

Accuratezza dei metodi immunoenzimatici nel dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-topoisomerasi I (Scl70)

D. Villalta^a, N. Bizzaro^b, S. Platzgummer^c, A. Antico^d, M. Tampoia^e, L. Camogliano^f,
D. Bassetti^g, M. Pradella^h, A. Piazzaⁱ, F. Manoni^l, R. Tozzoli^m, E. Tonuttiⁿ

^a Immunologia Clinica e Virologia, A.O. S. Maria degli Angeli, Pordenone

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

^c Laboratorio Analisi, Ospedale di Merano (BZ)

^d Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Cittadella (PD)

^e Laboratorio di Patologia Clinica, Policlinico Bari

^f Laboratorio Analisi, Ospedale di Novi Ligure (AL)

^g Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Chiara, Trento

^h Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile Castelfranco Veneto (TV)

ⁱ Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico, Padova

^l Laboratorio Analisi, Ospedale di Monselice (PD)

^m Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile di Latisana (UD)

ⁿ Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, A.O. S. Maria della Misericordia, Udine

Gruppo di Studio in Autoimmunologia della Società Italiana di Medicina di Laboratorio

Premesse: L'anticorpo anti-Scl70 è largamente utilizzato per la diagnosi di sclerosi sistemica. Recentemente in letteratura è stata segnalata la possibilità di correlare il livello di concentrazione anticorpale con le manifestazioni cliniche di questi pazienti. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare, tramite uno studio multicentrico, la affidabilità analitica dei sistemi immunoenzimatici nel dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-Scl70.

Metodi: Tre campioni a diversa concentrazione anticorpale anti-Scl70 (A, M, B), ottenuti per diluizioni successive (1:1, 1:3, 1:15) sono stati inviati in cieco, per tre volte nell'arco di 6 mesi, a 39 laboratori clinici italiani. Contemporaneamente è stato inviato anche un siero a bassa concentrazione anticorpale (LPC), utilizzato come calibratore comune. A ciascun laboratorio è stato chiesto di eseguire i dosaggi con il metodo ELISA in uso nel proprio laboratorio e di riportare i valori in densità ottica dei singoli campioni (ODs), del siero cut-off fornito dal produttore del kit in uso (ODco) e del LPC (OD_{LPC}).

Risultati: L'imprecisione analitica complessiva, tra metodi e tra laboratori, per i 13 diversi metodi ELISA utilizzati dai partecipanti allo studio, delle tre diverse determinazioni per i valori espressi rispettivamente in ODs, e in ratio ODs/ODco e ODs/OD_{LPC} è risultata essere 47.1%, 52.8% e 34.0% per il campione A, 56.2%, 47.4% e 34% per il campione M e 84.6%, 86.0% e 86.6% per il campione B. L'imprecisione media intra-metodo per i valori in

ODs, ODs/ODco e ODs/OD_{LPC} è risultata rispettivamente del 20.7%, 29.8% e 18.6% per il campione A, del 24.6%, 26.5% e 19.3% per il campione M e del 30.6%, 28.1% e 20.2% per il campione B. L'imprecisione inter-laboratori ha fornito risultati intermedi rispetto ai precedenti. Per quanto riguarda la capacità di discriminare tra campioni a diversa concentrazione anticorpale, 9 metodi su 13 sono riusciti a evidenziare una differenza tra le diluizioni 1:1 e 1:15, ma solo 6 metodi tra le diluizioni 1:3 e 1:15 e solo 1 metodo tra le diluizioni 1:1 e 1:3.

Conclusioni: I 13 metodi ELISA commerciali da noi esaminati per la determinazione degli autoanticorpi anti-Scl70 presentano tra loro notevoli differenze nei dosaggi di tipo quantitativo. La maggior parte di essi è in grado di distinguere solo tra livelli anticorpali assai diversi tra loro e solo uno è stato capace di rilevare piccole differenze nella concentrazione di anti-Scl70. Una minore variabilità sia tra metodi che tra laboratori, e quindi una maggiore capacità discriminante, è stata osservata quando i valori sono stati espressi come rapporto tra la OD del campione e quella del calibratore comune (ODs/OD_{LPC}). Solo quando saranno disponibili sieri standard a concentrazione anticorpale nota potranno essere condotti studi clinici prospettici in grado di chiarire l'eventuale utilità del dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-Scl70 nel monitoraggio dei pazienti con sclerodermia diffusa.

Background: Accuracy of immunoassay methods in the quantitation of anti-topoisomerase I (Scl70) antibodies.

Reports of a possible correlation between anti-Scl70 antibody concentration and clinical manifestations in systemic sclerosis patients have recently appeared in scientific literature.

The goal of our study was evaluating, by means of a multicenter study, the analytical reliability of immunoassay systems in the quantitative dosage of Scl70 antibodies.

Methods: Three blind samples (A, M, B) at different anti-Scl70 antibody concentrations, obtained by a procedure of successive dilutions (1:1, 1:3, 1:15) have been sent three times in a six-month time span to 39 Italian clinical laboratories. At the same time, a low concentration antibody serum (LPC), used as a common calibrator, was sent. Each laboratory was asked to calculate dosages following the ELISA method they used and report the optical density values of each sample (ODs), of the cut-off serum provided by the manufacturer of the used kit (OD_{co}), and of LPC (OD_{LPC}).

Results: The overall analytical imprecision (between-methods and between-laboratories) in relation to the different 13 ELISA methods, used by the participants in the study of the three different determination of the values respectively expressed in ODs, and in ODs/OD_{co} e ODs/OD_{LPC} ratio, was 47.1%, 52.8% and 34.0% for sample A, 56.2%, 47.4% and 34% for sample M and 84.6%, 86.0% and 86.6% for

sample B. The average intra-method analytical imprecision of the values in ODs, ODs/OD_{co} and ODs/OD_{LPC} was, respectively, 20.7%, 29.8% and 18.6% for sample A, 24.6%, 26.5% and 19.3% for sample M, and, lastly, 30.6%, 28.1% and 20.2% for sample B. The inter-laboratories imprecision provided intermediate results in comparison to the previous results obtained. As for the ability to discriminate between samples with different antibody concentrations, 9 of the 13 methods succeeded in highlighting a difference of between 1:1 and 1:15 dilutions; only 6 methods showed a difference of between 1:3 and 1:15 dilutions, and only one method showed a difference of between 1:1 e 1:3 dilutions.

