

## ARTICOLO ORIGINALE

# Profilo autoanticorpale su microblot array nelle malattie autoimmuni sistemiche: efficienza diagnostica in confronto con il metodo di immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2

## Autoantibody profiling on microblot array in systemic autoimmune diseases: diagnostic efficiency compared with the indirect immunofluorescence method on HEp-2 cells

Maria BARRALE <sup>1</sup> \*, Nicola BIZZARO <sup>2</sup>, Danilo VILLALTA <sup>3</sup>, Ignazio BRUSCA <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unità Operativa Complessa di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla FBF, Palermo, Italia; <sup>2</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Udine, Italia; <sup>3</sup>Unità di Immunologia e Allergologia di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Friuli Occidentale, Ospedale S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italia

\*Autore di contatto: Maria Barrale, Unità Operativa Complessa di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla FBF, Palermo, Italia.  
E-mail: [barrale.maria@fbfpa.it](mailto:barrale.maria@fbfpa.it)

### RIASSUNTO

**Premesse:** L'immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2 è tuttora considerato il metodo di riferimento per lo *screening* degli anticorpi antinucleo (ANA) nelle malattie reumatiche autoimmuni sistemiche. Tuttavia, questa metodica presenta diverse limitazioni, tra cui l'interpretazione dipendente dall'operatore, una standardizzazione limitata e la necessità di eseguire test aggiuntivi per identificare specifici bersagli autoanticorpali. Tecnologie immunometriche *multiplex* che consentono la rilevazione simultanea di molteplici autoanticorpi stanno emergendo come strumenti promettenti per una caratterizzazione sierologica più completa.

**Metodi:** Abbiamo valutato la *performance* diagnostica di un *multiplex microblot array* (MBA) in grado di rilevare 43 specificità autoanticorpali associate alle malattie autoimmuni sistemiche. Sono stati analizzati complessivamente 382 campioni, comprendenti 152 pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche e 230 soggetti di controllo. I risultati ottenuti con il metodo MBA sono stati confrontati con la determinazione degli ANA in IFI su cellule HEp-2.

**Risultati:** La sensibilità diagnostica del metodo MBA è risultata del 98%, e quella del metodo IFI 89,5%. La specificità globale è risultata del 75,7% per l'MBA e del 78,3% per l'IFI. Quando valutati singolarmente, tutti gli anticorpi inclusi nel pannello MBA hanno mostrato una specificità diagnostica molto elevata, con un valore medio del 99%. La concordanza complessiva tra MBA e ANA-IIF è risultata pari al 71,4%, con un coefficiente  $\kappa$  di Cohen medio di 0,450.

**Conclusioni:** Il *multiplex microblot array* ha mostrato una concordanza moderata con l'ANA-IFI, consentendo tuttavia un'identificazione altamente specifica dei singoli autoantigeni bersaglio. L'ampia copertura antigenica permette una caratterizzazione rapida e simultanea di profili autoanticorpali complessi e può rappresentare uno strumento complementare utile all'interno degli algoritmi diagnostici delle malattie autoimmuni sistemiche.

(Per citare questo articolo: Barrale M, Bizzaro N, Villalta D, Brusca I. Profilo autoanticorpale su microblot array nelle malattie autoimmuni sistemiche: efficienza diagnostica in confronto con il metodo di immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2. Riv Ital Med Lab 2026;22:000-000. DOI: 10.23736/S1825-859X.26.00327-0)

## ABSTRACT

**Background:** Indirect immunofluorescence (IIF) on HEp-2 cells is still considered the gold standard for screening for antinuclear antibodies (ANA) in systemic autoimmune rheumatic diseases. However, this method has several limitations, including operator-dependent interpretation, limited standardization, and the need for additional tests to identify specific autoantibody targets. Multiplex immunometric technologies that allow the simultaneous detection of multiple autoantibodies are emerging as promising tools for more comprehensive serological characterization.

