

## Nelle tireopatie autoimmuni il dosaggio degli autoanticorpi anti-tiroide con metodi immunometrici è ancora affetto da una spiccata variabilità analitica

**R. Tozzoli<sup>a</sup>, N. Bizzaro<sup>b</sup>, E. Tonutti<sup>c</sup>, M. Pradella<sup>d</sup>, F. Manoni<sup>e</sup>,  
D. Villalta<sup>f</sup>, D. Bassetti<sup>g</sup>, A. Piazza<sup>h</sup>, P. Rizzotti<sup>h</sup>**

<sup>a</sup>Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale di Latisana (Ud)

<sup>b</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di S. Donà di Piave (Ve)

<sup>c</sup>Istituto di Chimica Clinica, Azienda ospedaliera di Udine

<sup>d</sup>Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale di Castelfranco Veneto (Tv)

<sup>e</sup>Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale di Chioggia (Ve)

<sup>f</sup>Servizio di Microbiologia-Immunologia, Azienda ospedaliera di Pordenone

<sup>g</sup>Patologia Clinica II, Ospedale S. Chiara, Trento

<sup>h</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale Geriatrico, Padova

**Riassunto.** Premessa. Negli ultimi anni nei laboratori clinici si è verificata una progressiva estensione dell'impiego di metodi immunometrici ad alta sensibilità per il dosaggio degli autoanticorpi anti-tiroide, ma non è noto se le nuove tecnologie abbiano migliorato la variabilità analitica connessa con l'impiego delle tecnologie precedenti. Il Gruppo di Studio in Autoimmunologia della SIMeL ha condotto uno studio collaborativo con l'industria biomedica, per valutare il grado di standardizzazione delle nuove procedure analitiche e porre le basi per un programma di verifica esterna di qualità.

Metodi. 12 aziende di diagnostici operanti in Italia hanno accettato di partecipare allo studio che consisteva nel ricercare gli anticorpi anti-tireoglobulina (anti-Tg) e anti-tireoperossidasi (anti-TPO) in 9 sieri di pazienti affetti da tiroidite autoimmune e in 6 sieri di pazienti affetti da tireopatia non autoimmune. Sono stati complessivamente utilizzati 10 metodi immunometrici (di 2<sup>a</sup> generazione) e 3 metodi di immunofluorescenza (di 1<sup>a</sup> generazione).

Risultati. La concordanza dei risultati qualitativi è stata prossima al 90% per anti-Tg e al 97% per anti-TPO, senza rilevanti differenze tra i metodi, mentre la variabilità dei risultati quantitativi, espressa come CV% dei valori assoluti (in UI/mL) e relativi (in multipli del valore soglia), è risultata rispettivamente del 93.9% e del 102.3% per anti-Tg e del 75.5% e 62.9% per anti-TPO.

Conclusioni. La variabilità tra metodi per il dosaggio di anti-Tg e anti-TPO permane inaspettatamente elevata, nonostante il progressivo miglioramento delle tecnologie analitiche. Sono probabilmente responsabili del fenomeno vari fattori quali l'incertezza nella definizione del valore soglia di positività, l'assenza di adeguate preparazioni di riferimento internazionali, le modalità di purificazione degli autoantigeni e le variabili analitiche dello schema di saggio.

### Introduzione

Le tireopatie autoimmuni (AITD) rappresentano il modello classico di malattia autoimmune organo-specifica, in quanto le loro caratteristiche rispettano con aderenza quasi assoluta i criteri patogenetici di Milgrom e Witebski, recentemente rivisti<sup>1</sup>.

I principali quadri clinici di AITD sono costituiti dalle tiroiditi linfocitarie diffuse (tiroidite di Hashimoto classica e varianti, mixedema idiopatico dell'adulto, tiroidite atrofica asintomatica) e dall'ipertiroidismo primario<sup>2</sup>: in queste malattie è rappresentato l'intero spettro dei disordini della funzione tiroidea (ipotiroidismo nel mixedema idiopatico, eutiroidismo in molti casi di tiroidite di Hashimoto, ipertiroidismo nel morbo di Basedow). Il fondamento della diagnosi di laboratorio delle AITD, analogamente a quanto avviene per le altre malattie autoimmuni, è la dimostrazione della presenza in circolo di autoanticorpi specifici che, pur rappresentando

quasi certamente un epifenomeno del danno cellulare o tessutale, sono strettamente correlati con i fenomeni apoptotici e immunitari cellulo-mediati (contraddistinti sul piano istopatologico dall'infiltrazione linfocitaria dei follicoli tiroidei), che sono in gioco nella patogenesi della malattia<sup>3</sup>.

Nella pratica clinica comune i test più utilizzati per la diagnosi sono il dosaggio nel siero degli anticorpi anti-tireoglobulina (anti-Tg) e anti-tireoperossidasi (anti-TPO), essendo il dosaggio degli autoanticorpi anti-recettore del TSH riservato a situazioni cliniche particolari<sup>4</sup>. Da più di 40 anni sono disponibili metodi immunologici per il dosaggio degli autoanticorpi anti-tiroide (immunodiffusione (ID), fissazione del complemento (FC), emoagglutinazione passiva (EAP), agglutinazione di particelle (LA), immunofluorescenza indiretta (IFI), dosaggio radioimmunologico (RIA), dosaggio immunoenzimatico (EIA), etc)<sup>5-13</sup>; a seguito dell'individuazione della perossidasi tiroidea, come il principale, se