Conclusions: The commercial ELISA methods currently used to determine the presence of anti-Scl70 autoantibodies show considerable differences in the quantitative determination. Most of these methods could distinguish only between significantly different antibody levels, and none but one could detect small differences in the concentration of anti-Scl70. The best results for reproducibility analyses have been obtained when the values were expressed as a ratio between the ODs of the sample and of the common calibrator (ODs/OD_{LPC}). Forward-looking clinical studies that can clarify the usefulness of quantitative determination of anti-Scl70 antibodies in the monitoring of diffuse scleroderma patients can be performed only when standard serum with a known antibody concentration are made available.

Introduzione

Le malattie autoimmuni sistemiche sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari e citoplasmatici¹. Alcuni di questi anticorpi sono strettamente associati ad una specifica forma morbosa, come gli anti-dsDNA e gli anti-Sm al lupus eritematoso sistemico (LES)^{2,3}, gli anti-sintetasi alla dermatopolimiosite⁴, gli anti-centromero alla sclerodermia limitata⁵, gli anti-topoisomerasi I (Scl70) alla sclerodermia diffusa⁶. In alcuni casi, inoltre, la loro presenza è correlata a particolari manifestazioni cliniche: la nefrite lupica per gli anti-dsDNA^{2,7}, il blocco cardiaco congenito per gli anti-Ro/SSA⁸, la fibrosi interstiziale polmonare per gli anti-Scl70 e gli anti-Jo1^{9,10}. Tutto ciò fa sì che la ricerca di tali autoanticorpi rivesta un importante ruolo diagnostico e in alcuni casi anche prognostico.

Molto dibattuto è invece il possibile ruolo patogenetico svolto da questi anticorpi e di conseguenza il valore predittivo delle modifiche dei livelli autoanticorpali nel decorso delle malattie autoimmuni sistemiche. Una evidenza positiva in tal senso è data dagli autoanticorpi anti-dsDNA che sembrano svolgere un ruolo importante nella cascata degli eventi che portano al danno renale in corso di LES^{11,12}; infatti,

un loro incremento ematico è predittivo di riacutizzazione della malattia e in particolare di nefrite lupica¹³⁻¹⁵. Una simile relazione è stata descritta anche per gli autoanticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) in corso di granulomatosi di Wegener (WG)¹⁶. Infatti, un trattamento precoce della WG basata sui livelli degli ANCA avrebbe confermato la sua efficacia nel prevenire le recidive di malattia, senza aumentare morbilità e mortalità associate al trattamento¹⁷.

Il tentativo di correlare i livelli di altre specificità autoanticorpali con l'attività della malattia ha portato invece a risultati contrastanti¹⁸⁻²⁹, e ciò può essere imputabile in parte ad una diversa selezione della casistica o al disegno dello studio, ma soprattutto alle diverse caratteristiche dei metodi analitici utilizzati per il dosaggio quantitativo degli autoanticorpi. In alcuni studi e in particolar modo in quelli più datati, i dosaggi anticorpali sono stati infatti eseguiti con metodiche di controimmuno-elettroforesi o immunodiffusione che non sono adatte a dosaggi di tipo quantitativo^{30,31}. Negli studi più recenti sono stati utilizzati test immunoenzimatici (ELISA), che forniscono risultati quantitativi, ma presentano limiti di precisione analitica³².

Tuttavia, prima di poter dire se c'è o non c'è relazio-

ne tra la concentrazione ematica di un determinato anticorpo e il decorso della malattia, è necessario verificare se i metodi che vengono oggi utilizzati nei laboratori di diagnostica autoimmunologica sono effettivamente in grado di fornire misurazioni quantitative accurate e precise.

Lo scopo del nostro studio è stato pertanto quello di valutare, avvalendoci di uno studio policentrico, la affidabilità delle metodiche commerciali ELISA nella determinazione quantitativa degli autoanticorpi anti-Scl70. La scelta di tale anticorpo è stata suggerita dai risultati di un precedente lavoro del nostro gruppo³³, che aveva dimostrato la elevata accuratezza delle metodiche ELISA commerciali per la determinazione qualitativa degli anticorpi anti-Scl70 e da recenti segnalazioni sulla possibile correlazione tra concentrazione anticorpale anti-Scl70 e manifestazioni cliniche in pazienti con sclerosi sistemica^{26,28,34}.

Materiali e metodi

Selezione dei sieri campione e disegno dello studio.

Per la realizzazione dello studio sono stati selezionati tre campioni di siero positivi per anti-Scl70 a diversa concentrazione autoanticorpale. Il siero a concentrazione più elevata (A) è stato ottenuto per plasmaferesi da una paziente affetta da sclerodermia diffusa. I campioni a concentrazione intermedia (M) e bassa (B) sono stati ottenuti diluendo il siero A rispettivamente 1/3 e 1/15 con un pool di sieri di donatori normali negativi per autoanticorpi anti-Scl70. È stato preparato, inoltre, un quarto siero ottenuto anch'esso per plasmaferesi da un paziente con sclerosi sistemica, da utilizzarsi come calibratore comune (LPC, low positive control), il cui contenuto autoanticorpale, espresso in unità di densità ottica (OD), è risultato essere tra il 30% e il 50% superiore al valore dei cut-off dei metodi ELISA utilizzati in 4 laboratori di riferimento. Per ciascuno dei sieri A, M e B sono stati preparati 3 lotti, ognuno dei quali è stato suddiviso in 39 aliquote. Il siero LPC è stato aliquotato in 4 lotti, anch'essi composti da 39 aliquote ciascuno. I diversi lotti sono state contrassegnati con una diversa lettera dell'alfabeto e un'aliquota di ciascun lotto è stata inviata ai laboratori partecipanti senza ulteriori indicazioni. La chiave identificativa dei campioni è rimasta segreta fino al momento della elaborazione conclusiva dei dati per garantire l'esecuzione in cieco dei campioni da parte dei laboratori partecipanti.

