riportati la presenza di autoanticorpi anti-nucleo (ANA), anti-Sm, anti-dsDNA, anti-cardiolipina (aCL) nel LES^{2,3}; la presenza di autoanticorpi anti-Ro e anti-La nella sindrome di Sjögren⁴; la presenza di aCL e anti- β 2-glicoproteina I nella sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS)⁵. In alcuni casi gli autoanticorpi possono assumere un valore prognostico, oppure possono variare in concentrazione con l'andamento della malattia e quindi essere utilizzati per il monitoraggio, come nel caso degli anti-dsDNA nel SLE⁶ e degli anti-citoplasma dei neutrofilici (ANCA) nelle vasculiti autoimmuni ANCA-associate⁷. Infine, in alcuni casi gli autoanticorpi possono essere rilevati alcuni anni prima delle manifestazioni cliniche e quindi essere predittivi di futura insorgenza di una malattia autoimmune in persone ancora asintomatiche⁸.

Nel tempo sono state proposte varie tecniche per la rilevazione autoanticorpale (immunofluorescenza, agglutinazione, immunodiffusione doppia, controimmuno-elettroforesi, test immunometrici e immunoblot)⁹ nel continuo tentativo di migliorare la sensibilità e la specificità analitica e di potenziare i processi di automazione. Negli ultimi 15 anni i laboratori di autoimmunità hanno vissuto un periodo di grande dinamismo, legato alla introduzione di nuovi test, derivanti dalla identificazione di vari nuovi autoanticorpi e dalla dimostrazione della loro utilità clinica, nonché dalla migliore conoscenza delle molecole autoantigeniche, legata alla crescita esplosiva delle tecniche molecolari. Ancor più recentemente l'applicazione di tecnologie proteomiche alla diagnostica delle malattie autoimmuni ha aperto nuovi scenari diagnostici in grado di poter in futuro modificare radicalmente le attuali procedure diagnostiche, facendo intravedere interessanti opportunità, ma anche possibili rischi in termini di appropriatezza diagnostica.

Appropriatezza e linee guida per i dosaggi autoanticorpali nelle malattie autoimmuni

Secondo la definizione del College of American Pathologists¹⁰, l'appropriatezza in medicina di laboratorio è "il grado con cui una procedura, un trattamento, test o servizio è efficace, chiaramente indicato, non eccessivo, qualitativamente adeguato e fornito a pazienti ricoverati, ambulatoriali, a domicilio o in qualsiasi altra situazione si trovino, per rispondere al meglio ai loro bisogni". Price¹¹ definisce appropriato un "test che è

utile per prendere una decisione clinica per la cura del paziente". Qualsiasi sia la definizione di appropriatezza che si voglia adottare, un test di laboratorio, e quindi anche una ricerca autoanticorpale, deve essere finalizzato a condurre a diagnosi, prognosi e terapie adeguate. Un uso inappropriato dei test di laboratorio è uno dei più frequenti problemi in cui ci si imbatte nel campo della diagnostica autoimmunitaria e ciò può essere causa di diagnosi non corrette, a volte di terapie inappropriate e, non da ultimo, di un incremento ingiustificato della spesa sanitaria¹². Con l'obiettivo di migliorare il trattamento del paziente attraverso un uso appropriato e razionale dei test autoanticorpali, vari gruppi di lavoro nell'ambito della comunità scientifica a livello nazionale e internazionale hanno elaborato linee guida per il corretto utilizzo dei marcatori autoanticorpali per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie autoimmuni¹³⁻¹⁵. Nelle linee guida in genere vengono in primis riportate le condizioni cliniche, o i segni e sintomi ad esse riferibili, che giustificano la richiesta di uno specifico test autoanticorpale, al fine di aumentare la probabilità pre-test che il paziente abbia una specifica patologia autoimmune. Di conseguenza un risultato positivo del test acquisisce una maggiore predittività diagnostica. Tale dato è di estrema importanza in particolare per malattie a bassa prevalenza come in genere sono le malattie autoimmuni.