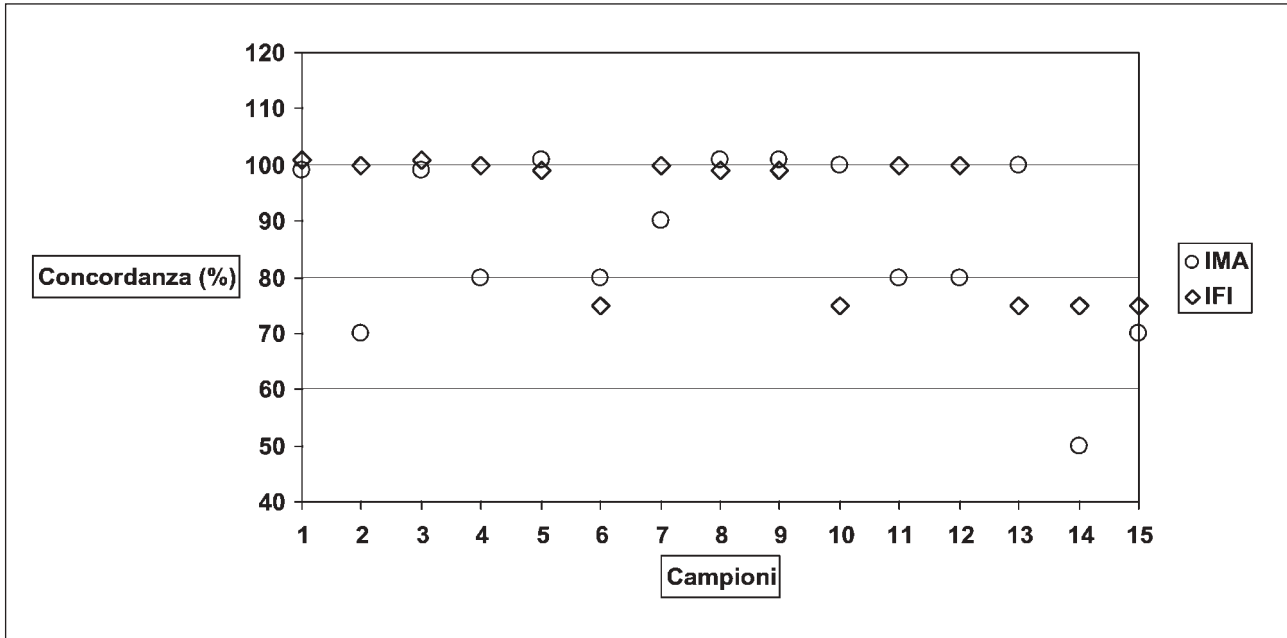
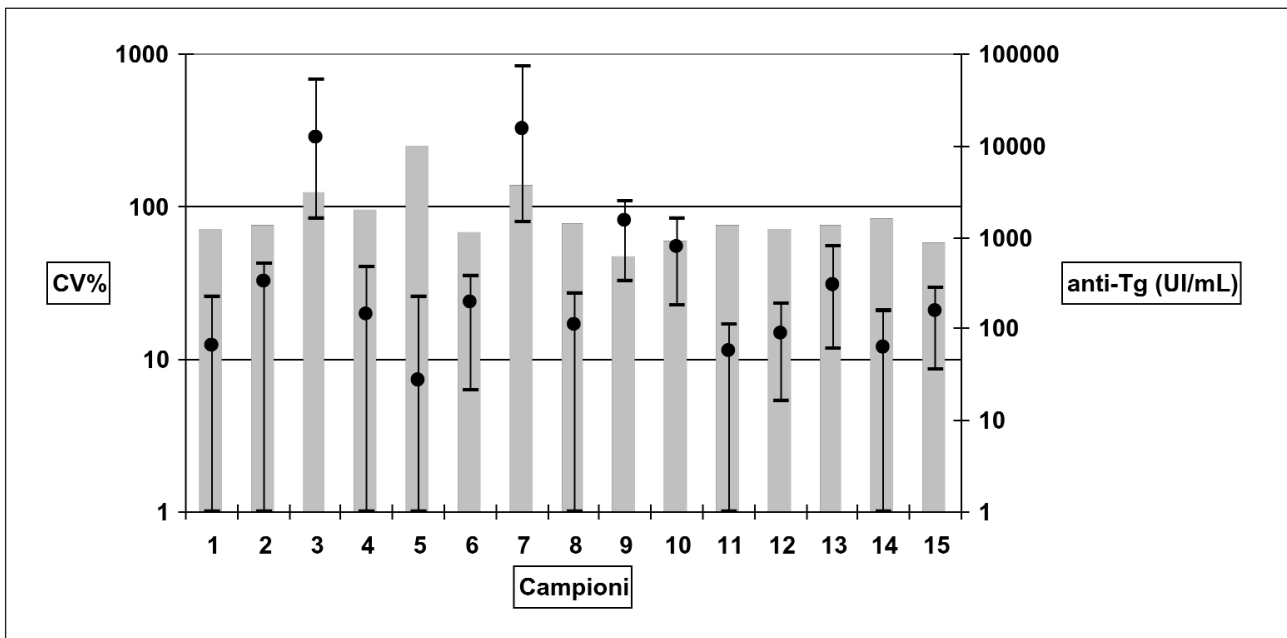
Figura 1. Concordezza dei risultati qualitativi di anti-Tg sui 15 sieri campione con metodi di 1<sup>a</sup> (IFI) e di 2<sup>a</sup> (IMA) generazione.

Figura 2. Risultati del dosaggio di anti-Tg (UI/mL) sui 15 sieri campione: in colonna sono rappresentati i coefficienti di variazione; in cerchio nero la media con l'intervallo dei valori.



non unico, autoantigene microsomiale tiroideo<sup>14</sup>, questi metodi, genericamente definibili di prima generazione, sono stati progressivamente sostituiti da metodi di seconda generazione, rappresentati dai metodi immunometrici a tracciante radioisotopico (IRMA), enzimatico (IEMA), luminescente (ILMA)<sup>15-17</sup>.

