

## Affidabilità diagnostica dei metodi immunologici per la determinazione degli anticorpi anti-topoisomerasi I (Scl-70): risultati di uno studio multicentrico

N. Bizzaro<sup>1\*</sup>, E. Tonutti<sup>2\*</sup>, S. Pirrone<sup>3</sup>, D. Villalta<sup>4\*</sup>, D. Bassetti<sup>5\*</sup>, R. Tozzoli<sup>6\*</sup>,  
F. Manoni<sup>7\*</sup>, A. Piazza<sup>8\*</sup>, M. Pradella<sup>9\*</sup>, P. Rizzotti<sup>8\*</sup>.

\* Gruppo di Studio in Autoimmunologia della Società Italiana di Medicina di Laboratorio.

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S. Donà di Piave (VE); <sup>2</sup>Istituto di Chimica Clinica e <sup>3</sup>Divisione 4 Medica, Azienda Ospedaliera "S. Maria della Misericordia" Udine; <sup>4</sup>Servizio di Immunologia e Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone; <sup>5</sup>Patologia Clinica II, Ospedale S. Chiara, Trento; <sup>6</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile di Latisana (UD); <sup>7</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile di Chioggia (VE); <sup>8</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale Geriatrico, Padova; <sup>9</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Civile di Castelfranco Veneto (TV).

**Riassunto.** *Premesse.* L'affidabilità analitica e diagnostica dei metodi immunometrici nella identificazione degli anticorpi anti-topoisomerasi I (Scl70) è controversa. Un'analisi dei dati ottenuti in precedenti studi ha dimostrato una consistente variabilità dei risultati, con percentuali di sensibilità e specificità molto diverse non solo tra metodi diversi, ma anche all'interno dello stesso metodo. Dato che tali esperienze erano state condotte con metodi prevalentemente home-made, noi ci proponevamo di verificare l'affidabilità diagnostica e analitica degli attuali sistemi diagnostici commerciali per il dosaggio degli anticorpi anti-topoisomerasi I attraverso un ampio studio multicentrico.

*Metodi.* 50 laboratori clinici italiani hanno partecipato allo studio che prevedeva l'analisi di 36 campioni, 27 dei quali appartenenti a soggetti con sclerodermia/sclerosi sistemica e 9 come gruppo di controllo. Sono stati utilizzati 42 metodi/kit immunoenzimatici (ELISA), 21 di immunoblot (IB), 3 di controimmunolettroforesi (CIE) e 2 di dot-blot, prodotti da 23 aziende diverse. I dati sono stati analizzati in rapporto alla sensibilità e alla specificità diagnostica e analitica dei metodi impiegati nella rilevazione degli autoanticorpi anti-Scl70.

*Risultati.* Si sono ottenuti complessivamente 2.389 risultati. I metodi ELISA hanno fornito i risultati migliori con il 99.2% di specificità e il 97.2% di sensibilità per anti-Scl70 e, rispettivamente, il 96.3% e il 92.9% come dato globale per tutti gli anti-ENA. I metodi di IB si sono dimostrati altrettanto affidabili nella rilevazione di anti-Scl70 (97.6% specificità e 96.1% sensibilità) ma non così nella identificazione degli altri anticorpi anti-ENA (84.7% e 93%) dove, soprattutto il metodo di Western-blot ha dimostrato carenza di specificità. I metodi di CIE e di dot-blot commerciali, anche se poco impiegati dai Laboratori partecipanti a questo studio, hanno dimostrato un buon livello di affidabilità. L'unico Laboratorio che ha utilizzato un metodo di CIE home-made ha evidenziato una grave carenza di sensibilità.

*Conclusioni.* Questo studio ha dimostrato che i reagenti commerciali impiegati nei laboratori clinici per la determinazione degli anticorpi anti-Scl70 sono dotati di buona sensibilità e di elevata specificità. Tra i diversi metodi, l'ELISA presenta le migliori caratteristiche di affidabilità analitica; un po' meno i metodi di blot e, tra questi, l'Western blot non è dotato di sufficiente specificità. E' presumibile che la realizzazione di programmi nazionali di VEQ possa consentire un ulteriore miglioramento della qualità analitica, evidenziando e correggendo i pochi casi di inaffidabilità legati ai reagenti e/o ai Laboratori.

### Introduzione

Gli anticorpi anti-topoisomerasi I (anti-Scl70) sono il marker sierologico della sclerosi sistemica diffusa (1) di cui rappresentano uno dei fondamentali criteri diagnostico-classificativi (2,3). L'apporto del Laboratorio di autoimmunologia nella diagnosi di questa rara ma grave malattia, che comporta tra l'altro degli elevatissimi costi sociali ed economici (4), è fondamentale ed esige un'elevata qualità analitica.

Studi sull'affidabilità diagnostica dei metodi immunometrici nella identificazione degli anticorpi anti-Scl70, condotti da altri autori e dal nostro gruppo (5-13), hanno fornito risultati discordanti, con percentuali di sensibilità e specificità molto variabili. Una conferma di tale fenomeno proviene da un recente studio collaborativo (14), che pur impiegando i sieri di riferimento del CDC/WHO (15), ha evidenziato notevoli differenze sia di sensibilità (20 - 100%) che di specificità (85 - 100%). Le differenze riscontrate

negli studi fin qui prodotti, possono trovare spiegazione oltre che nel differente disegno di ciascun studio, anche nelle diverse caratteristiche e numerosità dei pazienti esaminati, nel diverso tipo di laboratori coinvolti e di reagenti impiegati. In particolare, i principali studi collaborativi, per quanto ampi, sono stati effettuati impiegando per lo più metodi home-made e coinvolgendo laboratori di riferimento selezionati. Dal momento che nella maggior parte dei laboratori clinici vengono impiegati esclusivamente reagenti commerciali, le esperienze precedenti non sono in grado di fornire informazioni al riguardo del tutto attendibili e conclusive.