Trentanove laboratori clinici italiani hanno partecipato allo studio e a ciascuno di essi, in 4 diverse spedizioni nell'arco di 6 mesi, sono stati inviati per 3 volte i sieri A, M e B e ogni volta il siero LPC. In ognuno dei 4 invii, a ciascun laboratorio è stato richiesto di compilare il modulo di risposta, in cui dovevano essere riportate le misure espresse in OD ottenute dall'analisi dei singoli campioni (ODs) e del

siero LPC (OD_{LPC}), la OD del cut-off fornito dal produttore del kit impiegato (ODco), il nome e il lotto del kit utilizzato.

Elaborazione statistica dei dati

L'analisi statistica è stata condotta sia sui dati in ODs sia sulla ratio tra OD di ciascun campione e quella del cut-off di ciascun kit (ODs/ODco). Dal momento, inoltre, che la diversa modalità di definizione del cut-off da parte delle ditte produttrici può essere un fattore di variabilità tra metodi e tra laboratori, con l'intento di normalizzare i dati si è proceduto a calcolare anche la ratio tra OD dei campioni e quella del calibratore comune (ODs/ OD_{LPC}). Dai dati ottenuti è stata valutata la riproducibilità, espressa come coefficiente di variazione (CV%), per ciascuno dei tre campioni a diversa concentrazione anticorpale. L'imprecisione analitica globale è stata ulteriormente suddivisa nelle sue componenti interne al metodo (intra-metodo) e tra laboratori (inter-laboratorio).

La valutazione della eventuale differenza statistica tra i risultati ottenuti con sieri a concentrazione diversa per ciascun metodo è stata effettuata mediante l'analisi della varianza di tipo non parametrico (test di Kruskal-Wallis) e l'applicazione di confronti multipli con il test di Dunn, con errore complessivo $\alpha = 0.05$. La scelta di utilizzare una tecnica non parametrica è stata determinata dalla scarsa numerosità dei dati, in particolare per alcune metodiche, e dalla mancanza di normalità delle distribuzioni nell'ambito delle stesse.

Nel caso di metodi utilizzati da più di un laboratorio, l'applicazione del test di Dunn ha permesso l'individuazione di aberranti, attribuibili al singolo laboratorio e non al metodo. Gli outliers così identificati, sono stati eliminati dalle successive elaborazioni. Come software statistico è stato utilizzato SAS versione 8.

Risultati

I 39 laboratori partecipanti hanno utilizzato complessivamente 13 kit commerciali diversi, prodotti dalle seguenti aziende: Biochem Immunosystem (Guidonia Montello, Italia), BioRad Laboratories (Hercules, CA), Byk Gulden (Berlino, Germania), Diamedix Corporation (Miami, FL), Diasorin (Saluggia, Italia), Euroimmun (Lubecca, Germania), Fenning (Kirchzarten, Germania), Helix Diagnostics (Sacramento, CA), Inova Diagnostics (San Diego, CA), Orgentec (Mannheim, Germania), Elias (Freiburg, Germania), Radim (Pomezia, Italia) e Shield Diagnostics (Dundee, Scozia). Ogni metodo è stato contrassegnato con una lettera dell'alfabeto dalla A alla O, in sequenza diversa da quella sopra riportata. La numerosità dei laboratori che hanno utilizzato una specifico metodo variava da 1 a 8 (Tabella I).

Per quanto attiene ai valori espressi in ODs sono stati individuati come dati isolati (outliers) 2 dei 5 laboratori utilizzando il metodo D, e 1 dei 3 laboratori utilizzando il metodo A. Per i dati espressi in OD/ODco sono risultati outliers 1 dei 3 laboratori utilizzando il metodo M, 2 degli 8 laboratori utilizzando il metodo C e 1 dei 4 laboratori utilizzando il metodo A. Nessun outlier è stato individuato per i dati espressi come ODs/OD_{LPC}.

Tabella I. Numerosità dei metodi (A-O) utilizzati dai 39 laboratori partecipanti allo studio per il dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-Sc170 (l'elenco nominativo delle aziende produttrici dei kit è presente nella sezione dei risultati).

Metodo/kit	n° lab
A	4
B	6
C	8
D	5
E	1
F	3
G	1
H	2
I	1
L	3
M	3
N	1
O	1

Imprecisione analitica

L'imprecisione analitica globale, espressa come CV delle tre diverse determinazioni per i valori espressi rispettivamente in ODs, ODs/ODco e ODs/OD_{LPC}, è risultata essere 47.1%, 52.8% e 34.0% per il siero A, 56.2%, 47.4% e 34% per il siero M, 84.6%, 86.0% e 86.6% per il siero B. La variabilità analitica è risultata più elevata nel campione B con bassi valori autoanti-

corpali; un miglioramento del CV è stato ottenuto esprimendo il dato in ratio ODs/OD_{LPC}, anche se il comportamento non è stato uniforme per tutti i metodi. L'imprecisione media intra-metodo per i valori espressi in ODs, ODs/ODco e ODs/OD_{LPC} è risultata rispettivamente del 20.7%, 29.8% e 18.6% per il siero A, del 24.6%, 26.5% e 19.3% per il siero M, e del 30.6%, 28.1% e 20.2% per il siero B (Tabella II).

