

L'appropriatezza nella richiesta dei test autoanticorpali per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni

N. Bizzaro

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile S. Donà di Piave (VE)

Introduzione

Negli ultimi 10 anni si è verificato un deciso cambiamento nel concetto di adeguatezza dei processi diagnostici e terapeutici: la medicina basata sulle evidenze scientifiche, pur senza negare l'importanza del rapporto personalizzato medico-paziente, ha introdotto nuove regole di comportamento al fine di ottenere un miglioramento della qualità delle cure. Tuttavia, anche il medico più coscienzioso, che dedica tempo ed energie all'aggiornamento, può trovarsi in difficoltà sia nella scelta degli esami di Laboratorio più appropriati, a causa della continua evoluzione dei metodi diagnostici e la conseguente proposta di nuovi test dei quali non è sempre chiaro il contesto clinico in cui devono essere richiesti, sia nella corretta interpretazione dei risultati e dei valori di riferimento, che sono spesso solo di tipo statistico e non associati a livelli decisionali¹.

Nel tentativo di superare queste difficoltà e per facilitare il processo diagnostico sono state prodotte e si stanno da più parti approntando linee guida in tutti i campi della patologia e della diagnostica. Numerosi studi hanno però dimostrato che la maggior parte degli interventi effettuati in tal senso non ha avuto successo e non ha modificato sostanzialmente il modo di agire dei medici²⁻⁵. Le più consistenti tra le obiezioni sollevate riguardano la proposta di linee guida di carattere generale che non possono essere applicate al singolo paziente, il timore del medico di perdere l'autonomia decisionale, la percezione che la spinta a cambiare sia dettata quasi esclusivamente da ragioni economiche e non di qualità dell'assistenza. In realtà l'appropriatezza delle prestazioni (e perciò anche la corretta scelta degli esami di Laboratorio) è comunque un elemento di competenza professionale che non può essere trattato con superficialità se non addirittura accantonato con fastidio.

Per ottenere realmente un miglioramento della qualità delle prestazioni è però necessario che ciò che viene proposto sulla base delle più recenti conoscenze scientifiche, possa essere facilmente applicato e abbia un immediato riscontro pratico, ovvero comporti dei vantaggi per il medico e per il paziente.

E' bene a questo punto chiarire che, a differenza di quanto viene generalmente indicato nelle raccomandazioni e nelle indicazioni diagnostiche che tendono ad associare determinati esami a specifiche patologie, nella maggior parte dei casi il medico richiede un esame non per confermare una diagnosi, ma per escluderla^{6,7}. Le motivazioni di tale approccio risiedono sostanzialmente nel timore di farsi sfuggire una patologia importante in pazienti che presentano sintomi sfumati o incerti. Inoltre, a differenza di quanto accadeva fino a qualche anno fa, aspetti medico-legali rivestono oggi un ruolo non secondario in questo comportamento e il paziente stesso vuole spesso essere rassicurato che "non ha il cancro o non ha il LES, ecc." e ritiene spesso inadeguata una visita medica che non preveda l'esecuzione di qualche accertamento diagnostico. Questo atteggiamento, di per sé comprensibile e per certi versi anche giustificabile, non tiene però conto di alcuni fattori che determinano l'efficacia di un test e che sono la sua sensibilità e specificità, il valore predittivo positivo e negativo e la prevalenza della malattia in una determinata popolazione.

Valore predittivo di un test - importanza dei dati clinici

Per cercare di comprendere meglio come questi fattori entrino in gioco nel determinare il risultato di un test, consideriamo un test ANA che abbia, per esempio, il 95% sia di sensibilità che di specificità. Supponiamo che in un anno vengano sottoposti alla ricerca degli ANA 2.000 soggetti che presentano un sintomo di LES. Ammesso che la prevalenza del LES in una popolazione così selezionata sia circa 1:100, vi saranno 20 pazienti affetti da LES e 1980 pazienti che non hanno la malattia. Poiché il test ANA ha una sensibilità del 95%, 19 LES verranno correttamente individuati (veri positivi, VP) e vi sarà 1 falso negativo (FN). Allo stesso modo, poiché la specificità è anch'essa del 95%, tra i 1980 pazienti non affetti vi saranno 1881 veri negativi (VN) e ben 99 falsi positivi (FP). Il valore predittivo negativo (VPN) sarà del

99.9%, ma il valore predittivo positivo (VPP) sarà solo del 16%. Il gran numero di FP comporterà tutta una serie di ulteriori indagini cliniche, strumentali e di laboratorio, costose e inutili, creando inoltre nel paziente un comprensibile stato di ansia e un senso di sfiducia verso il proprio medico e le strutture sanitarie.