Negli ultimi anni, l'utilizzo di substrati antigenici ottenuti con tecniche di biologia molecolare e il perfezionamento dei metodi di estrazione e purificazione degli antigeni nativi, hanno contribuito ad una più precisa caratterizzazione e identificazione di questo e degli altri autoanticorpi diagnostici delle malattie autoimmuni. Inoltre, il progressivo sviluppo delle tecniche analitiche ha reso possibile l'impiego di nuovi test commerciali per la determinazione delle diverse specificità autoanticorpali in un sempre maggior numero di laboratori, rendendo perciò necessaria una continua verifica di qualità. Per questo motivo, il Gruppo di Studio in Autoimmunologia della Società Italiana di Medicina di Laboratorio ha realizzato un ampio studio multicentrico tra laboratori clinici ospedalieri nell'analisi di campioni di siero relativi a pazienti affetti da SSc, con l'impiego di numerosi metodi/kit commerciali, allo scopo di definire l'attuale affidabilità diagnostica e analitica nella determinazione degli autoanticorpi anti-poisomerasi I.

## Materiali e metodi

50 laboratori clinici appartenenti a 14 regioni italiane hanno partecipato a questo studio che prevedeva la determinazione degli anticorpi anti-ENA (antigeni nucleari estraibili) in 36 campioni di siero, 27 dei quali relativi a pazienti con diagnosi clinica di sclerodermia/sclerosi sistemica progressiva (SSc), formulata secondo i criteri proposti dall'American College of Rheumatologists (16). 16 di questi campioni appartenevano a soggetti con SSc diffusa (dSSc) (anti-Sc170 positivi e anti-centromero negativi) e 11 erano di pazienti con SSc limitata (lSSc) (anti-Sc170 negativi e anti-centromero positivi). Due sieri dSSc presentavano anche una contemporanea reattività per Ro/SSA. La specificità anticorpale attesa è stata definita, oltre che in riferimento ai parametri clinici, anche sulla base dei risultati preliminarmente ottenuti con due metodi diversi (ELISA e immunoblot (IB)) nei 4 laboratori che hanno raccolto i campioni test, e solo i campioni risultati positivi con ambedue i metodi sono stati inclusi nello studio. I 16 sieri dSSc presentavano concentrazioni anticorpali variabili, determinate sulla base delle densità ot-

tiche ottenute con metodo ELISA. Il gruppo di controllo era costituito da 3 sieri di pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) (1 con anti-RNP e anti-Sm, 1 con anti-RNP, 1 con anti-Ro/SSA), 3 con infezione da virus di Epstein-Barr (EBV) e 3 da soggetti sani. I sieri aliquotati, sono stati conservati a -85 °C fino al momento dell'invio. Ai partecipanti non è stata fornita alcuna informazione clinica ed è stato richiesto di usare i reagenti ed i sistemi analitici da loro correntemente impiegati per la determinazione degli anticorpi anti-ENA.

I 50 laboratori partecipanti hanno effettuato complessivamente 68 serie di determinazioni anticorpali, per un totale di 2.389 risultati. Il numero di determinazioni è superiore a quello dei partecipanti, dal momento che numerosi laboratori hanno impiegato più di un metodo. 42 laboratori hanno eseguito la determinazione con metodi ELISA (61.8% dei test eseguiti), 21 in IB (30.9%), 3 in controimmunolettroforesi (CIE) (4.4%) e 2 con metodo di dot-blot (2.9%). I reagenti provenivano da 23 diverse aziende produttrici (elencate in tabella I). Un solo laboratorio ha eseguito la ricerca con metodo CIE home-made.

**Tabella I. Elenco delle aziende commerciali produttrici di sistemi analitici per gli anticorpi anti-ENA, con il numero dei Laboratori che hanno utilizzato il metodo.**

<i>ELISA</i>	
Bio-Rad, Hercules, CA, USA	1
Chematil, Scafati, Italia	1
Clarck, Wicklow, UK	2
CLS, Ely-Cambridgeshire, UK	2
Cogent, Peniculk, UK	3
Diamedix, Miami, FL, USA	5
Helix, West Sacramento CA, USA	1
Pharmacia & UpJohn, Elias Division, Freiburg I.Br., Germania	6
Euroimmun, Lubeca, Germania	2
Fenning, Freiburg I.Br., Germania	2
Immuno Concepts, Sacramento, CA, USA	1
Imtec, Zepernick, Germania	1
Incstar, Stillwater, MN, USA	1
Medic, Pavone Canavese, Italia	3
Shield, Dundee, UK	9
Zeus, Raritan, NJ, USA	1
<i>Immunoblot</i>	
Autoimmune Diagnostika, Strasburgo, Germania	4
Euroimmun, Lubeca, Germania	6
Imtec, Zepernick, Germania	3
Innogenetics, Temse, Belgio	4
MarDx, Carlsbad, CA, USA	2
Nurex, Sassari, Italia	1
Scimdex, Denville, NJ, USA	1
<i>CIE</i>	
Binding Site, Birmingham, UK	2
<i>Dot-blot</i>	
Alphadia, Wavre, Belgio	2

L'analisi statistica è stata effettuata calcolando per ciascun metodo e per ciascun kit i valori di sensibilità diagnostica nella rilevazione dell'anticorpo anti-Scl70 nei 16 campioni dcSSc e di specificità diagnostica negli altri 20 campioni in cui l'anticorpo anti-Scl70 era assente. Oltre alla specificità diagnostica, abbiamo anche effettuato una valutazione della specificità analitica, ovvero del numero di falsi positivi che si sono registrati per altri anticorpi anti-ENA (ad es., anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro, anti-La, anti-Jo1) nei sieri in cui queste positività non erano il dato atteso.