Per i metodi utilizzati da più di un laboratorio è stato possibile valutare anche l'imprecisione inter-laboratorio che ha fornito risultati intermedi tra la imprecisione globale e la imprecisione intra-metodo (Tabella III).

Prestazioni dei diversi metodi nel dosaggio quantitativo degli anti-Sc170

La media dei risultati ottenuti nei singoli laboratori, relativi alle misurazioni effettuate nei sieri a differente concentrazione anticorpale anti-Sc170, espressi rispettivamente in ODs, ODs/ODco e ODs/OD_{LPC} è rappresentata graficamente nelle figure 1, 2 e 3. In Tabella IV sono riportati dati numerici della media e delle relative deviazioni standard dei risultati ottenuti con ciascun metodo.

L'analisi statistica ha evidenziato come le misure ottenute nei tre sieri campione, espresse in ODs e in ratio ODs/ODco, non siano risultate tra loro significativamente diverse per i metodi E, G, I, L e O. Migliore è stato il risultato dei dati espressi in ratio ODs/OD_{LPC}, dove solo per 2 metodi (E ed I) non sono state rilevate differenze significative (Tabella V). I metodi che hanno dimostrato di poter discriminare tra i diversi livelli autoanticorpali, nella maggioranza dei casi sono stati capaci di evidenziare solo una diversità tra il livello A e il livello B e in pochi casi tra il livello M e il livello B, ma solo un metodo (kit C) è stato in grado di identificare come diversi i va-

Tabella II. Imprecisione analitica intra-metodo. Per i metodi usati in più laboratori, il dato riportato corrisponde alla media dei CV ottenuti nei singoli laboratori. (OD_S, densità ottica del campione; OD_{CO}, densità ottica del cut-off presente in ciascun kit; OD_{LPC}, densità ottica del calibratore comune utilizzato nello studio).

Metodo/kit	Campione A (CV%)			Campione M (CV%)			Campione B (CV%)		
	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}
A	19.9	24.0	17.4	19.1	25.9	21.4	36.3	30.3	26.1
B	33.6	32.3	34	18.8	28.9	34.2	36.2	38.0	27.6
C	10.6	20.3	16.8	17.6	21.1	17.2	21.4	38.0	13.6
D	10.6	42.7	24.9	47	25.1	36.0	47.6	36.1	36.9
E	18	29.8	14.1	40	43.9	47.0	6.5	1.1	15.6
F	23.9	25.7	13.4	14.6	21.8	22.5	22.5	5.1	28.3
G	32.7	27.0	20.3	54.2	8.4	5.8	30.2	13.6	7.2
H	32.4	18.3	21.1	16.9	12.2	10.0	65.4	29.2	41.3
I	22.1	69.9	29.1	21.7	66.8	29.8	29.5	23.9	12.5
L	10.2	29.3	13.6	14.7	43.7	11.0	45.0	71.1	22.2
M	7.1	15.3	11.9	7.8	10.9	3.7	24.2	21.6	16.2
N	25.6	32.9	20.4	23.3	19.5	6.3	12.2	22.3	5.4
O	22.2	20.6	5.3	23.9	16.8	6.5	20.5	24.5	9.4
Media	20.7	29.8	18.6	24.6	26.5	19.3	30.6	28.1	20.2

Figura 1. Media (X) dei risultati espressi in ODs del dosaggio dei sieri A, M e B per ciascun laboratorio. I risultati ottenuti in laboratori che usano lo stesso metodo sono uniti da una linea.

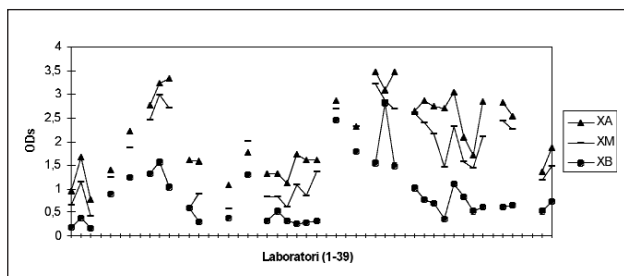


Figura 2. Media (X) dei risultati espressi in ODs/ODco del dosaggio dei sieri A, M, e B per ciascun laboratorio. I risultati ottenuti in laboratori che usano lo stesso metodo sono uniti da una linea.

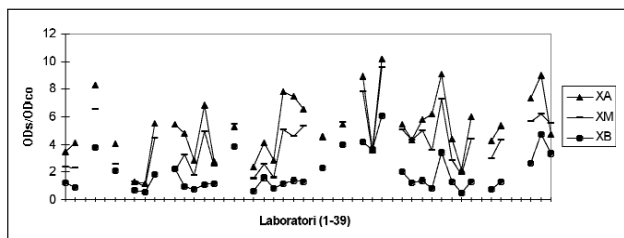
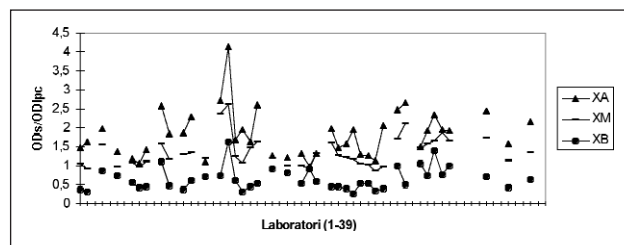


Figura 3. Media (X) dei risultati espressi in ODs/OD_{LPC} del dosaggio dei sieri A, M e B per ciascun laboratorio. I risultati ottenuti in laboratori che usano lo stesso metodo sono uniti da una linea.



lori del siero A rispetto a quelli del siero M. Tale metodo, peraltro, è quello utilizzato dal maggiore numero di laboratori. L'espressione dei dati in ratio ODs/OD_{LPC} ha sicuramente migliorato il potere discriminante in quanto 11 metodi su 13 hanno evidenziato una differenza significativa tra il siero A e il siero B e 7 su 13 tra il siero M e il siero B, in confronto agli 8 su 13 e 5 su 13 della ratio ODs/ODco e ai 9 su 13 e 6 su 13 dei dati espressi in ODs.