Se viceversa si seleziona la popolazione da indagare sulla base non di uno solo ma di almeno due sintomi compresi tra i criteri diagnostici di LES (per es. artralgia ed eritema), supponiamo allora che i soggetti studiati siano solo 100. In questo caso i VP saranno sempre 19 e 1 il FN, ma vi saranno 76 VN e solo 4 FP. Il VPN rimane molto elevato (98.7%), ma aumenta invece in maniera significativa il VPP, che dal 16% sale al 82.6%. Dunque, anche qualora il medico intenda richiedere un test per escludere e non per confermare la presenza di LES, un'accurata preselezione del paziente da sottoporre ad indagine, gli consente di ridurre drasticamente il numero dei falsi positivi⁸. Ciò sottolinea e conferma una volta di più l'importanza dell'indagine clinica che, da sola, è in grado di modificare sostanzialmente i dati di predittività di un test di Laboratorio.

Vediamo allora, per quanto riguarda i test autoanticorpali per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni, quale potrebbe essere un approccio corretto e appropriato nella richiesta degli esami. Esaminiamo come punto di partenza del nostro ragionamento i dati reali di sensibilità e specificità diagnostica caratteristici di ciascun test e suddivisi per tipo di autoanticorpo, riportati in tabella I.

polimiosite (PM) la percentuale di positività è inferiore, mentre per gli anticorpi anti-centromero, la specificità è molto alta.

Viceversa, sia per gli anti-dsDNA che per la maggior parte degli anti-ENA, la situazione è capovolta: la sensibilità è in genere inferiore a quella degli ANA e la specificità maggiore.

Inoltre, la metodica di determinazione degli ANA in IFI è di facile esecuzione e poco costosa, mentre la ricerca di anticorpi specifici che viene effettuata con metodi ELISA, immunoblot, immunodot, controimmunoelettroforesi o Western blot, è sicuramente più complessa e più costosa.

Questi dati indicano che il test ANA presenta tutte le caratteristiche per essere utilizzato come test di primo livello nella diagnosi delle malattie autoimmuni reumatiche e che gli altri test hanno maggior significato ed efficacia se impiegati come test di secondo livello⁹.

Un'ottimale utilizzazione dei test per la diagnostica autoanticorpale richiede che le procedure diagnostiche vengano preliminarmente concordate tra medico clinico e medico di Laboratorio e che venga sviluppato un algoritmo soddisfacente per entrambi. Per ottenere ciò, è essenziale che la richiesta di esami autoanticorpali riporti sempre il sospetto diagnostico e/o le notizie cliniche e che gli esami vengano effettuati secondo una corretta sequenza.

Sulla base di queste premesse, il processo diagnostico nelle malattie autoimmuni reumatiche si sostanzia in diverse tappe, non differenti in realtà da quelle che dovrebbero essere seguite per la diagnosi della maggior

Tabella I. Sensibilità e specificità diagnostica dei test autoanticorpali, in rapporto alle diverse malattie reumatiche autoimmuni.

MALATTIA	TEST	ANTICORPO	SENSIBILITÀ	SPECIFICITÀ
tutte le MAIS	ANA		94 - 100%	bassa
Sjögren			80%	
Polimiosite			40%	
Sclerodermia		ACA	100%	98%
LES	dsDNA ENA	dsDNA	50-70%	98%
		Sm	8-20%	99%
		RNP	30%	bassa
		Ro/SSA	30%	bassa
		La/SSB	20%	bassa
Sjögren		Ro/SSA	80%	bassa
		La/SSB	50%	bassa
Sclerodermia		Sci70	50%	99%
Polimiosite		Jo-1	25%	98%
Connettivite mista		U-RNP	95%	98%

Come si può vedere, il test ANA in immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2 è l'esame dotato di maggior sensibilità mentre la sua specificità è bassa, con alcune eccezioni: per la sindrome di Sjögren e la

parte delle altre malattie, e cioè: anamnesi ed esame obiettivo, formulazione di un'ipotesi diagnostica, esecuzione di esami di 1° livello (ANA), raccolta e analisi dei dati, esecuzione di esami di approfondimento di

2° livello (anti-ENA, anti-dsDNA, aPL), formulazione della diagnosi e decisione clinico-terapeutica.

Esaminiamo ora i diversi aspetti della diagnostica autoanticorpale nelle malattie reumatiche autoimmuni, affrontando uno alla volta i punti più controversi.

