Sette anni di attività del GdS-AI: un percorso tra formazione e ricerca scientifica

N. Bizzaro

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S.Donà di Piave (VE)
Coordinatore Gruppo di Studio SIMeL in Autoimmunologia

Introduzione

Secondo quanto stabilito dal nuovo Consiglio Nazionale della SIMeL che ha fatto proprie e dato ulteriore impulso alle linee programmatiche della precedente direzione societaria, i gruppi di studio rappresentano il motore scientifico della Società Italiana di Medicina di Laboratorio.
E' questo un richiamo preciso ad un impegno culturale, scientificamente rigoroso e responsabile, per la realizzazione di un modello organizzativo che non ha eguali in altre società scientifiche. Il percorso ideale che ciascun gruppo dovrebbe seguire passa attraverso diverse fasi, tra loro strettamente collegate: l'attività di formazione, indispensabile per approfondire le conoscenze e individuare gli obiettivi da perseguire; la realizzazione di studi originali e la diffusione dei risultati ottenuti, da cui traggono origine prima la competenza e infine l'autorevolezza scientifica.
In questo senso può essere utile analizzare l'esperienza di sette anni di attività del gruppo di studio in autoimmunologia (GdS-AI) che, a partire dalla sua formazione, ha seguito un analogo percorso evolutivo.

L'attività di formazione

L'attività di formazione, sviluppatasi sul modello indicato dal gruppo di studio in Ematologia sorto già parecchi anni prima, si è rapidamente concretizzata nella realizzazione di numerosi corsi, ciascuno con un numero limitato di partecipanti ma che alla fine ha coinvolto complessivamente oltre 450 colleghi. La formula dei piccoli gruppi ha consentito rapide procedure di apprendimento e un notevolissimo interscambio di idee e informazioni. E' stato proprio lo scambio di informazioni tra i partecipanti ai corsi e i componenti del gruppo che ha subito messo in evidenza quali fossero i problemi concreti da affrontare e risolvere nell'ambito della diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni. Ne cito qui alcuni senza un ordine logico, per poi riprenderli e discuterli più avanti: quali sono i metodi più affidabili per la determinazione dei vari anticorpi? Ha senso titolare o comunque esprimere quantitativamente il risultato? Qual è il significato da dare ai diversi titoli anticorpali? Quali test eseguire e quali eventualmente abbandonare? Qual è la migliore sequenza di test per ciascuna determinata patologia? Quali sono i rapporti costi/benefici? Esistono flowcharts o linee di indirizzo per la diagnosi di laboratorio delle malattie autoimmuni sistemiche e d'organo? Queste e numerose altre domande ci hanno presto fatto capire che l'opera di formazione andava subito integrata dalla possibilità di fornire risposte precise a quanto richiesto e che, se i dati non erano disponibili in letteratura, andavano progettati e condotti degli studi appositi.

La ricerca nel settore delle malattie autoimmuni sistemiche

Il GdS-AI ha iniziato a lavorare nel 1996, in un periodo in cui la diagnostica autoimmune si stava evolvendo molto rapidamente. Da qualche anno i test di laboratorio per la ricerca dei vari anticorpi si stavano infatti diffondendo con velocità crescente sia per il notevole progredire nella conoscenza dei meccanismi immunologici che sono alla base delle numerose malattie autoimmuni, sia per il progresso delle tecnologie analitiche; da pochi laboratori selezionati, per lo più universitari, che approntavano in proprio i principali test diagnostici, si stava passando ad una diagnostica molto più articolata e diffusa, con necessità crescenti di verificarne l'accuratezza e il corretto impiego.
Il primo studio fu progettato per verificare l'affidabilità analitica dei test per la determinazione degli anticorpi-nucleo, anti-dsDNA, anti-ENA e anti-fosfolipidi. Molti erano infatti i dati presenti in letteratura sul significato clinico dei vari test, ma pochissi-