Discussione

Gli anticorpi anti-Sc170 sono dei marcatori sierologici specifici per sclerodermia e vengono rilevati nel 20-60% dei pazienti con forma cutanea diffusa e nel 46-56% dei pazienti con interessamento polmonare³⁵⁻³⁸. Tradizionalmente la loro determinazione viene eseguita a scopo classificativo e diagnostico, mentre incerto è il loro ruolo nel monitoraggio del follow-up³⁹. Pochi e in parte tra loro conflittuali sono infatti gli studi relativi alle fluttuazioni delle concentrazioni anticorpali durante il decorso della malattia. Mentre alcuni autori hanno riscontrato una relativa stabilità del titolo anticorpale anti-Sc170 nel follow-up^{27,40}, Kuwana et al. hanno riportato l'esistenza di un sottogruppo di pazienti in cui la negativizzazione degli anti-Sc170 si associava ad un outcome più favorevole²⁶. Sato et al.²⁸ a loro volta, hanno riscontrato una correlazione positiva tra il titolo degli anticorpi anti-Sc170 e il *modified Rodnan total skin thickness score*, nonché la resistenza vascolare renale. Gli stessi autori hanno evidenziato anche una correlazione inversa con la funzionalità polmonare, espressa come capacità vitale, suggerendo una stretta relazione tra livelli anticorpali e severità della fibrosi polmonare. Più recentemente, una correlazione positiva tra livelli sierici di anticorpi anti-Sc170 e attività della malattia è stata riportata da Hu et al.³⁴. Tuttavia, in tutti gli studi sopra citati i dati sono stati raccolti nel laboratorio degli autori e sono state utilizzate metodiche immunometriche home-made; il che significa che i risultati ottenuti potrebbero non essere riproducibili se il test venisse eseguito in laboratori diversi e che utilizzassero metodi ELISA di tipo commerciale. Di quest'ultimi è già stata comprovata l'affidabilità nella determinazione qualitativa degli anticorpi anti-Sc170^{33,41} e un recente ed elegante studio di Tan et al.⁴² ha riportato che buona parte di questi metodi è dotata anche di una discreta accuratezza nella determinazione quantitativa di tale specificità autoanticorpale. Il nostro studio è stato progettato per verificare se questi risultati potevano essere confermati anche quando i test venivano ese-

Tabella III. Imprecisione analitica inter-laboratorio (sono rappresentati solo i metodi utilizzati da almeno 2 laboratori).

Metodo/kit	Campione A (CV%)			Campione M (CV%)			Campione B (CV%)		
	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}
A	41.8	29.4	22.6	31.7	26.4	23.7	38.2	62.3	51.3
B	35.5	52.9	59.7	35.7	52.3	56.8	47.8	44.7	75
C	19	23.3	29.8	29.8	26.2	29.9	39.3	44.7	25.1
D	46.8	48.4	29.7	50.1	30.5	45.6	58.0	60.8	63.6
F	42.9	21.9	13.2	48.5	14.1	21.8	42.4	19.1	27.1
H	43.5	23.6	20.3	17.5	22.4	14.7	58.0	47.5	64.5
L	12.2	59.9	21.3	17.3	66.8	22.2	45.1	78.5	30.3
M	10.7	14.5	18.7	10.7	18.8	6.75	23.4	61.2	20.5

Tabella IV. Media e deviazione standard dei risultati dei dosaggi quantitativi di anti-Sc170 nei campioni A, M e B, espressi in ODs, ratio ODs/ODco e ratio ODs/OD_{LPC}.

Metodo/kit	Campione A (CV%)			Campione M (CV%)			Campione B (CV%)		
	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}
A	1.380±0.578	7.32±2.15	1.92±0.43	1.159±0.368	5.78±1.41	1.66±0.39	0.575±0.219	3.62±1.84	0.57±0.21
B	1.445±.513	5.19±2.74	2.46±1.47	0.876±0.312	3.46±1.81	1.74±0.99	0.339±0.162	1.16±0.52	0.33±0.16
C	2.667±0.370	5.35±1.25	1.59±0.47	1.977±0.599	4.24±1.11	1.14±0.34	0.714±0.275	1.36±0.61	0.71±0.27
D	1.422±.666	4.57±2.24	2.15±0.64	0.685±0.343	2.89±1.59	1.34±0.41	0.423±0.245	1.25±0.79	0.42±0.24
E	1.776±0.320	5.33±1.59	1.10±0.64	2.000±0.763	5.41±2.37	1.20±0.57	1.303±0.084	3.83±0.43	1.30±0.08
F	1.123±0.480	3.87±0.845	1.55±0.20	0.741±0.359	2.36±0.33	0.98±0.21	0.244±0.119	0.98±0.19	0.24±0.11
G	1.398±0.458	8.32±2.24	1.98±0.40	1.240±0.673	6.52±0.55	1.56±0.09	0.897±0.271	3.75±0.51	0.89±0.27
H	2.705±1.178	4.70±1.11	2.56±0.52	2.339±0.408	3.69±0.83	1.92±0.28	0.622±0.367	0.94±0.45	0.62±0.36
I	2.855±0.632	4.63±3.22	1.27±0.37	2.676±0.508	4.36±2.91	1.18±0.35	2.461±0.723	2.31±0.55	2.46±0.72
L	3.334±0.409	7.59±4.83	1.20±0.25	2.915±0.503	6.95±4.65	1.08±0.24	2.004±0.904	4.07±3.4	2.00±0.90
M	3.104±0.333	1.26±0.18	1.20±0.23	2.717±0.292	1.14±0.22	1.05±0.07	1.535±0.564	0.62±0.15	1.53±0.56
N	2.524±0.646	4.08±1.34	1.36±0.28	1.873±0.437	2.60±0.51	0.96±0.06	1.240±0.152	2.06±0.46	1.24±0.15
O	2.316±0.54	14 5.47±1.12	1.21±0.06	2.314±0.555	5.58±0.93	1.00±0.07	1.785±0.365	3.97±0.97	1.78±0.36
Media	2.111±0.900	5.33±2.76	1.67±0.57	1.695±0.871	4.10±2.38	1.28±0.44	0.842±0.670	1.93±1.67	0.84±0.67