L'impiego dei nuovi schemi di dosaggio, basati sull'uso di anticorpi monoclonali anti-TPO e anti-Tg e di antigeni purificati o ottenuti con tecniche ricombinanti, ha sicuramente migliorato la sensibilità analitica dei test per gli autoanticorpi tiroidei. Tuttavia, non è noto se l'estensivo impiego di queste nuove tecnologie, associate alla disponibilità di preparazioni internazionali di riferimento

utilizzate da tutti i nuovi metodi, abbia di fatto anche ridotto la consistente variabilità analitica metodo-dipendente, presente nei metodi di 1<sup>a</sup> generazione utilizzati in passato<sup>18-20</sup>; in particolare non esistono nella letteratura scientifica che rari studi condotti sulla variabilità analitica dei metodi commerciali di 2<sup>a</sup> generazione<sup>21</sup> e sull'impatto che tale variabilità presenta nella diagnosi clinica.

In seguito alla recente introduzione di raccomandazioni relative agli obiettivi analitici per il dosaggio di anti-Tg e anti-TPO<sup>22</sup>, il Gruppo di Studio in Autoimmunologia della Società Italiana di Medicina di Laboratorio (GdS-AI) ha progettato e realizzato uno studio collaborativo con numerose aziende dell'indu-

Figura 3. Risultati del dosaggio di anti-Tg (MVS) sui 15 sieri campione: in colonna sono rappresentati i coefficienti di variazione; con cerchio nero la media con l'intervallo dei valori.

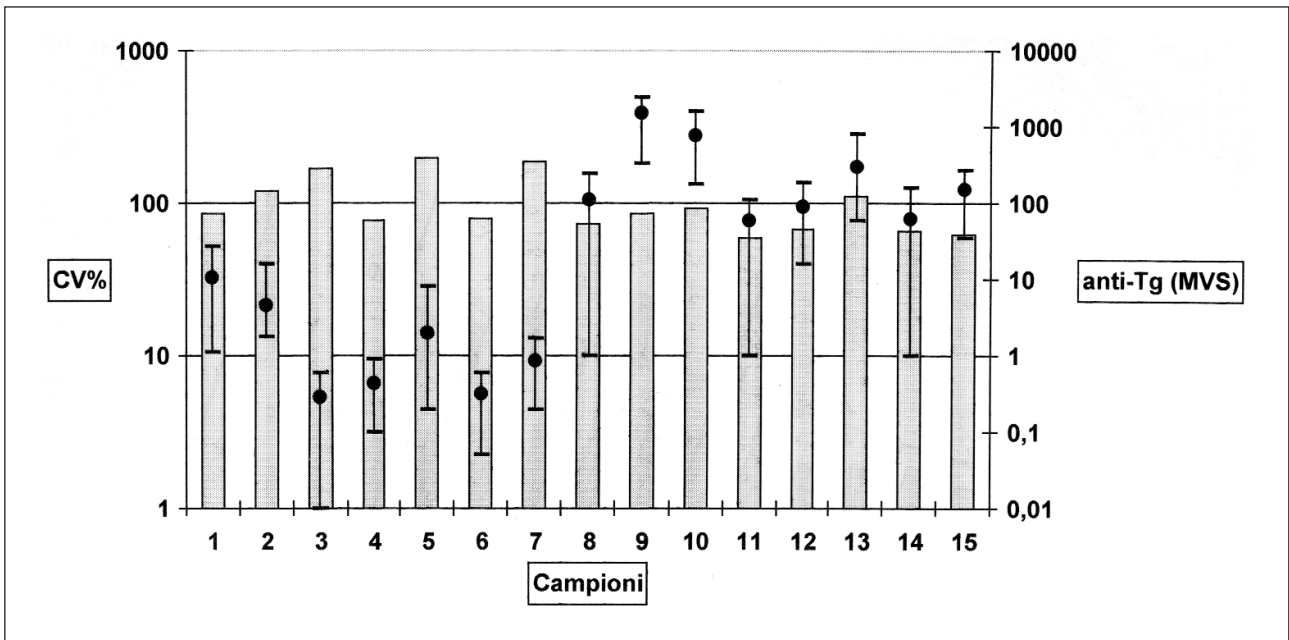
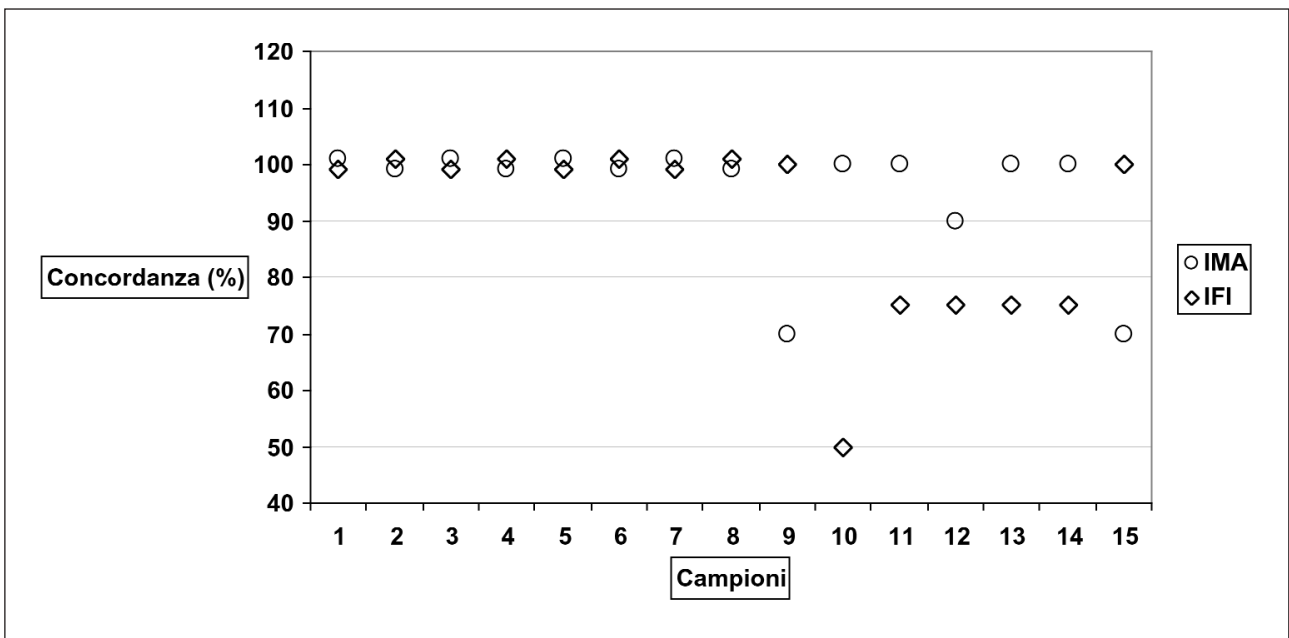