mi quelli relativi all'accuratezza dei metodi e praticamente nessuno che avesse valutato i metodi commerciali che invece noi tutti usavamo quotidianamente in laboratorio. I risultati di questo primo studio effettuato in collaborazione con l'industria biomedica, hanno dimostrato che i diversi metodi utilizzati concordavano tra loro nel 90-93% dei casi per la rilevazione degli ANA e per gli aCL, e un po' meno per gli anti-dsDNA (85%) e per gli anti-ENA (87%) (1,2). Risultava perciò evidente la necessità di una più rigorosa standardizzazione dei reagenti e delle procedure analitiche così come dell'introduzione di programmi di verifica esterna di qualità per mantenere sotto controllo l'intero sistema.
Soprattutto tra gli anti-ENA, i dati peggiori erano stati riscontrati per gli anticorpi anti-Scl70 e anti-Sm. La necessità di verificare la giustezza del dato ci ha spinto ad organizzare un ampio studio multicentrico per la valutazione dell'affidabilità diagnostica dei metodi immunologici per la determinazione degli anticorpi anti-Scl-70 (3). In questo studio che ha coinvolto 50 laboratori italiani, i metodi ELISA hanno fornito i risultati migliori con il 99.2% di specificità e il 97.2% di sensibilità per anti-Scl70 e tra il 93 e il 96% per tutti gli anti-ENA. I metodi di immunoblot 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. In linea generale, questo studio ha dimostrato che i reagenti commerciali impiegati nei laboratori clinici per la determinazione degli anticorpi anti-ENA erano sufficientemente affidabili e che, in particolare, potevano essere abbandonati metodi consolidati ma indaginosi come l'immunodiffusione doppia e la controimmunoelettroforesi a favore di metodi più rapidi e riproducibili come gli ELISA.
Un altro indiscutibile vantaggio dei metodi immunoenzimatici è la possibilità di esprimere i risultati in termini quantitativi; tuttavia, da parte di tutta la comunità scientifica internazionale è largamenta condivisa l'idea che l'espressione quantitativa dei diversi anticorpi anti-ENA non abbia alcun significato clinico (con l'eccezione degli anti-U_1RNP nella connettivite mista). La recente comparsa in letteratura di segnalazioni su una possibile correlazione tra concentrazione anticorpale anti-Scl70 e manifestazioni cliniche in pazienti con sclerosi sistemica ci ha suggerito un secondo studio multicentrico sull'accuratezza dei metodi immunoenzimatici nel dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-Scl70. Lo studio che al momento è in corso di pubblicazione (4), ha dimostrato che i metodi ELISA commerciali, pur essendo molto affidabili nel rilevare la presenza dell'anticorpo, presentano tra loro notevoli differenze nei dosaggi di tipo quantitativo. La maggior parte di essi è infatti in grado di distinguere solo tra livelli anticorpali assai diversi e quasi nessuno ha la capacità di rilevare piccole differenze nella concentrazione anticorpale. I risultati migliori sono stati ottenuti quando i valori sono stati espressi come rapporto tra la densità ottica del campione e quella di un calibratore comune. La ovvia conclusione è che solo quando saranno disponibili sieri standard a concentrazione nota per ciascuno dei diversi anticorpi, potranno essere condotti studi clinici prospettici in grado di chiarire l'eventuale utilità del dosaggio quantitativo nel monitoraggio dei pazienti affetti da malattia reumatica autoimmune.

Uno degli aspetti più controversi nei numerosi dibattiti avvenuti durante i corsi di formazione e in occasione dei vari convegni scientifici è quello relativo all'uso dei test ELISA come test di primo livello per la determinazione degli ANA in sostituzione della immunofluorescenza indiretta (IFI).
L'esigenza è motivata dal notevole aumento delle richieste e dall'obiettiva difficoltà di eseguire il test IFI in un elevato numero di campioni. La accresciuta domanda, insieme alla necessità di contenimento della spesa, hanno imposto nuovi modelli organizzativi, quali il consolidamento e la creazione di centri diagnostici di riferimento. L'utilizzo di sistemi analitici automatizzati, rapidi e in grado di processare un elevato numero di campioni è diventata perciò una necessità in taluni casi ineludibile.
Anche in questo settore i dati in letteratura sono però estremamente confusi e contraddittori. I dati disponibili dimostrano infatti che i test ELISA sono in grado di rilevare la presenza di autoanticorpi rivolti verso i principali autoantigeni, ma non presentano una sensibilità clinica del 100% e non sono sempre correlati con il metodo IFI; la principale difficoltà consiste nell'incapacità di evidenziare la presenza di autoanticorpi responsabili di pattern rari o atipici.
Il problema fondamentale a questo punto è capire quanto importanti siano gli ANA responsabili di pattern rari o atipici. La maggior parte di questi anticorpi non ha in realtà un diretto corrispettivo clinico e, nei pochi casi in cui questo esiste, la sensibilità nosografica non supera il 3-5%. Un metodo ELISA "ANA screening" che includesse nel substrato il maggior numero di antigeni potrebbe dunque corrispondere alle esigenze di sensibilità del test e rappresentare la soluzione di compromesso tra ANA-IFI e ANA-ELISA. Un risultato positivo in ELISA dovrebbe essere poi confermato con il metodo IFI, con specificazione del pattern e del titolo, prima di proseguire con indagini di 2° livello. Viceversa, un metodo ELISA che includesse solo pochi antigeni selezionati mancherebbe di sufficiente sensibilità come test di 1° livello.
Allo scopo di verificare queste ipotesi e il possibile impiego di test ANA-ELISA come alternativa all'immunofluorescenza indiretta per la determinazione degli anticorpi-antinucleo è stato organizzato uno