Una positività autoanticorpale, infatti, riscontrata in un paziente con bassa probabilità pre-test di malattia, ha un basso valore predittivo positivo. Se non correttamente interpretato, quindi, tale risultato può indurre a diagnosi errate e a successivi accertamenti strumentali anche invasivi e costosi. Tutto questo significa che l'appropriatezza di un test autoanticorpale può essere valutata solo nel contesto di uno specifico quesito clinico relativo al singolo paziente e dipende in larga parte dalla probabilità pre-test che il paziente abbia la malattia per la cui conferma l'indagine di laboratorio è stata richiesta¹⁶⁻¹⁸.

Nelle varie linee guida proposte, di fronte a sintomi suggestivi di una specifica patologia autoimmune, in genere viene consigliato di partire con l'esecuzione di un test affidabile e sensibile, come ad esempio il test ANA su cellule HEp-2 nel sospetto di connettiviti. Nel caso di positività del test ANA può essere previsto un algoritmo diagnostico con l'esecuzione a cascata di una serie di test riflessi che hanno lo scopo di condurre il più possibile ad un risultato finale dotato di elevata specificità diagnostica e altamente informativo per il clinico richiedente, riducendo così la probabilità di fornire risultati falsi positivi¹⁷. Un esempio di algoritmo diagnostico per le connettiviti¹⁸ è riportato nella figura 1.

L'avvento delle tecnologie proteomiche e dei microarray modifica radicalmente tale approccio diagnostico, passando da una diagnostica basata su test singoli eseguiti in serie, a una diagnostica basata su test multipli eseguiti in parallelo.

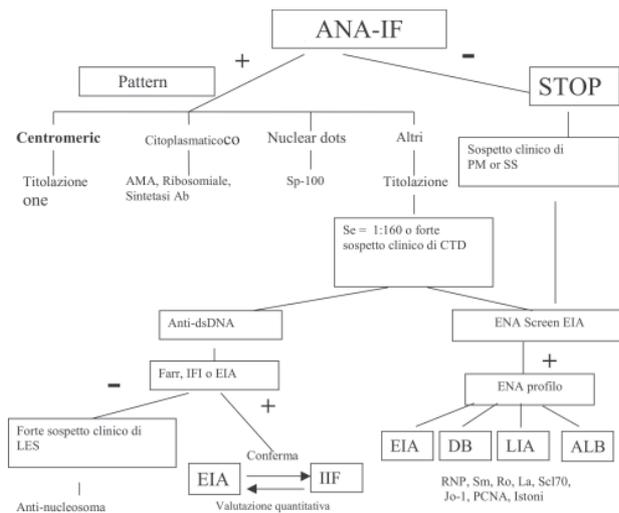


Figura 1. Esempio di algoritmo diagnostico per la diagnosi delle connettiviti.

Tecnologia degli array e proteomica nella diagnosi delle malattie autoimmuni

E' opinione largamente condivisa che le malattie autoimmuni siano il risultato dell'interazione fra fattori genetici predisponenti, condizioni di disregolazione del sistema immunitario e fattori ambientali scatenanti. Dal punto di vista genetico è noto che nel caso delle malattie autoimmuni esiste una complessa interazione tra i prodotti di vari geni, e le analisi genomiche eseguite con la tecnologia degli array possono rilevare quali geni sono attivati nei diversi tessuti dei pazienti affetti da malattie autoimmuni. L'espressione degli RNA messaggeri, comunque, da sola non è in grado di predire se le proteine da essi codificate siano realmente sintetizzate¹⁹. La proteomica, cioè lo studio su larga scala della espressione, funzione e interazione fra proteine²⁰, resa possibile grazie alle nuove tecnologie, potrà essere un mezzo in grado di sopperire a tale limitazione della genomica. E' prevedibile, quindi, che approccio genomico e proteomico associati possano essere la via in grado di condurre alla scoperta delle basi molecolari delle malattie autoimmuni.

