Articolo Originale

Valutazione di 4 kit diagnostici per la ricerca degli anticorpi anti-nucleo su cellule HEp-2 e HEp-2000 con metodica di immunofluorescenza indiretta

E. Tonutti[a], A. Picierno[a], D. Visentini[a], M. Butazzoni[a], P. Molinaro[a], E. Grimaldi[a], N. Bizzaro[b]

[a]Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine
[b]Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo (UD)

Riassunto

Premessa. La diagnosi delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS) viene posta secondo criteri clinici e immunologici; tra quest'ultimi, un ruolo determinante hanno gli anticorpi anti-nucleo (ANA) la cui ricerca rappresenta la prima indagine di laboratorio nell'approccio diagnostico alle MAIS. Questo studio ha l'obiettivo di valutare le caratteristiche analitiche e di sensibilità diagnostica di quattro kit commerciali per la ricerca degli ANA in immunofluorescenza indiretta (IFI) su substrato di cellule HEp-2.

Metodi. In 409 sieri (328 giunti consecutivamente nel nostro laboratorio per la ricerca degli ANA e 81 selezionati perché ANA e/o ENA positivi) sono stati ricercati gli ANA con 4 diversi test HEp-2 in IFI (Inova, Euroimmun, BioRad, ImmunoConcepts) e gli anticorpi anti-ENA e anti-dsDNA con metodi ELISA. Dei 4 kit ANA, sono state valutate le diverse procedure di analisi, le caratteristiche dei substrati, i pattern di fluorescenza e il titolo, e le positività per anti-ENA e anti-dsDNA. La sensibilità clinica di ciascun kit è stata calcolata su 78 sieri che appartenevano a pazienti con diagnosi di MAIS.

Risultati. Le percentuali di positività degli ANA al titolo ≥ 1:40 sono state rispettivamente del 59% per Euroimmun e per Bio-Rad, del 58% per ImmunoConcepts e del 52% per Inova. 86 sieri sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-ENA (39 anti-SSA, 6 anti-SSB, 23 anti-SSA/SSB, 8 anti-RNP, 6 anti-Scl70, e 1 ciascuno anti-Sm, anti-RNP/Sm, SSA/Jo1 e Jo1) e 14 per anti-dsDNA con risultati comparabili tra i 4 kit. La differenza maggiore è stata osservata per l'anticorpo anti-SSA: dei 39 sieri con positività isolata per anti-SSA, 8 (20%) sono risultati ANA negativi con il kit Inova, 9 (23%) con il kit Euroimmun, 10 (26%) con Bio-Rad e 5 (13%) con ImmunoConcepts. In maniera analoga, nei 78 sieri di pazienti affetti da MAIS, la maggior parte dei risultati negativi si è registrata nei pazienti con sindrome di Sjögren anti-SSA positivi in cui il kit Inova è risultato negativo nel 9% dei casi, Euroimmun e Bio-Rad nel 10% e ImmunoConcepts nel 2.5%.

Conclusioni. Le performance dei 4 kit ANA HEp-2 sono risultate più che soddisfacenti e, considerando le difficoltà intrinseche al metodo di IFI, la comparazione ha dimostrato livelli di sensibilità analitica e diagnostica accettabili per tutti i metodi valutati. Il kit ImmunoConcepts ha fornito percentuali più elevate di sensibilità nel gruppo di pazienti con anticorpi anti-SSA.

Summary

Evaluation of 4 diagnostic kits for the search of anti-nuclear antibodies by indirect immunofluorescence on HEp-2 and HEp-2000

Background. The diagnosis of connective tissue disease (CTD) is based on clinical and immunological criteria. Among them, the anti-nuclear antibodies (ANA) hold a determining role and represent the first laboratory approach in the diagnosis of CTD. The objective of this study was to evaluate the analytical characteristics and diagnostic sensitivities of four commercial methods for the detection for ANA by indirect immunofluorescence (IIF) on HEp-2 and on HEp-2000 cell substrates.