studio che ha coinvolto 1513 pazienti, 315 dei quali con malattia autoimmune sistemica e 1198 in cui una qualsiasi patologia autoimmune è stata esclusa (5). Su tutti i sieri è stata eseguita la ricerca degli ANA in IFI e con 5 diversi kit ELISA. I risultati sono stati valutati in rapporto alla diagnosi clinica e alla presenza di eventuali specificità autoanticorpali (anti-ENA o anti-dsDNA), e infine comparati con quelli ottenuti con il metodo ANA-IFI di riferimento.
La positività del test ANA-IFI in soggetti con malattie autoimmuni sistemiche è stata del 92%, mentre tra i vari kit ANA-ELISA si è evidenziata una ampia diversità di risposta con percentuali di positività variabili dal 74% al 94%. Tutti i kit ELISA hanno correttamente rilevato la presenza di anticorpi (anti-dsDNA, anti-RNP, anti-Ro/SSA) responsabili di quadri di fluorescenza omogenea e granulare, ma dimostrato anche una sostanziale difficoltà in presenza del pattern nucleolare, con una sensibilità media in questo caso attorno al 50%. Molto diverso da kit a kit è invece stato il comportamento nell'identificare il pattern anti-Scl70 per il quale si sono osservate sensibilità variabili dal 45% al 91%, e quello centromerico, con differenze comprese tra il 49 e il 100%.
I risultati da noi ottenuti dimostrano che i kit ANA-ELISA presenti in commercio si comportano in maniera molto diversa. Alcuni sono caratterizzati da un livello di accuratezza diagnostica analogo e talvolta superiore a quello del metodo IFI e potrebbero perciò essere impiegati come metodo di screening alternativo; altri invece non garantiscono risultati accettabili. La conclusione è stata che un'attenta valutazione dei vari kit disponibili in commercio è necessaria prima di inserire nel percorso clinico-diagnostico uno di questi metodi.

Gli anticorpi anti-dsDNA sono uno tra i pochi anticorpi la cui concentrazione anticorpale correla con l'andamento della malattia, tanto che un loro aumento è predittivo di esacerbazione del danno renale in corso di LES (6). La loro periodica determinazione quantitativa è perciò fondamentale nel monitoraggio della malattia. Tuttavia, gli anticorpi anti-dsDNA non sono costituiti da una popolazione anticorpale omogenea, ma da anticorpi a diverso grado di avidità che vengono individuati in maniera diversa dai diversi metodi impiegati per il loro dosaggio. La tecnica radioimmunologica di Farr, che rappresenta ancor oggi il metodo di riferimento, individua solo gli anticorpi ad alta avidità che sono quelli con il maggior significato clinico, ma è una tecnica che viene utilizzata solo in pochissimi laboratori. Il metodo di immunofluorescenza indiretta su Crithidia *luciliae* è in grado di evidenziare anticorpi ad alta e media avidità ma non è quantitativo, e i metodi ELISA che sono invece quantitativi, vedono tutto il range di autoanticorpi, da quelli a bassa avidità fino a quelli ad alta avidità e sono quindi soggetti ad un certo grado di aspecificità.

Il problema del miglior metodo per la determinazione degli anti-dsDNA e in particolare della specificità dei metodi ELISA è stato affrontato dal GdS-AI che, in collaborazione con un'industria del settore, ha messo a punto un sistema ELISA in grado di fornire dati sia sulla concentrazione che sull'avidità anticorpale (7,8). La produzione e commercializzazione di questo test e il suo eventuale inserimento nella diagnostica e nel monitoraggio del LES sono in questo momento in corso di valutazione.