**Methods:** We evaluated the diagnostic performance of a multiplex microblot array (MBA) capable of detecting 43 autoantibody specificities associated with systemic autoimmune diseases. A total of 382 samples were analyzed, including 152 patients with systemic autoimmune diseases and 230 control subjects. The results obtained with the MBA method were compared with ANA by IIF on HEp-2 cells.

**Results:** The diagnostic sensitivity of the MBA method was 98%, and that of the IIF method was 89.5%. The overall specificity was 75.7% for MBA and 78.3% for IIF. When evaluated individually, all antibodies included in the MBA panel showed very high diagnostic specificity, with a mean value of 99%. The overall concordance between MBA and ANA-IIF was 71.4%, with a mean Cohen's  $\kappa$  coefficient of 0.450.

**Conclusions:** The multiplex microblot array showed moderate concordance with ANA-IIF, while still allowing highly specific identification of individual target autoantigens. The broad antigenic coverage allows for rapid and simultaneous characterization of complex autoantibody profiles and may represent a useful complementary tool within diagnostic algorithms for systemic autoimmune diseases.

**KEY WORDS:** Antinuclear antibodies; Immunoassay; Indirect fluorescent antibody technique; Autoantibodies; Autoimmune diseases.

## Introduzione

Le malattie reumatiche autoimmuni (MRA), tra cui il lupus eritematoso sistemico, la sclerosi sistemica, la sindrome di Sjögren, la connettivite mista e le miopatie infiammatorie idiopatiche, sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi circolanti diretti contro un'ampia gamma di antigeni nucleari e citoplasmatici.<sup>1-3</sup>

Tra questi biomarcatori, gli anticorpi anti-antigeni cellulari (ANA) svolgono un ruolo centrale nella diagnosi e nella classificazione delle MRA. La determinazione degli ANA mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2 è da tempo considerata il metodo di riferimento per lo *screening* ed è raccomandata dalle principali linee guida nazionali e internazionali.<sup>4-6</sup> Il test ANA-IFI è infatti dotato di un'elevata sensibilità analitica per la capacità di rilevare un ampio spettro di autoanticorpi (circa un centinaio) diretti contro numerose strutture cellulari. Presenta però anche alcuni limiti. In particolare, l'interpretazione dei *pattern* di fluorescenza dipende fortemente dall'esperienza dell'operatore, determinando una consistente variabilità intra- e inter-laboratorio.<sup>7,8</sup> Inoltre, un risultato positivo allo *screening* ANA-IFI non consente di identificare direttamente il bersaglio antigenico degli autoanticorpi, rendendo necessari test aggiuntivi per la rilevazione di anticorpi anti-antigeni nucleo-citoplasmatici specifici.<sup>5,9</sup>

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecnologie immunometriche multiparametriche automatizzate con l'obiettivo di superare tali limitazioni. Questi sistemi con-

sentono la rilevazione simultanea di molteplici autoanticorpi antigene-specifici in un'unica analisi, offrendo una maggiore standardizzazione ed efficienza diagnostica.<sup>10-18</sup> Tra queste, le tecnologie *microblot array* combinano i principi dei saggi immunoblot con la rilevazione *multiplex*<sup>19</sup> e rappresentano probabilmente le tecniche di rilevazione degli anticorpi che verranno largamente impiegate in futuro.<sup>20,21</sup>

L'obiettivo di questo studio è stato valutare la *performance* diagnostica e l'affidabilità analitica di un nuovo *microblot array multiplex* e confrontarne i risultati con quelli ottenuti mediante la determinazione convenzionale degli ANA in IFI su cellule HEp-2, allo scopo di verificare se questo nuovo metodo sia dotato di sensibilità e specificità diagnostiche superiori al metodo IFI HEp-2, in grado cioè di sostituirlo nello *screening* degli ANA.

## Materiali e metodi

Il presente studio osservazionale ha incluso 382 campioni di siero, di cui 152 di pazienti affetti da MRA e 230 di soggetti con infezioni virali o affetti da varie malattie non autoimmuni, come gruppo di controllo. La distribuzione dei campioni è riportata nella Tabella I.