Figura 4. Concordanza dei risultati qualitativi di anti-TPO sui 15 sieri campione con metodi di 1ª (IFI) e di 2ª (IMA) generazione.



stria biomedica, con struttura e caratteristiche descritte in precedenza<sup>23,24</sup>, per contribuire alla standardizzazione dei metodi per il dosaggio degli anticorpi anti-tiroide e porre le basi per un programma di verifica esterna di qualità (VEQ).

**Materiali e metodi**

9 sieri di pazienti affetti da tiroidite linfocitaria diffusa (5 tiroiditi di Hashimoto, 3 mixedema idiopatico, 1 tiroidite atrofica asintomatica) e 6 sieri di pazienti affetti da tireopatie autoimmuni (4 gozzi nodulari sem-

plici, 1 tiroidite acuta di De Quervain, 1 adenoma tiroideo), sono stati distribuiti a 12 aziende di diagnostici operanti in Italia, produttrici di sistemi analitici e di reagenti per il dosaggio di autoanticorpi anti-tiroide. I campioni di siero, raccolti nei 4 mesi precedenti lo studio, sono stati suddivisi in aliquote di 0.5 mL senza sodio-azide e conservati a -85 °C.

Le aziende coinvolte sono state invitate ad effettuare la determinazione degli analiti indicati, in toto o in parte, anche con più metodi, presso i loro laboratori. L'elenco completo delle aziende partecipanti, con i diversi reagenti e i metodi impiegati, è presentato in tabella I. Sono stati complessivamente utilizzati 9

**Tabella I. Elenco delle aziende produttrici di reagenti per la ricerca degli anticorpi anti-tiroide, partecipanti allo studio (IEMA: metodo immunoenzimometrico; IFMA: metodo immunofluorimetrico; IFI: immunofluorescenza indiretta).**

PRODUTTORE	METODO
BIOCHEM IMMUNOSYSTEMS, MILANO	IEMA
BIORAD LABORATORIES, HERCULES, USA	IEMA
CLS, ELI-CAMBRIDGESHIRE, UK	IEMA
DIAMEDIX, MIAMI, USA	IEMA
ELIAS, FRIBURGO, GERMANIA	IEMA
EUROIMMUN, LUBECCA, GERMANIA	IEMA, IFI
EUROSPITAL, TRIESTE	IFMA
IMMCO DIAGNOSTICS, BUFFALO, USA	IEMA
IMMUNOCONCEPTS, SACRAMENTO, USA	IFI
SCIMDEX, DENVILLE, USA	IEMA
SHIELD DIAGNOSTIC, DUNDEE, UK	IEMA
ZEUS, RARITAN, USA	IFI

metodi/kit IEMA, 1 metodo/kit IFMA, 3 metodi/kit IFI; tutti i metodi immunometrici impiegavano antigeni naturali purificati per la ricerca di anti-Tg, antigeni naturali (10/11) e ricombinanti (1/11) per la ricerca di anti-TPO, mentre per i metodi IFI il substrato era rappresentato da tiroide di scimmia.

La concordanza dei risultati ottenuti è stata calcolata sui dati qualitativi (positivo/negativo).

Sono considerati positivi i risultati superiori alla soglia discriminante proposta da ciascun produttore e bassi positivi i risultati compresi nella zona grigia.

Sui risultati quantitativi, espressi in unità internazionali (UI)/mL e in multipli del valore soglia (MVS), ottenuti dividendo ciascun dato quantitativo per il valore soglia proposto dal produttore, è stata condotta l'analisi statistica delle differenze con il test t di Student per dati appaiati.

## Risultati

### Anticorpi anti-tireoglobulina

I risultati qualitativi, forniti dai laboratori aziendali, sono rappresentati in tabella II e figura 1. In base a questa classificazione la ricerca degli anti-Tg ha fornito una concordanza di risultati del 88.6% (88.6% IEMA-IFMA, 88.6% IFI).

I risultati quantitativi, ottenuti con i metodi immunometrici ed espressi in IU/mL in rapporto alla preparazione di riferimento (MRC 65/93) sono indicati nella figura 2. Sono rappresentati per ciascun siero la media e l'intervallo (minimo-massimo) dei risultati e il corrispondente coefficiente di variazione; il CV medio complessivo sui 15 sieri è di 93.9%, con un intervallo compreso tra 46.5% e 247.2%.