Il test ANA in IFI è sempre positivo in presenza di una malattia reumatica sistemica?

L'immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2 è il metodo di riferimento per la ricerca degli ANA per le sue caratteristiche di elevata sensibilità. Tuttavia, data la relativa scarsità degli antigeni SSA/Ro e Jo-1 nei substrati cellulari, in alcuni casi il test può risultare negativo anche se questi anticorpi sono presenti nel siero. Pertanto, in presenza di dati clinici fortemente suggestivi per polimiosite o per sindrome di Sjögren, anche con un test ANA negativo è consigliabile eseguire la ricerca degli anti-ENA.

E' importante definire il pattern degli ANA?

Anche se non assoluta, esiste una correlazione tra il pattern ANA e la presenza di anticorpi anti-DNA e/o anti-ENA e le diverse malattie reumatiche autoimmuni. Tale correlazione è indicata in tabella II.

blot, il solo in grado di determinare la presenza o meno di determinati autoanticorpi, e in presenza di un quadro omogeneo, può essere indicato effettuare la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA. Viceversa, quando è presente un pattern anti-centromero, l'esecuzione di un test anti-ENA non è essenziale poiché la specificità anticorpale è facilmente desumibile dal tipico aspetto morfologico in IFI. In alcuni casi, inoltre, quando nel siero sono presenti contemporaneamente più anticorpi (per es. anti-DNA e anti-RNP e/o anti-Sm), man mano che si procede con le diluizioni del siero si può osservare la comparsa di un secondo pattern, diverso da quello osservato alla diluizione iniziale. Questi dati, ancorché non essenziali, possono perciò contribuire a migliorare l'accuratezza del processo diagnostico.

È importante definire il titolo degli ANA?

La presenza di ANA ad alto titolo e la loro persistenza nel tempo è caratteristica delle malattie reumatiche autoimmuni e non si osserva come epifenomeno. Viceversa, anticorpi antinucleo a basso titolo (1:40 - 1:80) possono essere presenti in pazienti affetti da diverse patologie non autoimmuni (infezioni virali, neoplasie, etc.) e in soggetti sani, in particolare nelle gravide, nelle donne sopra i 40 anni e negli anziani^{12,13}. Un ampio studio multicentrico ha evidenziato che ANA senza significato cli-

Tabella II. Correlazione tra il pattern fluoroscopico degli anticorpi anti-nucleo, la specificità autoanticorpale e la malattia reumatica autoimmune.

Pattern ANA	Anticorpo	Malattia
Omogeneo	anti-DNA anti-istoni	LES LES da farmaci
Granulare	RNP, Sm SSA, SSB	LES LES e SS
Diffuse grainy	ScI70	dSSc
Centromero	ACA	ISSc, Raynaud
Nucleolare	PM/ScI, RNA-pol I U3RNP, ecc.	SSc, LES, SS
Granulare citoplasmatico	Jo-1	PM/DM

Esistono pareri discordanti sull'opportunità di inserire la descrizione del pattern nel referto^{10,11} perché ritenuto di scarsa utilità pratica per il medico che ha richiesto l'esame. Una corretta definizione del pattern è invece molto utile per il Laboratorio, perché in alcuni casi il quadro fluoroscopico condiziona la scelta dei test di secondo livello. Per esempio, in presenza di una fluorescenza citoplasmatica o di tipo nuclear dots, potrebbe essere utile utilizzare il metodo di Western

blot. nico si possono ritrovare nel 30% dei soggetti sani al titolo di 1:40 e nel 5% a 1:160¹⁴. Poiché però anche il 20% circa dei soggetti con malattia reumatica autoimmune, soprattutto in fase iniziale, può avere anticorpi anti-nucleo ad un titolo inferiore a 1:160¹⁵, è chiaro che non esiste un'unica diluizione in grado di distinguere i soggetti malati da quelli sani. Pertanto, i titoli di 1:40 e di 1:160 vanno considerati come livelli decisionali che impongono dif-

ferenti comportamenti operativi: titoli uguali o superiori a 1:160 sono da considerare positivi e i pazienti vanno sottoposti ad approfondimento diagnostico mediante l'esecuzione di test di secondo livello, dato che è probabile che siano affetti da una patologia autoimmune; titoli inferiori a 1:40 vanno considerati negativi; titoli di 1:40 e 1:80 vanno considerati bassi positivi: il paziente non deve essere sottoposto ad approfondimento diagnostico, ma a monitoraggio nel tempo perché è possibile che possa sviluppare una malattia reumatica autoimmune¹⁶.