Inoltre, per quanto riguarda i metodi di immunoblot l'elaborazione dei dati è stata fatta operando anche una valutazione separata tra le due diverse tipologie di reagenti disponibili sul mercato: l'immunoblot semplificato (per il quale noi preferiamo utilizzare il termine di bar-blot) (17) in cui la deposizione degli ENA su supporti di nitrocellulosa viene fatta in quantità ottimali e posizioni predefinite per facilitare la lettura e l'interpretazione del risultato, e il classico Western-blot, in cui invece è presente l'intera corsa elettroforetica, con tutti gli antigeni estraibili dal materiale cellulare impiegato.

Il cosiddetto dot-blot, che per le sue caratteristiche tecniche è più simile ai metodi ELISA che non a quelli propri dei blot, è stato considerato a parte.

## Risultati

Sensibilità e specificità per anti-Scl70, considerando tutti i metodi impiegati, sono state rispettivamente del 96.9% e del 98.6% (Tabella II). I dati complessivi relativi alla rilevazione di tutti gli anticorpi anti-ENA hanno evidenziato una sensibilità del 93.1% e una specificità del 92.6% (Tabella III).

*Metodi ELISA* (1481 risultati): Per quanto riguarda la rilevazione di anti-Scl70 si è registrato un ottimo valore di specificità (99.2%) e una buona sensibilità (97.2%). Come dato complessivo per tutti gli anti-ENA la specificità è stata del 96.3% e la sensibilità del 92.9%. In quest'ultimo caso, nell'analisi dei dati relativi a questo metodo, i risultati forniti da un laboratorio sono stati esclusi dall'elaborazione perchè chiaramente aberranti (42% di falsi negativi) rispetto a quelli ottenuti da altri laboratori che impiegavano lo stesso kit. Benchè sia stata segnalata una migliore sensibilità dei sistemi che impiegano antigeni ricombinanti rispetto a quelli che utilizzano antigeni nativi (18), tale osservazione non viene confermata in questo studio, in quanto la sensibilità media dei 30 laboratori che hanno utilizzato antigeni estrattivi è risultata decisamente migliore di quella ottenuta

Tabella II: Falsi positivi e falsi negativi per l'anticorpo anti-topoisomerasi I (Scl70), suddivisi per ciascuno dei 4 metodi utilizzati nello studio dai Laboratori partecipanti.

Metodo	EIA	BLOT	DOT	CIE	Totale
<b>FALSI POSITIVI</b>	<b>0.8 %</b> (7/826)	<b>2.4 %</b> (10/406)	<b>0.0 %</b> (0/39)	<b>5.0 %</b> (2/40)	<b>1.4 %</b> (19/1311)
<b>FALSI NEGATIVI</b>	<b>2.8 %</b> (18/639)	<b>3.9 %</b> (12/307)	<b>0.0 %</b> (0/32)	<b>6.2 %</b> (2/32)	<b>3.1 %</b> (32/1010)
<b>SPECIFICITA'</b>	<b>99.2 %</b>	<b>97.6 %</b>	<b>100 %</b>	<b>95.0 %</b>	<b>98.6 %</b>
<b>SENSIBILITA'</b>	<b>97.2 %</b>	<b>96.1 %</b>	<b>100 %</b>	<b>93.8 %</b>	<b>96.9 %</b>

Tabella III. Falsi positivi e falsi negativi complessivi per tutti gli anticorpi anti-ENA, suddivisi per ciascuno dei 4 metodi utilizzati nello studio dai Laboratori partecipanti.

Metodo	EIA	BLOT	DOT	CIE	Totale
<b>FALSI POSITIVI</b>	<b>3.7 %</b> (55/1481)	<b>15.3 %</b> (112/729)	<b>7.0 %</b> (5/71)	<b>2.7 %</b> (2/72)	<b>7.4 %</b> (174/2353)
<b>FALSI NEGATIVI</b>	<b>7.1 %</b> (51/702)	<b>7.0 %</b> (26/367)	<b>0.0 %</b> (0/37)	<b>6.9 %</b> (4/58)	<b>6.9 %</b> (81/1164)
<b>SPECIFICITA'</b>	<b>96.3 %</b>	<b>84.7 %</b>	<b>93.0 %</b>	<b>97.3 %</b>	<b>92.6 %</b>
<b>SENSIBILITA'</b>	<b>92.9 %</b>	<b>93.0 %</b>	<b>100 %</b>	<b>93.1 %</b>	<b>93.1 %</b>

dai 12 laboratori che hanno eseguito i test con reagenti che impiegavano antigeni ricombinanti (98.3% vs 89.4%). I dati relativi alla specificità sono risultati invece sostanzialmente sovrapponibili tra i due tipi di preparazione antigenica (99.4% vs 98.3%).