L'approccio proteomico può avvalersi di due diversi gruppi di tecnologie: the "unbiased proteomic technologies" and the "biased proteomic technologies". Le prime si riferiscono in genere alla gel elettroforesi bidimensionale (2D) e alla spettrometria di massa²¹ e sebbene non siano dotate di elevata sensibilità esse rappresentano le tecnologie più idonee per lo screening e la identificazione di nuovi autoantigeni o di marcatori correlati con specifiche patologie autoimmuni. Liao e coll. usando la spettrometria di massa hanno identificato biomarcatori proteici nel liquido sinoviale e nel siero di pazienti con artrite reumatoide (AR) in grado di predire la presenza di erosioni ossee e quindi la gravità della malattia²². Drynda e coll. usando la 2D gel elettroforesi, hanno identificato l'eterocomplesso

S100A8/9, anche ripotato con il nome di calprotectina, come il miglior marcatore in grado di distinguere l'AR da altre malattie infiammatorie e dall'osteoartrite²³. Inoltre, Stone e coll. tramite la spettrometria di massa hanno dimostrato come usando tale tecnica fosse possibile distinguere i pazienti con granulomatosi di Wegener in fase di remissione da quelli con malattia in fase attiva²⁴. Se tali tecnologie, quindi, sembrano avere un ruolo importante nella ricerca per l'identificazione di biomarcatori e nuovi autoantigeni, a causa della loro complessità è difficile prevedere che possano venire adottate nei laboratori clinici per un uso routinario.

Le tecnologie proteomiche maggiormente candidate all'utilizzo nei laboratori clinici sono le "biased proteomic technologies". In tal caso, quando una componente sierica o cellulare è stata identificata come un possibile bersaglio anticorpale e di rilievo per la diagnostica di una patologia autoimmune, viene selezionata e utilizzata per comporre il profilo antigenico di un array. Quest'ultimo risulterà più o meno complesso in base alla numerosità delle molecole che lo compongono, che potranno essere anche diverse centinaia negli array planari e fino a un centinaio negli array su microsfera. Con tale tecnologia, quindi, non ci si limita alla identificazione di un singolo anticorpo, bensì si va a rilevare un profilo autoanticorpale che rappresenta lo specifico "fingerprint" del paziente autoimmune, che può essere utile per classificare il paziente in differenti sottogruppi a diverso valore prognostico.

In letteratura sono già state pubblicate diverse esperienze sull'utilizzo di tale tecnologia, ad iniziare dal lavoro di Joos e coll.²⁵, che hanno usato un microarray composto da 18 diversi autoantigeni già ben caratterizzati e ampiamente utilizzati per la diagnosi di varie malattie autoimmuni, quali la perossidasi tiroidea (TPO) per le tireopatie autoimmuni; la mieloperossidasi (MPO) per le vasculiti sistemiche; dsDNA, Sm, SmB'istone, U1snRNP A and C; U1snRNP 68Kd, SSA, SSB, Scl70, CENP-B, Jo1, PM-Scl 100, per le connettiviti; la β 2-glicoproteina I per la APS. Utilizzando la chemiluminescenza come sistema di rilevamento, questi autori hanno dimostrato la elevata sensibilità e specificità del sistema. Robinson e coll. hanno allestito un microarray composto di 196 diverse biomolecole fissate su un vetrino da un apposito sistema robotico²⁶. Gli autori hanno testato il sistema utilizzando sieri ben caratterizzati di pazienti affetti da specifiche malattie autoimmuni. Mentre nella popolazione di controllo non fu evidenziata alcuna positività, nei pazienti affetti da patologie autoimmuni i risultati correlarono con quelli ottenuti con i metodi convenzionali (ELISA, immunoprecipitazione, western-blot). Fu possibile rilevare autoanticorpi a concentrazioni di ng/mL, con un ampio range di linearità, e la sensibilità globale risultò 4-8 volte più elevata rispetto agli ELISA. Più recentemente Feng e coll. hanno sviluppato un microarray contenente 15 autoantigeni per la rilevazione di autoanticorpi presenti nelle malattie reumatiche²⁷. La imprecisione analitica del microarray, misurata tramite il coefficiente

