Affidabilità dei metodi immunometrici per la determinazione degli autoanticorpi anti-antigeni nucleari specifici. Risultati del secondo studio nazionale interdisciplinare "FIRMA"

N. Bizzaro [a], P. Migliorini [b], C.M. Montecucco [c], O. De Pità [d]
[a] *Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S. Donà di Piave (VE)*
[b] *Servizio di Immunologia Clinica, Università degli Studi, Pisa*
[c] *Servizio di Reumatologia, Policlinico "S. Matteo", Pavia*
[d] *Laboratorio Immunologia e Allergologia, IDI-IRCCS, Roma*

per il Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA)

Introduzione

La diagnostica di Laboratorio delle malattie reumatiche autoimmuni ha ricevuto negli ultimi anni un notevole impulso e una crescente diffusione dovute in gran misura al considerevole sviluppo delle tecniche analitiche, all'utilizzo di substrati antigenici ottenuti con tecniche di biologia molecolare[1] e al perfezionamento dei metodi di estrazione e purificazione degli antigeni naturali, che globalmente hanno contribuito ad una più precisa caratterizzazione e identificazione degli autoanticorpi diagnostici[2]. Tuttavia, la maggior parte dei dati disponibili sulla variabilità analitica dei metodi e sulla affidabilità dei risultati, si riferisce a studi condotti in un numero limitato di laboratori, o in ambito monodisciplinare[3-9].
A distanza di tre anni dal primo e innovativo studio effettuato su scala nazionale e in ambito multidisciplinare dai centri Universitari e Ospedalieri che fanno parte del Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA), si è voluto ripetere l'esperimento per verificare la riproducibilità analitica dei test autoanticorpali per la diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni reumatiche.

Materiali e Metodi

Nei Laboratori dei Centri Universitari e Ospedalieri partecipanti sono stati selezionati 11 sieri (4 da pazienti con malattie del tessuto connettivo e anti-ENA positivi, 5 da pazienti con altre malattie reumatiche autoimmuni e anti-ENA negativi e 2 da controlli sani). I campioni, contrassegnati da una sigla e senza notizie cliniche, sono stati distribuiti in aliquote ai 18 Laboratori che hanno preso parte allo studio, per la determinazione degli autoanticorpi anti-antigeni nucleari specifici (ENA) da effettuarsi con un test di screening e con un test di profilo anticorpale. Il test ENA screen è stato impiegato in 11 laboratori: per questo esame, 7 partecipanti hanno utilizzato il metodo ELISA (da 7 fonti commerciali diverse), 2 l'immunodiffusione (ID) (ambedue commerciali), e uno ciascuno i metodi di IB e di CIE (*home-made*).
Per quanto riguarda il profilo autoanticorpale, sono stati utilizzati complessivamente 12 metodi ELISA (tutti commerciali), 2 metodi di ID (1 commerciale e 1 *home-made*), 4 di CIE *home-made*, 4 di immunoblot (1 commerciale e 3 *home-made*) e 4 di line-immunoassay commerciali. Complessivamente sono state effettuate 26 serie complete di determinazioni, per un totale di 286 profili autoanticorpali e 1706 risultati.
I dati sono stati analizzati in rapporto alla sensibilità e alla specificità diagnostica, sia complessivamente che suddivisi per metodo e per tipo di autoanticorpo.
In assenza di un metodo di riferimento, le specificità anticorpali attese sono state determinate con il criterio del consenso, calcolato in maniera ponderata sulla base della numerosità dei dati ottenuti con ciascun metodo, e assegnate se i risultati coincidevano in almeno il 70% dei Laboratori. Gli anticorpi presi in considerazione sono stati quelli di più frequente utilizzo nella pratica clinica (RNP, Sm, Ro/SSA, La/SSB, Scl70 e Jo-1).

