

L'evoluzione della tecnologia e le ricadute sui percorsi diagnostici nelle malattie autoimmuni

R. Tozzoli

Dipartimento dei Servizi di Diagnostica, Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Presidio Ospedaliero di Latisana (UD)

Riassunto

I metodi immunologici convenzionali per la ricerca e la quantificazione di autoanticorpi nel siero hanno costituito per 40 anni uno dei cardini della diagnosi delle malattie autoimmuni e hanno raggiunto nell'ultima decade un grado di accuratezza diagnostica tale da consentire l'inserimento dei test di laboratorio autoanticorpali tra i criteri internazionali di diagnosi e classificazione delle principali patologie autoimmuni, sistemiche ed organo-specifiche.

L'elevato grado di purificazione raggiunto dagli autoantigeni impiegati in questi metodi ha permesso di coniugare un'alta sensibilità diagnostica ed un'adeguata specificità analitica e diagnostica, in particolare per alcuni nuovi autoanticorpi di rilevante significato clinico, quali gli anti-nucleosomi, gli anti-transglutaminasi, gli anti-recettore del TSH, gli anti-peptidi citrullinati.

Negli ultimi 5 anni l'avvento della tecnologia proteomica, che permette la misurazione contemporanea di più autoanticorpi (multiplexing), ha aperto nuovi orizzonti nella diagnostica delle malattie autoimmuni.

Summary

The evolution of technology and its impact on autoimmune disease diagnosis.

For more than 40 years, conventional immunologic methods for the study and quantification of serum autoantibodies have been considered the basis for the diagnosis of autoimmune diseases. In the last ten years they have reached a level of diagnostic accuracy that allowed the inclusion of autoantibody lab tests among international criteria for the diagnosis and classification of the main autoimmune, systemic and organ-specific diseases.

The high level of purification reached by the autoanti-

Il multiplexing presenta un interesse rilevante per il laboratorio clinico, per motivi organizzativi, logistico-gestionali, fisiopatologici e di ricerca.

Le tecnologie emergenti sono rappresentate da sistemi basati su microarray planari e non planari (in sospensione): tra questi ultimi vanno compresi i metodi che utilizzano microbiglie colorate o microparticelle codificate. In particolare hanno larga diffusione i sistemi che consentono la rilevazione di microbiglie colorate mediante laser-fluorimetria in citometri a flusso: questa metodologia presenta numerose applicazioni commerciali, è in rapida espansione ed è ampiamente validata da numerosi studi clinici, condotti in tutto il mondo.

I metodi multiplex consentiranno entro pochi anni l'analisi di profili autoanticorpali, che potranno probabilmente migliorare la comprensione della fisiopatologia dell'autoimmunità, consentire la diagnosi precoce (grazie al valore predittivo degli autoanticorpi) e favorire l'introduzione della terapia antigene-specifica nelle malattie autoimmuni.

genes used in the tests has made possible the combination of a high diagnostic sensibility with an adequate analytic and diagnostic specificity, particularly with regard to some new autoantibodies of considerable clinical value, such as the anti-nucleosomes, the anti-transglutaminase, the anti-TSH receptor and the anti-citrullinated peptides.

Recently, the new proteomic technology with its ability for the simultaneous detection of multiple antibodies, has opened new horizons for the diagnosis of autoimmune diseases. Indeed, multiplexing analysis is of considerable interest to the clinical lab for reasons of organization, logistics, management, physiopathology, and

research.

Emerging diagnostic technologies are representative of systems based on planar and non-planar (in suspension) microarrays.

The latter includes methods using colored microspheres or nanobarcoded particles. In particular, the systems that allow the detection of colored microspheres by employing flow cytometry and the laser-fluorimetry technology, are widely employed. This method has numerous commercial applications, is rapidly expanding and has been validated world-wide in various clinical

studies.

In the near future, the multiplex methods will enable the analysis of autoantibody profiles, possibly improving the understanding of the autoimmunity pathophysiology, allowing for an early diagnosis (thanks to the predictive value of the autoantibodies), and facilitating the introduction of antigen-specific therapy in autoimmune diseases.

Key words: autoantibodies, diagnosis, technologies, conventional immunoassays, multiplex immunoassays, microarrays.

I metodi immunologici convenzionali per il dosaggio autoanticorpale: le 'vecchie' tecnologie.

Per 40 anni (1957-1997), i metodi immunologici convenzionali hanno rappresentato il presidio principale per la diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni. Anche se i primi test per la rilevazione di autoanticorpi, il test per il fattore reumatoide (FR)¹ e il test LE², risalgono all'anno 1948, è il 1957 l'anno di riferimento per la prima messa a punto di metodi di do-

saggio di autoanticorpi³⁻¹². Da allora numerose tecnologie sono state proposte ed utilizzate nella pratica clinica (Tab. I e II):

- i metodi immunochimici: immunofluorescenza indiretta (IIF)^{3,4}, fissazione del complemento (CF)⁵⁻⁷, agglutinazione passiva (PA)^{8,9}, immunodiffusione (ID)¹⁰⁻¹³, controimmunolettroforesi (CIE)^{14,15}, immunoprecipitazione (IPA)¹⁶⁻¹⁸, immunoblot (IB) e sue varianti^{19,20}, immunodot^{21,22};
- i metodi immunometrici: saggio radioimmunologi-

Tabella I. Metodi immunochimici per la rilevazione autoanticorpale (per le sigle, vedi testo).

