

Otoantikörlerin Belirlenmesi İçin Alternatif İmmün Yöntemler: Geleneksel Derleme

Alternative Immune Methods for the Determination of Autoantibodies: Narrative Reviews

 Rasim ŞAHİN^a

^aMersin Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Mersin, TÜRKİYE

ÖZET Otoantikör tespiti, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, Sjögren sendromu, sistemik skleroz ve antifosfolipid sendromu gibi sistemik ve otoimmün tiroid hastalıkların yanı sıra primer biliyer siroz ve otoimmün hepatit gibi organa özgül olan çeşitli otoimmün hastalıkların tanısı için çok önemlidir. Çok sayıda otoimmün hastalık doğada kroniktir, yıllar boyunca ilerler ve varlığı tam gelişmiş hastalıktan aylarca veya yıllarca önce gelebilen özgün otoantikörlerle karakterizedir. Klinik laboratuvarlarda otoantikör testi için taleplerin ve test sayısının artması, saptanması ve ölçülmesi için daha verimli, daha az emek gerektiren, daha objektif yöntemlere ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur. Farklı performans özelliklerine sahip çeşitli manuel veya otomatik tek veya çok aşamalı immünojenik testler; enzim bağlı immünoassay, kemilüminesans temelli immünojenik testler geliştirilmiştir. Kemilüminesans temelli immünojenik testlerin, immünoenzimatik yöntemlerden daha geniş dinamik aralık, sayısal değerlerde ifade edilen sonuçların yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, yüksek otomasyon derecesi ve sonuç verme süresindeki azalma ve çalışılan antikör testi sayısındaki artış sayesinde bu teknolojiyi, iş laboratuvarı ve immünojenik laboratuvarının organizasyonunda en gelişmiş yöntem hâline getirdi. Önümüzdeki yıllarda, akış enjeksiyonlu kemilüminesans immünoassay, kemilüminesans multipleks immünoassay için 2 boyutlu çözünürlük ve manyetik nanopartiküller kemilüminesans immünoassay gibi yeni analitik sistemlerin geliştirilmesi beklenmektedir. Yeni geliştirilen teknikler ve güncellemelere rağmen otoantikör tayininin immün floresan teknik, hâlâ altın standart olarak kabul edilmektedir.

ABSTRACT Systemic and autoimmune thyroid diseases such as autoantibody detection, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, systemic sclerosis and antiphospholipid syndrome, as well as various organ-specific diseases such as primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. It is very important. A large number of autoimmune diseases are chronic in nature, progress over the years and are characterized by unique autoantibodies, the presence of which can come months or years before a fully developed disease. In clinical laboratories, the demand for autoantibody testing and the number of tests increased required more efficient, less labor-intensive and objective methods to detect and measure. Various manual or automatic single or multi-stage immunological tests with different performance characteristics; enzyme bound immoassay, chemiluminescent based immunological tests have been developed in immunology laboratory. Chemiluminescence-based immunological tests have made this technology the most advanced method in the organization of the business laboratory and immunology laboratory, thanks to the wider dynamic range than immunoenzymatic methods, the high sensitivity and specificity of the results expressed in numerical value, the high degree of automation and the increase in the number of antibody tests studied. In the coming years, new analytical systems such as chemiluminescence immunoassay for flow injection, chemiluminescence multiplex immunoassay, and magnetic nanoparticles chemiluminescence immunoassay are expected to be developed. Despite the newly developed techniques and updates, immunofluorescent technique is still accepted as the gold standard in auto antibody detection.

