

**IT**

ANA HEp-2

REF FA2500A**IVD****Rx Only**

DESTINAZIONE D'USO

ANA HEp-2 è un test di immunofluorescenza indiretta per il rilevamento qualitativo e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi antinucleo IgG nel siero umano, mediante microscopia a fluorescenza manuale o con il microscopio automatizzato diFine®. La presenza di anticorpi antinucleo può essere utilizzata insieme ad altri test sierologici e riscontri clinici per supportare la diagnosi di lupus eritematoso sistemico e altre malattie reumatiche sistemiche.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il test di immunofluorescenza indiretta (IFA) è stato ampiamente utilizzato per rilevare la presenza di anticorpi antinucleo (ANA) nei sieri di pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) e altre patologie del tessuto connettivo clinicamente simili (1-5). Inoltre, gli ANA possono essere associati a numerose sindromi da lupus indotto da farmaci (6-7) che imitano clinicamente la forma spontanea del LES. La tecnica IFA è stata adattata per il test ANA da diversi ricercatori (8-9), seguendo i metodi di base descritti originariamente da Coons (10).

Gli ANA sono costituiti principalmente da anticorpi IgG; tuttavia, possono essere rilevati anche ANA di tipo IgA e IgM (11). È ormai noto che molte fonti di materiale nucleare possono essere utilizzate come substrato per il test ANA. Sebbene la maggior parte delle ricerche iniziali sugli ANA sia stata condotta utilizzando substrati di sezioni di tessuto epatico o renale di ratto o topo, l'uso di colture cellulari derivate da tessuti embrionali umani o animali ha fornito un'alternativa affidabile e di facile interpretazione.

La linea cellulare HEp-2 deriva da un carcinoma epidermico della laringe umana. L'impiego del substrato di cellule HEp-2 nell'IFA ha aumentato la sensibilità del rilevamento degli autoanticorpi e contribuito alla diagnosi di malattie autoimmuni sistemiche, oltre che alla descrizione di nuove patologie, grazie alla possibilità di rilevare oltre 100 antigeni nel loro nucleo e citoplasma. Esistono diversi pattern di immunofluorescenza nucleare e citoplasmatica. **Il sistema diFine® è stato programmato per suggerire otto pattern ANA comuni. Questi otto pattern, insieme alla loro base di valutazione, possono essere analizzati sia da diFine® che da un lettore manuale come segue:**