guiti nei laboratori clinici ospedalieri, nelle normali condizioni di attività diagnostica. A differenza dello studio di Tan et al, infatti, in cui i dosaggi autoanticorpali sono stati eseguiti direttamente dai produttori dei kit in una unica seduta analitica, nel nostro studio i dosaggi sono stati eseguiti in diversi laboratori clinici e in più sedute analitiche distribuite nell'arco di 6 mesi. In questo modo è stato possibile determinare la imprecisione analitica dei vari metodi, fattore che deve essere sempre valutato qualora si vogliano confrontare risultati di dosaggi eseguiti in momenti diversi come di fatto avviene durante il follow-up. L'imprecisione analitica intra-metodo, espressa come CV, è risultata mediamente di poco superiore al 20%, anche se con prestazioni diversifi-

cate per ciascun metodo, e perciò assolutamente accettabile soprattutto se paragonata con quella di altri dosaggi autoanticorpali³². I dati del nostro studio hanno dimostrato però come, al di là della contenuta imprecisione, esista una notevole diversità tra i vari metodi ELISA per quanto riguarda la loro capacità di discriminare tra diverse concentrazioni anticorpali anti-Sc170. Analizzando i risultati espressi in ODs, infatti, solo 1 metodo su 13 è riuscito a discriminare tra i campioni ad alta e media concentrazione anticorpale, solo 6 metodi su 13 tra campioni a media e bassa concentrazione, e 9 metodi su 13 tra campioni ad alta e bassa concentrazione. Ciò evidenzia, quindi, che i test ELISA commerciali in genere riescono ad essere discriminanti solo se le concentrazioni an-

Tabella V. Analisi della varianza non parametrica (test di Kruskal-Wallis) e dei confronti multipli (test di Dunn) per le determinazioni quantitative di anti-Sc170 nei sieri A, M e B con il medesimo metodo. (ns, non significativo; S, differenza statisticamente significativa con errore complessivo $\alpha = 0.05$).

Metodo/kit	A≠M			A≠B			M≠B		
	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}	ODs	ODs/ODco	ODs/OD _{LPC}
A	ns	ns	ns	S	S	S	S	S	S
B	ns	ns	ns	S	S	S	S	S	S
C	S	ns	S	S	S	S	S	S	S
D	ns	ns	ns	S	S	S	ns	S	S
E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
F	ns	ns	ns	S	S	S	S	ns	ns
G	ns	ns	ns	ns	S	S	ns	ns	ns
H	ns	ns	ns	S	S	S	S	ns	ns
I	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
L	ns	ns	ns	S	ns	S	ns	ns	S
M	ns	ns	ns	S	S	S	S	S	S
N	ns	ns	ns	S	ns	S	ns	ns	S
O	ns	ns	ns	ns	ns	S	ns	ns	ns

ticorpali sono tra loro assai diverse. I risultati ottenuti nel presente studio, meno brillanti rispetto a quelli di Tan et al., possono trovare numerose spiegazioni: il diverso disegno dello studio (noi abbiamo usato sieri non standardizzati mentre Tan et al. hanno impiegato i sieri standard WHO); il maggior numero di metodi da noi analizzati; la differenza delle concentrazioni anticorpali nei sieri campione; il fatto che nello studio di Tan et al. i test sono stati eseguiti direttamente nei laboratori delle aziende produttrici dei kit e non nei laboratori clinici ospedalieri. In rapporto a queste variabili è opportuno sottolineare come il nostro studio riproduca molto più fedelmente la reale condizione in cui si svolge l'attività diagnostica autoimmunologica in ambito ospedaliero e sia perciò più indicativa della affidabilità analitica dei laboratori e dei metodi commerciali.

Una considerazione che emerge dalla analisi dei nostri dati, comunque, è il significativo miglioramento dei risultati, intesi sia come imprecisione analitica sia come capacità di discriminare tra concentrazioni diverse, quando questi vengono espressi come rapporto tra la OD del campione e quella di un unico calibratore (ODs/OD_{LPC}). L'introduzione di un fattore di normalizzazione, come può essere il siero a basso titolo da noi preparato come calibratore comune, riduce infatti la variabilità analitica legata a fattori strumentali (diluitori, spettrofotometri, etc.) o procedurali (diluizioni, tempi di incubazione, lavaggi, etc.) migliorando globalmente le prestazioni analitiche del sistema. Ciò dimostra come, qualora si potesse disporre di uno standard internazionale o di una preparazione di riferimento a concentrazione anticorpale nota di anti-Sc170, si potrebbero senz'altro ottenere dei risultati migliori in termini quantitativi. Infine, dobbiamo segnalare che, in generale, i test commerciali per il dosaggio degli anticorpi anti-antigeni nucleari, e quindi anche per gli anti-Sc170, sono architettati per l'analisi qualitativa (presenza/assenza dell'anticorpo), anche se, in quanto metodi immunometrici, potenzialmente in grado di dare risposte di tipo quantitativo. Come abbiamo evidenziato in questo studio però, molti di essi non riescono a distinguere tra concentrazioni anticorpali anche grossolanamente diverse e solo alcuni sono in grado di rilevarne le piccole variazioni. Per tale motivo, allo stato attuale, i metodi ELISA commerciali non possono essere utilizzati per un accurato dosaggio quantitativo degli anticorpi anti-Sc170. La revisione della architettura dei test in associazione alla preparazione di uno standard internazionale a concentrazione definita di anti-Sc170, che permetta l'allestimento di curve di calibrazione con valori espressi in unità internazionale (IU), sono a nostro parere i due passaggi fondamentali per la preparazione di metodi realmente di tipo quantitativo. I risultati incoraggianti di alcuni recenti studi^{26,28} sul possibile significato prognostico delle variazioni delle concentrazioni anticorpali anti-Sc170, dovrebbero indurre gli organismi prepo-

sti alla standardizzazione dei metodi immunologici a preparare uno standard internazionale e i produttori ad allestire metodi strutturati per il dosaggio quantitativo degli anti-Sc170. Solo quando avremo a disposizione tali metodi, potremo definire, tramite studi prospettici a lungo termine, il ruolo degli anticorpi anti-Sc170 nel monitoraggio dei pazienti affetti da sclerodermia.