In figura 3 gli stessi risultati sono espressi come multipli del valore soglia (MVS), ottenuti dividendo ciascun risultato analitico per il valore soglia proposto (ambidue espressi in IU/mL); per ciascun siero sono indicati la media e l'intervallo (minimo-massimo) dei risultati e il corrispondente coefficiente di variazione. Il CV medio complessivo è risultato 102.3%, con un intervallo compreso tra 59.4 e 196.3%.

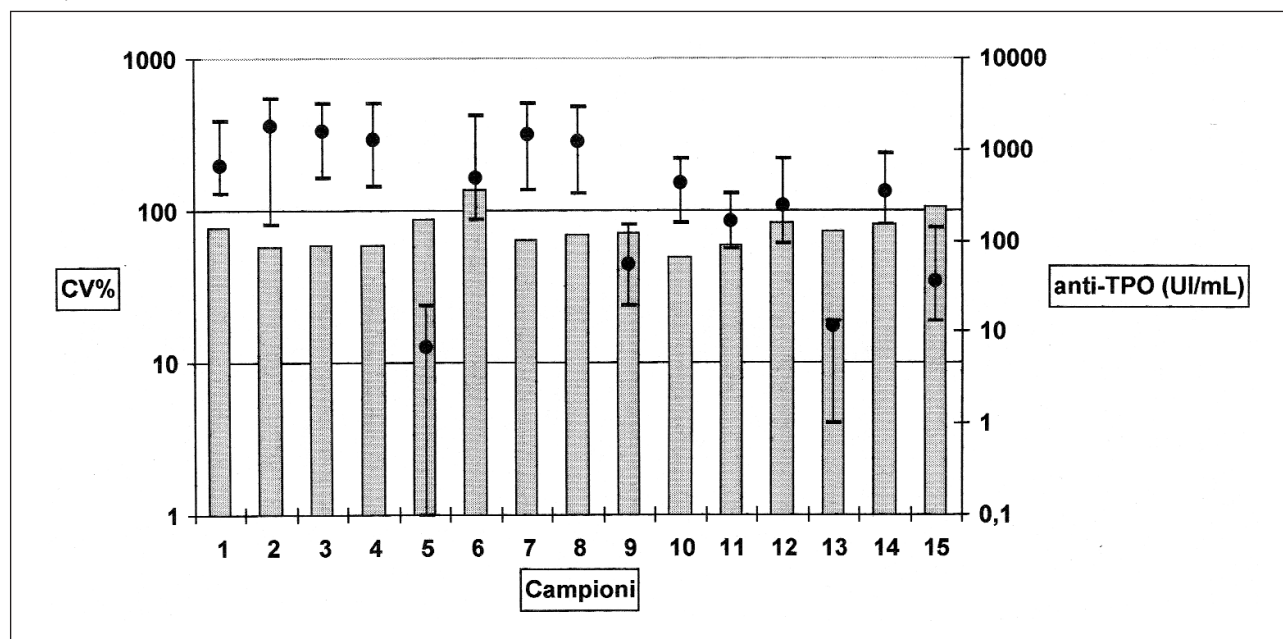
### Anticorpi anti-tireoperossidasi

In maniera simile ai precedenti, i risultati qualitativi sono indicati nella tabella III e figura 4: la concordanza dei risultati è stata del 96.4% (96.0% EIA, 96.7% IFI).

I risultati quantitativi, ottenuti con i metodi immunometrici ed espressi in IU/mL della preparazione di riferimento (MRC 66/387) sono indicati nella figura 5; il CV medio complessivo è di 75.5%, con un intervallo compreso tra 49.0% e 135.7%.

In figura 6 gli stessi risultati sono espressi come multipli del valore soglia (MVS); il CV medio complessivo è risul-

**Figura 5. Risultati del dosaggio di anti-TPO (UI/mL) sui 15 sieri campione: in colonna sono rappresentati i coefficienti di variazione; con cerchio nero la media con l'intervallo dei valori.**



tato 62.9%, con un intervallo compreso tra 47.5 e 86.5%.

Nella tabella IV sono riportati i coefficienti di variazione medi ottenuti con le due modalità di rappresentazione e la significatività statistica delle differenze.

## Discussione

La concordanza tra metodi per il dosaggio degli autoanticorpi anti-tiroide è relativamente soddisfacente quando i risultati sono espressi in termini qualitativi, confermando recenti dati ottenuti da altri ricercatori <sup>21</sup>: in particolare non sembrano esservi differenze in questo caso tra l'impiego di metodi di 1<sup>a</sup> (IFI) o di 2<sup>a</sup> generazione (IEMA, IFMA).

Tuttavia l'espressione dei risultati in termini binari (positività-negatività), oltre a lasciare irrisolto il problema dei risultati *borderline* o bassi positivi, non sembra più adeguata all'attuale stato dell'arte della diagnostica delle tireopatie autoimmuni, che richiede una precisa e accurata determinazione quantitativa delle concentrazioni sieriche anticorpali.

Nonostante l'evoluzione tecnologica dei metodi commerciali abbia migliorato la standardizzazione delle procedure analitiche, il presente studio evidenzia un'inaspettata spiccata variabilità analitica nell'espressione quantitativa dei risultati tra i diversi metodi. Data l'importanza che tale variabilità può avere sulla sensibilità e specificità diagnostica soprattutto per concentrazioni autoanticorpali prossime al valore soglia, è evidente che le cause di questo fenomeno devono essere indagate e approfondite.