Anahtar Kelimeler: Otoantikör; immünojenik testler; kemilüminesans; immünofloresan

Keywords: Autoantibody, immunological tests; chemiluminescent; immunofluorescent

Otoantikör tespiti, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, Sjögren sendromu, sistemik skleroz ve antifosfolipid sendromu gibi sistemik ve otoimmün tiroid hastalıkların yanı sıra primer biliyer siroz ve otoimmün hepatit gibi organa özgül olan çeşitli otoimmün hastalıkların tanısı için çok önemlidir.¹⁻¹⁰ Otoantikör tayini, bazı otoimmün hastalıkları sınıf-

landırmada kullanılır.¹¹⁻¹⁷ Otoantikörler, hastalığın klinik bulgularından yıllar önce ortaya çıkabilir.⁹⁻¹³ Otoantikör tespiti için çok sayıda analitik yöntem geliştirilmiştir.¹³⁻¹⁷ Bunlardan, immünoanaliz, modern laboratuvar teşhisine olan talebin artması nedeniyle sürekli teknolojik gelişmeyle son yıllarda önemli ve radikal değişiklikler geçirmiştir. Temel olarak immü-

Correspondence: Rasim ŞAHİN

Mersin Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Mersin, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: rasimsahin@gmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine.

Received: 10 May 2020

Received in revised form: 22 Nov 2020

Accepted: 26 Nov 2020

Available online: 22 Jan 2021

2458-8733 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

noanaliz gelişimi, immünoassay etiketleme teknolojisinin evrimine karşılık gelir. Radioimmünoassay (RIA), geliştirilen ilk immünoassaydi ve modern immüno ölçümün öncüsü olarak kabul edilir.¹⁸ 1950'li yılların sonlarında insülin için ilk doğrudan immünoassayın kullanımı, Solomon Berson ve Rosalyn Yalow'a Nobel Ödülü'nü kazandırdı. İki araştırmacı, analitik programı patentlememeyi seçti ve bu karar, sonraki yıllarda immünoassay tekniklerinin gelişimine hiçbir şekilde katkıda bulunmadı. Ekins, sonraki yıllarda önemli teorileri ve uygulamalarıyla immünoassay gelişiminin mimarı oldu.¹⁹ Diğer araştırmacılar da bu teknikleri günümüzde doğrulamaktadır.²⁰⁻²³

ENZİM BAĞLI İMMÜNOASSAY

Oto antikor tespitinde kullanılan immün floresan antikor (IFA) dışı yöntemlerden enzim bağlı immünoassay [enzyme bound immoassay (ELİSA)], klinik laboratuvarlarda kullanılan en yaygın ve çok yönlü tekniklerdendir. Ticari olarak temin edilebilen ELİSA'lar çeşitli antijen içeriğine (substratlar) ve sekonder antikorlara sahiptir.^{7,8} Otoantikorların tespiti için çoğu ELİSA, sistemik otoimmün romatizmal hastalıklarla ilişkili saflaştırılmış, rekombinant veya doğal proteinlerin birleşimiyle HEp-2 hücre özütlarini kullansa da birkaçı HEp-2 hücresi içermez.^{5,6,8,10} Bu nedenle ELİSA'nın klinik performansları, formülasyonlarına bağlı olarak değişir.⁵⁻⁸ Ayrıca antijenik yapılarıdaki konformasyonel değişiklikler yanlış sonuçlara neden olabilir.⁵⁻⁷

KEMİLÜMİNESANS İMMÜNOANALİZ

Kemilüminesans immünoanaliz [chemiluminescence immunoassay (CLIA)], etiketin, yani analitik reaksiyonun gerçek "göstergesinin" lüminesans bir molekül olduğu bir immünoanaliz tekniğidir. Genel olarak lüminesans, bir elektronun uyarılmış bir durumdan temel durumuna geçtiğinde, ortaya çıkan görünür veya neredeyse görülebilir ($\lambda=300-800$ nm) radyasyon yayar.²⁴ Nihai atomdaki potansiyel enerji, ışık şeklinde açığa çıkar. Spektrofotometri sayesinde ışığı soğurma avantajına sahiptir. Heterojen yöntem, daha yaygın olarak kullanılan kemilüminesans analizidir.²⁴ ²⁹ Kemilüminesans yöntemler, direkt olarak - lüminoför belirteci kullanılarak - veya dolaylı olarak -