Ricevuto: 06-11-2006 Accettato: 13-12-2006 Pubblicato on-line: 13-01-2007

Corrispondenza a: Dott. Elio Tonutti, Laboratorio di Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine, Piazzale S. Maria della Misericordia, 33100 Udine. Tel. 0432-552403, fax 0432-552402, e-mail: tonutti.elio@aoud.sanita.fvg.it

Methods. Four different IIF tests (Inova, Euroimmun, BioRad, ImmunoConcepts) were used to search for ANA in 409 sera (328 of them came to the lab with a request for ANA search, 81 were selected because either ANA and/or ENA positive). The 4 ANA kits were evaluated based on the various analytical methods, the substrate characteristics, the fluorescence pattern and title, and the anti-ENA and anti-dsDNA positivities. The clinical sensitivity of each kit was calculated on 78 CTD diagnosed sera.
Results. The percentage of the ANA positivities (≥ 1:40) was: 59% with Euroimmun and Bio-Rad, 58% with ImmunoConcepts and 52% with Inova. 86 sera were positive for anti-ENA antibodies (39 anti-SSA, 6 anti-SSB, 23 anti-SSA/SSB, 8 anti-RNP, 6 anti-Scl70, and one each anti-Sm, anti-RNP/Sm, SSA/Jo1 and Jo1). 14 were positive for anti-dsDNA with comparable results among the 4 kits. The biggest difference was noted in the anti-SSA antibody. Of the 39 sera showing isolated anti-SSA positivity, 8 (20%) were ANA negative with the Inova kit, 9 (23%) with the Euroimmun kit, 10 (26%) with Bio-Rad, and 5 (13%) with ImmunoConcepts.
Similarily, in the 78 sera of patients affected by CTD, the large majority of the negative results were observed in anti-SSA positive patients with Sjögren's syndrome. The Inova kit was negative in 9% of the cases, Euroimmun and Bio-Rad in 10%, and ImmunoConcepts in 2.5%.
Conclusions. The performance of the four ANA kits was more than satisfactory. Considering the inherent difficulties of the IIF method, the comparison has shown acceptable levels of diagnostic and analytic sensitivity for all the methods evaluated. The ImmunoConcept kit provided higher sensitivity percentages in the group of patients with anti-SSA antibodies.
Key words: Anti-nuclear antibodies, indirect immunofluorescence, HEp-2, HEp-2000, diagnostic accuracy.

Introduzione

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA) hanno acquisito un ruolo di notevole importanza nell'ambito dell'immunologia clinica e la loro valutazione rappresenta l'esame più utilizzato nella fase di approccio diagnostico delle malattie autoimmuni sistemiche (MAIS)[1]. Sebbene il ruolo degli ANA nella patogenesi delle MAIS non sia stato ancora del tutto chiarito, la presenza di tali autoanticorpi è stata inclusa tra i criteri classificativo-diagnostici di queste patologie, validati dalla comunità scientifica internazionale per quanto riguarda il lupus eritematoso sistemico (LES)[2,3], la sclerosi sistemica (SSc)[4], la sindrome di Sjögren (SS)[5] e altre patologie sistemiche autoimmuni[6,7].

Attualmente la metodica di elezione per la ricerca degli ANA è l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su un monostrato di cellule in linea continua derivanti da carcinoma laringeo umano (HEp-2)[8]; questo test offre buone performance in termini di sensibilità, riproducibilità e facilità di esecuzione[9] sebbene abbia il limite di essere una procedura analitica di difficile standardizzazione, sia nella fase metodologica che in quella interpretativa. La metodica IFI su HEp-2 consente di individuare uno spettro molto ampio di autoanticorpi diretti contro antigeni noti ma anche contro antigeni non ancora ben definiti, ed è generalmente impiegata come esame di primo livello nella diagnostica delle MAIS[10]. I sieri positivi agli ANA necessitano di ulteriori indagini per definire il target delle specificità autoanticorpali che può essere rappresentato da acidi nucleici (principalmente DNA a doppia elica, dsDNA) o complessi nucleoproteici, denominati genericamente ENA (antigeni nucleari estraibili)[11]. E' noto comunque che, in presenza di autoanticorpi ENA anti-SSA e anti-Jo1, la metodica IFI su HEp-2 non offre sensibilità assoluta; infatti, sia per la scarsa concentrazione di questi antigeni nelle cellule HEp-2, sia per la loro elevata solubilità, nel 20% circa dei sieri anti-SSA positivi e nella maggior parte dei sieri con anticorpi anti-Jo1 il test ANA risulta negativo[11,12].

Obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare le performance analitiche di 4 kit per la ricerca degli ANA in IFI, scelti tra quelli più commercializzati in Europa. La valutazione dei kit è stata eseguita attraverso un'analisi dei risultati ottenuti su 409 campioni di siero sui quali sono stati ricercati anche gli anticorpi anti-ENA e anti-dsDNA. Le correlazioni sono state eseguite prendendo in considerazione le specificità autoanticorpali identificate con i test di secondo livello e le diagnosi cliniche.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su 409 sieri, di cui 328 giunti consecutivamente nel nostro laboratorio per l'esecuzione del test ANA e 81 selezionati per positività ai test ANA e/o ENA e/o DNA o per diagnosi clinica di MAIS (effettuata secondo i criteri internazionali). I campioni di siero sono stati conservati a –20°C suddivisi in aliquote. Ciascun campione è stato testato per la ricerca degli ANA (effettuata con tutti i test a disposizione) e anti-ENA, mentre gli anti-dsDNA sono stati ricercati solamente sui sieri che erano risultati positivi a uno o più dei 4 kit ANA.

I test sono stati eseguiti secondo le indicazioni fornite dai produttori, utilizzando i kit: Nova Lite™ HEp-2 (Inova Diagnostics, San Diego, CA), Euroimmun HEp-2 (Euroimmun, Lubecca, Germania), Kallestad™ HEp-2 Cell Line Substrate (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, Francia), HEp-2000® Fluorescent ANA-Ro (ImmunoConcepts, Sacramento, CA). Tutti i test utilizzano un substrato di cellule HEp-2. ImmunoConcepts propone un substrato HEp-2 che si differenzia

Tabella I. Caratteristiche dei 4 substrati di cellule HEp-2.

Kit	*n° cellule*	*n° mitosi per campo*	*Morfologia cellulare (aspetto)*	*Fluorescenza aspecifica(livello)*
Inova	Medio	6	Omogeneo	Basso
Euroimmun	Alto	15	Disomogeneo	Medio (citoplasmatico e nucleare)
Bio-Rad	Alto	6	Molto omogeneo	Medio (nucleare)
ImmunoConcepts	Alto	8	Omogeneo	Basso

Tabella II. Percentuali di positività ANA osservate con ciascun kit HEp-2 nei 409 sieri indagati.

	Inova *% (n°)*	*Euroimmun* *% (n°)*	*Bio-Rad* *% (n°)*	*ImmunoConcepts* *% (n°)*
POS ≥ 1:40	52% (211)	59% (240)	59% (240)	58% (236)
POS ≥ 1:160	39% (161)	42% (172)	39% (162)	45% (184)

sostanzialmente in quanto le cellule sono transfettate con copie multiple di DNA specifico per la sintesi dell'antigene SSA 60kDa (cellule HEp-2000^{R}) con l'obiettivo di iperesprimere SSA e aumentare la sensibilità analitica del test[13].

Le caratteristiche analitiche dei 4 kit sono molto simili con qualche lieve e non significativa differenza per quanto riguarda la quantità di siero utilizzato, i tempi di incubazione e di lavaggio. Il tipo di coniugato utilizzato è in tutti i casi rappresentato da anticorpi anti-IgG umane, ed è ottenuto con sensibilizzazione di capra per Inova, Euroimmun e ImmunoConcepts e di asino per Bio-Rad.