<i>Metodi immunochimici</i>	<i>Sorgente antigenica</i>	<i>Primi anticorpi rilevati</i>	<i>Attuale livello di automazione</i>	<i>Attuale utilizzo nei laboratori clinici</i>	<i>Principale (primo) riferimento bibliografico</i>
IFI	Sezioni criostatiche tissutali, cellule umane o di protozoo in coltura (HEp-2, Crithidia luciliae)	ANA	+	+++	Friou, 1957, Holborow, 1957
FC	Estratti cellulari purificati	dsDNA, TMA, PCA	-	-	Robbins, 1957 Trotter, 1957 Anderson, 1957
AP	Estratti cellulari purificati	dsDNA, Tg,	-	+	Miescher, 1957 Witebsky, 1957
ID	Estratti cellulari purificati	dsDNA, Tg, Sm	-	++	Cepellini, 1957 Seligmann, 1957 Doniach, 1957 Tan, 1966
CIE	Estratti cellulari purificati	ENA	-	++	Kurata, 1976 Walravens, 1996
RIP	Estratti cellulari purificati, antigeni ricombinanti	RNP GAD 21-OH	-	-	Lerner, 1979 Hagopian, 1993 Colls, 1995
IB	Estratti cellulari purificati, antigeni ricombinanti	rP, Ro 60/52	-	+++	Towbin, 1979 Ben-Chetrit, 1985
DB	Estratti cellulari purificati, antigeni ricombinanti	ENA	-	+++	Stott, 1989 Hermens, 1997

Tabella II. Metodi immunometrici per il dosaggio autoanticorpale (per le sigle, vedi testo).

<i>Metodi immunochimici</i>	<i>Sorgente antigenica</i>	<i>Primi anticorpi rilevati</i>	<i>Attuale livello di automazione</i>	<i>Attuale utilizzo nei laboratori clinici</i>	<i>Principale (primo) riferimento bibliografico</i>
RIA	Antigeni purificati o ricombinanti	dsDNA, TG, TPO TSHR	+	++	Wold, 1968 Peake, 1974 Rees Smith, 1974
EIA	Antigeni purificati o ricombinanti	dsDNA, Tg, TMA/TPO	+++	+++	Engvall, 1976 Voller, 1980 Endo, 1980
FIA	Antigeni purificati o ricombinanti	dsDNA	+++	+++	Jones, 1981 van der Sluijs Veer, 1996
LIA	Antigeni purificati o ricombinanti	AGA	+++	+++	Merridew, 1995

co (RIA) e sue varianti²³⁻²⁵, saggio immunoenzimatico (ELISA) e sue varianti²⁶⁻²⁸, saggio immunofluorescente (FIA) e sue varianti^{29,30}, saggio immunoluminescente (CLIA) e sue varianti³¹.

I metodi immunochimici hanno consentito la ricerca qualitativa, definendo la presenza o l'assenza degli autoanticorpi nel siero dei pazienti, mentre i metodi immunometrici hanno permesso la misurazione quantitativa delle concentrazioni anticorpali.

Nel corso degli anni '90 l'applicazione dei metodi immunometrici a sistemi analitici sempre più evoluti in termini di affidabilità analitica e di automazione ha determinato la sempre maggiore diffusione dei test autoanticorpali, con incremento dei volumi di test eseguiti in ogni laboratorio di Immunologia Clinica e riduzione dei tempi di risposta.

E' ormai vasta la gamma di strumenti analitici validati³²⁻³⁸, a diverso livello di complessità e produttività (Tab. III).

L'impiego dei singoli test autoanticorpali nella diagnosi e nella classificazione delle malattie autoimmuni

Dato che la produzione di autoanticorpi specifici ad alta affinità rappresenta un marcatore caratteristico della malattie autoimmuni³⁹, l'impiego dei metodi per la loro rilevazione si è progressivamente imposto nella pratica clinica come strumento per la diagnosi di queste patologie, al punto che uno o più test di laboratorio ne costituiscono criteri classificativo-diagnostici, ad es. anti-nucleo (ANA), anti-dsDNA, anti-Sm, anti-fosfolipidi (aPL) per il lupus eritematoso sistemico (LES)^{40,41}, RF per l'artrite reumatoide (AR)⁴², anti-Ro, anti-La per la sindrome di Sjögren⁴³, anti-cardiolipina (aCL) e anti- β 2-glicoproteina (β 2-GPI) per la sindrome da antifosfolipidi^{44,45}, anti-LKM, anti-SMA, ANA per l'epatite autoimmune⁴⁶, anti-tireoperossidasi (TPO) per la tiroi-

dite di Hashimoto⁴⁷. L'introduzione dei metodi quantitativi per la misura delle concentrazioni anticorpali ha inoltre consentito il monitoraggio del decorso delle malattie autoimmuni, soprattutto della loro attività e della risposta alla terapia, come nel caso dei PR3-ANCA nella granulomatosi di Wegener⁴⁸, degli anti-dsDNA nel LES⁴⁹ e degli anti-recettore del TSH (anti-TSHR) nel morbo di Graves⁵⁰.