di variazione, è risultata <15% per tutti i 15 autoanticorpi testati, eccetto il dsDNA (18% e 23% intra e inter-assay, rispettivamente), e la sensibilità clinica è risultata superiore rispetto a quella ottenuta con i singoli dosaggi. Gli autori conclusero con l'affermazione che la tecnologia dei microarray può rappresentare un progresso sia in termini di accuratezza che di costo-beneficio nella diagnosi delle malattie autoimmuni. Infine, Hueber e coll. hanno sviluppato un array contenente 225 tra peptidi e proteine, e dimostrato che la risposta autoreattiva B cellulare rivolta verso proteine citrullinate era presente in un sottogruppo di pazienti con AR precoce ed era predittiva di evoluzione verso un forma più severa di AR²⁸. Al contrario, reattività anticorpali verso epitopi nativi della sinovia, inclusi i peptidi gp39 e il collagene tipo II, sono state associate a forme meno severe di AR. L'utilizzo di un sistema proteomico, quindi, può stratificare i pazienti con AR precoce in diversi sottogruppi con importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche.

Ma la ricerca simultanea di molti autoanticorpi tramite l'utilizzo di microarrays può aprire anche nuove frontiere finora difficilmente immaginabili, come quelle della immunologia funzionale o dell'utilizzo degli autoanticorpi come marcatori tumorali. Quintana e coll., utilizzando un microarray composto da 266 differenti autoantigeni, hanno dimostrato che nei topi maschi dei ceppi NOD (diabetici non-obesi), indotti a sviluppare diabete tipo 1 tramite trattamento con ciclofosfamide, il profilo autoanticorpale dei topi che avrebbero in seguito sviluppato il diabete era diverso da quello dei topi resistenti²⁹. Tali dati avvalorerebbero l'ipotesi che l'analisi del repertorio immuno può contribuire allo sviluppo della medicina predittiva. La tecnologia degli array, quindi, può aprire nuovi orizzonti sulla interpretazione della immunità naturale, le malattie autoimmuni e il legame tra le due. Per quanto attiene l'utilizzo dei profili autoanticorpali in oncologia, del tutto recentemente Wang e coll. usando un sistema che combina la "phage-display technology" con la proteomica su microarray hanno identificato e caratterizzato nuovi autoanticorpi capaci di legarsi a proteine specifiche del tessuto prostatico neoplastico, riportando come la definizione della loro presenza sia utile nello screening del tumore della prostata, in quanto dotata di maggior sensibilità e specificità rispetto al dosaggio del PSA (prostate specific antigen)³⁰.

Opportunità e rischi legati alla tecnologia proteomica

In medicina, quando l'avvento di una nuova tecnologia fa intravedere la possibilità di acquisire informazioni che possono aumentare in maniera significativa le conoscenze, nonché cambiare l'approccio diagnostico e terapeutico nei confronti di determinate patologie, la comunità scientifica è pervasa da un senso di euforia. Così è stato a partire da metà degli anni '90 con lo sviluppo degli approcci genomici utilizzando microarrays ad elevata-densità³¹, e lo è stato ancor di più negli