I test analizzati nello studio erano stati richiesti nell'ambito dell'attività diagnostica routinaria e sono stati analizzati in forma anonimizzata e de-identificati prima dell'analisi, in conformità alla Dichiarazione di Helsinki e alla legislazione italiana (Autorizzazione del Garante

TABELLA I.—Diagnosi dei pazienti e dei soggetti di controllo.

Gruppo con malattie autoimmuni sistemiche	N.	Gruppo di controllo	N.
Lupus eritematoso sistemico	33	Infezioni virali (CMV, HCV, HBV, EBV)	77
Connettivite mista	20	Pazienti ricoverati per patologie non autoimmuni	107
Miositi autoimmuni	20	Malattie varie non autoimmuni	23
Sindrome di Sjögren	29	Febbre di origine sconosciuta	23
Sclerosi sistemica	50		
Totale	152		230

per la protezione dei dati personali n. 9 del 12 dicembre 2013).

La determinazione degli ANA è stata eseguita in IFI su cellule HEp-2 alla diluizione iniziale di 1:80, utilizzando il sistema automatico QUANTA LITE (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA). I campioni positivi sono stati successivamente titolati fino alla diluizione di 1:1280. Un titolo  $\geq 1:80$  è stato considerato indicativo di positività per ANA.

La rilevazione delle singole specificità autoanticorpali è stata effettuata mediante un sistema *microblot array* (MBA) (BioVendor/TestLine, Brno, Repubblica Ceca). Il test valutato nel presente studio è costituito da un pannello di marcatori sia malattia-specifici sia malattia-associati, relativi a diverse patologie autoimmuni sistemiche, che include i seguenti 43 autoantigeni nucleari e citoplasmatici: dsDNA, nucleosomi, istoni, SmB, SmD, RNP-A, RNP-68/70, RNP-C, Ro60, Ro52, La, P ribosomiale, PCNA, Ku, PM/Sc1-100, PM/Sc1-75, CENP-A, CENP-B, Th/To, RNA polimerasi III, Sc170, fibrillarina, NOR90, Mi-2, TIF1 $\gamma$ , KS, YARS, ZoA, ZoB, MDA5, NXP2, SAE1, SAE2, SRP54, PL-7, PL-12, EJ, OJ, Jo1, PDGFR- $\beta$ , nucleolina, DFS70 e AMA-M2.

Il saggio include inoltre controlli interni e un profilo di calibrazione su quattro punti per garantire la validità analitica del test e la quantificazione della concentrazione anticorpale.

### Analisi statistica

La concordanza tra MBA e ANA-IIF è stata valutata mediante concordanza complessiva e coefficiente kappa di Cohen ( $\kappa$ ). La specificità diagnostica globale dei due metodi a confronto e di ogni singolo anticorpo per il metodo MBA è stata calcolata utilizzando la popolazione di controllo. L'area sotto la curva è stata calcolata con l'analisi delle curve ROC.

### Risultati

Nei 152 pazienti con malattia autoimmune sistemica, la sensibilità diagnostica del metodo MBA è risultata del

98% e quella del metodo IFI del 89,5%. Questa differenza di sensibilità è dovuta soprattutto al gruppo delle miositi autoimmuni dove solo otto campioni su 20 (40%) sono risultati positivi in IFI contro 20/20 (100%) con MBA. Il metodo MBA ha fornito prevalentemente positività multiple: dove il risultato coincideva con quello atteso per patologia, i livelli anticorpali erano molto alti, mentre le positività a bassa concentrazione, per lo più di poco sopra il *cutoff*, riguardavano per lo più anticorpi in genere non associati alla patologia in esame.

Quando valutati singolarmente, tutti gli anticorpi inclusi nel pannello MBA hanno mostrato una specificità diagnostica molto elevata, con un valore medio del 99% (Tabella II). Valutata globalmente, la specificità derivante dalla somma di tutti gli anticorpi presenti nell'MBA nei 230 campioni di controllo è risultata del 75,7%, rispetto al 78,3% dell'IFI alla diluizione di 1:80. Alla diluizione di 1:160, la specificità dell'IFI è risultata del 88,2%.