*Metodi di Immunoblot* (729 risultati): La affidabilità analitica dei reagenti che utilizzano questo metodo è risultata leggermente inferiore a quella dei metodi ELISA, con il 97.6% di specificità e il 96.1% di sensibilità per anti-Sc170, e 93.0% di sensibilità e 84.7% di specificità globali per anti-ENA. Anche in questo caso, i risultati forniti da un partecipante sono stati esclusi dal calcolo della sensibilità per la presenza di un elevatissima percentuale di falsi negativi (44%) in confronto all'assenza di falsi negativi dell'altro laboratorio che aveva utilizzato lo stesso reagente. Una comparazione tra bar-blot e Western-blot non ha dimostrato differenze significative in termini di specificità (falsi positivi, 2.4% vs 2.5%) e di sensibilità (falsi negativi, 4.3% vs 3.5%) per quanto riguarda la valutazione dell'anticorpo anti-Sc170, ma invece notevoli differenze nella identificazione delle varie specificità anti-ENA diverse da anti-Sc170 (anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-Jo1). In effetti, accanto al 7.8% di falsi positivi col bar-blot si è registrato il 23% di falsi positivi col metodo di Western-blot.

*Metodi di CIE* (108 risultati): Per anti-Sc170, a fronte di un buon dato di specificità (96.7%) si è ottenuta invece una scarsa sensibilità (72.9%), imputabile all'unico test eseguito con reagenti home-made, per il quale la sensibilità si è dimostrata del tutto insufficiente (68.7% di falsi negativi). Se tuttavia si considerano solo i metodi commerciali, escludendo dall'analisi l'unico metodo home-made, sensibilità (93.8%) e specificità (95%) sono paragonabili a quelle ottenute con gli altri metodi. I dati relativi a tutti gli anti-ENA evidenziano un valore di specificità del 97.3% e di sensibilità del 93.1%.

*Metodi di dot-blot* (71 risultati): Con questo metodo si sono ottenute le migliori performances, con sensibilità e specificità del 100% per anti-Sc170 e del 93% e 100% per tutti gli anti-ENA. Il dato deve tuttavia essere considerato con cautela per il ristretto numero di laboratori interessati e il limitato numero di osservazioni.

Un'analisi dettagliata delle performance dei singoli kit, suddivisa per metodo, è presente nelle tabelle IV e V per il metodo ELISA, VI e VII per il metodo di immunoblot e VIII per il metodo CIE. In tabella IX sono riportati i falsi positivi registrati per ciascun anticorpo.

**Tabella IV: Distribuzione e percentuale di falsi positivi e falsi negativi per anti-Sc170 dei diversi metodi/kit in ELISA.**

<b>AZIENDA</b>	<b>FALSI POSITIVI</b>		<b>FALSI NEGATIVI</b>	
<b>BIORAD</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/20)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/16)</b>
<b>CHEMATIL</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/20)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/16)</b>
<b>CLARCK</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/40)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/32)</b>
<b>CLS</b>	<b>5.0 %</b>	<b>(2/40)</b>	<b>6.2 %</b>	<b>(2/32)</b>
<b>COGENT</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/60)</b>	<b>8.3 %</b>	<b>(4/48)</b>
<b>DIAMEDIX</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/100)</b>	<b>1.2 %</b>	<b>(1/80)</b>
<b>ELIAS</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/107)</b>	<b>6.2 %</b>	<b>(5/80)</b>
<b>EUROIMMUN</b>	<b>2.5 %</b>	<b>(1/40)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/32)</b>
<b>FENNING</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/39)</b>	<b>12.9%</b>	<b>(4/31)</b>
<b>HELIX</b>	<b>2.5 %</b>	<b>(1/40)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/32)</b>
<b>IMMUNO CONCEPTS</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/20)</b>	<b>6.2 %</b>	<b>(1/16)</b>
<b>IMTEC</b>	<b>5.0 %</b>	<b>(1/20)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/16)</b>
<b>INCSTAR</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/20)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/16)</b>
<b>MEDIC</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/60)</b>	<b>3.1 %</b>	<b>(1/32)</b>
<b>SHIELD</b>	<b>1.1 %</b>	<b>(2/180)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>(0/144)</b>
<b>ZEUS</b>	<b>0.0 %</b>	<b>0/20)</b>	<b>0.0 %</b>	<b>0/16)</b>

Tabella V: Distribuzione e percentuale di falsi positivi e falsi negativi per tutti gli anticorpi anti-ENA dei diversi metodi/kit in ELISA.

AZIENDA	FALSI POSITIVI		FALSI NEGATIVI	
<b>BIORAD</b>	<b>8.3 %</b>	(3/36)	<b>0.0 %</b>	(0/19)
<b>CHEMATIL</b>	<b>2.7 %</b>	(1/36)	<b>10.5 %</b>	(2/19)
<b>CLARCK</b>	<b>0.0 %</b>	(0/72)	<b>7.9 %</b>	(3/38)
<b>CLS</b>	<b>5.5 %</b>	(4/72)	<b>10.5 %</b>	(4/38)
<b>COGENT</b>	<b>6.4 %</b>	(7/108)	<b>8.7 %</b>	(5/57)
<b>DIAMEDIX</b>	<b>1.6 %</b>	(3/180)	<b>3.1 %</b>	(3/95)
<b>ELIAS</b>	<b>5.9 %</b>	(11/186)	<b>6.1 %</b>	(7/113)
<b>EUROIMMUN</b>	<b>4.1 %</b>	(3/72)	<b>2.6 %</b>	(1/38)
<b>FENNING</b>	<b>2.8 %</b>	(2/71)	<b>13.5%</b>	(5/37)
<b>HELIX</b>	<b>12.5 %</b>	(9/72)	<b>2.6 %</b>	(1/38)
<b>IMMUNO CONCEPTS</b>	<b>0.0 %</b>	(0/36)	<b>10.5 %</b>	(2/19)
<b>IMTEC</b>	<b>5.5 %</b>	(2/36)	<b>10.5 %</b>	(2/19)
<b>INCSTAR</b>	<b>0.0 %</b>	(0/36)	<b>5.2 %</b>	(1/19)
<b>MEDIC</b>	<b>0.0 %</b>	(0/108)	<b>13.1 %</b>	(5/38)
<b>SHIELD</b>	<b>1.5 %</b>	(5/324)	<b>5.8 %</b>	(10/171)
<b>ZEUS</b>	<b>0.0 %</b>	(0/36)	<b>0.0 %</b>	(0/19)