ultimi 5 anni con il diffondersi delle tecnologie proteomiche. Anche se quest'ultime sono ancora nella fase della loro infanzia, per quanto riguarda la tecnologia array che utilizza autoantigeni, è possibile intravedere parecchi campi di potenziali applicazioni. Il primo e più immediato è la definizione di profili autoanticorpali utili per una diagnosi e trattamento precoce delle malattie autoimmuni. Esempi dell'utilizzo dei profili autoanticorpali sono già stati riportati nella AR²⁸⁻³², nella sclerosi multipla³³ e nel diabete di tipo 1³⁴, ma è possibile che con la scoperta di nuovi autoantigeni sia possibile identificare specifici profili autoanticorpali in grado di meglio caratterizzare sottogruppi di pazienti con diverso andamento clinico e risposta terapeutica nella maggior parte delle malattie autoimmuni. Altra potenzialità delle tecnologie proteomiche è il monitoraggio dello "spreading" epitopico. Quest'ultimo può essere visto come un indice di una risposta autoimmune più severa e progressiva, fornendo al clinico indicazioni utili per una migliore scelta terapeutica³⁵. La tecnologia degli array, inoltre, permettendo di definire gli isotipi anticorpali e quindi il bilancio Th1 versus Th2, favorisce la comprensione di alcuni aspetti patogenetici, che possono in futuro avere ripercussioni anche sul fronte terapeutico, quali l'utilizzo di terapie antigene specifiche o vaccini tollerizzanti³⁵.

Tuttavia, se queste possibili applicazioni possono giustificare il grande interesse verso tali metodiche, non possono d'altra parte essere sottovalutati i possibili rischi legati al loro utilizzo.

Da un punto di vista strettamente analitico, con gli array planari, ad esempio, alcuni autoantigeni, come proteine Sm e istoniche, possono essere non rilevate, presumibilmente per una perdita della loro struttura tridimensionale, interferenze steriche o repulsioni elettrostatiche²⁶. Tali metodi, quindi, devono ancora essere perfezionati e sottoposti ad attenta validazione analitica, affinché le performance di ognuna delle componenti antigeniche siano comparabili con quelle ottenute utilizzando le metodiche di uso già consolidato. Processi di standardizzazione, allestimento di programmi specifici di controllo di qualità e un miglioramento dei sistemi statistici di elaborazione delle informazioni derivanti dalla lettura degli array sono inoltre necessari prima che queste tecnologie vengano utilizzate nei laboratori clinici.

Per quanto riguarda l'utilizzo clinico, le problematiche possono diversificarsi in base al fatto che siano considerati profili limitati, e comunque composti da autoantigeni già noti e ampiamente utilizzati nelle metodiche tradizionali, come avviene in genere con gli array su microsfera già in commercio, oppure si tratti di arrays più complessi, costituiti da decine o centinaia di molecole autoantigeniche, molte delle quali di recente identificazione, ancora poco studiate e di incerto significato clinico. Nel primo caso eventuali problemi possono essere legati alla gestione di un dato autoanticorpale inatteso sulla base del sospetto clinico iniziale. Tale evento può essere frequente qualora vengano utilizzati

Tabella 1. Esempi di profili autoanticorpali utili nella pratica clinica.

<i>Quesito clinico</i>	<i>Profilo autoanticorpale</i>
Il paziente è affetto da CTD?	Ro, La, RNP, Sm, Scl70, Jo1, rib-P, dsDNA, nucleosomi, CENP-B
Il paziente è affetto da miosite?	Mi-2, Jo1, Pl-7, Pl-12, PM-Scl
Il paziente è affetto da vasculite autoimmune?	MPO-ANCA, PR3-ANCA
Il paziente è affetto da epatopatia autoimmune?	AMA-M2, SLA/LP, LKM1, LC1, SP100, Actina
Il paziente è a rischio di sviluppare diabete tipo 1?	IAA, GADA, IA2
Il paziente è affetto da AR?	FR, CCP, RA33

profili autoantigenici estesi, non patologia orientati o comunque non costruiti per dare risposta ad uno specifico quesito clinico. La flessibilità del sistema e la composizione dei profili, quindi, assumono una importanza fondamentale nella gestione dei nuovi sistemi diagnostici basati sulla tecnologia degli array. Nella tabella I vengono riportati alcuni possibili profili di arrays costruiti secondo la logica di dare risposta ad uno specifico quesito diagnostico.