enzim belirteci kullanılarak olabilir. Her 2 yöntem de rekabetçi olabilir veya olmayabilir.^{7,9,24} Doğrudan kemilüminesans yöntemlerde kullanılan lüminoför belirteci, akridinyum ve rutenyum esterleridir, dolaylı yöntemlerde kullanılan enzimatik belirteç ise adamanitil 1, 2-dioksetan aril fosfat substratı ve yaban turpu peroksidazı luminol veya bunun türevleridir. 3-(2'-spiroadamantyl)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane ve izoluminol molekülü türevleri gibi sentezleyici moleküller, diğer lüminesans belirteçlere kıyasla daha kararlıdır ve karakteristik olarak artmış bir ışık yaymasıyla sonuçlanır.^{7,9,24} Bu substratların aktivasyonu, immünojenik reaksiyonla ilişkili kimyasal veya enzimatik reaksiyonlar gerektirir. Örneğin kemilüminesans etiketler olarak luminol ve izoluminol türevlerinin kullanılması, immüno-tahlilin peroksidaz tarafından katalize edilen enzimatik reaksiyonlarla birleştirilmesine bağlıdır.²⁴ ²⁷ Bir güçlendiricinin (ferrosiyandır, metalik iyonlar) eklenmesi, elektronik aktivasyonu daha da artırır ve son derece yüksek analitik hassasiyete yol açar. Bu durum CLIA yönteminin duyarlılığını RIA, ELİSA ve floroimmünoenzimatik (FEİA) yöntemler gibi diğer immüno-deney yöntemleriyle elde edilebileceklerden daha üstün yapar. CLIA teknolojisine dayalı otomatik analitik platformların kullanılması, katı immünokimyasal reaksiyonları, diğer immünoanaliz tiplerinden önemli ölçüde daha kısa yürütme süreleriyle (30-40 dk) sonuçlandırır. Reaktiflerin ve konjugatların yüksek stabilitesine ilişkin en kritik analitik aşamaların mutlak standardizasyonu, kalibrasyon eğrisinin stabilitesinin süresine (birkaç hafta) önemli ölçüde katkıda bulunur.^{9,24} Gelişmiş yazılım, analiz cihazlarını yönetir ve analitik sonucun otomatik işlenmesini, kalite kontrol yönetiminin ve analitik aşamaların her yönünün sürekli izlenmesini sağlar. Ayrıca hasta ve kalite kontrol numunelerinin ve ortak reaktiflerin, tek odaklı tanınmasını sağlar. Aslında aynı özellikler, FEİA ve boncuk temelli bir multipleks immüno-tahlil sistemi gibi farklı teknolojilere dayanan diğer immüno-analizlerde de mevcuttur. Bu, farklı otoantikorların yoğunluğundaki değişiklikleri tararken özellikle önemlidir. CLIA teknolojisi, diğer immünoanaliz yöntemlerinden daha düşük analit saptama sınırları olan analitik sürece izin verir. Başka bir deyişle CLIA, son derece düşük yoğunlukta antikor-

ların varlığını belirleyebilir (saptama sınırı=zeptomol 10-21 mol).²⁵ Çok sayıda otoimmün hastalık doğada kroniktir, yıllar boyunca ilerler ve varlığı tam gelişmiş hastalıktan aylarca veya yıllarca önce gelebilen özgün otoantikörlerle karakterizedir.²⁵⁻²⁹ İmmünoenzimatik yöntemlerden daha geniş dinamik aralık, sayısal formda ifade edilen sonuçların yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, yüksek otomasyon derecesi ve sonuç verme süresindeki azalma, bu teknolojiyi immünoloji laboratuvarının en gelişmiş sistemi hâline getirir. Önümüzdeki yıllarda, akış enjeksiyonlu CLIA ve kemilüminesans multipleks immünoassay için 2 boyutlu çözünürlük ve manyetik nanopartiküller CLIA gibi yeni analitik platformların geliştirilmesi beklenmektedir.