Tabella VI: Distribuzione e percentuale di falsi positivi e falsi negativi per anti-Sci70 dei diversi metodi/kit in immunoblot, distinti per i metodi di Bar-blot (BB) e di Western-blot (WB).

AZIENDA	FALSI POSITIVI		FALSI NEGATIVI	
BB <b>EUROIMMUN</b>	0.9 %	(1/106)	4.8 %	(4/83)
<b>INNOGENETICS</b>	5.0 %	(4/80)	4.6 %	(3/64)
<b>SCIMDEX</b>	0.0 %	(0/20)	0.0 %	(0/16)
	<b>2.4 %</b>	(43/441)	<b>4.3 %</b>	(7/163)
WB <b>AUTOIM. DIAGNOSTIKA</b>	3.7 %	(3/80)	7.8 %	(5/64)
<b>ARNIKA</b>	0.0 %	(0/40)	0.0 %	(0/16)
<b>IMTEC</b>	3.3 %	(2/60)	0.0 %	(0/48)
<b>NUREX</b>	0.0 %	(0/20)	0.0 %	(0/16)
	<b>2.5 %</b>	(63/252)	<b>3.5 %</b>	(5/144)

## Discussione

L'anticorpo anti-topoisomerasi I è specifico per i pazienti affetti da sclerodermia (19) con una prevalenza che si aggira intorno al 40% ma che presenta ampie oscillazioni (3-75%) (20,21); i valori più elevati si osservano nei pazienti affetti dalla forma diffusa di sclerodermia (22,23) di cui rappresenta l'anticorpo diagnostico. La presenza dell'anticorpo sembra inoltre conferire una minor sopravvivenza rispetto ai pazienti che non lo hanno (24). La precoce e corretta identificazione di questo anticorpo è perciò di fonda-

mentale importanza sia nella fase diagnostica che prognostica della malattia e impegna il laboratorio di autoimmunologia a fornire dati sempre più accurati. Questo studio si prefiggeva perciò l'obiettivo di valutare l'affidabilità analitica dei diversi metodi/kit commerciali e la variabilità analitica tra laboratori di autoimmunologia, nel dosaggio dell'anticorpo anti-topoisomerasi I. L'elevato numero di dati ottenuti e di laboratori partecipanti, la loro omogenea distribuzione sul territorio nazionale, unita alla rilevante rappresentatività e numerosità delle aziende produttrici coinvolte nello studio, costituisce sicuramente un so-

**Tabella VII: Distribuzione e percentuale di falsi positivi e falsi negativi per tutti gli anticorpi anti-ENA dei diversi metodi/kit in Immunoblot, distinti tra Bar-blot (BB) e Western-blot (WB).**

AZIENDA		FALSI POSITIVI		FALSI NEGATIVI	
IB	<b>EUROIMMUN</b>	1.0 %	(2/189)	5.9 %	(6/101)
	<b>INNOGENETICS</b>	15.9 %	(23/144)	9.2 %	(7/76)
	<b>SCIMDEX</b>	11.1 %	(4/36)	5.2 %	(1/19)
		<b>7.8 %</b>	<b>(29/369)</b>	<b>7.1 %</b>	<b>(14/196)</b>
WB	<b>AUTOIM. DIAGNOSTIKA</b>	27.7 %	(40/144)	10.5 %	8/76)
	<b>ARNIKA</b>	19.4 %	(14/72)	0.0 %	(0/19)
	<b>IMTEC</b>	18.5 %	(20/108)	7.0 %	(4/57)
	<b>NUREX</b>	25.0 %	(9/36)	0.0 %	(0/19)
		<b>23.0 %</b>	<b>(83/360)</b>	<b>7.0 %</b>	<b>(12/171)</b>

**Tabella VIII: Distribuzione e percentuale di falsi positivi e falsi negativi per anti-Sc170 (parte superiore) e per tutti gli anticorpi anti-ENA (parte inferiore) dei diversi metodi/kit in controimmuno-elettroforesi.****Per anti-topoisomerasi I**

AZIENDA	FALSI POSITIVI		FALSI NEGATIVI	
<b>THE BINDING SITE</b>	5.0 %	(2/40)	6.2 %	(2/32)
<b>HOME-MADE</b>	0.0 %	(0/20)	68.7 %	(11/16)
<b>TOTALE</b>	<b>3.3 %</b>	<b>(2/60)</b>	<b>27.1 %</b>	<b>(13/48)</b>

**Per tutti gli anticorpi anti-ENA**

AZIENDA	FALSI POSITIVI		FALSI NEGATIVI	
<b>THE BINDING SITE</b>	2.7 %	(2/72)	6.9 %	(4/58)
<b>HOME-MADE</b>	0.0 %	(0/36)	41.3 %	(12/29)
<b>TOTALE</b>	<b>1.8 %</b>	<b>(2/108)</b>	<b>18.4 %</b>	<b>(16/87)</b>

lido parametro per definire con ragionevole accuratezza quale sia l'attuale livello di affidabilità diagnostica dei sistemi commerciali disponibili e dunque di fatto impiegati nella diagnosi della sclerodermia.