La concordanza complessiva tra MBA e IFI è risultata pari al 71,4%, con un coefficiente  $\kappa$  di Cohen medio di 0,450. I risultati discrepanti sono stati riscontrati prevalentemente nelle infezioni virali (maggiore positività di MBA) e nelle malattie non autoimmuni (maggiore positività di ANA-IFI). Gli autoanticorpi causa più frequente di risultati falsi positivi con MBA sono stati gli anti-Ro60, gli anti-RNP-A e gli anti-nucleosomi (Tabella III).

L'efficienza diagnostica globale, ovvero la capacità di classificare correttamente sia i campioni veri positivi che i campioni veri negativi, è risultata del 84,5% per MBA e del 82,7% per l'IFI. L'area sotto la curva delle curve ROC è risultata del tutto sovrapponibile (0,876 MBA e 0,887 IFI).

### Discussione

L'IFI su cellule HEp-2 è considerata il metodo di riferimento per lo *screening* degli ANA, ma i suoi indubbi limiti hanno negli anni spinto l'industria biomedica del settore a sviluppare dapprima sistemi automatici per la preparazione e la lettura dei preparati in immunofluorescenza<sup>22-24</sup> e in seguito metodi analitici multiparametrici che potessero

TABELLA II.—Specificità diagnostica del microblot array per i singoli autoanticorpi inclusi nel profilo.

Autoanticorpo	Specificità diagnostica
dsDNA	97,3%
Nucleosoma	96,0%
Istoni	98,2%
SmB	99,7%
SmD	99,1%
RNP-A	96,0%
RNP-70	98,7%
RNP-C	98,2%
Ro60	91,5%
Ro52	97,3%
La	100%
P ribosomiale	100%
PCNA	99,6%
Ku	99,1%
PM-Scl100	100%
PM-Scl75	99,6%
Th/To	100%
RNA polimerasi III	100%
Scl-70 (Topoisomerasi I)	99,6%
CENP-A	99,6%
CENP-B	99,7%
Fibrillarina	100%
NOR90	99,1%
Mi-2	98,7%
Jo-1	100%
TIF1y	99,1%
MDA5	99,6%
NXP2	99,1%
SAE1	100%
SAE2	99,6%
SRP54	98,7%
PL-7	100%
PL-12	100%
EJ	99,1%
OJ	100%
KS	100%
YARS	99,6%
ZoA	100%
ZoB	100%
PDGFR-β	100%
Nucleolina	100%
AMA-M2	100%

Specificità diagnostica media: 99,0%.

fornire una maggiore specificità diagnostica e una minore variabilità analitica.<sup>25, 26</sup> In particolare, queste tecnologie consentono la rilevazione simultanea di numerosi autoanticorpi e permettono di ottenere profili sierologici completi in un'unica analisi.<sup>27, 28</sup> In questo senso, i saggi immunometrici *multiplex* sono emersi come promettenti alternative all'IFI, in grado di migliorare la standardizzazione analitica e l'efficienza del laboratorio nella fase di *screening*.<sup>14</sup> In questo studio abbiamo valutato la *performance* diagnostica di un nuovo sistema *multiplex* con tecnologia

TABELLA III.—Principali autoanticorpi associati ai risultati falsamente positivi osservati nel gruppo di controllo con il metodo MBA.

Specificità autoanticorpale	N.	Percentuale sui falsi positivi
Anti-Ro60	19	33,9%
Anti-RNP-A	7	12,5%
Anti-nucleosomi	7	12,5%
Anti-Ro52	6	10,7%
Anti-dsDNA	4	7,1%
Anti-istoni	4	7,1%
Altre specificità	9	16,1%
Totale	56	100,0%

*microblot array* per la rilevazione di un ampio pannello di autoanticorpi, confrontandola con quella del metodo convenzionale ANA-IFI.