La necessità di fare chiarezza nella scelta del miglior approccio alla diagnostica autoimmune ha portato infine il GdS-AI a produrre delle linee guida che hanno sortito un grande interesse e aperto un ampio dibattito sia a livello nazionale che internazionale (9-13). Queste linee guida che sono state adottate ufficialmente dal Consiglio Nazionale della SIMeL nel febbraio 2002, costituiscono un'utile strumento di lavoro per i colleghi che si occupano della disciplina e un'importante base di partenza per coloro che iniziano ad occuparsene.

Dai numerosi studi effettuati, un aspetto risultava sempre evidente e cioè quello della necessità di indirizzare gli sforzi verso il tentativo di ottenere una miglior standardizzazione dei dosaggi anticorpali. Era inoltre assolutamente necessario poter verificare l'accuratezza dei nuovi metodi commerciali in rapporto ai metodi preparati in proprio (home-made), sui risultati dei quali si basava tutta la vasta letteratura specifica. A questo scopo, l'attenzione del GdS-AI si è rivolta verso studi collaborativi a carattere interdisciplinare, organizzati all'interno del forum nazionale per la ricerca nelle malattie autoimmuni (FIRMA). Due grossi studi multicentrici condotti sia nei laboratori ospedalieri che universitari hanno confermato il buon livello raggiunto da tutti i laboratori italiani nella rilevazione dei principali autoanticorpi, sottolineando in particolare la superiore affidabilità complessiva dei metodi immunoenzimatici commerciali nei confronti dei metodi di immunoprecipitazione home-made (14-17).

La ricerca nel settore delle malattie autoimmuni d'organo

Nel versante delle malattie organo-specifiche, partivano contemporaneamente altri studi analoghi. Di particolare interesse appariva lo studio degli anticorpi presenti nelle tireopatie autoimmuni e nella malattia celiaca, sia per l'elevata frequenza di queste forme cliniche, sia per la scoperta di nuovi antigeni e la messa a punto di nuovi sistemi diagnostici. Per quanto riguarda le tireopatie autoimmuni, negli ultimi anni si era verificata in effetti una progressiva estensione dell'impiego di metodi immunometrici ad alta sensibilità (di seconda generazione) per il do-

saggio degli autoanticorpi anti-tiroide, ma non esistevano studi che avessero affrontato il problema dal punto di vista analitico. Il GdS-AI ha allora condotto uno studio collaborativo con l'industria biomedica, al quale hanno partecipato 12 aziende di diagnostici operanti in Italia e che consisteva nel ricercare gli anticorpi anti-tireoglobulina (anti-Tg) e anti-tireoperossidasi (anti-TPO) in pazienti affetti da tiroidite autoimmune e in pazienti affetti da tireopatia non autoimmune (18-20). I risultati hanno dimostrato che, nonostante la concordanza dei risultati qualitativi sia risultata prossima al 90% per anti-Tg e al 97% per anti-TPO, la variabilità dei risultati quantitativi è risultata molto elevata e probabilmente da individuarsi nell'incerta definizione del valore soglia di positività, nell'assenza di adeguate preparazioni di riferimento internazionali e nelle diverse modalità di purificazione degli autoantigeni.