In presenza di un test ANA positivo è sempre necessario ricercarne la specificità anticorpale?

La varietà di autoantigeni bersaglio degli autoanticorpi anti-nucleo è estremamente ampia. Il test ANA in IFI è in grado di mettere in evidenza oltre 40 diversi tipi di anticorpi, solo una parte dei quali ha significato clinico accertato e per i quali è possibile determinarne la specificità con esami di secondo livello. Nell'ottica di un corretto rapporto costo-beneficio, non è perciò ragionevole tentare l'individuazione dell'autoanticorpo specifico in tutti i casi di positività degli ANA; è ragionevole invece limitare la ricerca almeno ai 7 autoanticorpi per i quali è stata assegnata importanza nella diagnosi clinica. Attualmente gli autoanticorpi con queste caratteristiche sono gli anti-dsDNA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-Sm, anti-U₁RNP, anti-Scl70 e anti-Jo-1. Poiché la diagnosi di malattia reumatica autoimmune si basa sia sulla presenza che sull'assenza di determinati anticorpi, la rilevazione degli anti-ENA è più utile quando viene effettuata con un sistema analitico sensibile e specifico multiparametrico¹¹.

È utile ripetere i test autoanticorpali nel monitoraggio dei pazienti con malattia reumatica autoimmune?

Il titolo degli ANA in IFI non correla, in genere, con l'andamento clinico e non è perciò un parametro particolarmente utile per seguire il decorso della malattia¹⁷. Tuttavia variazioni consistenti del titolo possono accompagnare fasi di evoluzione o di remissione della malattia. Gli anti-ENA, una volta presenti, tendono a rimanere per sempre e non scompaiono nelle fasi di remissione della malattia^{18,19}.

Il livello degli anticorpi anti-dsDNA correla con l'andamento clinico e la loro determinazione è obbligatoria nel monitoraggio dei pazienti con LES^{20,21}.

Quando è utile richiedere la ripetizione di un test ANA?

La ripetuta determinazione degli ANA è utile nella fase diagnostica (iniziale negatività o positività a

basso titolo, in pazienti con segni clinici). Nel paziente con malattia autoimmune sistemica clinicamente definita è sufficiente il controllo del titolo ANA una volta all'anno, a meno che non vi sia una modifica del quadro clinico tale da far sospettare una evoluzione della malattia di base o la comparsa di un'altra malattia reumatica associata, evenienza peraltro non infrequente.

Con quale frequenza va effettuata la ricerca degli anticorpi anti-dsDNA nei pazienti con LES?

La frequenza dei controlli dipende dall'attività della malattia e dal quadro clinico. In genere, varia dalle 4 alle 6 settimane nelle forme attive e dai 6 ai 12 mesi in quelle non attive. Poiché però un aumento delle concentrazioni anticorpali può precedere anche di qualche mese un episodio di esacerbazione clinica in soggetti con nefrite lupica, e poiché in questi casi il trattamento precoce è in grado di impedire la riaccutizzazione o di limitarne la gravità²²⁻²⁴, nei soggetti con LES con interessamento renale il controllo anticorpale dovrebbe essere fatto ogni 6 settimane, indipendentemente dal fatto che la malattia si trovi in fase attiva o meno.

Significato prognostico degli anti-ENA

Oltre che ai fini diagnostici, particolari autoanticorpi nucleari specifici hanno anche un elevato significato prognostico: nei soggetti con SS sia gli anti-Ro/SSA che gli anti-La/SSB si associano con maggiore frequenza a infiltrazione linfocitaria ghiandolare e a manifestazioni extraghiandolari (porpora, vasculite, malattie linfoproliferative). Nelle donne con LES in gravidanza, anticorpi anti-SSA/Ro52 possono essere causa di blocco cardiaco congenito fetale (lupus neonatale); viceversa, la presenza di anticorpi anti-La/SSB conferisce protezione per lo sviluppo di nefropatia. Anticorpi anti-Jo-1 nella PM e anticorpi anti-Scl70 nella SSc, si associano ad interessamento polmonare e sono indicativi di una prognosi peggiore.

Quando è utile richiedere la ripetizione di un test anti-ENA?