OTOİMMÜN LABORATUVAR İÇİN KEMİLÜMINESANS İMMÜNOANALİZ TEKNOLOJİSİNİN AVANTAJLARI VE SINIRLAMALARI

Kemilüminesans analitik yöntemlerin temel avantajları; geniş dinamik aralık, yüksek sinyal yoğunluğu, yüksek özgüllük, analitik sinyalin hızlı bir şekilde elde edilmesi, reaktiflerin ve konjugatlarının yüksek stabilitesi, düşük reaktif tüketimi, inkübasyon süresinin kısalmasıdır. Bazı sınırlamalar da dikkate alınmalıdır.^{24,26,27} Bazı kemilüminesans sistemler için analit yokluğunda düşük bir arka plan ışınma seviyesi vardır.²⁴ İmmünoenzimatik yöntemlerden daha geniş dinamik aralık, sayısal değerle ifade edilen sonuçların yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, yüksek otomasyon derecesi ve sonuç verme süresindeki azalma ve büyük bir antikör testi sayısı çalışma kabiliyeti (farklı izotiplerde bile) sayılabilir.^{24,30-33} Önümüzdeki yıllarda, akış enjeksiyonlu CLIA, kemilüminesans multipleks immünoassay için 2 boyutlu çözünürlük ve manyetik nanopartiküller CLIA gibi yeni analitik platformların geliştirilmesi beklenmektedir.

TARTIŞMA

Son yıllarda, otomasyonda çok sayıda otoantikörün hızlı bir şekilde tahlil edilmesi için kullanılan immüno kimyasal analizörlerin aşamalı difüzyonu ve katı faza bağlı 16'ya kadar farklı antijenik özgüllüğü dikkate alan yeni tarama testlerinin mevcudiyeti, otoantikör tespiti için hangi analitik yöntemlerin benimseneceği tartışmasını yeniden açtı.³⁴⁻³⁷ Bu ko-

nuda yapılan kemilüminesans tekniğinin performansını antinükleer antikör (ANA) taraması için HEp-2 hücresel substrat üzerindeki geleneksel indirekt immüno floresan (IIF) testiyle karşılaştıran çalışmalar önemli katkı sağlanmıştır.³⁴⁻³⁸ Tahmin edilebileceği gibi otoimmün romatizmal hastalıktan etkilenen hastalarda manuel ANA IIF, CLIA'ya kıyasla daha fazla duyarlılık (%78,1 karşı %81,5) ve daha düşük özgüllük %94,1 karşı %79,4) gösterildi.³⁷ Bununla birlikte, kontrol grubundaki sağlıklı bireylerde CLIA (%4,1) ve IIF (%21,2) arasındaki pozitiflik farkı önemlidir. Bu nedenle CLIA testinin özgüllüğünün, daha üstün olduğu vurgulandı. Toplam istenen test sayısındaki artış ve artan uygunsuz istek sayısı, hücre içi tarama için kullanılan testlerin tanısal özgüllüğüne daha fazla dikkat edilmesini gerektirir.³⁷⁻⁴⁰ CLIA, numuneyi seyreltmeye gerek kalmadan yüksek antikör konsantrasyonlarını doğru bir şekilde algılama kapasitesine sahiptir. Örneğin CLIA tahliliyle ELISA ve FEIA arasında dinamik aralık amplitüdündeki fark, antitransglutaminaz antikörlerinin (tTG) ölçümü için gösterilmiştir; duodenal biyopsiyle doğrulanan çölyak hastalığı olan erişkin hastaların yaklaşık %50'sinde, CLIA'da ölçülen anti-tTG immüno globulin A (IgA) seviyeleri normal değerinin üst sınırından 10 katından fazla olduğunu gösterdi. Bu pozitiflik oranı, FEIA yöntemi kullanılarak aynı numunelerin test edilmesiyle elde edilenin, belirgin bir şekilde daha üstün olduğunu kanıtlamıştır.²⁵ Bu nedenle geniş dinamik aralığı nedeniyle anti-tTG IgA'nın saptanması için CLIA yöntemlerinin kullanılması, erişkinlerde çölyak hastalığının teşhisi için duodenal biyopsi ihtiyacını önemli ölçüde azaltabilir. Alternatif yöntemlerin IFA testine göre avantajları arasında; kullanım kolaylığı, yüksek verimli analiz yapma olasılığı, özneliğin azalması ve otoantikörlerle ilgili testlerin tek bir platformda birleştirilmesi sayılabilir.^{9,25-30}