La concordanza complessiva tra MBA e ANA-IFI è risultata moderata, pari al 71,4%. Le discrepanze osservate tra i due metodi sono probabilmente riconducibili ai differenti principi analitici su cui si basano. Mentre l'ANA-IFI rileva una reattività globale nei confronti delle strutture cellulari, i saggi *multiplex* identificano anticorpi diretti contro pannelli antigenici predefiniti.

La maggiore sensibilità diagnostica del metodo MBA rispetto all'IFI (98% vs. 89,5%), indica chiaramente che il pannello di 43 antigeni è adeguato e sufficiente ad individuare tutti i principali anticorpi associati alle MRA. Atteso il dato relativo alle miositi, dove l'ampio profilo antigenico del metodo MBA non ha registrato risultati falsi negativi mentre il metodo IFI è risultato negativo nel 60% dei campioni. Per quanto riguarda la specificità, ambedue i metodi si attestano in questo studio attorno al 76-78%. Se si considera la diluizione di 1:160 che è il livello decisionale clinicamente significativo, la specificità dell'IFI aumenta di 10 punti percentuali attestandosi attorno all'88%, ma la sensibilità inevitabilmente scende al 71%.

I falsi positivi con MBA nel gruppo di controllo sono risultati principalmente associati agli autoanticorpi anti-Ro60 nel siero di soggetti con infezioni virali. La presenza di tali autoanticorpi in condizioni non autoimmuni è stata precedentemente descritta e può essere dovuta ad attivazione policlonale transitoria associata all'infezione virale.<sup>29, 30</sup>

Un nostro precedente studio che aveva valutato un sistema multiparametrico che impiega la *particle-based multi-analyte technology* (PMAT) e che includeva 29 antigeni, aveva dimostrato una sensibilità del 83% e una specificità del 78%.<sup>31</sup> Pur non essendo i due studi direttamente confrontabili per le diverse serie di pazienti studiate, è verosimile che la maggiore sensibilità del metodo MBA rispet-

to al PMAT possa essere dovuta al maggiore numero di antigeni (43 contro 29). La specificità è invece del tutto sovrapponibile (76% MBA vs. 78% PMAT). A questo proposito è estremamente interessante notare che più aumenta il numero di antigeni che vengono inseriti nei saggi, più ci si avvicina alle prestazioni del metodo IFI, ovvero la specificità del sistema multiparametrico scende agli stessi livelli del metodo IFI. Infatti, quando si utilizza un sistema multiparametrico, anche se la specificità di ognuno dei singoli anticorpi è del 99%, quando si calcola la specificità globale del sistema, la quota di falsi positivi per ciascun anticorpo viene a sommarsi e quindi essa ha valori sempre più bassi rispetto a quella del singolo anticorpo. Questo particolare aspetto dei sistemi multiparametrici, ci induce a considerare che l'ideale sarebbe settare i sistemi multiparametrici in modo tale che la specificità dei singoli anticorpi sia sempre del 100%, anche a costo di perdere qualche punto percentuale in sensibilità.

Questo studio presenta diversi punti di forza: è il primo studio che riporta i dati di accuratezza diagnostica del nuovo metodo MBA che utilizza un profilo multiparametrico molto esteso, comprendente 43 autoantigeni e vi è il confronto diretto con il metodo di riferimento ANA-IFI. Un possibile limite è rappresentato dal disegno monocentrico che potrebbe limitare la generalizzabilità dei risultati.

L'integrazione di queste tecnologie negli algoritmi diagnostici di laboratorio può contribuire a ridurre la soggettività nell'interpretazione degli ANA e migliorare l'efficienza complessiva del laboratorio. Dal punto di vista clinico, la profilazione *multiplex* potrebbe consentire un'identificazione più rapida e completa degli autoanticorpi malattia specifici, contribuendo alla definizione di sottogruppi molecolari associati a differenti aspetti clinici.<sup>32</sup>

In conclusione, il *multiplex microblot array* valutato in questo studio ha dimostrato di poter già essere utilizzabile nell'algoritmo diagnostico come test di secondo livello per individuare le specificità anticorpali responsabili della positività dei test di *screening*. L'ampia copertura antigenica consente infatti una profilazione autoanticorpale completa e potrebbe rappresentare uno strumento complementare di valore all'interno degli algoritmi diagnostici delle malattie autoimmuni sistemiche.