Normalmente, gli anticorpi anti-ENA sono presenti già al momento della diagnosi e non si positivizzano in seguito, per cui non è utile ripetere la ricerca in più occasioni. Tuttavia, in casi selezionati e cioè quando si modifichi il quadro clinico, può essere indicato ripetere l'esame per la possibile associazione di più malattie autoimmuni e perché esistono sindromi da sovrapposizione. Inoltre, in una piccola parte di soggetti affetti da sclerodermia, la scomparsa degli anticorpi anti-Scl70 si associa ad un decorso clinico più favorevole²⁵.

Bisogna inoltre considerare che i metodi analitici per le determinazioni degli anti-ENA hanno differenti caratteristiche di sensibilità e specificità; in pratica nessuno dei metodi che vengono oggi impiegati dà da solo garanzie di assoluta affidabilità. Pertanto, in presenza di un quadro clinico caratteristico e dopo il riscontro di una positività ad alto titolo degli ANA, un'eventuale negatività degli anti-ENA deve essere confermata con almeno due metodi diversi^{26,27}.

Esiste una correlazione tra la positività degli ANA e la presenza di anti-ENA?

La correlazione nella positività tra ANA e anti-ENA è condizionata dal titolo degli ANA. Infatti, la probabilità di ottenere un risultato positivo nella ricerca di anticorpi specifici anti-ENA aumenta direttamente con l'aumentare del titolo ANA⁹. Al di sotto di un titolo di 1:320 solo il 16% dei campioni ANA positivi è anti-ENA positivo. La percentuale di positività supera il 50% solo per concentrazioni uguali o superiori a 1:1280²⁸. Pertanto, in presenza di un titolo ANA inferiore a 1:160 la ricerca sistematica degli anti-ENA non dovrebbe essere effettuata²⁹. L'unica eccezione a questa regola è costituita da una positività citoplasmatica granulare, in cui la possibile presenza di un anticorpo con specificità anti-Jo1 va esclusa con un test più specifico. La decisione di eseguire un test di 2° livello in presenza di positività ANA a basso titolo deve comunque sempre essere basata su un consistente sospetto di malattia reumatica autoimmune. Questo semplice algoritmo aumenta nettamente l'efficienza diagnostica dei test in presenza di questo tipo di malattie che sono a bassa o bassissima prevalenza (Tabella III).

Tabella III. Prevalenza delle malattie reumatiche autoimmuni nella popolazione Europea e Nord-Americana (da Jacobsen DL et al.³⁰).

Malattia reumatica autoimmune	Prevalenza
Artrite reumatoide	1/116
Lupus Eritematoso Sistemico	1/4.200
Sindrome di Sjögren	1/6.940
Polimiosite/Dermatomiosite	1/20.000
Sclerosi sistemica	1/22.700

Proposta di un modello operativo

Il protocollo diagnostico adottato nel nostro Laboratorio prevede che in fase iniziale venga effettuato il test ANA in IFI, e solo successivamente, sulla base del risultato degli ANA (positività e titolo) e delle notizie cliniche, il medico del Laboratorio decida la eventuale migliore prosecuzione delle indagini. Dai dati in nostro possesso, questo algoritmo non modifica sostanzialmente la numerosità degli esami, ma influisce quali-

tativamente aumentando la specificità dei test anti-ENA e anti-dsDNA. Lo scopo in effetti non è quello di aumentare o diminuire il numero di esami che esegue il Laboratorio, quanto piuttosto quello di migliorare l'efficienza del test diagnostico, fornire un servizio migliore ai clinici e ai pazienti e prevenire le richieste inutili. Il Laboratorio diventa quindi parte attiva del processo diagnostico e non solamente un servizio da acquistare in grande quantità e al minimo prezzo possibile⁸.

In conclusione, possiamo affermare che la diagnostica delle malattie autoimmuni, come la clinica di queste malattie, è molto complessa e articolata e che la diagnosi è sempre frutto della sinergia tra clinica e Laboratorio. La ricerca di autoanticorpi dovrebbe essere effettuata in forma selettiva e solo quando vi sia un consistente sospetto di malattia reumatica sistemica. Se il sospetto clinico è basso, la gran parte dei risultati positivi, a basso titolo, è probabilmente un falso positivo e può portare alla richiesta di inutili test addizionali e ad un trattamento inappropriato. Poiché esistono numerose situazioni di sovrapposizione sintomatologica e sieroinmunologica che rendono difficile l'interpretazione dei dati, le richieste di esami di Laboratorio dovrebbero sempre includere il sospetto diagnostico e le notizie cliniche, per aumentare la specificità dei risultati. Infine, se appropriatezza delle richieste e delle prestazioni significa anche minor spreco e miglior utilizzo delle scarse risorse a disposizione, appare evidente una volta di più che questo obiettivo può essere raggiunto con maggior efficacia, non tanto mediante operazioni di budgeting o attraverso provvedimenti economici restrittivi³¹, quanto con le armi proprie dell'arte medica, ovvero la conoscenza scientifica e l'indagine clinica.