La determinazione del pattern fluoroscopico e del titolo anticorpale è stata eseguita con microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse E400 (utilizzando obiettivo a 40x) mediante valutazione indipendente da parte di due operatori con maturata esperienza nella fase interpretativa dei preparati fluoroscopici. La soglia di positività è stata definita al titolo di 1:40 che era anche la diluizione di partenza per tutti i kit utilizzati.

Gli anti-ENA sono stati ricercati con un metodo immunoenzimatico di screening (DIASTAT™ ENA, EuroDiagnostica, Medeon, Svezia). Il test permette la rilevazione simultanea di autoanticorpi della classe IgG specifici verso un pool di antigeni (Sm, RNP, SSA, SSB, Scl70 e Jo1) discriminando i campioni in positivi e negativi. In caso di positività del test di screening è stata eseguita la ricerca delle singole specificità anticorpali anti-ENA (ELISA QUANTA Lite™, Inova). La ricerca degli anti-dsDNA è stata eseguita con metodo ELISA non competitivo indiretto (VARELISA™, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germania). Il test anti-dsDNA in IFI su substrato *Crithidia luciliae* (NOVA LITE™, Inova) è stato eseguito come test di conferma sui sieri positivi agli anti-dsDNA in ELISA. Le determinazioni immunoenzimatiche degli anti-dsDNA e degli anti-ENA sono state effettuate con l'ausilio di uno strumento automatizzato dedicato agli immunodosaggi che esegue le fasi di pre-diluizione dei campioni, dispensazione, incubazione e lettura (DSX System Dynex Technologies, VI, USA).

Un metodo di blot (Euroline ANA Profile 3 IgG profile, Euroimmun) per un'analisi approfondita degli anti-ENA, degli anti-DNA e anti-centromero è stato utilizzato solo in alcuni casi particolari: campioni con risultati contraddittori, con quadri fluoroscopici peculiari o con più pattern sovrapposti.

Risultati

La valutazione dei quattro substrati HEp-2 utilizzati ha permesso di identificare alcune caratteristiche tecniche proprie di ciascun kit; in particolare sono stati considerati i parametri di cellularità, numero di mitosi, morfologia delle cellule fissate e presenza di fluorescenza aspecifica; come riportato in Tabella I risultano evidenti alcune peculiarità dei singoli kit. Il kit Euroimmun presenta un'alta cellularità associata ad un elevato numero di mitosi che determinano una sostanziale disomogeneità della morfologia cellulare; presenta inoltre un discreto grado di fluorescenza aspecifica del citoplasma e parzialmente anche a livello nucleare. Inova, Bio-Rad e ImmunoConcepts sono caratterizzati invece da un numero di mitosi inferiore con una maggiore omogeneità della morfologia cellulare; la fluorescenza aspecifica nucleare è irrilevante per Inova e ImmunoConcepts, mentre è più elevata per Bio-Rad.

Dei 409 sieri testati, sono risultati positivi ad un titolo ≥ 1:40 il 52% con il kit Inova, il 58% con il kit ImmunoConcepts, il 59% con i kit Euroimmun e Bio-Rad (Tab. II).

Prendendo come soglia di significatività clinica il titolo di 1:160[10,11,14] le percentuali di positività sono state 39% con Inova e Bio-Rad, 42% con Euroimmun e 45% con ImmunoConcepts (Tab. II).

La fase interpretativa ha permesso di individuare sui quattro substrati i principali pattern di fluorescenza nucleare e citoplasmatica[10], con una netta prevalenza in tutti i kit del pattern "speckled" (granulare) (Tab. III). Il pattern misto speckled/nucleolare, caratteristico dei sieri

Tabella III. Numero e percentuale di sieri positivi per i pattern di fluorescenza individuati con ciascun kit ANA HEp-2.