In questo senso, giocano probabilmente un ruolo importante la definizione del valore soglia di positi-

vità, le preparazioni di riferimento internazionali, le modalità di purificazione dell'autoantigene sulle fasi solide dei metodi immunometrici e, infine, le variabili analitiche dello schema di saggio, il cui ruolo è opportuno considerare separatamente.

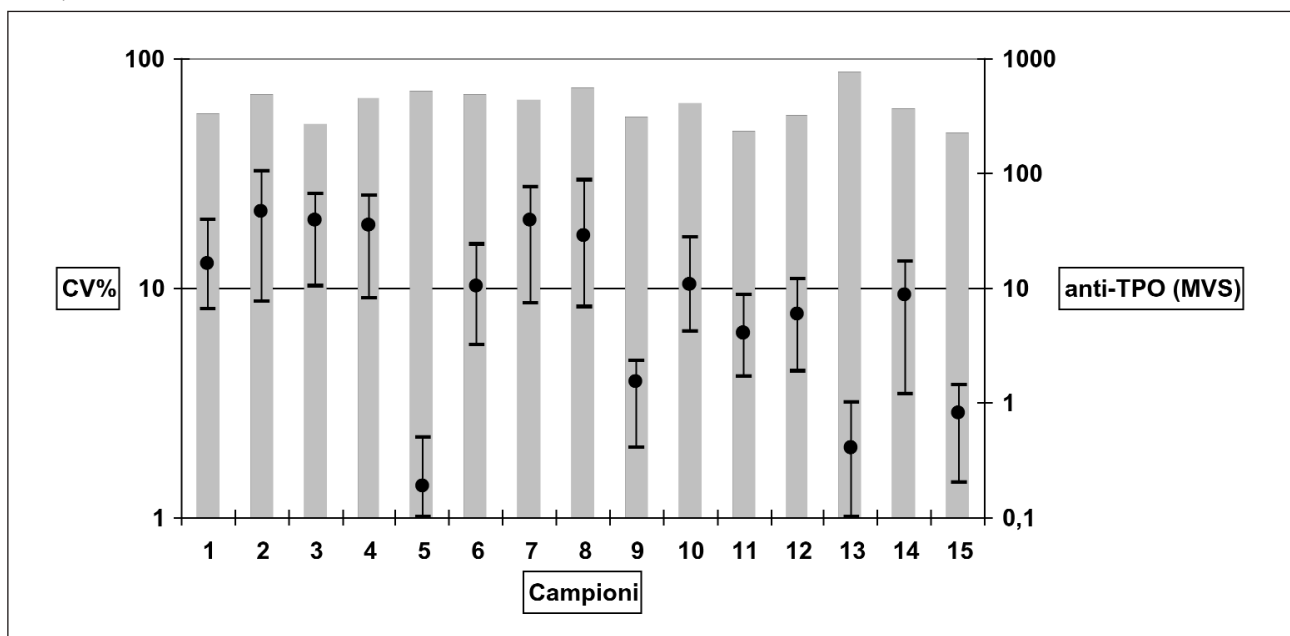
### a) La definizione del valore soglia

L'inaccuratezza nella definizione del valore soglia di positività può presentare un'importanza fondamentale, soprattutto per la deprecabile abitudine all'impiego di valori di cut-off predeterminati, in genere suggeriti dai produttori dei metodi/kit commerciali, sulla scorta di prove preliminari.

Valori soglia non corretti possono ridurre l'affidabilità diagnostica dei test autoanticorpali nelle AITD, dato che l'elevata sensibilità analitica dei metodi di 2<sup>a</sup> generazione ha individuato la presenza di autoanticorpi anti-tiroide in una elevata percentuale di soggetti eutiroidei <sup>17</sup> e che altre tireopatie non autoimmuni (gozzo semplice, adenoma di Plummer, carcinoma tiroideo, tiroidite di De Quervain, etc.) possono presentare quadri di infiltrazione linfocitaria focale con presenza di autoanticorpi circolanti<sup>2</sup>.

Nel nostro studio, per gli anticorpi anti-Tg sono state rilevate profonde differenze quantitative nei valori soglia di positività indicati dai produttori, con un'ampiezza di variazione anche di 4 volte tra minimo e massimo (80 e 325 kUI/L) tra i diversi sistemi diagnostici esaminati; tale dato tuttavia non è nuovo e conferma precedenti osservazioni <sup>22</sup>. Va inoltre osservato che la normalizzazione dei risultati (da valori assoluti a multipli del valore soglia), non produce miglioramenti in termini di variabilità analitica tra metodi,

Figura 6. Risultati del dosaggio di anti-TPO (MVS) sui 15 sieri campione: in colonna sono rappresentati i coefficienti di variazione; con cerchio nero la media con l'intervallo dei valori.



**Tabella II. Risultati della ricerca degli anticorpi anti-Tg nei 15 sieri campione, espressi in termini qualitativi (+ positivo; (+) basso positivo; - negativo).**

SIERO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>PRODUTTORE E METODO</b>															
BIOCHEM (IEMA)	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
BIORAD (IEMA)	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	(+)
CLS (IEMA)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
DIAMEDIX (IEMA)	-	(+)	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	(+)	-	-
ELIAS (IEMA)	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
EUROIMMUN (IEMA)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	(+)
EUROIMMUN (IFI)	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
EUROSPITAL (IFMA)	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
IMMCO (IEMA)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
IMMUNOCONCEPTS (IFI)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
SCIMDEX (IEMA)	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	(+)
SHIELD (IEMA)	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
ZEUS (IFI)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

**Tabella III. Risultati della ricerca degli anticorpi anti-TPO nei 15 sieri campione, espressi in termini qualitativi (+ positivo; (+) basso positivo; - negativo).**