Se si decidesse di utilizzarlo come test di *screening* per gli ANA, fornisce prestazioni uguali o lievemente superiori a quelle del metodo IFI HEP-2. Ulteriori studi saranno comunque necessari per confermare il ruolo dei saggi autoanticorpali *multiplex* nella pratica clinica routinaria e il loro corretto posizionamento nell'algoritmo diagnostico delle malattie reumatiche autoimmuni.

## Bibliografia

1. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res* 2014;2014:315179.
2. Cinquanta L, Bizzaro N. Il test ANA: cosa è necessario sapere per interpretare correttamente i risultati. *Riv Ital Med Lab* 2022;18:77-84.
3. Sciascia S, Bizzaro N, Meroni PL, Dimitrios B, Borghi MO, Bossuyt X, *et al.* Autoantibodies testing in autoimmunity: Diagnostic, prognostic and classification value. *Autoimmun Rev* 2023;22:103356.
4. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, *et al.* International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as ANA. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17-23.
5. Cinquanta L, Bizzaro N, Villalta D, Morozzi G, Tonutti E, Bagnasco M, *et al.* Linee guida per l'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche sistemiche. *Revisione* 2015. *Riv Ital Med Lab* 2015;11:205-24.
6. Cinquanta L, Infantino M, Manfredi M, Daves M, Radice A, Villalta D, *et al.* Aggiornamento delle linee guida SIPMeL sull'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche sistemiche: metodi per lo screening degli anticorpi anti-antigeni cellulari (ANA). *Riv Ital Med Lab* 2019;15:294-9.
7. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N. Challenges in the Standardization of Autoantibody Testing: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;53:68-77.
8. Bizzaro N, Mazzoni A, Carbone T, Cinquanta L, Villalta D, Radice A, *et al.* Issues in autoantibody tests used in the classification criteria for autoimmune rheumatic diseases: the laboratory autoimmunologist's perspective. *Autoimmun Rev* 2024;23:103604.
9. Damoiseaux JG, Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev* 2006;5:10-7.
10. Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Autoimmune diagnostics: the technology, the strategy and the clinical governance. *Immunol Res* 2015;61:126-34.
11. Bizzaro N. Autoantibody profiles in autoimmune rheumatic diseases. *Mediterr J Rheumatol* 2019;30:86-9.
12. Bizzaro N, Cinquanta L. Determinazione di profili autoanticorpali con metodi multiparametrici proteomici: impatto su prevenzione, diagnosi, monitoraggio e terapia personalizzata nelle malattie autoimmuni. *Riv It. Med Lab (Ed Ital)* 2021;17:143-53.
13. Bizzaro N, Villalta D, Bini V, Migliorini P, Franceschini F, Piantoni S, *et al.*; FIRMA Collaborators. Multiparametric autoantibody analysis: a new paradigm for the diagnosis of connective tissue diseases. *Arthritis Res Ther* 2022;24:278.
14. Fritzler MJ, Choi MY. Antinuclear Antibody Testing: Gold Standard Revisited. *J Appl Lab Med* 2022;7:357-61.
15. Cafaro G, Bartoloni E, Baldini C, Franceschini F, Riccieri V, Fioravanti A, *et al.*; FIRMA (Interdisciplinary Forum for the Research on Autoimmune Diseases) Collaborators; FIRMA Collaborators. Autoantibody status according to multiparametric assay accurately estimates connective tissue disease classification and identifies clinically relevant disease clusters. *RMD Open* 2023;9:e003365.
16. Bizzaro N. Test multiparametrici, una nuova arma per la diagnosi delle malattie reumatiche. *Ligand Assay* 2024;29:197.
17. Infantino M, Carbone T, Patel D, Sargur R, Stanley C, Bhayat-Cammack A, *et al.* Harmonization of anti-nuclear antibody testing (ANA) by indirect immunofluorescence assay: results from ten years of UK NEQAS external quality assessment. *Clin Chim Acta* 2025;567:120088.
18. Vercammen M, Bonroy C, Broeders S, Chan EK, Bizzaro N, Bogdanos DP, *et al.*; EFLM Working Group on Autoimmunity Testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by HEP-2 indirect immunofluorescence: EFLM report on an international survey. *Clin Chem Lab Med* 2023;61:1199-208.