Nel corso degli anni '90 la scoperta di nuovi autoantigeni specifici e il progressivo affinamento delle tecniche di purificazione ha aumentato la sensibilità e la specificità dei test anticorpali, migliorando la diagnosi e la classificazione di alcune importanti malattie autoimmuni. Esempi di questa evoluzione tecnologica sono i metodi di dosaggio degli anticorpi anti-cromatina (nucleosomi) (ANuA) per la diagnosi del LES, degli anti-peptidi citrullinati (anti-CCP) per la diagnosi di AR, degli anti-transglutaminasi (anti-tTG) per la diagnosi di malattia celiaca, degli anti-TSHR per la diagnosi delle tireopatie autoimmuni ed in particolare del morbo di Graves (Tab. IV).

Per gli ANuA, la disponibilità di preparazioni antigeniche purificate, costituite da cromatina priva dell'istone H1, ha consentito di elevare significativamente la sensibilità analitica e diagnostica fino a valori dell'85-90%^{51,52}, superiori a quelli ottenuti con le tecniche di prima generazione, che utilizzavano il nucleosoma intatto.

Anche per gli anti-CCP, l'introduzione dei metodi di seconda generazione, che impiegano 10 peptidi citrullinati rispetto al singolo peptide, ha permesso di elevare la sensibilità diagnostica nell'AR all'85%⁵³.

La situazione è simile per i metodi di seconda generazione per il dosaggio di anti-tTG e anti-TSHR: da quando sono state rese disponibili preparazioni antigeniche ricombinanti, questi test autoanticorpali presentano sensibilità analitiche prossime al 100% nella dia-

Tabella III. Sistemi analitici commerciali per il dosaggio autoanticorpale.

<i>Sistemi</i>	<i>Strumenti commerciali</i>	<i>Principale (primo) riferimento bibliografico</i>
Convenzionali (a test singolo) ad automazione discreta (a moduli)	DSX, Triturus, Alisei, Evolis, etc.	Tampoia, 2005
Convenzionali (a test singolo) ad automazione completa	Cobas Core, Immulite, Elecsys, EliA, etc.	Bayer, 1999 Bohuslavizki, 2000 Sapin, 2003 Villalta, 2002 Villalta, 2004 Gonzalez, 2005

Tabella IV. Metodi immunometrici convenzionali di 1^a e 2^a generazione per il dosaggio di autoanticorpi.

<i>Malattia autoimmune</i>	<i>'Vecchio' antigene Metodo di prima generazione</i>	<i>'Nuovo' antigene Metodo di seconda generazione</i>	<i>Autoanticorpi</i>	<i>Principale (primo) riferimento bibliografico</i>
Lupus eritematoso sistemico	Nucleosoma intatto	Nucleosoma privo di istone H1	ANuA	Ghirardello, 2004 Villalta, 2005
Artrite reumatoide	CCP1 (1 peptide)	CCP2 (10 peptidi)	CCP-IgG	Van Gaalen, 2005
Malattia celiaca	tTG guinea pig	tTG umana ricombinante	tTG-IgA tTG-IgG	Collin, 2005
Morbo di Graves	TSHR porcino ricombinante	TSHR umano	TSHR-IgG	Costagiola, 1999 Villalta, 2004

gnosi della malattia celiaca⁵⁴ e del morbo di Graves^{55,56}. E' importante sottolineare che questi risultati sono stati raggiunti senza diminuire la specificità diagnostica di questi test autoanticorpali, con grandi vantaggi nella pratica clinica.

Le tecnologie a determinazione multipla per lo studio dei profili autoanticorpali.

Convenzionalmente lo studio della risposta autoimmune è sempre stato condotto analizzando la presenza o la concentrazione dei singoli autoanticorpi nei liquidi biologici. L'obiettivo è stato di identificare pochi autoanticorpi (spesso uno solo) quali marcatori specifici di ciascuna malattia autoimmune e di attribuire ad essi un ruolo centrale nella fisiopatologia di ciascun quadro clinico.

La possibilità di misurare simultaneamente più analiti tra loro correlati (multiplexing) consente oggi di superare alcune limitazioni dei metodi convenzionali e appare di rilevante interesse per motivi analitici (volumi di campioni, reagenti e costi contenuti), logistico-gestionali (associazione di marker attualmente misurati con metodologie differenti), fisiopatologici (combinazione di marker in profili (profiling) patologia-orientati od organo-orientati) e a scopo di ricerca. L'obietti-

vo, in questo caso, è poter studiare l'intero processo autoimmune, anziché le sue singole componenti.

I limiti della genomica hanno reso necessario lo studio dei prodotti genici, cioè RNA e proteine. In particolare la proteomica, intesa come scienza che studia su larga scala l'espressione, la funzione e l'interazione di proteine, sembra rappresentare la chiave di volta per indagare compiutamente alcune patologie umane acquisite, in campo oncologico, infettivologico, immunologico, etc. Analogamente alla genomica e alla ribonmica, la proteomica consente l'analisi parallela di centinaia di differenti antigeni/anticorpi in quantità minime di fluidi biologici, con l'obiettivo di identificare nuove molecole trascritte dall'RNA, che sono sovra o sotto-regolate in relazione ad una particolare malattia o fenotipo⁵⁷.