Risultati

ENA screen

La sensibilità nella rilevazione dei 6 autoanticorpi principali è risultata del 97.7%, con un solo risultato falso negativo per il metodo di IB, e la specificità

del 92.2% (1 falso positivo ciascuno per ELISA, ID, CIE e 2 per IB).

ENA profilo

La sensibilità complessiva di tutti i metodi impiegati è risultata buona (93.7%) e ottima la specificità (98.4%). L'analisi separata per metodo ha evidenziato un livello di sensibilità decrescente per ELISA (100%), LIA (93.7%), IB (90.6%), ID (87.5%) e CIE (81.2%) e una specificità assoluta (100%) per i metodi CIE e ID, molto elevata (99.5%) per ELISA e un pò inferiore per IB (94.8%) e per LIA (95.7%). Per quanto riguarda ogni singolo autoanticorpo, si sono osservate difficoltà analoghe nell'identificazione di tutti gli anticorpi, accanto invece ad una ottima specificità (99-100%) con l'eccezione per gli anti-Ro che hanno registrato un 9.1% di falsi positivi.

Conclusioni

In questo studio, i metodi impiegati per lo *screening* degli anticorpi anti-ENA, hanno dimostrato di possedere una buona sensibilità (98%) e una discreta specificità (92%). Ovviamente, trattandosi di un test di screening il dato relativo alla sensibilità è più importante rispetto alla specificità. Inoltre, poiché 5 falsi positivi su 6 sono stati registrati con metodi di immunoprecipitazione, è possibile che con queste tecniche possa essere stata rilevata la presenza di altri anticorpi effettivamente presenti nei sieri in esame e diversi dai sei anti-ENA classici.
Per quanto riguarda il *test di profilo*, tutti gli anticorpi presentano difficoltà di identificazione sovrapponibili (all'incirca 1 su 10 non viene correttamente rilevato), mentre i falsi positivi sono imputabili esclusivamente alla errata rilevazione di anti-Ro.
Tra i diversi metodi, ID (utilizzato da 2 centri) e CIE (4 centri) hanno confermato di essere metodi analitici molto specifici, ma di essere nel contempo dotati di scarsa sensibilità, mentre l'ELISA ha dimostrato di essere in assoluto il metodo più affidabile, con il 100% di sensibilità e il 99.5% di specificità.
Il confronto con i risultati ottenuti nel primo studio FIRMA effettuato nel 1999[10], ha evidenziato una sostanziale sovrapposizione dei dati di accuratezza diagnostica, con un modesto peggioramento della sensibilità solo per l'anti-Scl70, imputabile ai metodi CIE e LIA (quest'ultimo non presente nello studio precedente) e della specificità solo per l'anti-Ro, legato ai risultati ottenuti con IB e LIA (Tabb. I e II). Si è inoltre avuta conferma della difficoltà di rilevazione degli anti-Sm da parte dei metodi di CIE. Infine, modeste performances si sono ottenute nella rilevazione degli anti-La/SSB (per i quali non è possibile un confronto con i dati del 1999 poiché nessun siero era reattivo per questo anticorpo nel primo studio) con sensibilità comprese tra il 75 e l'87% per tutti i metodi indagati, con l'eccezione dell'ELISA che ha sempre rilevato correttamente la presenza dell'anticorpo. Va comunque sottolineato il fatto che, nel presente studio, gli anti-Sm (così come gli anti-RNP e gli anti-Scl70) erano presenti in uno solo dei sieri campione, e che perciò l'analisi statistica deve essere considerata con la necessaria cautela.
In conclusione, questa seconda verifica della qualità dei metodi, sia commerciali che *home-made*, per la determinazione degli anticorpi anti-ENA, effettuata su scala nazionale e in ambito multidisciplinare da centri con specifica esperienza, rappresenta un ulteriore passo in avanti nella conoscenza della variabilità analitica dei metodi e la base di partenza per un processo di standardizzazione assolutamente indispensabile per una affidabile diagnosi di laboratorio delle malattie reumatiche autoimmuni.