19. Infantino M, Pavia F, Grossi V, Lari B, Benucci M, Li Gobbi F, *et al.* Evaluation of a new multiparametric microdot array-based immunoassay panel for systemic autoimmune disease diagnosis. *J Pers Med* 2024;14:607.
20. Villalta D, Tozzoli R, Tonutti E, Bizzaro N. The laboratory approach to the diagnosis of autoimmune diseases: is it time to change? *Autoimmun Rev* 2007;6:359–65.
21. Irure-Ventura J, López-Hoyos M. The past, present, and future in antinuclear antibodies (ANA). *Diagnostics (Basel)* 2022;12:647.
22. Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassetti D, Pesente F, *et al.*; Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Laboratory Medicine, Italy. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmun Rev* 2014;13:292–8.
23. Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput auto-antibody detection technology: strengths and limitations. *BMC Med* 2014;12:38.
24. Cinquanta L, Bizzaro N, Pesce G. Standardization and quality assessment under the perspective of automated computer-assisted HEp-2 immunofluorescence assay systems. *Front Immunol* 2021;12:638863.
25. Bizzaro N, Brusca I, Previtali G, Alessio MG, Daves M, Platzgummer S, *et al.* The association of solid-phase assays to immunofluorescence increases the diagnostic accuracy for ANA screening in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2018;17:541–7.
26. Bizzaro N. Can solid-phase assays replace immunofluorescence for ANA screening? *Ann Rheum Dis* 2020;79:e32.
27. Cinquanta L, Infantino M, Bizzaro N. Detecting autoantibodies by multiparametric assays: impact on prevention, diagnosis, monitoring and personalized therapy in autoimmune diseases. *J Appl Lab Med* 2022;7:137–50.
28. Tozzoli R, Cinquanta L, Bizzaro N. Autoantibody profiling in autoimmune rheumatic diseases: how research may translate into clinical practice. In: Rezaei N. (ed.) *Translational Autoimmunity*. Elsevier Inc.: New York. 2022; 6:149-68.
29. Cainelli F, Betterle C, Vento S. Antinuclear antibodies are common in an infectious environment but do not predict systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1707–8.
30. Mahler M, Fritzler MJ. Advances in antinuclear antibody (ANA) testing. In: Shoenfeld Y, Meroni PL, Fritzler MJ, editors. *Autoantibodies*. Third edition. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 9–18.
31. Buzzulini F, Villalta D, Previtali G, Alessio MG, Cafaro G, Bartoloni E, *et al.*; Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA Group). Diagnostic performance of particle-based multi-analyte technology compared to indirect immunofluorescence in screening for anti-nuclear antibodies in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2025;43:1622–8.
32. Radin M, Cecchi I, Barinotti A, Wilson Jones G, Arbrile M, Miraglia P, *et al.* Identifying subsets of patients with undifferentiated connective tissue disease: results from a prospective, real-world experience using particle-based multi-analyte technology. *Autoimmun Rev* 2023;22:103298.

#### Conflitti di interesse

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse con alcuna ditta legata al contenuto del manoscritto.

#### Studi condotti su esseri umani e animali

Tutte le procedure descritte nello studio e che hanno coinvolto esseri umani sono state attuate in conformità alle norme etiche stabilite dalla dichiarazione di Helsinki del 1964 e successive modifiche.

#### Consenso informato

Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti inclusi nello studio.

#### Cronologia

Publicato online: \_\_\_\_\_ . - Accettato: 14 aprile 2026. - Ricevuto: 23 marzo 2026.