Più complesse sono le problematiche che possono presentarsi sul piano clinico interpretativo, utilizzando gli array più complessi. In tal caso, oltre all'aiuto indispensabile derivante dalla bioinformatica, sono fondamentali studi prospettici, multicentrici, su larga scala, condotti al fine di imparare a interpretare il significato delle diverse tipologie di profili autoanticorpali. A tale scopo, è necessario stabilire nuovi standard comuni da adottare per progettare gli studi, pubblicare e interpretare i dati ottenuti utilizzando queste metodologie³¹. E' d'altra parte molto probabile che in una prima fase l'utilizzo di tecnologie proteomiche generi dei problemi sul piano interpretativo. In particolare, la sfida più grande, ma anche più coinvolgente, sarà la valutazione del preciso significato clinico delle nuove e diverse specificità autoanticorpali evidenziate con tali tecnologie, anche alla luce della loro associazione con le specificità autoanticorpali già note.

Se c'è chi prevede che si stia per entrare "in un periodo di fitta nebbia"³⁶ la speranza è che nel momento in cui avremo imparato a trarre informazioni dai risultati ottenuti con le nuove tecnologie avremo a disposizione mezzi diagnostici senz'altro più efficaci nell'approccio al paziente autoimmune.

In questa fase in cui le tecnologie proteomiche stanno muovendo i primi passi, clinici e patologi devono lavorare in stretta sinergia per programmare quegli studi che si spera nel giro di 5-6 anni possano portare a delle risposte chiare sul ruolo diagnostico, prognostico e predittivo della risposta terapeutica relativa all'utilizzo dei test multiparametrici. Solo quando sarà chiaramente dimostrata la loro utilità, tali tecniche potranno trovare impiego diagnostico, evitando così che si inizi a correre, prima ancora di aver imparato a camminare³⁷.

Conclusioni

E' molto probabile che nel prossimo futuro il progresso tecnologico, e in particolare le tecnologie proteomiche e lo sviluppo dei microarrays, modifichino in

maniera sostanziale l'approccio diagnostico alle malattie autoimmuni. Profili autoanticorpali composti da decine, se non centinaia di autoanticorpi saranno in grado di definire lo specifico "fingerprint" autoanticorpale di ogni paziente, selezionando sottoclassi di pazienti a diversa valenza prognostica e con diversa risposta terapeutica. Le tecnologie proteomiche necessitano ancora di essere perfezionate e di essere poi sottoposte a opportuni protocolli di validazione analitica. Una volta che le tecniche saranno ritenute affidabili, dovranno seguire studi di validazione clinica in cui clinici e patologi assieme definiranno le potenzialità, in termini di accuratezza diagnostica e di impatto sull'outcome clinico, delle tecniche in esame. Solo quando i risultati di tali studi saranno noti e confermati, si potrà pensare ad un loro utilizzo nel laboratorio clinico. In ogni caso, poiché il principio che deve sempre guidare la richiesta, il processo diagnostico e la risposta ad un quesito clinico è quello dell'appropriatezza, la filosofia che deve sottendere allo sviluppo di tali sistemi diagnostici è legata da un lato alla loro flessibilità e dall'altro al fatto che siano in grado di rispondere ad uno specifico quesito clinico. Microarrays generici pensati per rispondere ad una generica ipotesi di possibile malattia autoimmune rischiano di aumentare la quota dei risultati falsi positivi, con il pericolo di indurre delle diagnosi errate e successivi accertamenti strumentali anche invasivi e costosi e comunque arrecanti disagio al paziente. Quindi, anche se nel prossimo futuro le conquiste tecnologiche porteranno ad un cambiamento radicale delle diagnostiche di laboratorio delle malattie autoimmuni, finché non saranno conosciuti in maniera soddisfacente le loro potenzialità e i loro limiti, l'approccio diagnostico alle malattie autoimmuni dovrà continuare ad avvalersi delle tecnologie tradizionali e degli algoritmi diagnostici proposti dalle linee guida nazionali e internazionali, definite sui principi dell'appropriatezza e della medicina basata sull'evidenza.