Negli ultimi anni, tra i numerosi sistemi ideati⁵⁸, alcuni microarray stanno trovando applicazione per lo studio dei profili autoanticorpali delle malattie autoimmuni; si tratta degli array autoantigenici planari e non-planari (in sospensione).

Tra gli array planari vanno ricordati i sistemi costituiti da microspot su vetrino, su micropiastre di polistirene o membrane di nitrocellulosa e i sistemi di immunoblot lineare su membrane di nitrocellulosa (Tab. V).

Tabella V. Array autoantigenici planari per la rilevazione di autoanticorpi (L, Luminometria; F, Fluorimetria; C, Colorimetria; ND, non dichiarato).

<i>Supporto</i>	<i>Formato</i>	<i>Sistema di rilevazione</i>	<i>Autoanticorpi rilevati (numero e tipo)</i>	<i>Produttività stimata (test/ora)</i>	<i>Prodotto commerciale</i>	<i>Riferimento bibliografico</i>
Vetrini	Microspot	L	18	~8.000	-	Joos, 2000
Vetrini	Microspot	L	115	~10.000	-	Haab, 2001
Vetrini	Microspot	F	196	~10.000	-	Robinson, 2002
Vetrini	Microspot	F	650	~10.000	-	Hueber, 2003
Vetrini	Microspot	F	225	~10.000	-	Hueber, 2005
Micropiastre	Microspot	C	15	ND	-	Feng, 2004
Membrane di nitrocellulosa	Microspot	C	30	ND	-	Hentschel, 2004
Membrane di nitrocellulosa	Blot lineare	C	15 (ENA)	~50	Inno-LIA	Pottel, 2004
Membrane di nitrocellulosa	Blot lineare	C	13 (ENA)	~50	RecomLine	Eissfeller, 2005
Membrane di nitrocellulosa	Blot lineare	C	11 (ENA)	~50	ANA-LIA	Damoiseaux, 2005

I primi si fondano sulla tecnica originariamente proposta da Ekins⁵⁹ e presentano prospettivamente una rilevante importanza per la loro semplicità e flessibilità, una volta che siano risolte alcune problematiche tecniche; per essi non sono ancora disponibili applicazioni commerciali, ma sono note numerose esperienze di validazione della loro affidabilità⁶⁰⁻⁶⁶.

I secondi si basano sulla tecnica di westernblot lineare (line-immunoblot), con migrazione elettroforetica su membrane di nitrocellulosa; il metodo ha trovato numerose applicazioni commerciali e sono ormai disponibili esperienze di validazione clinica dei sistemi condotte su vaste casistiche, anche provenienti da studi multicentrici⁶⁷⁻⁷³. In generale il line-immunoassay presenta accuratezza diagnostica e clinica paragonabile, se non superiore ai metodi immunometrici convenzionali.

Tra gli array nonplanari (Tab. VI), hanno diffusione i sistemi in sospensione che utilizzano microparticelle che vengono riconosciute mediante nefelometria laser⁷⁴ o fluorimetria laser in citometri a flusso⁷⁵; quest'ultima tecnologia presenta numerose applicazioni commerciali, è in rapida espansione ed è stata ampiamente validata da numerosi studi clinici, condotti in tutto il mondo.

I principali sistemi commerciali, che si fondano sulla tecnologia delle microparticelle fluorescenti, sono rappresentati da:

- il sistema FIDIS, BioMedical Diagnostics, Marne la Vallée, Francia;
- il sistema AtheNA Multi-Lite, Zeus Diagnostics, Raritan, NJ, USA;

- il sistema QuantaPlex, Inova Diagnostics, S. Diego, CA, USA;
- il sistema BioPlex 2200, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.

Il sistema FIDIS, attualmente il più diffuso nei laboratori clinici, consente la determinazione di 5 diversi profili autoanticorpali, per le malattie reumatiche, la malattia celiaca, le tireopatie autoimmuni, le vasculiti, l'artrite reumatoide e sono ormai numerosi gli studi clinici di validazione pubblicati⁷⁶⁻⁸¹.

Il sistema AtheNA è di diffusione più recente, consente il profiling autoanticorpale per le malattie reumatiche, le tireopatie autoimmuni e le vasculiti e presenta buona affidabilità analitica⁸²⁻⁸⁴.

Il sistema QuantaPlex è ancora di diffusione limitata, permette la determinazione di diversi profili autoanticorpali per le malattie reumatiche, la malattia celiaca, le vasculiti e le epatopatie autoimmuni e dimostra un'elevata affidabilità analitica^{85,86}.

Il sistema BioPlex 2200 è un sistema di introduzione molto recente, a totale automazione e ad elevata produttività analitica, e consente di eseguire un profilo autoanticorpale per le malattie reumatiche; esperienze di validazione clinica sono disponibili su vaste casistiche^{87,88}.