Bibliografia

1. Bobbio MC. Presentazione dell'edizione italiana di "Test di Laboratorio e prove di efficacia". 2 ed. Speicher CE. ed. Roma: Pensiero Scientifico Editore; 1999.
2. Grimshaw J, Russell I. Effect of clinical guidelines on medical practice: a systematic review of rigorous evaluations. *Lancet* 1993; 342:1317-22.
3. Oxman AD, Thomson MA, Davis DA, Haynes RB. No magic bullets: a systematic review of 102 trials of interventions to improve professional practice. *Can Med Assoc J* 1995; 153:1423-31.
4. Solomon DH, Hashimoto D, Daltroy L, Liang MH. Techniques to improve physicians' use of diagnostic tests. A new conceptual framework. *JAMA* 1998; 280:2020-7.
5. Cabana MD, Rand CS, Powe NR, Wu AW, Wilson MH, Abboud PAC, et al. Why don't physicians follow clinical practice guidelines? *JAMA* 1999; 282:1458-65.
6. Suarez-Almazor ME, Homik J. Reducing serologic testing for rheumatic diseases. Feasible goal or utopian dream? *J Rheumatol* 1999; 26:2505-8.
7. Ménard HA. Antinuclear antibodies: the medium is the message. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18:429-30.

8. Keren DF, Nakamura R. Progress and controversies in autoimmune disease testing. *Clin Lab Med* 1997; 17:483-97.
9. Dawkins RL, Martinez OP, Freitas EM, Hollingsworth PN. Diagnosis of autoimmune disease. In: Rose NR, Mackay IR, eds. *The autoimmune diseases*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 1998. p. 821-31.
10. Pawlotsky JM, Andre C, Metreau JM. Multiple nuclear dots antinuclear antibodies are not specific for primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16:127-31.
11. Teodorescu M, Froelich CJ. Laboratory evaluation of systemic lupus erythematosus. In: Lahita RG, ed. *Systemic Lupus Erythematosus*. 3rd ed. S.Diego: Academic Press; 1999. p. 477-505.
12. Shmerling RH. Rheumatic disease: choosing the most useful diagnostic tests. *Geriatrics* 1996; 51:22-32.
13. Thomas C, Robinson JA. The antinuclear antibody test. When is a positive result clinically relevant? *Postgrad Med* 1993; 94:55-66.
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. Vaile JH, Dyke L, Kherani R, Johnston C, Higgins T, Russell AS. Is high titre ANA specific for connective tissue disease? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18:433-8.
16. 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.
17. Corzillius M, Liang MH. Monitoring patients with SLE. In: Lahita RG (eds.), *Systemic Lupus Erythematosus*. 3rd ed. Academic Press, S.Diego, 1999. p 467-76.
18. Moder KG. Use and interpretation of rheumatologic tests: a guide for clinicians. *Mayo Clin Proc* 1996; 71:391-6.
19. Ward MM. Laboratory testing for systemic rheumatic diseases. *Postgrad Med* 1998; 103:93-100.
20. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kaltenberg CGM. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1990; 33:634-43.
21. Swaak AJK, Groenwold J, Aarden LA, Staius van Eps LW, Feltkamp TEW. Prognostic value of anti-dsDNA in SLE. *Ann Rheum Dis* 1982; 41:388-95.
22. Swaak AJG, Groenwold J, Bronsveld W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1986; 45:359-66.
23. Le Blanc BA, Gladman DD, Urowitz MB. Serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus – Predictors of clinical flares. *J Rheum* 1994; 21:2239-41.
24. Bootsma H, Spronk P, Derksen R, de Boer G, Wolters-Dicke H, Hermans J, et al. Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1995; 345:1595-9.
25. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1074-84.
26. 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.
27. 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.
28. Bizzaro N, Pasini P. Correlazione tra titolo e pattern degli anticorpi anti-nucleo in immunofluorescenza indiretta e positività degli anticorpi anti-ENA. *Med Lab* 1999; 7: 419.
29. Homburger HA. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue diseases. *Mayo Clin Proc* 1995; 70:183-4.
30. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NMH. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84:223-43.
31. Brook RH. Appropriateness: the next frontier. *Br Med J* 1994; 308:218-9.