PATTERN	*Inova* *n° (%)*	*Euroimmun* *n° (%)*	*Bio-Rad* *n° (%)*	*ImmunoConcepts* *n° (%)*
Speckled	126 (60)	120 (50%)	149 (62%)	105 (44.5%)
Speckled/Omogeneo	16 (8)	29 (12%)	21 (9%)	18 (8%)
Speckled/Nucleolare	7 (3.5)	11 (5%)	6 (2.5%)	31 (13%)
Omogeneo	10 (5)	9 (4%)	15 (6%)	12 (5%)
Nucleolare	20 (9.5)	28 (11.5%)	10 (4%)	35 (14.5%)
Centromerico	11 (5)	11 (5%)	11 (5%)	13 (5.5%)
PCNA	5 (2)	5 (2%)	6 (2.5%)	6 (2%)
Matrice Nucleare	8 (4)	3 (1.5%)	5 (2%)	5 (2%)
Fase Replicativa	1	7 (3%)	3 (1 %)	3 (1%)
Citoplasmatico	3 (1)	12 (5%)	9 (4%)	5 (2%)
Altro	4 (2)	5 (2%)	5 (2%)	3 (1%)
TOTALE	211	240	240	236

con positività per anti-SSA analizzati con substrato HEp-2000[R 15], è stato riscontrato in meno del 5% dei sieri positivi con i kit Inova, Euroimmun e Bio-Rad, e nel 13% dei sieri con il kit ImmunoConcepts. La percentuale di pattern che identificano antigeni propri della fase replicativa sommata alla percentuale di pattern rari (cui si attribuisce scarso significato clinico) è risultata del 8% con Inova, 11% con Euroimmun, 9% con Bio-Rad e del 7% con ImmunoConcepts (Tab. III).

Il test ENA screening eseguito con metodo ELISA su tutti i 409 sieri è risultato positivo in 106 casi. In 86 di questi sono state individuate con il test ENA profilo una o più specificità anticorpali: 39 SSA, 6 SSB, 23 SSA/SSB, 8 RNP, 1 Sm, 1 RNP/Sm, 6 Scl70, 1 Jo1, 1 SSA/Jo1. Correlando la positività ANA di ciascun kit con la positività anti-ENA si è osservato che non tutti i sieri ENA positivi erano stati identificati al test ANA HEp-2; in particolare i sieri con anticorpi anti-SSA sono risultati negativi nel 20.5%, 23%, 26%, 13% dei casi rispettivamente con i kit Inova, Euroimmun, Bio-Rad e ImmunoConcepts. Il solo siero con specificità isolata per Jo1 è risultato negativo con tutti i 4 i kit (Tab. IV).

Il test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA è stato eseguito su 324 sieri selezionati perché ANA positivi anche ad uno solo dei 4 kit HEp-2. Solo 18 (6%) sono risultati positivi al test dsDNA ELISA e, tra questi, 14 sono stati i casi che hanno avuto conferma con il metodo anti-dsDNA in IFI su *Crithidia luciliae*. Un solo siero dei 14 positivi con DNA IFI non risultava identificato dal metodo ANA HEp-2 con i kit Euroimmun, Bio-Rad e ImmunoConcepts.

78 sieri appartenevano a pazienti con una diagnosi clinica di MAIS, in particolare 19 LES, 18 SS, 16 connettivite indifferenziata (UCTD), 10 SSc, 5 Raynaud, 5 connettivite mista (MCTD), 3 artrite reumatoide (AR) e 2 polimiosite (PM). Alcuni dei campioni appartenenti a questo gruppo sono risultati negativi nei test ANA: Inova ha dato esito negativo per 4 SS, 2 PM e 1 UCTD; Euroimmun per 6 SS, 1 PM e 1 UCTD; Bio-Rad per 6 SS e 2 PM; ImmunoConcepts per 1 SS e 1 PM. Tutti i sieri di soggetti con diagnosi di LES, SSc, Raynaud, MTCD e AR sono risultati positivi ai 4 kit ANA (Tab. V).