Del tutto recentemente è stato introdotto in commercio un nuovo sistema a determinazione multipla (UltraPlex, SmartBead Technologies, Cambridge, UK), che utilizza un diverso tipo di microarray nonplanare, le particelle codificate; di esso sono note alcune esperienze preliminari^{89,90}.

Tabella VI. Array autoantigenici non planari (in sospensione) per il dosaggio di autoanticorpi (LN, Nefelometria Laser; LF, Fluorimetria Laser).

<i>Supporto</i>	<i>Formato</i>	<i>Sistema di rilevazione</i>	<i>Autoanticorpi rilevati (numero e tipo)</i>	<i>Produttività stimata (test/ora)</i>	<i>Prodotto commerciale</i>	<i>Riferimento bibliografico</i>
Microbiglie	Pozzetti di polistirene	LN	3 (ENA)	~200	Copalis	Bizzaro, 2001
Microbiglie	Pozzetti di polistirene	LF	9 (ENA)	~1.000	FIDIS	Rouquette, 2003 Buliard, 2005
Microbiglie	Pozzetti di polistirene	LF	3 (AGA/tTG)	~200	FIDIS	Tozzoli, 2004 Yiannaki, 2004
Microbiglie	Pozzetti di polistirene	LF	2 (Tg/TPO)	~200	FIDIS	Tozzoli, 2006 Gonzalez, 2005
Microbiglie	Pozzetti di polistirene	LF	5 (ENA)	~1.000	AtheNA	Gilburd, 2004 Shovman, 2005
Microbiglie	Pozzetti di polistirene	LF	5 (ENA)	~500	QuantaPlex	Ghillani, 2004 Martins, 2004
Particelle codificate	Pozzetti di polistirene	LF	9 (ENA)	~10.000	UltraPlex	Smith, 2005 Pang, 2005
Microbiglie	Automazione completa	LF	15 (ENA)	~2200	BioPlex 2200	Shovman, 2005 Binder, 2005

Il ruolo dei profili anticorpali nella predizione di malattia e nella teranostica.

Sebbene un diretto ruolo patogenetico dei linfociti B autoreattivi sia stato dimostrato solamente per alcune malattie autoimmuni organo-specifiche (morbo di Graves, miastenia grave, etc), gli autoanticorpi compaiono molto precocemente nella storia naturale delle malattie autoimmuni, patologie caratterizzate da un lungo periodo preclinico, durante il quale i sintomi sono pressoché assenti o particolarmente lievi e sfumati⁹¹.

Inoltre gli autoanticorpi accompagnano l'evoluzione clinica delle malattie autoimmuni, spesso per tutta la loro durata: in genere la risposta autoanticorpale inizia contro uno od un ristretto numero di autoantigeni, per poi estendersi a numerosi altri autoantigeni o loro epitopi. Il LES, con la sua molteplicità autoanticorpale, è l'esempio più evidente di questo fenomeno^{92,93}.

Al riscontro di autoanticorpi nel siero viene attribuito un ruolo predittivo nelle malattie autoimmuni, dato che essi riflettono la presenza, la natura e l'intensità della risposta autoimmune. A partire dal primo lavoro pionieristico sul valore predittivo degli anticorpi anti-microsomi tiroidei nella disfunzione tiroidea post-partum⁹⁴, da più di 20 anni specifici autoanticorpi vengono associati strettamente alla fase preclinica delle patologie autoimmuni e numerosi sono ormai i lavori sul

loro ruolo come fattori di rischio, condotti in tutto il mondo su diverse popolazioni di soggetti⁹⁵⁻¹⁰¹.

Il valore predittivo degli autoanticorpi può essere utile sia nella diagnosi precoce di malattia in soggetti clinicamente sani o in gravidanza, sia nella definizione dell'attività o della severità della malattia¹⁰². A questo proposito, i sistemi di determinazione multipla autoanticorpale possono in prospettiva essere utilizzati a scopo preventivo nello screening di popolazioni aperte o di gruppi a rischio, con rilevanti ricadute pratiche (anticipazione di diagnosi e di terapia) in un corretto rapporto costi-benefici.

Lo studio dei profili anticorpali consentirà forse di giungere a nuove correlazioni cliniche, utili per un approccio terapeutico più individualizzato (teranostica); anche in questo campo i sistemi a determinazione multipla potranno giocare un ruolo fondamentale, consentendo di identificare nei singoli pazienti le peculiarità autoanticorpali, in grado di indirizzare la terapia antigeno-specifica delle malattie autoimmuni¹⁰³, con risultati simili a quelli ottenuti in infettivologia¹⁰⁴.