Per quanto riguarda la malattia celiaca, numerosi fatti nuovi sono emersi in questi anni. Il più importante di tutti è probabilmente l'evidenza prodotta da ampi studi epidemiologici che la malattia non è così poco diffusa come si riteneva ma, viceversa, molto frequente e spesso in forma asintomatica. La successiva scoperta che l'enzima transglutaminasi rappresenta il bersaglio di autoanticorpi specifici ha aperto un vastissimo campo di ricerca nel settore diagnostico. L'utilizzo di substrati antigenici estrattivi animali e poi ricombinanti umani ha offerto l'opportunità di avviare studi di validazione dei metodi e dei reagenti, studi sulla loro accuratezza analitica e diagnostica e sull'ottimale utilizzo dei vari test impiegati per la diagnosi della celiachia.
Anche in questo settore il GdS-AI ha contribuito con alcuni studi importanti. Analogamente a quanto fatto per gli anticorpi presenti nelle malattie autoimmuni sistemiche e nelle tireopatie autoimmuni, sono state condotte valutazioni sull'affidabilità analitica dei test anti-gliadina e anti-endomisio (EMA) (21), ben presto superati dall'enorme interesse suscitato dalla scoperta degli anticorpi anti-transglutaminasi (tTG). Ancora una volta, mentre ovunque si discuteva sul significato patogenetico di questi anticorpi e sul ruolo dell'enzima nei meccanismi immunologici regolatori dell'apoptosi cellulare, il mercato era invaso da test diagnostici di cui a fatica si conoscevano le caratteristiche di sensibilità e specificità e il significato da attribuire ai risultati. L'impatto del test anti-tTG nei laboratori clinici è stato analizzato dal GdS-AI mediante uno studio multicentrico al quale hanno partecipato 74 laboratori italiani e francesi e nel quale sono stati studiati 7948 pazienti con sospetta celiachia (22,23). Su tutti sono stati ricercati gli anti-tTG di classe IgA con estratto di fegato di guinea-pig e gli EMA, ed eseguito il dosaggio delle IgA totali sieriche. Una parte dei sieri è stata poi ritestata in un laboratorio di riferimento con il nuovo test anti-tTG che utilizzava l'antigene ricombinante umano. I risultati hanno evidenziato che gli anti-tTG guinea pig sono più sensibili ma meno specifici degli EMA, mentre gli anti-tTG con antigene ricombinante umano sono caratterizzati da una specificità nettamente superiore rispetto agli anti-tTG guinea pig e da una analoga sensibilità. Lo studio confermava anche la scarsa riproducibilità degli EMA e le notevoli difficoltà di interpretazione dei relativi quadri di fluorescenza.
Se questo studio aveva in parte chiarito quali erano le caratteristiche e il ruolo clinico del test per la ricerca degli anti-tTG di classe IgA, ancora nulla si sapeva sul significato degli anti-tTG di classe IgG. In particolare, la loro specificità era analoga a quella degli AGA IgG e cioè molto bassa? Potevano sostituire gli AGA IgG nella diagnosi dei soggetti celiaci con deficit di IgA ed erano dotati della stessa sensibilità nei bambini fino ai due anni di vita?
Per rispondere alla prima di queste domande, abbiamo studiato gli anti-tTG IgA e IgG in 400 pazienti con connettivite, 100 con rettocolite ulcerosa, 70 con morbo di Crohn, 48 con cirrosi biliare primitiva e in 120 soggetti sani (24,25). Nei casi positivi sono stati ricercati gli EMA ed è stata effettuata la tipizzazione HLA per gli alleli DQ2 e DQ8; se uno dei due test risultava a sua volta positivo, i pazienti venivano sottoposti a biopsia duodenale.
La prevalenza per anti-tTG (IgA e/o IgG) è stata del 1.9% (12 casi positivi). Tra questi, 2 sono risultati poi celiaci (0.3%). Il che significa che la specificità del test anti-tTG è risultata molto elevata sia per le IgA (99.0%) che per le IgG (98.9%). Quest'ultimo dato evidenzia molto chiaramente che gli autoanticorpi anti-tTG di classe IgG sono di gran lunga più specifici degli AGA IgG.

Sulla base delle evidenze raccolte dalla letteratura internazionale e delle esperienze proprie, il GdS-AI ha proposto una serie di raccomandazioni da seguire per un ottimale approccio alla diagnosi di laboratorio di malattia celiaca (26). Tali raccomandazioni verranno periodicamente aggiornate con il progredire delle conoscenze scientifiche e l'evoluzione tecnologica.
Oltre agli argomenti citati, il GdS-AI ha nel tempo effettuato molti altri studi sia sul significato di numerosi altri anticorpi, come gli anti-nucleosomi, anti-protrombina e anti-annexina V, anti-peptidi ciclici citrullinati, anti-Sm, anti-Saccharomyces *cerevisiae*, ANCA, anti-recettore per il TSH, alfa-fodrina (27-36), che su aspetti tecnologi innovativi (37-39).

Conclusioni

Per ovvi motivi legati alle finalità proprie di questo articolo che riassume la relazione inserita nella sessione del 17° Congresso Nazionale SIMeL dedicata ai gruppi di studio, questa rassegna ha preso in esame solo i contributi forniti dal GdS-AI, ben sapendo

però che essi rappresentano in realtà solo una piccolissima parte di quanto la ricerca scientifica produce ogni giorno. Tuttavia, essi dimostrano che, nel campo della ricerca applicata, è possibile dare un proprio contributo originale, confermando che il progetto della SIMeL sul ruolo scientifico propulsivo dei gruppi di studio non è velleitario ma può effettivamente concretizzarsi a vantaggio della disciplina e di noi tutti.