Otoantikör tespiti için IFA olmayan yöntemlerin kullanımının ana dezavantajları; sınırlı sayıda antijen nedeniyle negatif sonuçların güvenilmezliği ve tarama sonuçlarının, pozitif ve sonraki ANA IFA test sonuçlarının negatif olması durumunda teşhis ikilemiyle ilgilidir.^{7,9,31-35}

Çoklu-analit deneylerinde; farklı antijenler, katı faz üzerindeki farklı pozisyonlarda, her bir immüno-

reaksiyonun aynı anda meydana gelebileceği ve de-
dektörleri tarafından belirgin bir şekilde algılanabi-
leceği şekilde düzenlenmiştir.³⁶⁻⁴¹ Otoantikör tespiti
için CLIA veya FEIA yöntemlerini benimsemek, bi-
limsel araştırma dünyasının önerdiği sürekli genişle-
yen otoantikörler dizisi ve test taleplerinde artışla
başta çıkmak açısından önemlidir ve otoimmünoloji
laboratuvarında verimlilikte artışa yol açar.⁴²⁻⁴⁵ Oto-
immün patolojiler konusunda artan farkındalıktan
kaynaklanan çeşitli klinik disiplinlerden, çok sayıda
test gerçekleştirebilen otomatik immünoassay anali-
zörlerinin kullanılmasıyla istenen otoantikör testleri
sadece birkaç saat içinde sonuçlandırılabilir.⁴⁶

Yeni geliştirilen teknikler ve güncellemelere rağ-
men otoantikör tayinininde immünofloresan teknik
hâlâ altın standart olarak kabul edilmektedir.

Finansal Kaynak

*Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğru-
dan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet,
gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi
bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma
ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya
manevi herhangi bir destek alınmamıştır.*

Çıkar Çatışması

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin
çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üye-
liği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir
firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.*

Yazar Katkıları

*Bu çalışma tamamen yazarın kendi eseri olup başka hiçbir yazar
katkısı alınmamıştır.*

KAYNAKLAR

- O'Sullivan M, McLean-Tooke A, Loh RK. Anti-nuclear antibody test. *Aust Fam Physician*. 2013;42(10):718-21. [PubMed]
- Karamelic J, Subasic D, Gavrankapetanovic F, Zecevic L, Eminovic I, Memic S, et al. The incidence of antinuclear antibodies (ANA) detected by indirect immunofluorescence assay (IFA) method. *Med Arh*. 2007;61(1):16-9. [PubMed]
- Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in healthy people and non-rheumatic diseases - diagnostic and clinical implications. *Reumatologia*. 2018; 56(4):243-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- 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 anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):17-23. [PubMed]
- Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE, et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2011;63(1):191-200. Erratum in: *Arthritis Rheum*. 2011;63(5):1468. [Crossref] [PubMed]
- Pisetsky DS, Spencer DM, Lipsky PE, Rovin BH. Assay variation in the detection of antinuclear antibodies in the sera of patients with established SLE. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(6): 911-3. [PubMed]
- Bizzaro N. Can solid-phase assays replace immunofluorescence for ANA screening? *Ann Rheum Dis*. 2020;79(3):e32. [Crossref] [PubMed]
- Ulvestad E. Performance characteristics and clinical utility of a hybrid ELISA for detection of ANA. *APMIS*. 2001;109(3):217-22. [Crossref] [PubMed]
- Tozzoli R, Bonaguri C, Melegari A, Antico A, Bassetti D, Bizzaro N, et al. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin Chem Lab Med*. 2013; 51(1):129-38. [Crossref] [PubMed]
- Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev*. 2004;25(2):105-20. [PubMed] [PMC]
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-81. [PubMed]
- Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-86. [PubMed] [PMC]
- van den Hoogen F, Khanna D, Franssen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative ini-
- tiative. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1747-55. [PubMed]
- Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al; International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(1): 35-45. [PubMed] [PMC]
- James OF, Bhopal R, Howel D, Gray J, Burt AD, Metcalf JV, et al. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom? *Hepatology*. 1999;30(2):390-4. [Crossref] [PubMed]
- Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005;22;353(12):1261-73. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006;19;354(3): 313. [Crossref] [PubMed]
- Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al; International Autoimmune Hepatitis Group. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;48(1):169-76. [Crossref] [PubMed]
- Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*. 1960;39(7):1157-75. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Ekins RP. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chim Acta*. 1960;5:453-9. [Crossref] [PubMed]

20. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4-5):435-40. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;26;47(4):846-51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
22. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;16;349(16):1526-33. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Bizzaro N, Tozzoli R, Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1736-44. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Bizzaro N. Autoantibodies as predictors of disease: the clinical and experimental evidence. *Autoimmun Rev.* 2007;6(6):325-33. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto Immun Highlights.* 2017;8(1):9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
26. Bizzaro N. The predictive significance of autoantibodies in organ-specific autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008;34(3):326-31. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183:267-87. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Mahler M, Silverman ED, Schulte-Pelkum J, Fritzler MJ. Anti-Scl-70 (topo-I) antibodies in SLE: myth or reality? *Autoimmun Rev.* 2010;9(11):756-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
29. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapää-Dahlqvist S, et al. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Res Ther.* 2011;22;13(1):R30. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
30. Tozzoli R. The diagnostic role of autoantibodies in the prediction of organ-specific autoimmune diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(5):577-87. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
31. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibodies 2015: from diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention. *Autoimmun Rev.* 2015;14(6):555-63. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
32. Tozzoli R, Kodermaz G, Perosa AR, Tampona M, Zucano A, Antico A, et al. Autoantibodies to parietal cells as predictors of atrophic body gastritis: a five-year prospective study in patients with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmun Rev.* 2010;10(2):80-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
33. Miles LE, Hales CN. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature.* 1968;13;219(5150):186-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Campbell AK, Patel A. A homogeneous immunoassay for cyclic nucleotides based on chemiluminescence energy transfer. *Biochem J.* 1983;15;216(1):185-94. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
35. Lakos G, Norman GL, Mahler M, Martis P, Bentow C, Santora D, et al. Analytical and clinical comparison of two fully automated immunoassay systems for the diagnosis of celiac disease. *J Immunol Res.* 2014;2014:371263. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
36. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. European Society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(1):136-60. Erratum in: *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(4):572. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
37. Bentow C, Lakos G, Rosenblum R, Bryant C, Seaman A, Mahler M, et al. Clinical performance evaluation of a novel, automated chemiluminescent immunoassay, QUANTA Flash CTD Screen Plus. *Immunol Res.* 2015;61(1-2):110-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
38. Bentow C, Lakos G, Martis P, Wahl E, Garcia M, Vi-as O, et al. International multi-center evaluation of a novel chemiluminescence assay for the detection of anti-dsDNA antibodies. *Lupus.* 2016;25(8):864-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
39. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest.* 2001;108(9):1247-52. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
40. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, 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. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
41. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):380-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
42. Somers E, Magder LS, Petri M. Antiphospholipid antibodies and incidence of venous thrombosis in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29(12):2531-6. [[PubMed](#)]
43. Eber T, Chapman J, Shoenfeld Y. Anti-ribosomal P-protein and its role in psychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: myth or reality? *Lupus.* 2005;14(8):571-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
44. Harel M, Shoenfeld Y. Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality? *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1069:322-45. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Gelpi C, Pérez E, Roldan C. Efficiency of a solid-phase chemiluminescence immunoassay for detection of antinuclear and cytoplasmic autoantibodies compared with gold standard immunoprecipitation. *Auto Immun Highlights.* 2014;18;5(2):47-54. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
46. Tozzoli R, Bizzaro N. The clinical autoimmunologist and the laboratory autoimmunologist: the two sides of the coin. *Autoimmun Rev.* 2012;11(10):766-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]