Bibliografia

1. van Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24:333-58.
2. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NT, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
3. Hochberg M. Updating the American College of Rheuma-

- tology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725-34.
4. 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.
 5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the preliminary classification criteria for antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2005; 3:1-12.
 6. Bootsma H, Spronk P, Derksen R, de Boer G, Wotters-Dicke H, Hermans J, et al. Prevention of relapse systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1995; 345:1595-9.
 7. Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The TH, van der Hem GK, et al. Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990; 336:709-11.
 8. Scofield RH. Autoantibodies as predictor of disease. *Lancet* 2004; 383:1544-6.
 9. Gonzales-Buitrago JM, Gonzales C. Present and future of the autoimmunity laboratory. *Clin Chim Acta* 2005; Aug 25 (Epub ahead of print).
 10. College of American Pathologists. Standard for laboratory accreditation. Northfield: College of American Pathologists, 1996.
 11. Price CP. Application of the principles of evidence-based medicine to laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2003; 333:147-54.
 12. American College of Rheumatology ad hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. *Arthritis Care Res* 2002; 47:429-33.
 13. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:316-24.
 14. James S. National Institutes of Health consensus development conference statement on celiac disease. Jan 28-30, 2004. *Gastroenterology* 2005; 128(suppl 1):S1-S9.
 15. 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.
 16. Plebani M. Appropriateness in programs for continuous quality improvement in clinical laboratories. *Clin Chim Acta* 2003; 333:131-9.
 17. Wiik AS. Appropriateness of autoantibody testing in clinical medicine. *Clin Chim Acta* 2003; 333:177-80.
 18. Bizzaro N, Wiik A. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:349-55.
 19. Fathman CG, Soares L, Chan SM, Utz PJ. An array possibilities for the study of autoimmunity. *Nature* 2005; 435:605-11.
 20. Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:3998-4002.
 21. Canelle L, Bousquet J, Pionneau C, Deneux L, Imam-Sghiouar N, Caron M, et al. An efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies. *J Immunol Methods* 2005; 299:77-89.
 22. Liao H, Wu J, Kuhn E, Chin W, Chang B, Jones MD, et al. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3792-803.
 23. Drynda S, Ringel B, Kekow M, Kuhne C, Drynda A, Glocker MO, Thiesen HJ, Kekow J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004; 200:165-71.
 24. Stone JH, Rajapakse VN, Hoffman GS, Specks U, Merkel PA, Spiera RF, et al. A serum proteomic approach to gauging the state of remission in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:902-10.
 25. Joos T, Schrenk M, Höpfl P, Kroger K, Chowbhury U, Schorner D. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 2000; 21:2641-50.
 26. Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haan BB, Kamachi M, Dean EJ, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nature Med* 2002; 8:295-301.
 27. Feng Y, Ke X, Ma R, Chen Y, Hu G, Liu F. Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases. *Clin Chem* 2004; 50: 416-22.
 28. Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, Lee BJ, Bruce B, Fries JF, et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2645-55.
 29. Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR. Functional immunomics: Microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:14615-21.
 30. Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giachero D, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1224-35.
 31. Moser KL, Gaffney PM, Grandits ME, Emamian ES, Machado DB, Baechler EC, et al. The use of microarrays to study autoimmunity. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2004; 9:18-22.
 32. Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Zucano A, Pansini N. Proteomic: new advances in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2005; 357: 219-25.
 33. Hueber W, Utz PJ, Steinman L, Robinson WH. Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease. *Arthritis Res* 2002; 4: 290-5.
 34. Pietropaolo M, Eisenbach GS. Autoantibodies in human diabetes. *Curr Dir Autoimmun* 2001; 4:252-82.
 35. Robinson WH, Garren H, Utz PJ, Steinman L. Millennium Award, proteome for the development of DNA tolerizing vaccines to treat autoimmune disease. *Clin Immunol* 2002; 103:7-12.
 36. Shoenfeld Y, Tincani A. Introduction autoantibodies – the smoke and the fire. *Autoimmunity* 2005; 38:1-2.
 37. Check E. Running before we can walk? *Nature* 2004; 249:496-7.