Appendice

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

- A. Antico e R. Bertolo (Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Cittadella, PD);
- F. Antico, G.L. Gessoni e S. Valverde (Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile, Chioggia, VE);
- D. Bassetti e P. Caciagli (Laboratorio Analisi, Ospedale S.Chiera, Trento);
- A. Bianco, A. Marchetti e G. Bauckneht (Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Cairomontenotte, SV);
- N. Bizzaro e P. Pasini (Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S.Donà di Piave, VE);
- L. Camogliano, M.L. Goggi, M. Pallavicino e P. Repetto (Patologia Clinica, Ospedale S.Giacomo, Novi Ligure, AL);
- G. Catanoso e F. Gioia (Laboratorio Analisi, Ospedale di Busto Arsizio, VA);
- G. Ceron (Laboratorio Analisi Chimico-cliniche, Ospedale di Dolo, VE);
- P.L. Clemen, M. Pradella e A. Xamin (Laboratorio Analisi, Ospedale di Castelfranco Veneto, TV);
- R. Colombi, P. Bianchi e P. Novarini (Laboratorio Analisi, Ospedale di Stradella, PV);
- P. Fonio, C. Di Natale, M. Bandi e A. Patta (Microbiologia e Virologia, Az. Osp. "Maggiore della Carità", Novara);
- L. Fornasiero, F. Manoni, M. Nequinio (Laboratorio Analisi, Ospedale di Monselice, PD)
- E. Gentileschi, L. Lauro e E. Zepponi (Laboratorio Analisi, Ospedale S.Camillo de Lellis, Rieti);
- M. Giavarina e D. Forlani (Servizio di Microbiologia, Ospedale di Legnago, VR);
- L. Giovannelli e E. Girolami (Laboratorio di Autoimmunità, SIT Ospedale Bambino Gesù, Roma);
- E. Gulletta, M.C. Berlinghieri e A. Dardano (Patologia Clinica, Università di Catanzaro);
- C. Lo Cascio, G. Maineri e R. Salmoiraghi (Laboratorio Analisi, Ospedale di S.Bonifacio, VR);
- M.A. Manfredi, D. Macchia, E. Cammelli e S. Testi (Lab. Immunologia, Nuovo Osp. S. Giovanni di Dio, Firenze);
- V. Marrè e G. Fera (Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Lavagna, GE);
- A. Melegari, R. Roncaglia e A. Fortuna (Laboratorio Analisi Chimico-cliniche, Ospedale di Modena);
- G. Moscato, A. Bossi e P. Pignatti (Servizio di Allergologia e Immunologia Clinica, Fondazione S. Maugeri, Pavia);
- L. Padovan (Laboratorio Analisi, Ospedale Umberto I, Mestre, VE);
- N. Papa, G. Bertiato e M. Battistel (Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Belluno);
- L. Peretti (Anatomia Patologica, Az. Osp. S.Croce e

Carle, Cuneo);
 A. Piazza (Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche, Ospedale Geriatrico, Padova);
 S. Platzgummer (Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Merano, BZ);
 A. Ratto e M. Fiorelli (Patologia Clinica, Ospedale S. Carlo, Genova-Voltri);
 F. Rigolin e L. Nunzi (Laboratorio Analisi, Ospedale di Ferrara);
 E. Rorai e M. Fonda (Laboratorio Analisi, Ospedale di Cattinara, Trieste);
 G. Saglimbeni, F. Sanavia e G.M. Cappuzzo (Laboratorio Analisi, Ospedale di Mirano (VE));
 L. Scarso, P. Petrone, L. Bocciardo e M. Iannacchino (Centro Trasfusionale, Istituto Gaslini, Genova);
 M. Tampoia (Patologia Clinica I, Policlinico Universitario, Bari);
 F. Targa, C. Vecchiato e O. Prinoth (Servizio Trasfusionale e Immunoematologia, Ospedale Generale di Bolzano);
 L. Tasinato e N. Osti (Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile di Rovigo);
 A. Tesser (Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Bassano del Grappa, VI);
 E. Tonolli e M. Pegoraro (Servizio di Microbiologia, Ospedale Civile Maggiore, Verona);
 E. Tonutti, D. Visentini e M. Poletto (Istituto di Chimica Clinica, Az. Ospedaliera "S.Maria della Misericordia" Udine);
 R. Tozzoli e A.R. Perosa (Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile di Latisana, UD);
 S. Vaccarella, V. Mancini, P.F. Rocca e L.M. Greco (Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale di Cosenza);
 D. Villalta (Immunologia Clinica e Virologia, Az. Osp. S. Maria degli Angeli, Pordenone).