Discussione

Il metodo di elezione per la ricerca degli ANA è l'immunofluorescenza indiretta su substrato di cellule HEp-2 anche se è noto che tale metodo non presenta sensibilità assoluta in presenza di autoanticorpi anti-SSA e anti-Jo1[10]. Infatti a causa della scarsa concentrazione e della elevata solubilità degli antigeni, il test ANA HEp-2 risulta negativo nel 20% circa dei sieri SSA positivi e nella maggior parte dei sieri con anticorpi anti-Jo1[11,12]. In commercio sono disponibili numerosi kit diagnostici con monostrato di cellule HEp-2 che presentano diverse caratteristiche e quindi si comportano in maniera non omogenea nella rilevazione degli ANA[16]; in particolare le differenze sono identificabili nel tipo di linea cellulare utilizzata (HEp-2 normale o transfettata), nel tipo di fissativo (etanolo, acetone, etc.), nel tipo di coniugato e di procedure consigliate per l'esecuzione del test.

Questo studio aveva come obiettivo la comparazione di quattro test ANA tra i più utilizzati in Italia e nei paesi europei.

Analizzando la percentuale di sieri ANA positivi, è stata evidenziata una differenza di sensibilità tra i quattro kit: Inova ha dato risultati positivi nel 52% dei casi, Euroimmun e Bio-Rad nel 59% e ImmunoConcepts nel 58% dei casi. Tali percentuali di positività sono sicuramente elevate, ma è necessario ricordare che la casistica era costituita oltre che da 328 sieri selezionati dalla routine (in cui vi è una prevalenza di ANA negativi), anche da 81 sieri già identificati come ANA e/o ENA e/o DNA positivi. La differenza nelle percentuali di positività al titolo ≥ 1:160 è risultata insignifi-

Tabella IV. Sieri reattivi per le specificità anti-ENA o anti-dsDNA (ELISA e *Crithidia*) risultati ANA negativi con ciascun Kit ANA HEp-2.

ANTIGENI	*n°*	*Inova* NEGATIVI *n° (%)*	*Euroimmun* NEGATIVI *n° (%)*	*Bio-Rad* NEGATIVI *n° (%)*	*ImmunoConcepts* NEGATIVI *n° (%)*
SS-A	39	8 (20.5)	9 (23)	10 (26)	5 (13)
SSA/Jo1	1	1	0	1	0
SSA/SSB	23	0	0	1	0
Jo1	1	1	1	1	1
Scl70	6	1	1	1	1
SSB	6	1	1	0	2
RNP	8	0	1	0	0
RNP/Sm	1	0	0	0	0
Sm	1	0	0	0	0
dsDNA (ELISA e Crithidia +)	14	0	1	1	1
TOTALE	100	12 (12)	14 (14)	15 (15)	10 (10)

cante tra i kit Inova (39%), Euroimmun (42%) e Bio-Rad (39%); il kit ImmunoConcepts si è dimostrato invece il test con una più elevata percentuale (45%) di sieri positivi a titolo ≥ 1:160, dovuta probabilmente al fatto che questo test utilizza cellule HEp-2 transfettate con SSA 60 kDa e quindi in grado di identificare un maggior numero di sieri SSA positivi e con titoli più elevati rispetto agli altri kit[17,18].

Considerando i quadri di fluorescenza non si sono osservate differenze significative nelle percentuali di sieri positivi con pattern omogeneo, centromerico e PCNA individuati con ciascun kit. E' stato invece riscontrato un numero maggiore di sieri con pattern nucleolare e speckled/nucleolare con ImmunoConcepts rispetto agli altri kit, mentre la percentuale di sieri con pattern speckled era più alta con Inova, Euroimmun e Bio-Rad piuttosto che con ImmunoConcepts. Ciò può essere in parte spiegato dal fatto che, con alcuni sieri SSA positivi, la fluorescenza sulle cellule HEp-2000^R si manifesta con un pattern speckled/nucleolare o nucleolare, mentre negli altri 3 kit è generalmente di tipo speckled[15]. Il kit Euroimmun ha evidenziato rispetto agli altri kit una percentuale più elevata di sieri con pattern specifici per antigeni della fase replicativa cellulare (fuso mitotico, mid-body) e per antigeni citoplasmatici non mitocondriali; tale riscontro può essere messo in relazione all'elevato indice mitotico delle cellule HEp-2 Euroimmun, e benchè questi pattern non siano in genere rilevanti per la diagnosi di patologie autoimmuni sistemiche[10], la presenza di numerose figure mitotiche è di grande utilità nella identificazione del pattern centromerico.