Contrariamente alle precedenti esperienze che avevano evidenziato difficoltà nella identificazione di anticorpi anti-Sc170 (6,11,13,14), gli eccellenti risultati in termini sia di sensibilità che di specificità ottenuti da tutti i metodi/kit impiegati in questo studio consente di affermare che, in generale, i sistemi diagnostici commerciali per la determinazione degli anticorpi anti-Sc170, sono sicuri e affidabili. Il peso maggiore nel raggiungimento di indici così elevati di efficienza diagnostica è sicuramente da attribuire ai metodi immunoenzimatici che costituivano il 60% dei metodi/kit impiegati e i cui risultati sono stati i migliori in assoluto.

È degno di menzione il fatto che i reagenti costituiti da antigeni estrattivi (sia che fossero ottenuti da cellule umane HEp-2 che da timo bovino o di coniglio) abbiano fornito risultati migliori in termini di sensibilità, rispetto ai reagenti costituiti da antigeni ricombinanti (ottenuti sia con sistemi eucarioti che procarioti), senza invece sostanziali differenze in termini di specificità. Ciò significa che il consistente miglioramento delle tecniche di purificazione degli antigeni nativi, almeno per quanto riguarda l'antigene Sc170, ha consentito di ottenere preparazioni sufficientemente pure, prive cioè di significativa contaminazione antigenica, mantenendo nel contempo inalterate le caratteristiche di autenticità molecolare. Ne derivano sensibilità e specificità analitiche paragonabili, se non superiori, a quelle di preparazioni che utilizzano proteine espresse con la tecnologia del DNA ricombinante.

Tabella IX: Falsi positivi suddivisi per metodo e per specificità anticorpale (solo metodi commerciali)

	EIA	BLOT	DOT	CIE	Totale
<b>Sci70</b>	0.8 %	2.4 %	0.0 %	3.3 %	1.4 %
<b>RNP</b>	0.8 %	3.3 %	0.0 %	0.0 %	1.6 %
<b>Sm</b>	1.2 %	0.5 %	0.0 %	0.0 %	0.9 %
<b>SSA/Ro</b>	0.7 %	7.3 %	3.1 %	0.0 %	3.0 %
<b>SSB/La</b>	0.4 %	4.8 %	1.4 %	0.0 %	1.9 %
<b>Jo1</b>	0.6 %	1.5 %	2.8 %	0.0 %	0.9 %

Tabella X: Percentuale di falsi positivi suddivisi per metodo e per tipologia nei campioni del gruppo di controllo (ISSC = sclerosi sistemica limitata; CN = controlli sani; EBV = infezione da virus di Epstein-Barr; LES = Lupus Eritematoso Sistemico).

## Per anti-topoisomerasi I

	EIA	BLOT	CIE	Totale
<b>11 ISSc</b>	0.2 %	1.8 %	0.0 %	0.7 %
<b>3 CN</b>	0.8 %	3.3 %	0.0 %	1.5 %
<b>3 EBV</b>	1.6 %	0.0 %	0.0 %	1.0 %
<b>3 LES</b>	3.2 %	6.4 %	11.1 %	4.5 %

## Per tutti gli anticorpi anti-ENA

	EIA	BLOT	CIE	Totale
<b>11 ISSc</b>	1.7 %	15.7 %	0.0 %	5.9 %
<b>3 CN</b>	1.6 %	11.6 %	0.0 %	4.4 %
<b>3 EBV</b>	6.4 %	9.6 %	0.0 %	7.4 %
<b>3 LES</b>	6.4 %	29.0 %	22.2 %	13.9 %

Da questo studio è emerso anche che, seppure la numerosità dei campioni contenenti altri autoanticorpi anti-ENA diversi da anti-Sci70 fosse molto meno significativa, sui sieri con specificità anti-Ro/SSA e anti-RNP si sono ottenute buone performance di tutti i metodi valutati, con l'eccezione dell'WB che ha dimostrato di essere poco specifico, evidenziando come la difficoltà interpretativa rimanga il problema principale nell'assegnazione delle positività anticorpali. Che tale difficoltà interpretativa non sia da attribuire solo alla capacità ed alla esperienza dell'osservatore ma piuttosto ad un problema intrinseco del metodo, appare evidente dalla seguente osservazione. Una delle 4 aziende produttrici di metodi di WB che hanno fornito il materiale ai laboratori, è dotata di un sistema informatico per la lettura mediante scanner delle strisce di nitrocellulosa e di software applicativo per la loro interpretazione. Dei 4 laboratori che hanno utilizzato tale reagente, 2 hanno eseguito la lettura con metodo manuale e 2 con sistema esperto, senza che tra i due gruppi si siano verificate sostanziali differenze in termini di specificità; in entrambe le situazioni si è osservato infatti un alto numero di falsi positivi (27%). Il che significa che anche l'utilizzo di sistemi esperti non è in grado di risolvere il problema intrinseco a questo tipo di metodica che, pur rappresentando un validissimo e irrinunciabile mezzo diagnostico per la identificazione di pattern anticorpali rari o atipici, presenta altresì un minor livello di specificità rispetto ad altri metodi.