Bibliografia

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1987; 33: 167-240.
2. Rothfield NF, Stollar BD. The relation of immunoglobulin class, pattern of anti-nuclear antibody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1967; 46: 1785-92.
3. Isenberg DA, Shoenfeld Y, Schwartz RS. Multiple serologic reactions and their relationship to clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 132-8.
4. Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with lupus erythematosus. *J Immunol* 1968; 96:464-71.
5. Fritzler MJ, Kinsella TD, Garbutt E. The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med* 1980; 69: 520-6.
6. Shero J, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titer of antibodies to topoisomerase I (Scl70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986; 231:737-40.
7. Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Eng J Med* 1968; 278: 533-8.
8. Reichlin M, Brucato A, Frank MB, Maddison PJ, McCubbin VR, Wolfson-Reichlin M, et al. Concentration of autoantibodies to native 60-kd Ro/SSA and 52-kd Ro/SSA in eluates from heart of a child who died with congenital complete heart block. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1698-703.
9. Jacobsen S, Halberg P, Ullman S, Høler-Madsen M, Petersen J, Mortensen J, et al. A longitudinal study of pulmonary functions in Danish patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 1997; 16: 384-90.
10. Diot E, Giraudeau B, Diot B, Degenne D, Ritz L, Guilmot JL, et al. Is anti-topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis? *Chest* 1999; 116: 715-20.
11. Koffler D, Agnello V, Thoburn R, Kunkel HG. Systemic lupus erythematosus prototype of immune complex nephritis in man. *J Exp Med* 1971; 134 (suppl): 169.
12. Morioka T. Anti-DNA antibody derived from a systemic lupus erythematosus (SLE) patients forms histone-DNA-antiDNA complexes that bind to rat glomeruli in vivo. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 92-100.
13. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966; 45: 1732-40.
14. Swaak AJG, Aarden LA, Stadius van Epps LW, Feltkamp TEW. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guide in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 22: 226-35.
15. Smeenk RJT, Berden JHM, Swaak AJG. dsDNA autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science BV; 1996. pp 227-36.
16. Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS, Ambrus JL, Velosa J, Keane WF, et al. Association between active Wegener's granulomatosis and anti-cytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989; 149: 2461-5.
17. Tervaert JW, Huitema MG, Henè RJ, Sluiter WJ, The TH, van der Hem GK, et al. Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on anti-neutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990, ii: 709-11.
18. Houtman PM, Kallenberg CGM, Limburg PC, Huitema MG, van Rijswijk MH, The TH. Quantitation of autoantibodies to nucleoribonucleoprotein by ELISA: relation between antibody levels and disease activity in patients with connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 1985; 62:696-704.
19. Habets WJA, Hoet MH, Sillrken PTG, De Rooij DJRAM, van De Putte LBA, van Venrooij WJ. Detection of autoantibodies in a quantitative immunoassay using recombinant ribonucleoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 1989; 76:172-7.
20. Nyman U, Lundberg I, Hedfors E, Wahren M, Petterson I. IgG and IgM anti-snRNP reaction in sequentially obtained serum samples from patients with connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis* 1972; 51:1307-12.
21. De Rooij DJRAM, Habets WJ, van de Putte JBA, Hoet MH, Verbek AL, van Venrooij WJ. Use of recombinant RNP peptides to 70K and A in an ELISA for measurement of antibodies in mixed connective tissue disease: a longitudinal follow up of 18 patients. *Ann Rheum Dis* 1990; 49:391-5.
22. Hoet RM, Koornneef I, De Rooij DJ, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Changes in anti-U1RNP anti-

- body levels correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus overlap syndrome. *Arthritis Rheum* 1992; 35:1202-10.
23. Yamamoto AM, Amoura Z, Johannet C, Jeronimo ALC, Campos H, Koutouzov S, et al. Quantitative radioligand assays using de novo-synthesized recombinant autoantigens in connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 689-98.
 24. Wahren M, Tengner P, Gunnarsson I, Lundberg I, Hedfors E, Ringertz NR, et al. Ro/SSA and La/SSB antibody level variation in patients with Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1998; 11: 29-38.
 25. Hassan AB, Lundberg IE, Isenberg D, Wahren-Herlenius M. Serial analysis of Ro/SSA and La/SSB antibody levels and correlation with clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheum* 2002; 31:133-9.
 26. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of antibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1074-84.
 27. Hildebrandt S, Jackh G, Weber S, Peter HH. A long-term longitudinal isotypic study of anti-topoisomerase I autoantibodies. *Rheumatol Int* 1993; 12: 231-4.
 28. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2001; 40: 1135-40.
 29. Gussin HAE, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M. Anti-topoisomerase I (anti-Scl70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 376-83.
 30. Brada FA, Andrews BS, Davis JS, Taylor RN. Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1236-44.
 31. Habets WJ, De Rooij DJ, Hoet MH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Quantitation of anti-RNP and anti-Sm antibodies in MCTD and SLE patients by immunoblotting. *Clin Exp Immunol* 1985; 59:457-66.
 32. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Pradella M, Manoni F, Villalta D, et al. Immunoassay of anti-thyroid autoantibodies: high analytical variability in second generation methods. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:568-72.
 33. 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.
 34. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1363-73.
 35. Steen VD, Powell DL, Medsger TA. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;31:196-203.
 36. Giordano M, Valentini G, Migliaresi S, Picillo U, Vatti M. Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. *J Rheumatol* 1986; 13: 911-16.
 37. Aeschlimann A, Meyer O, Bourgeois P, Haim T, Belmatoug N, Palazzo E, et al. Anti-Scl70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 992-7.
 38. Briggs DC, Vaughan RW, Welsh KI, Myers A, duBois RM, Black CM. Immunogenetic prediction of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis patients. *Lancet* 1991; 338: 661-2.
 39. Reveille JD, Solomon DH, and The American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: Anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Care & Res* 2003; 49:399-412.
 40. Vazquez-Abad D, Russel CA, Cusick SM, Earnshaw WC, Rothfield NF. Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase-I isotypes. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74: 257-70.
 41. Tan EM, Smolen JS, Mc Dougal JS, Butcher BT, Conn D, Dawkins R, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassay for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity and specificity. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 455-64.
 42. Tan EM, Smolen JS, Mc Dougal JS, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassay kits for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. II. Potential for quantitation of antibody content. *J Rheumatol* 2002; 29:68-74.