Per quanto riguarda le specificità ENA, i 4 kit ANA hanno fornito performance più che buone e sovrapponibili con i sieri reattivi per gli antigeni RNP e Sm. In riferimento alle altre specificità si è osservato che su 6 sieri con positività isolata anti-SSB il kit Bio-Rad era positivo in tutti i casi, Inova ed Euroimmun perdevano un siero e ImmunoConcepts ne perdeva 2; su 6 sieri Scl70 positivi uno (che non presentava diagnosi di sclerodermia) è risultato negativo con tutti e 4 i kit; analogamente l'unico siero che in ELISA era risultato positivo per Jo1 è risultato negativo con tutti i kit ANA.

Un discorso a parte va fatto per gli anticorpi anti-SSA. Anti-SSA è infatti l'anticorpo anti-ENA che si riscontra più frequentemente e ciò è evidente anche nella nostra casistica dove la positività isolata per SSA è stata evidenziata in 39 sieri, associata a SSB in altri 23 sieri, mentre un siero è risultato positivo per SSA e Jo1. Ciò suggerisce che l'utilizzo di un test ANA con una elevata sensibilità per SSA può avere importanti ricadute ai fini diagnostici. Numerosi dati in letteratura indicano che le cellule HEp-2000^R transfettate con la proteina SSA 60kDa presentano una maggiore sensibilità nella determinazione degli anticorpi anti-SSA con test in IFI[15,17,18]. In effetti, nei 39 sieri con positività isolata per anti-SSA, i kit Inova, Euroimmun e Bio-Rad sono risultati negativi in percentuale maggiore (tra il 20 e il 26%), rispetto al kit ImmunoConcepts che è risultato negativo solo nel 13% dei casi.

E' necessario per altro sottolineare come l'impiego di cellule SSA arricchite non è sempre in grado di rilevare tutti i sieri con anticorpi anti-SSA[19]; anche nella nostra casistica 5 sieri sui 39 anti-SSA positivi sono risultati negativi con il kit ImmunoConcepts. In uno studio pubblicato recentemente[19] in cui è stata eseguita una comparazione tra un kit ANA HEp-2 e il kit ImmunoConcepts ANA HEp-2000^R, su 494 sieri analizzati si è osservato che alcuni casi di positività ENA hanno fornito risultati negativi con entrambi i kit. Questi dati supportano i risultati ottenuti nel nostro studio e confermano la necessità di eseguire, indipendente-

Tabella V. Sieri con diagnosi di MAIS risultati ANA HEp-2 negativi per ciascun kit (tra parentesi, le specificità dei sieri risultati negativi).

CLINICA	*n° PAZIENTI*	*Inova NEGATIVI*	*Euroimmun NEGATIVI*	*Bio-Rad NEGATIVI*	*ImmunoConcepts NEGATIVI*
LES	19	0	0	0	0
Sjögren	18	4 (SSA)	6 (SSA)	6 (SSA)	1 (SSA)
UCTD	16	1 (SSA)	1 (RNP)	0	0
Sclerodermia	10	0	0	0	0
Raynaud	5	0	0	0	0
MTCD	5	0	0	0	0
AR	3	0	0	0	0
Polimiosite	2	2 (Jo1 e Jo1/SSA)	1 (Jo1)	2 (Jo1 e Jo1/SSA)	1 (Jo1)
TOTALE	78	7 (9%)	8 (10%)	8 (10%)	2 (2.5%)

(UCTD, connettivite indifferenziata; MCTD, malattia mista del connettivo; AR, artrite reumatoide).

mente dal risultato degli ANA in IFI, anche la determinazione degli anti-ENA soprattutto in presenza di una clinica significativa per MAIS.