Bibliografia

1. Rose HM, Ragan C, Pearce E, Lipman MO. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. Proc Soc

- Exp Biol Med 1948;68:1-6.
2. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements: the 'tart cell' and the 'LE cell'. Proc Staff Meet Mayo Clinic 1948;23:25-8.
 3. Friou GJ. Clinical application of lupus serum-nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. J Clin Invest 1957;86:890-4.
 4. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. Brit Med J 1957;13:732-4.
 5. Robbins WC, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG. Complement fixation with all nuclei and DNA in lupus erythematosus. Proc Soc Exp Biol Med 1957;96:575-9.
 6. Trotter WR, Belyavin G, Waddams A. Precipitating and complement-fixing antibodies in Hashimoto's disease. Proc Roy Soc Med 1957;50:961-2.
 7. Anderson JD, Goudie RB, Gray K, Timbary GC. Autoantibodies in Addison's disease. Lancet 1957;1:1123-4.
 8. Miescher P, Strassle R. New serological methods for the detection of the L.E. factor. Vox Sang 1957;2:283-7.
 9. Witebsky E, Rose NR, Teplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and immunization. JAMA 1957;164:1439-43.
 10. Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusus. Proc Soc Exp Biol Med 1957;96:572-4.
 11. Seligmann M. Mise en évidence dans le serum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé d'une substance déterminant une réaction de précipitation avec l'acide désoxyribonucléique. C R Hebd Seances 1957;245:243-5.
 12. Doniach D, Roitt IM. Auto-immunity in Hashimoto's disease and its implications. J Clin Endocrinol Metab 1957;17:1293-304.
 13. Tan EM, Kunkel HG. Characteristic of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1966;96:464-70.
 14. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmuno-electrophoresis. Arthritis Rheum 1976;19:574-9.
 15. Walravens MJF, Vanherrewegen H, Lacquet F, Godefridis G, Korevits G, Stevens E, et al. Counter-immunoelectrophoresis with serum prediffusion: an improved method for the detection and identification of autoantibodies against extractable nuclear and cytoplasmic antigens. J Immunol Methods 1996;201:89-98.
 16. Lerner MR, Steitz JA. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:5495-99.
 17. Hagopian WA, Karlsen AE, Gottsater A, Landin-Olsson M, Grubin CE, Sudkvist G, et al. Quantitative assay using recombinant human islet glutamic acid decarboxylase (GAD 65) shows that 64k autoantibody positivity at onset predicts diabetes type 1. J Clin Invest 1993;91:368-74.
 18. Colls J, Betterle C, Volpato M, Prentice L, Smith BR, Furmaniak J. Immunoprecipitation assay for autoantibodies to steroid 21-hydroxylase in autoimmune adrenal disease. Clin Chem 1995;41:375-80.
 19. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4.
 20. Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kd protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 1988;167:1560-71.
 21. Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. J Immunol Methods 1989;119:153-87.
 22. Hermens AA, Bayens AJ, van Gemert AC, van Duijnhoven JL. Simple dot-blot method evaluated for the detection of antibodies against extractable nuclear antigens. Clin Chem 1997;32:2420-2.
 23. Wold RT, Young FE, Tan EM, Farr RS. Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid. Science 1968;161:806-7.
 24. Peake RL, Willis DB, Asimakis GK, Deiss WP. Radioimmunological assay for antithyroglobulin antibodies. J Lab Clin Med 1974;84:907-19.
 25. Rees Smith B, Hall R. Thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' disease. Lancet 1974;2:427-31.
 26. Engvall E. Determination of antibodies to DNA by ELISA. Lancet 1976;2:1410.
 27. Voller A, Bidwell DE, Burek CL. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to thyroglobulin. Proc Soc Exp Biol Med 1980;163:402-5.
 28. Endo Y, Nakano J, Horinouchi K, Ohtani S, Izumi M, Ishikawa E. An enzyme immunoassay for the measurement of anti-thyroglobulin autoantibody in human serum. Clin Chim Acta 1980;103:67-77.
 29. Jones CE, Pike JF, Dickinson RP, Rousseau RJ. Fluorescent enzyme immunoassay for antibody to single- or double-stranded DNA. Am J Clin Pathol 1981;75:509-18.
 30. van der Sluijs Veer G, Moens HJ. A time-resolved immunofluorometric assay of autoantibodies to double-stranded DNA. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:915-20.
 31. Merridew SR, Wilson DV, Williams EJ. Antigliadin antibody measurement by chemiluminescence ELISA in the diagnosis of coeliac disease. J Clin Pathol 1995;48:509-12.
 32. Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Lapadula G, Pansini N. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies measured by an automated enzyme immunoassay: analytical performance and clinical correlations. Clin Chim Acta 2005;335:137-44.
 33. Bayer PM, Bauerfeind S, Bienvenu J, Fabien N, Frei PC, Gilburd B, et al. Multicenter evaluation study on a new HEp-2 ANA screening enzyme immune assay. J Autoimmun 1999;13:89-93.
 34. Bohuslaviski KH, vom Baur E, Weger B, Krebs C, Saller B, Wetlitzky O, et al. Evaluation of chemiluminescence immunoassays for detecting thyroglobulin (Tg) and thyroid peroxidase (TPO) autoantibodies using the Immulite 2000 system. Clin Lab 2000;46:23-31.
 35. Sapin R, d'Herbomez M, Gasser F, Meyer L, Schlienger JL. Increased sensitivity of a new assay for anti-thyroglobulin antibody detection in patients with autoimmune thyroid disease. Clin Biochem 2003;36:611-6.
 36. 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.
 37. Villalta D, Tonutti E, Tampoia M, Bizzaro N, Papisch W, Tozzoli R. Analytical and diagnostic accuracy of the ELiA