Bibliografia

1. Kellermann S, Leistler B, Haubruck H, Liedvogel B. Recombinant antigens in autoimmune diagnostic. Immunologia 1998;17:37-59.
2. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshop for the detection of autoantibodies to intra-

Tabella I. Confronto dei dati di sensibilità diagnostica complessivi e suddivisi per metodo e per specificità anticorpale, ottenuti nel 1° studio (1999) e nel 2° studio (2002) FIRMA.

	ELISA		IB		LIA		CIE		ID		Totale	
	1999	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*
RNP	87.1	100	95.7	75	-	100	83.3	100	100	50	89.1	92.3
Sm	94.5	100	93.8	100	-	100	66.7	50	100	100	89.7	92.3
SSA/Ro	100	100	91.7	91.7	-	100	66.7	91.7	100	100	92.2	97.4
SSB/La	nd	100	nd	87.5	-	87.5	nd	75	nd	75	nd	90.3
Scl70	100	100	100	100	-	75	100	75	100	100	100	92
Jo-1	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Totale	93.3	100	94.9	90.6	-	93.7	77.8	81.3	100	87.5	90.9	93.7

Tabella II. Confronto dei dati di specificità diagnostica complessivi e suddivisi per metodo e per specificità anticorpale, ottenuti nel 1° studio (1999) e nel 2° studio (2002) FIRMA.

	ELISA		IB		LIA		CIE		ID		Totale	
	1999	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*	*1999*	*2002*
RNP	100	100	97.3	100	-	100	100	100	100	100	99.6	100
Sm	97.8	100	100	100	-	100	100	100	100	100	98.7	100
SSA/Ro	96.8	96.7	95.2	82	-	75	97.6	100	100	100	96.9	90.9
SSB/La	100	100	100	100	-	100	100	100	100	100	100	100
Scl70	99.5	100	100	97	-	100	100	100	100	100	99.7	99.6
Jo-1	100	100	100	100	-	100	100	100	100	100	100	100
Totale	98.5	99.5	98.2	94.8	-	95.7	99.5	100	100	100	98.7	98.4

cellular antigens in rheumatic diseases. J Immunol Methods 1991;140:181-9.
3. Bridges AJ, Lorden TE, Havighurst TC. Autoantibody testing for connective tissue diseases. Comparison of immunodiffusion, immunoblot, and enzyme immunoassay. Am J Clin Pathol 1997; 108:406-10.
4. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, et al. Variability 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.
5. Jaekel HP, Mueller D, Grobe N. Detectability of autoantibodies to ENA: comparative investigation of different ELISA kits, indirect immunofluorescence and immunoblot. Clin Lab 1998;44:673-9.
6. Cordiali Fei P, D'Agosto G, Ameglio F, Valesini G, Alessandri C, Farsi A, et al. Determination of antibodies to extractable nuclear antigens by commercial kits: a multicenter study. Int J Clin Lab Res 1998; 28: 29-33.
7. Bizzaro N, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Tozzoli R, Tonutti E, et al. Sensitivity of commercial reagents for the detection of anti-ENA antibodies. Clin Chem Lab Med 1999;37:480.
8. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Butcher BT, Conn D, Dawkins R, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificity. I. Precision, sensitivity, and specificity. Arthritis Rheum 1999;42:455-64.
9. Morozzi G, Bellisai F, Simpatico A, Pucci G, Bacarelli MR, Campanella V, et al. Comparison of different methods for the detection of anti-Ro/SSA antibodies in connective tissue diseases. Clin Exp Rheumatol 2000;18:729-31.
10. Bizzaro N, Migliorini P, Montecucco CM, Tozzoli R. Risultati del primo studio nazionale interdisciplinare "FIRMA" sulla variabilità analitica dei metodi per la determinazione degli autoanticorpi anti-ENA. Reumatismo 2000;52(Suppl. 2):138-41.