I dati relativi ai metodi CIE e di dot-blot non possono essere interpretati con sufficienza chiarezza, dato l'esiguo numero di laboratori che hanno utilizzato questi metodi. Se per la CIE però, che insieme all'immunodiffusione doppia, ha rappresentato per anni il metodo più diffuso, sembra poco probabile un suo ulteriore impiego soprattutto per la scarsa sensibilità nei confronti di alcuni autoanticorpi, viceversa la facilità di esecuzione, la semplicità di interpretazione e gli ottimi risultati ottenuti dal dot-blot, ne fanno prevedere un più ampio utilizzo da parte dei laboratori.

In accordo con quanto raccomandato dall'European Consensus Group (6) e dalle linee guida proposte dal nostro gruppo (25) che, sostengono la necessità dell'impiego di due diversi metodi nell'identificazione degli anticorpi anti-ENA, l'utilizzo in serie di 2 metodi avrebbe aumentato la sensibilità diagnostica, dimezzando il numero dei falsi negativi. In effetti, quasi la metà dei falsi negativi registrati in questo studio si è verificata solo con uno tra i 4 metodi impiegati. Da un attento esame dei risultati è possibile trarre anche altre considerazioni utili per una loro corretta interpretazione ed estendibili a tutti gli studi di verifica esterna di qualità (VEQ) di questo tipo: la prevedibile inaffidabilità di qualche laboratorio isolato che ha fornito risultati nettamente anomali rispetto alla media generale e soprattutto rispetto ad altri laboratori che hanno impiegato lo stesso reagente, conferma che la variabilità legata all'esecutore è co-

munque una parte importante della variabilità totale. Nonostante l'elevato numero di osservazioni, la distribuzione dei dati non è omogenea tra i diversi kit, e assoluta cautela deve essere posta nell'interpretazione di risultati ottenuti su campioni significativamente meno numerosi di altri. Il dato di specificità è grandemente influenzato dalla scelta arbitraria del numero e del tipo dei campioni inseriti come controllo, e in questo studio, il dato avrebbe potuto essere molto diverso qualora il gruppo di controllo fosse stato costituito da un maggior numero di sieri di soggetti con LES o con altre malattie autoimmuni. Infatti, come indicato in tabella X, la maggior prevalenza di falsi positivi si è registrata nei sieri LES, cioè in quelli con una complessità maggiore dal punto di vista immuno-anticorpale. Infine, la mancanza di un metodo di riferimento per gli anti-ENA che consenta l'attribuzione di un valore atteso certo, è uno dei principali problemi che si devono affrontare nell'allestimento e nella interpretazione dei risultati di studi di VEQ; solo l'utilizzo di campioni sicuramente positivi a titolo anticorpale medio-alto è in grado di ovviare a questo importante bias metodologico, anche se l'impiego di campioni test a basso titolo con valori distribuiti vicino alla soglia di positività dei metodi è più utile per la valutazione della accuratezza dei sistemi analitici.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che i reagenti commerciali impiegati nei laboratori clinici per la determinazione degli anticorpi anti-ENA presentano livelli accettabili di affidabilità diagnostica. In particolare, per l'anticorpo anti-topoisomerasi I, la specificità si è dimostrata eccellente (98.6%) e la sensibilità buona (96%). Tra i diversi metodi, l'ELISA sia costituito da antigeni ricombinanti che estrattivi, presenta le migliori caratteristiche di affidabilità analitica; tra i metodi di blot, l'Western-blot non è dotato di sufficiente specificità (85%). E' presumibile che la realizzazione di programmi nazionali di VEQ possa consentire un ulteriore miglioramento della qualità analitica, evidenziando e correggendo i pochi casi di inaffidabilità legati ai reagenti e/o ai Laboratori.

## Bibliografia

1. Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986; 231:737-40.
2. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anti-centromere antibodies and antibodies to Topoisomerase I. *Arthritis Rheum* 1988; 31:378-85.
3. 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.
4. Wilson L. Cost-of-illness of Scleroderma: the case for rare diseases. *Sem Arthr Rheum* 1997; 27:73-84.
5. Hildebrandt S, Weiner ES, Senecal JL, Noell GS, Earnshaw WC, Rothfield NF. Autoantibodies to Topoisomerase I (Scl70): analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57:399-410.
6. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshop for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods* 1991; 140:181-9.
7. Rothfield NF. Autoantibodies to scleroderma-associated antigens. In: WJ van Venrooij and RN Maini, eds. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1996. C5.1:1-7.
8. Gonzalez C, Martin T, Arroyo T, Garcia-Isidoro M, Navajo JA, Gonzalez-Buitrago JM. Comparison and variation of different methodologies for the detection of autoantibodies to nuclear antigens (ANA). *J Clin Lab Anal* 1997; 11:388-92.
9. 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.
10. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Villalta D, Manoni F, Bassetti D, et al. Variabilità analitica nella determinazione degli autoanticorpi anti-ENA. Risultati preliminari di un'esperienza di VEQ. *Med Lab* 1998; 6:161-5.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Feltkamp TEW. Standards and reference preparations. In: van Venrooij WJ & Maini RN, eds. *Manual of biological markers of disease*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht 1993, A11:1-12.
16. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-90.
17. Manoni F, Valverde S, Antico F, Giacomini A, Gessoni GL. Autoanticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA): metodi di studio. In: Tozzoli R, Bizzaro N, eds. *La diagnostica di Laboratorio delle Malattie Autoimmuni Sistemiche*. Padova: Piccin Nuova Libreria; 1998. p. 41-78.
18. Vázquez-Abad D, Rothfield NF. Topoisomerase-I (Scl-70) autoantibodies. In: Peter JB and Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science BV; 1996; 830-5.
19. Rothfield NF. Autoantibodies in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18:483-98.