SIERO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>PRODUTTORE E METODO</b>															
BIOCHEM (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
BIORAD (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(+)
CLS (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
DIAMEDIX (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
ELIAS (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
EUROIMMUN (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
EUROIMMUN (IFI)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
EUROSPITAL (IFMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
IMMCO (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
IMMUNOCONCEPTS (IFI)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SCIMDEX (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
SHIELD (IEMA)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ZEUS (IFI)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

**Tabella IV. Variabilità analitica tra metodi nel dosaggio di anti-Tg e anti-TPO, con due diverse modalità di espressione quantitativa (UI/mL = concentrazione; MVS = multipli del valore soglia)**

ANTICORPO	CV MEDIO (%)	INTERVALLO (%)	p
Anti-Tg (UI/mL)	93.9	46.5-247.2	ns
Anti-Tg (MVS)	102.3	59.4-196.3	
Anti-TPO (UI/mL)	75.5	49.0-135.7	0.03
Anti-TPO (MVS)	62.9	47.5-86.5	

in quanto il CV% dei dati non differisce significativamente tra le due modalità di espressione quantitativa (93.9% vs 102.3%,  $p = ns$ ).

Per gli anticorpi anti-TPO, le differenze tra metodi sono analoghe, anche se apparentemente di ampiezza minore, data la presenza di un CV% medio inferiore (75.5%) rispetto agli anti-Tg.

La dispersione dei valori soglia di positività è invece superiore rispetto agli anti-Tg, con una variazione di 5 volte (da 20 a 100 KU/L); in questo caso la normalizzazione dei risultati in termini di multipli del valore soglia, produce un miglioramento contenuto, seppur significativo, del CV medio (da 75.5% a 62.9%,  $p < 0.03$ ). E' possibile ipotizzare una riduzione della variabilità ricorrendo all'individuazione di regole precise per la definizione del valore soglia di positività che i produttori e i laboratori clinici dovrebbero seguire. Tali regole sono opportune, dato che, per l'elevata incidenza di AITD nella popolazione femminile (fino al 15%), soggetti apparentemente sani selezionati nella popolazione di controllo, possono presentare una tiroidite linfocitaria diffusa asintomatica o una tiroidite focale, e che le concentrazioni di autoanticorpi anti-tiroide crescono progressivamente nella popolazione con il crescere dell'età<sup>25</sup>. Si suggeriscono i seguenti criteri per la definizione del cut-off:

1. La numerosità del campione di controllo dovrebbe essere di almeno 100-120 soggetti;
2. Il rapporto tra maschi e femmine dovrebbe essere di 8-9 a 1;
3. L'età dei soggetti indagati dovrebbe essere compresa tra 20-80 anni, con prevalente presenza delle decadi intermedie (3<sup>a</sup>-5<sup>a</sup>);
4. I soggetti che presentano elevati livelli di anti-Tg e/o anti-TPO dovrebbero essere indagati mediante la determinazione del TSH ed ecografia tiroidea ed esclusi qualora presentino risultati alterati, espressivi di una patologia tiroidea asintomatica o sub-clinica.
5. Il valore soglia va identificato nel 97.5 percentile, dato che la distribuzione dei valori degli anticorpi anti-tiroide non è parametrica.
6. Vanno impiegati valori soglia età-dipendenti, rispettivamente superiori ed inferiori a 50 anni.

#### b) Le preparazioni di riferimento

Le preparazioni di riferimento, IRP 65/93 (WHO, EBCS) per anti-Tg e MRC 66/387 per anti-TPO (anti-microsomi, NIBSC) devono essere ormai considerate obsolete: sono state infatti introdotte alla fine degli anni 60, in un periodo in cui erano disponibili metodi immunologici di prima generazione (ID, EAP, LA, IFI), che presentavano affidabilità analitica assolutamente non paragonabile a quelle dei metodi attuali. Inoltre, dato che il materiale di riferimento MRC 66/387 è riferito ad una preparazione di anticorpi anti-frazione microsomiale tiroidea (anti-M) e non agli anticorpi anti-TPO, è possibile che tale siero presenti diversa immunoreattività tra metodo e metodo, a seconda delle caratteristiche della sorgente antigenica impiegata e dell'eventuale presenza di altri anticorpi (anti-Tg, etc), dato che è da tempo noto che Tg ed altri antigeni contaminavano le preparazioni di microsomi tiroidei utilizzate negli anni 60-80<sup>18,26</sup>.

#### c) La purificazione dell'autoantigene

Attualmente la purificazione dell'antigene nella preparazione del saggio immunometrico quantitativo per il dosaggio degli anticorpi anti-tiroide avviene con diverse modalità, in particolare per anti-TPO<sup>27</sup>. Le varie procedure utilizzate (purificazione per cromatografia di affinità di antigeni provenienti da tiroidi umane o porcine, preparazione degli antigeni completi o parzialmente troncati con tecniche del DNA ricombinante, etc) determinano una diversa rappresentazione degli epitopi immunodominanti<sup>28</sup>; ne consegue una diversa sensibilità nell'evidenziazione delle singole specificità anticorpali rivolte verso i vari epitopi, che sono diversamente presenti (epitopic 'fingerprint') nel siero dei soggetti sani e affetti da tireopatie autoimmuni<sup>29-31</sup>.

#### d) Le variabili analitiche del dosaggio

Le principali variabili dello schema di saggio immunometrico sono rappresentate dalla temperatura di incubazione (che può variare da 20 °C a 37 °C), dai differenti media per la diluizione del campione e dal diverso grado di automazione della procedura analitica (da manuale a completamente automatizzata); tali variabili non sono sufficientemente indagate, ma il loro contributo in termini di imprecisione e inaccuratezza è presumibilmente importante.