- automated enzyme fluoroimmunoassay for antineutrophil cytoplasmic autoantibody detection. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1161-7.
38. Gonzalez C, Garcia-Berrocal B, Perez M, Navajo NA, Herreraez O, Gonzales-Buitrago JM. Laboratory screening of connective tissue diseases by a new automated ENA screening assay (EliA Symphony) in clinically defined patients. *Clin Chim Acta* 2005;359:109-14.
 39. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995;24:323-58.
 40. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Ruffield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
 41. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
 42. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;31:315-24.
 43. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.
 44. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
 45. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the preliminary classification criteria for antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2005; 3:1-12.
 46. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Concado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-38.
 47. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-Rasmussen U, Henry JF, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003;13:3-126.
 48. Russell KA, Fass DN, Specks U. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with the proform of proteinase 3 and disease activity in patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 2001;44:463-8.
 49. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody test in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002;117: 317-24.
 50. Schott M, Morgenthaler NG, Fritzen R, Feldkamp J, Wiltenberg HS, Scherbaum WA, et al. Levels of autoantibodies against human TSH receptor predict relapse of hyperthyroidism in Graves' disease. *Horm Metab Res* 2004; 36: 92-6.
 51. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Tarricone E, Tozzoli R, Villalta D, et al. Antinucleosome antibodies in SLE: a two-year follow-up study of 101 patients. *J Autoimmun* 2004; 22:235-40.
 52. Villalta D, Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Ghirardello A, Doria A. The relevance of autoantigen source and cutoff definition in antichromatin (nucleosome) antibody immunoassays. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050:176-84.
 53. van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TW. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1510-2.
 54. Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, Korponay-Szabo I, Sommer R, Schreier E, et al. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of celiac disease: a biopsy-proven european multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17: 85-91.
 55. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:90-7.
 56. Villalta D, Orunesu E, Tozzoli R, Montagna P, Pesce G, Bizzaro N, et al. Analytical and diagnostic accuracy of "second generation" assays for thyrotropin receptor antibodies with radioactive and chemiluminescent tracers. *J Clin Pathol* 2004;57:378-82.
 57. Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. Proteomics technology for the study of autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2002;46:885-93.
 58. Venkatasubbarao S. Microarrays - status and prospects. *Trends Biotechnol* 2004;22:630-7.
 59. Ekins R, Chu F. Multianalyte microspot immunoassay: the microanalytical compact disk of the future. *Ann Biol Clin (Paris)* 1992;50:337-53.
 60. Joos TO, Schrenk M, Hopfl P, Kroger K, Chowdhury U, Stoll D, et al. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 2000;21:2641-50.
 61. Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2001;2:Research 0004.
 62. Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 2002; 8:295-301.
 63. Hueber W, Utz PJ, Robinson WH. Autoantibodies in early arthritis: advances in diagnosis and prognostication. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21:S59-S64.
 64. Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, Lee BJ, Bruce B, Fries JF, et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2645-55.
 65. Feng Y, Ke X, Ma R, Chen Y, Hu G, Liu F. Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases. *Clin Chem* 2004; 50:416-22.
 66. Hentschel C, Schoessler W, Schulte-Pelkum J, Kreutzberger J, Hiepe F. Development of a sensitive and reliable biochip for detection of autoantibodies in rheumatic diseases. In: Conrad C, Bachmann MP, Chan EKL, Fritzler MJ, Humbel RL, Sack U, Shoenfeld Y, eds. From animal