Bibliografia

1. 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.
2. 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.
3. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Tozzoli R, Manoni F, et al. Sensitivity and specificity of immunological methods for the detection of anti-topoisomerase I (Scl70) autoantibodies: Results of a multicenter study. Clin Chem 2000; 46:1681-5.
4. Villalta D, Bizzaro N, Platzgummer S, Antico A, Tampoia M, Camogliano L, et al. Accuratezza dei metodi immunoenzimatici nel dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-topoisomerasi I (Scl70). Riv Med Lab (submitted).
5. Tonutti E, Bassetti D, Piazza A, Visentini D, Poletto M, Bassetto F, et al. Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of 5 commercial kits. Autoimmunity (inviato per la pubblicazione).
6. Bizzaro, Villalta D. The predictive value of ANA and anti-dsDNA antibodies for flares in SLE. Rheumatology 2001; 40:1422-3.
7. Villalta D, Bizzaro N, Corazza D, Tozzoli R, Tonutti E. Evaluation of a new automated enzyme fluoroimmunoassay using recombinant plasmid dsDNA for the detection of anti-dsdNA antibodies in SLE. J Clin Lab Anal 2002; 16:227-32.
8. Villalta D, Romelli PB, Savina C, Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Ghirardello A, Doria A. Anti-dsDNA antibody avidity determination by a simple reliable ELISA method for SLE diagnosis and monitoring. Lupus 2003; 12:31-6.
9. Tozzoli R, Bizzaro N, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, Rizzotti P, Tonutti E, Villalta D. Linee guida per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie reumatiche autoimmuni. Med Lab 1999; 7:124-32.
10. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Il ruolo del Laboratorio nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni sistemiche. Laborama 1999; 4:9-16.
11. Bizzaro N. L'appropriatezza nella richiesta dei test autoanticorpali per la diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni. Riv Med Lab 2001; 2:11-6.
12. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti, Manoni F, Piazza A, Pradella M, Rizzotti P. 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.
13. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Linee guida per l'impiego di test per autoanticorpi nucleo-citoplasmatici nelle malattie autoimmuni sistemiche. Revisione 2001. Riv Med Lab 2001; 2(S1):77-83.
14. Sebastiani GD, Galeazzi M, Morozzi G, De Pità O, Mathieu A, Meroni PL, et al. Anticorpi anti-nucleo e anti-dsDNA: analisi metodologica e controllo di qualità dei risultati. Reumatismo 2000; 52:136-8.
15. 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; 52:139-41.
16. Villalta D, Sebastiani GD, Mathieu A, Meroni PL, Morozzi G, Tozzoli R, Tonutti E. ANA e anticorpi anti-DNA: esperienza di VEQ "FIRMA". Riv Med Lab 2002; 2:63-6.
17. Bizzaro N, Migliorini P, Montecucco CM, De Pità O. Affidabilità dei metodi immunometrici per la determinazione degli autoanticorpi anti-antigeni nucleari specifici. Risultati del secondo studio nazionale interdisciplinare "FIRMA". Riv Med Lab 2002; 2:67-9.
18. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Pradella M, Manoni F, Villalta D, et al. Variabilità tra metodi per la ricerca di autoanticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi. Med Lab 1997; 3:474.
19. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Pradella M, Manoni F, Villalta D, et al. Nelle tireopatie autoimmuni il dosaggio degli autoanticorpi anti-tiroide con metodi immunometrici è ancora affetto da una spiccata variabilità analitica. Riv Med Lab 2001; 2:38-45.
20. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Pradella M, Manoni F, Villalta D, Bassetti D, Piazza A, Rizzotti P. Immunoassay of anti-thyroid autoantibodies: High analytical variability in second generation methods. Clin Chem Lab Med 2002; 40:568-73.
21. Tonutti E, Bizzaro N, Tozzoli R, Piazza A, Manoni F, Villalta D, et al. Determinazione di anticorpi anti-endomisio e anti-gliadina: studio sulla variabilità analitica dei metodi commerciali. Med Lab 1999; 7:44-9.
22. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Anti-transglutaminase antibody ELISA using recombinant antigen is more specific than ELISA with guinea pig antigen. Autoimmunity Rev 2002; 1:90.
23. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al, for the French-Italian Laboratory Study Group on Coeliac Disaese. The role of anti-tissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: A French-Italian multicentre study. J Clin Pathol 2003; 56:389-93.
24. Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Doria A, Tampoia M, Bassetti D, et al. IgA and IgG tissue transglutaminase antibody prevalence and clinical significance in connective tissue diseases, inflammatory bowel disease, and primary biliary cirrhosis. Dig Dis Sci (in stampa).
25. Villalta D, Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R. IgG anti-transglutaminase autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren syndrome. Clin Chem 2002; 48:1133.
26. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli

R, Bagnasco M, et al. Proposta di linee guida per la diagnosi di laboratorio della malattia celiaca. Riv Med Lab 2001; 4: 44-51.
27. Doria A, Villalta D, Ghirardello A, Tozzoli R, Bizzaro N, Zampieri S, et al. Antinucleosome antibodies in SLE: A 2-year follow-up study of 101 patients. Arthritis Rheum 2000; 43:S244.
28. Villalta D, Tozzoli R, Doria A, Ghirardello A, Gambari PF, Bizzaro N, et al. Antinucleosome autoantibodies in the diagnosis of SLE: A preliminary report of a comparative evaluation of three commercial methods. In: Conrad K, Humbel RL, Meurer M, Shoenfeld Y, Tan EM (eds.) Autoantigens and autoantibodies: Diagnostic tools and clues to understanding autoimmunity. Lengerich: Pabst Science Publ. 2000; p. 688-9.
29. Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Tampoia M, Tozzoli R, Biasiolo A, et al. Anti-Prothrombin and anti Annexin V antibodies are associated with thrombosis in SLE patients, and fetal loss in women with recurrent abortion. Lupus 2002; 11:550.
30. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. Clin Chem 2001; 47:1089-93.
31. Bizzaro N, Pasini P, Mazzanti G, Villalta D, Tonutti E, Tozzoli R. Combined use of the anti-filaggrin and anti-cyclic citrullinated peptide antibody assays for the diagnosis of rheumatoid arthritis. Autoimmunity Rev 2002; 1:65.
32. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N, Doria A, Ghirardello A. Elevata frequenza di autoanticorpi anti-Sm (B/B', D) in pazienti con lupus eritematoso sistemico e loro correlazione inversa con autoanticorpi anti-nucleosomi. Riv Med Lab 2000; 1(supp.): 189.
33. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Villalta D, Tozzoli R, Tonello M, et al. Clinical usefulness of antibodies to Sm-B/B' UsnRNP polypeptides in CTD patients. In: Conrad K, Humbel RL, Meurer M, Shoenfeld Y, Tan EM (eds.) Autoantigens and autoantibodies: Diagnostic tools and clues to understanding autoimmunity. Lengerich: Pabst Science Publ. 2000; p. 702-3.
34. Tonutti E. Utilizzo razionale degli anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) nella diagnosi differenziale delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino. In: Focus on Gastrointestinal Immune Disease. Menarini Diagnostics editor. Pisa: Pacini Ed. 2002, p. 55-60.
35. Villalta D, Tozzoli R, Orunesu E, Montagna P, Pesce G, Bizzaro N, et al. Analytical and clinical evaluation of second generation assays for thyrotropin receptor antibodies. In: Conrad K, Fritzler M, Meurer M, Sack U, Shoenfeld Y (eds), From proteonomics to molecular epidemiology: Relevance of autoantibodies. Lengerich, Pabst Science Publishers: 2002; 566-7.
36. Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Tozzoli R, Ruffatti A, Grypiotis P, et al. Anticorpi anti-a fodrina nella diagnosi della sindrome di Sjögren. Insufficiente sensibilità analitica o bassa sensibilità nosografica? Riv Med Lab 2003 (in stampa).
37. Bizzaro N, Bonelli F, Pasini P, Marcon G, Tonutti E, Villalta D, et al. Comparison between E. coli and Baculovirus-expressed recombinant topoisomerase I antigens for the detection of autoantibodies in scleroderma patients. Clin Chem Lab Med 2001; 39:S130.
38. Bizzaro N, Bonelli F, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. New Coupled-Particle Light-Scattering Assay for detection of Ro/SSA (52 and 60 Kilodaltons) and La/SSB autoantibodies in connective tissue diseases. Clin Diag Lab Immunol 2001; 8:922-5.
39. Bizzaro N, Bonelli F, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Autoantibody detection in scleroderma patients. Diagnostic and analytical performances of a new coupled particle light scattering immunoassay. Clin Exp Rheumatol 2002; 20:45-51.