20. Van Venrooij WJ, Stapel SO, Houben H, Kallenberg CGM, Penner E, van de Putte LB. Scl-86: A marker antigen for diffuse scleroderma. *J Clin Invest* 1985; 75:1053-60.
21. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl70 antibodies. *Am J Med* 1997; 103:242-8.
22. Tsay GJ, Fann RH, Hwang J. Specificity of anti-Scl70 antibodies in scleroderma: Increased sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus. *J Rheumatol* 1990; 17:1314-9.
23. Verheijen R, van den Hoogen F, Beijer R, Richter A, Penner E, Habets WJ, et al. A recombinant topoisomerase I used for antibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990; 80:38-43.
24. Jacobsen S, Halberg P, Ullman S, Høier-Madsen M, Petersen J, Mortensen J, et al. A longitudinal study of pulmonary function in Danish patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 1997; 16:384-90.
25. Tozzoli R, Bizzaro N, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, et al. Linee guida per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie reumatiche autoimmuni. *Med Lab* 1999, 7:124-32.
18. F Manoni e F Antico, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile, Chioggia (VE);
19. G Marietti e R Leone, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino;
20. V Marrè, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Lavagna (GE);
21. E Marzot e M. Negri, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Vicenza;
22. R Mezzedimi e G Weisz, Laboratorio Analisi, Ospedale Martini, Torino;
23. A Mikulus, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Gorizia;
24. A Mottola e S Pascoli, Servizio di Microbiologia, Ospedale Civile, Treviso;
25. L Padovan, Laboratorio Analisi, Ospedale Umberto I, Mestre;
26. R. Panio e M Di Benedetto, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Aosta;
27. L Peretti, Anatomia Patologica, Az. Osp. S.Croce e Carle, Cuneo;
28. A Piazza e Rizzotti, Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche, Ospedale Geriatrico, Padova;
29. R Pica e M Ruggeri, U.O. di Medicina di Laboratorio I, Az. Osp. S.Giovanni-Addolorata, Roma;
30. R Piro e M Angius, Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale S.Martino, Oristano;
31. S. Platzgummer, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Merano (BZ);
32. R Pozzoli, Servizio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano;
33. E Romoli, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Orvieto (TR);
34. V Rossi e P Sartore, Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale P.Cosma, Camposampiero (PD);
35. G Scanu-Vallona e F Casu, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Sassari;
36. L Sodi e E Migali, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Arezzo;
37. M Tampoia, Patologia Clinica I, Policlinico Universitario, Bari;
38. M Tani e B Milanese, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Gavardo (BS);
39. L Tasinato e N Osti, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Rovigo;
40. A Tesser e E Pulido, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Bassano del Grappa (VI);
41. F Tiddia e M Pautasso, Laboratorio Analisi, Ospedale S Giovanni di Dio, Cagliari;
42. E Tonutti, Istituto di Chimica Clinica, Azienda Ospedaliera "S.Maria della Misericordia" Udine;
43. R Tozzoli, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile di Latisana (UD);
44. C Trapani, Laboratorio Analisi, Ospedale Mauriziano Umberto I, Torino;
45. S Varrassi e MS Colangeli, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, L'Aquila;
46. D Villalta e GS Carniello, Servizio di Immunologia e Microbiologia e Divisione di Medicina Generale, Az. Osp. S. Maria degli Angeli, Pordenone;
47. D Wolf e G Basso, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Venezia;
48. A Zavarini e L Nunzi, Laboratorio Analisi, Arcispedale S.Anna, Ferrara;
49. E Zirilli e F Zambelli, Laboratorio Analisi, Ospedale B Ramazzini, Carpi (MO).

## Appendice

Elenco dei partecipanti allo studio multicentrico (in ordine alfabetico):

1. D Bassetti, Laboratorio Analisi, Ospedale S.Chiera, Trento;
2. A Bianco, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Cairomontenotte (SV);
3. N Bizzaro e P. Pasini, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S. Donà di Piave (VE);
4. L Camogliano e M.L. Goggi, Patologia Clinica, Ospedale S.Giacomo, Novi Ligure (AL);
5. R Caporali e C Montecucco, Servizio di Reumatologia, IRCCS Policlinico S Matteo, Pavia;
6. E Cavanna, Laboratorio Centrale, Ospedale Galliera, Genova;
7. GB Cherchi e A Manunta, Laboratorio di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ozieri (SS);
8. A D'Agostino e D Guarniera, Laboratorio Analisi, Az. Osp. SS Annunziata, Taranto;
9. A Firenze, Laboratorio Medico Epidemiologico, Ospedale Civile, Terni;
10. G Garbaccio Ioria e P Roncati, Servizio di Immunematologia a Trasfusionale, Ospedale degli Infermi, Biella (VC);
11. E Gentileschi e E Zepponi, Laboratorio Analisi, Ospedale S.Camillo de Lellis, Rieti;
12. A Gera e G Guazzotti, Laboratorio di microbiologia, Ospedale S Andrea, Vercelli;
13. L Giorda e D Frezet, Laboratorio Centrale, Ospedale Molinette, Torino;
14. M Golato e N Colanero, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Renzetti, Lanciano (CH);
15. L Grassia, Divisione di Ematologia II, Ospedale S Martino, Genova;
16. E Intra, Laboratorio Analisi, Ospedale Evangelico Internazionale, Genova;
17. M Lotzniker e C Alpini, Laboratorio Analisi, IRCCS Policlinico S Matteo, Pavia;