In conclusione, questo studio evidenzia una variabilità analitica dei metodi commerciali per il dosaggio degli anticorpi anti-tiroide ancora molto rilevante, e sicuramente in grado di condizionare l'affidabilità diagnostica dei test autoanticorpali nella diagnosi delle AITD. Sforzi rilevanti devono essere condotti dalla comunità scientifica e dall'industria biomedica per migliorare la standardizzazione dei metodi e la qualità dei risultati e consentire un miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica; in questo processo l'applicazione di linee guida di comportamento diagnostico e l'estensione di programmi di controllo e di verifica esterna di qualità possono fornire un utile contributo alla risoluzione del problema.

#### Bibliografia

1. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases. (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today* 1994; 15:19-26.
2. Betterle C, Presotto F, Pedini B, Spadaccino AC, Zanchetta R. Autoanticorpi nelle malattie autoimmuni della tiroide. In: Betterle C, ed. *Gli autoanticorpi*. Padova: Piccin Nuova Libreria 1997; p. 61-99.
3. Paolieri F, Salmaso C, Battifora M, Montagna P, Pesce G, Bagnasco M, et al. Possible pathogenetic relevance of interleukin-1 beta in 'destructive' organ specific autoimmune disease (Hashimoto's thyroiditis). *Ann N Y Acad Sci* 1999; 876:221-8.
4. Larsen PR, Davies TF, Hay ID. The thyroid gland. Test for thyroid autoantibodies. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *William's Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders 1998; p 419-22.
5. Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, Vaughan Hudson R. Autoantibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet* 1956; 2:820-1.
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. White RG. An immunological investigation of Hashimoto's disease. *Proc Roy Soc Med* 1957; 50:953-6.
8. Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *JAMA* 1957; 164:1439-40.
9. Fujita K, Yanada N, Saube T. Haemagglutination test utilizing the microsomal antigen from thyroid epithelial cells. *Clin Pathol (Japan)* 1970; 50:961-2.
10. Mori T, Fisher JP. Measurement by competitive binding radioassay of serum anti-microsomal and anti-thyroglobulin antibodies in Graves' disease and other thyroid

- disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33:688-98.
11. Peake RL, Willis DB, Asimakis GK, Deiss WP. Radioimmunological assay for antithyroglobulin antibodies. *J Lab Clin Med* 1974; 84:907-19.
  12. Goodburn R, Williams DL, Marks U. A simple micro ELISA for the assay of antithyroglobulin antibodies in human serum. *J Clin Pathol* 1981; 34:1026-30.
  13. Schardt CW, McLachlan SM, Matheson J, Smith BR. An enzyme-linked immunoassay for thyroid microsomal antibodies. *J Immunol Methods* 1982; 55:155-68.
  14. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitski S. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Letter* 1985; 190:147-52.
  15. Mariotti S, Anelli S, Ruf J, Bechi R, Czarnocka B, Lombardi A, et al. Comparison of serum thyroid microsomal and thyroid peroxidase autoantibodies in thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:9987-93.
  16. Ruf J, Czarnocka B, Ferrand M, Doullais F, Carayon P. Novel routine assay for thyroperoxidase autoantibodies. *Clin Chem* 1988; 34:2231-4.
  17. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A. Anti-thyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:661-9.
  18. Finke R, Bogner U, Kotulla P, Schleusener H. Anti-TPO autoantibodies to thyroglobulin and to thyroid peroxidase. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102:145-50.
  19. Beever K, Bradbury J, Phillips D, McLachlan SM, Pegg C, Coral A, et al. Highly sensitive assay of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. *Clin Chem* 1989; 35:1949-54.
  20. The National Academy of Clinical Biochemistry. Thyroid Antibodies. In: Kaplan AL, Sawin CT, eds. Standards of laboratory practice. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. NACB Document 1996; p. 39-43.
  21. D'Herbomez M, Sapin R, Gasser F, Schlienger JL, Wemeau JL. Concordance of eight kits for anti-thyroid peroxidase autoantibodies determination. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:561-6.
  22. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor. *Clin Chem* 1996; 42:160-3.
  23. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni M, 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.
  24. 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; 1:44-9.
  25. Mariotti S, Sansoni P, Barbesino G, Caturegli P, Monti D, Cossarizza A, et al. Thyroid and other organ-specific autoantibodies in healthy centenarians. *Lancet* 1992; 339:1506-8.
  26. Feldt-Rasmussen U, Hoier-Madsen M, Bech K, Blichert-Toft M, Bliddal H, Date J, et al. Anti-thyroid peroxidase antibodies in thyroid disorders and non-thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* 1991; 9:245-53.
  27. Rapoport B, McLachlan S. Thyroid peroxidase autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier Science BV 1996; p. 816-21.
  28. Gardas A, Sutton BJ, Piotrowska U, Pasieka Z, Barnett PS, Huang G, et al. Distinct immunological and biological properties of thyroid peroxidase purified from human thyroid glands and recombinant protein produced in insect cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1433:229-39.
  29. Grennan Jones F, Ziemnicka K, Sanders J, Wolstenholme A, Fiera R, Furmaniak J, et al. Analysis of autoantibody epitopes on human thyroid peroxidase. *Autoimmunity* 1999; 30:157-69.
  30. Jaume JC, Guo J, Pauls DL, Zakarija M, McKenzie JM, Egeland JA, et al. Evidence for genetic transmission of thyroid peroxidase autoantibody epitopic 'fingerprints'. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1424-31.
  31. Rose NR, Burek CL. Autoantibodies to thyroglobulin in health and disease. *Appl Biochem Biotechnol* 2000; 83:245-51.