- models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. Lengerich: Pabst Scientific Publishers. 2004; 484-9.
67. Meheus L, van Venrooij WJ, Wiik A, Charles PJ, Tzioufas AG, Meyer O, et al. Multicenter validation of recombinant, natural and synthetic antigens used in a single multiparameter assay for the detection of specific anti-nuclear autoantibodies in connective tissue disorders. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:205-14.
 68. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1131-6.
 69. Lopez-Longo FJ, Rodriguez-Mahou M, Escalona-Monge M, Gonzales CM, Monteagudo I, Carreno-Perez. Simultaneous identification of various antinuclear antibodies using an automated multiparameter line immunoassay system. *Lupus* 2003;12:623-9.
 70. Pottel H, Wiik A, Loch H, Gordon T, Robert-Thompson P, Abraham D, et al. Clinical optimization and multicenter validation of antigen-specific cut-off values on the INNO-LIA ANA update for the detection of autoantibodies in connective tissue disorders. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:579-88.
 71. Gordon P, Rosenthal E, Simpson JM, Sharland G, Brucato A, Franceschini F, et al. Anti-52 kDa Ro, anti-60 kDa Ro, anti-La antibody profiles in neonatal lupus. *J Rheumatol* 2004;31:2480-7.
 72. Eissfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Luttich T, Motz M, et al. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:327-39.
 73. Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, Austen J, Cohen Ter-vaert JW. Evaluation of a novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:340-7.
 74. 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 Diagn Lab Immunol* 2001;8:922-5.
 75. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR Jr. Advanced multiplexed analysis with the FluoMetrix system. *Clin Chem* 1997;43:1749-56.
 76. Rouquette A-M, Desgruelles C, Laroche P. Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Am J Clin Pathol* 2003;120:676-81.
 77. Buliard A, Fortenfant F, Ghillani-Dalbin P, Musset L, Okzman F. Analysis of nine autoantibodies associated with systemic autoimmune diseases using the Luminex technology. Results of a multicenter study. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005;63:51-8.
 78. Tozzoli R, Kodermaz G, Tonutti E, Bizzaro N, Villalta D. Diagnostic accuracy of the FIDIS multiplex immunoassay system for the detection of gliadin and transglutaminase antibodies in celiac disease. *Autoimmun Rev* 2004;3 (suppl 2):127.
 79. Yiannaki EE, Zintzaras E, Analatos A, Theodoridou C, Dalekos GN, Germeris AE. Evaluation of a microsphere-based flow cytometric assay for diagnosis of celiac disease. *J Immunol Immunochem* 2004;25:345-7.
 80. Autoantibody profiling of AITD patients using a new multiplexed immunoassay method. *Clin Chem Lab Med* 2006 (in press).
 81. Gonzalez C, Garcia-Berrocal B, Talavan T, Casas ML, Navajo JA, Gonzales-Buitrago JM. Clinical evaluation of a microsphere bead-based flow cytometry assay for the simultaneous determination of anti-thyroid peroxidase and anti-thyroglobulin antibodies. *Clin Biochem* 2005;38: 966-72.
 82. Podlasek SJ, Rankin ET. Clinical evaluation of the AtheNA system for autoimmune multi-analyte profiling. *Arch Pathol Lab Med* 2003;123:139-40.
 83. Gilburd B, Abu-Shakra M, Shoenfeld Y, Giordano A, Bartolini Bocci E, Delle Monache F, et al. Autoantibodies profile in the sera of patients with Sjögren's syndrome: the ANA evaluation – a omogeneous, multiplexed system. *Clin Dev Immunol* 2004;11:53-6.
 84. Shovman O, Gilburd B, Zandman-Goddard G, Yehiely A, Langevitz P, Shoenfeld Y. Multiplexed AtheNA multi-lyte immunoassay for ANA screening in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2005;38:105-9.
 85. Ghillani P, Charuel JL, Diemert MC, Cacoub P, Amoura Z, Piette JC, et al. Use of multiplex technology to routinely detect anti-ENA antibodies in connective tissue diseases. *Autoimmun Rev* 2004;3(suppl 2):132.
 86. Martins TB, Burlingame R, von Muhlen CA, Jaskovski TD, Litwin CM, Hill HR. Evaluation of multiplexed microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11: 1054-9.
 87. Shovman O, Gilburd B, Barzilai O, Shinar E, Larida B, Zandman-Goddard G, et al. Evaluation of BioPlex ANA screen: analysis of 510 healthy subjects: incidence of natural/predictive autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050: 380-8.
 88. Binder SR, Genovese MC, Merrill JT, Morris RI, Metzger AL. Computer-assisted pattern recognition of autoantibody results. *Clin Lab Diagn Immunol* 2005;12:1353-7.
 89. Smith J, Onley D, Garey C, Crowther S, Cahir N, Johanson, et al. Determination of ANA specificity using the UltraPlex platform. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:286-94.
 90. Pang S, Smith J, Onley D, Reeve J, Walker M, Foy C. A comparability study of emerging protein array platforms with established ELISA procedures. *J Immunol Methods* 2005;302:1-12.
 91. Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, Zanchetta R. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocrine Rev* 2002;23:327-64.
 92. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:501-37.
 93. Deshmukh US, Bagavant H, Lewis J, Gaskin F, Fu SM. Epitope spreading within lupus-associated ribonucleoprotein antigens. *Clin Immunol* 2005;117:112-20.
 94. Amino N, Mori H, Iwatani Y, Tanizawa O, Kawashima M, Tsuge I, et al. High prevalence of transient postpartum thyrotoxicosis and hypothyroidism. *N Engl J Med* 1982;306:849-52.
 95. Betterle C, Zanette F, Zanchetta R, Pedini B, Trevisan A,

- Mantero F, et al. Complement-fixing adrenal autoantibodies as a marker for predicting onset of idiopathic Addison's disease. *Lancet* 1983;1:1238-41.
96. Vanderpump MPJ, Turnbridge MG, French JM, Appleton D, Bates D, Clarck F, et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham survey. *Clin Endocrinol* 1995;43:55-68.
97. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996;45:926-33.
98. Kisand KE, Metskula K, Kisand KV, Kivik T, Gershwin ME, Uibo R. The follow-up of asymptomatic persons with antibodies to pyruvate dehydrogenase in adult population samples. *J Gastroenterol* 2001;36:248-54.
99. Arbuckle MR, James JA, Kohlhase KF, Rubertone MV, Dennis GJ, Harley. Development of anti-dsDNA autoantibodies prior the clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2001;54:211-9.
100. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2741-9.
101. McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, Robeck J, Rubertone MV, et al. The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:1226-32.
102. Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* 2004;383:1544-6.
103. Graham KL, Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. High-throughput methods for measuring autoantibodies in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2004;37:269-72.
104. Picard FJ, Bergeron MG. Rapid molecular theranostics in infectious diseases. *Drug Discov Today* 2002;7:1092-101.