Per quanto riguarda gli anti-dsDNA non si sono evidenziate differenze significative con ottime performance dei 4 kit ANA. L'unica osservazione riguarda un siero positivo per anti-dsDNA in ELISA e in IFI su *C. luciliae* che è risultato positivo al test Inova e negativo per i kit Euroimmun, Bio-Rad e ImmunoConcepts.

Dal punto di vista strettamente clinico, considerando i sieri di pazienti con diagnosi di MAIS e analogamente a quanto già evidenziato per le specificità ENA, ImmunoConcepts ha fornito i risultati più soddisfacenti: su 78 campioni con diagnosi di MAIS solo 2 sono risultati negativi (un caso di SS SSA positivo e un caso di PM Jo1 positivo), mentre Inova, Euroimmun e Bio-Rad sono risultati rispettivamente negativi in 7, 8 e 8 sieri; anche in questo caso, le migliori performance del kit ImmunoConcepts sono dovute alla più elevata sensibilità nei confronti dei sieri SSA positivi che appartenevano prevalentemente a pazienti con diagnosi di SS.

Concludendo si può affermare che le performance dei 4 kit ANA HEp-2 sono risultate più che soddisfacenti e, considerando le già note difficoltà intrinseche al metodo di IFI, la comparazione ha dimostrato livelli di sensibilità analitica e diagnostica accettabili per tutti i metodi valutati.

Bibliografia

1. Bradwell AR, Stokes RP, Johnson GD. Atlas of HEp-2 patterns; Redditch (UK): KNP Group Ltd. 1995.
2. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25:1271-7.
3. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatologists revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1725-34.
4. Leroy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15:202-5.
5. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstain RM, et al. Preliminary criteria for the classification SS. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. Arthritis Rheum 1993 Mar; 36:340-7.
6. Alarcon-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. J Rheumatol 1989; 16:328-34.
7. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first two parts). N Engl J Med 1975; 292:344-7.
8. NCCLS. Quality Assurance for the Indirect Immunofluorescence Test for Autoantibodies to Nuclear Antigen (IF-ANA); Approved Guideline 1/LA2-A. Wayne, PA: NCCLS; 1996. Vol 16.
9. Feltkamp TE. Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. Ann Rheum Dis 1996; 55:723-7.
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. Homburger HA. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease. Mayo Clin Proc 1995; 70:183-4.
12. Bylund DJ, Nakamura RM. Importance of detection of SS-A/Ro autoantibody screening immunofluorescence tests for autoantibodies to nuclear antigens. J Clin Lab Anal 1991; 5:212-7.
13. Keech CL, Howarth S, Coates T, Rischmulleer M, McCluskey J, Gordon TP. Rapid and sensitive detection of anti-Ro (SS-A) antibodies by indirect immunofluorescence of 60 kDa Ro Hep-2 transfectans. Pathology 1996; 28: 54-7.
14. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. Arthritis Rheum 1997; 40:1601-11.
15. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westho-

vens R, Marien G. Detection of Anti-SSA Antibodies by Indirect Immunofluorescence. Clin Chem 2004; 50: 2361-9.

16. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, et al. Variabilità between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. J Immunol Methods 1998; 219:99-107.
17. Peene I, Van Ael W, Vandenbossche M, Vervaet T, Veys E, De Keyser F. Sensitivity of the Hep-2000 substrate for the detection of SSA Ro60 antibodies. Clin Rheum 2000; 19:291-5.
18. Bossuyt X, Merus L, Mewis A, Marien G, Blanckaert N. Screening for autoantibodies to SSA/Ro by indirect immunofluorescence using HEp-2000 cells. Ann Clin Biochem 2000; 37:216-9.
19. Hoffman IEA, Peene I, Veys E.M, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests. Clin Chem 2002; 48:2171-6.