1. **Omogeneo (AC-1)** - I pattern di colorazione omogenea o diffusa del nucleo sono coerenti con la presenza di autoanticorpi contro il DNA nativo (nDNA), gli istoni e/o il deossiribonucleoproteina (DNP) (12, 13). I cromosomi delle cellule mitotiche (cellule in divisione) sono indicatori importanti di un pattern omogeneo, poiché si coloreranno come masse di forma irregolare con un bordo esterno colorato più intensamente.
2. **A chiazze (AC-2, AC-4 e AC-5)** - Il pattern a chiazze è il pattern ANA più comunemente osservato. Con gli anticorpi anti-centromero si può osservare un pattern uniforme "a chiazze" in cellule non in divisione. Un pattern a chiazze dense può essere osservato con gli anticorpi contro n-RNP, Sm e SSB/La.
Pattern a chiazze fini, cromosoma-negativo (AC-4): Numerosi punti di fluorescenza piccoli e uniformi sparsi uniformemente nel nucleo. I nucleoli appaiono generalmente non colorati. Le cellule mitotiche possono presentare alcune chiazze nel citoplasma, ma i cromosomi saranno negativi.
Pattern a chiazze grossolane, cromosoma-negativo (AC-5): Punti di fluorescenza di medie dimensioni sono sparsi nei nuclei con margini nucleari distinti. Si possono osservare anche punti di fluorescenza di dimensioni maggiori; tuttavia, sono troppo numerosi e di dimensioni variabili per essere identificati come un pattern nucleolare. I cromosomi nelle cellule mitotiche saranno negativi.
Chiazze fini e dense nucleari (AC-2): Numerose chiazze fini con una distribuzione densa nel nucleo, esclusi i nucleoli. Associato ad anticorpi anti-DFS70, che può verificarsi in individui sani e ha limitate implicazioni di malattia autoimmune. Harmon et al. (17) hanno dimostrato che campioni di siero contenenti anti-SSA/Ro altamente monospecifici hanno dato un pattern di test IF-ANA di chiazze nucleari discrete su un'ampia varietà di cellule umane e nuclei tumorali. Tali campioni di siero con anti-SSA/Ro monospecifici hanno prodotto una colorazione citoplasmatica molto ridotta delle cellule del substrato. È stato descritto un pattern distinto, ampio e variabile di chiazze da 3 a 10 nel nucleo. Questi pazienti con chiazze grandi e variabili presentano sindromi reumatiche indifferenziate con anticorpi IgM anti istone FH-3 (18).
3. **Centromero (AC-3)** - *Chiazze discrete, cromosoma (specificità del centromero) positivo:* I cromosomi saranno positivi nelle cellule mitotiche; infatti, le chiazze discrete saranno raggruppate solo nella massa cromosomica, dimostrando chiaramente le varie fasi della mitosi. Il pattern centromerico è stato riconosciuto come associato alla sindrome CREST, che è una variante più lieve della sclerosi sistemica progressiva (PSS). Il pattern centromerico mostra punti discreti e uniformi di puntini fluorescenti sparsi nel nucleo. Le cellule mitotiche saranno positive, dimostrando un raggruppamento dei centromeri nei cromosomi in disposizioni diverse a seconda dello stadio mitotico.
4. **Nucleolare omogeneo (AC-8)** - Il pattern nucleolare mostra una colorazione omogenea o a chiazze del nucleolo. Questo pattern è spesso associato a una fluorescenza opaca e omogenea nel resto del nucleo. I cromosomi nelle cellule mitotiche sono negativi. Il

pattern nucleolare suggerisce la presenza di autoanticorpi contro PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleofosmina, nucleolina, No55/SC65. La fluorescenza nucleolare appare omogenea, a grumi o a chiazze, a seconda dell'antigene verso cui l'autoanticorpo reagisce. Gli anticorpi anti-nucleo sono presenti soprattutto nei sieri di pazienti affetti da sclerodermia, lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjögren o fenomeno di Raynaud (19).

5. **Puntini nucleari multipli (AC-6)** – Un piccolo numero di puntini nucleari, da 6 a 20, è più comunemente associato alla colangite biliare primaria.
6. **Membrana nucleare (AC-11)** – *Membrana antinucleare (lamine nucleari)*: Il pattern della membrana antinucleare appare come un bordo intorno al **nucleo** e assomiglia al pattern a bordo; tuttavia, si distingue da quest'ultimo per il fatto che lo stadio dei cromosomi in metafase risulta negativo. Questo autoanticorpo è importante da segnalare poiché è riconosciuto come associato a malattie autoimmuni del fegato.
7. **Citoplasma (Ribosomiale) (AC-19)**– Il pattern ribosomiale è caratterizzato da numerose chiazze citoplasmatiche con la massima **concentrazione** intorno al nucleo. Si distingue dal pattern mitocondriale per le chiazze più piccole e la maggiore densità. Il significato del pattern è sconosciuto.
8. **Citoplasmatico (mitocondriale) (AC-21)** – Il pattern è caratterizzato da numerose chiazze citoplasmatiche con la massima concentrazione nell'area peri-nucleare. Il pattern può essere osservato nelle cellule in interfase e in quelle mitotiche. Il significato clinico dell'AMA è più **frequentemente** un'associazione con la colangite biliare primaria, soprattutto quando l'AMA ha un titolo elevato.

I pattern aggiuntivi elencati di seguito non possono essere identificati con diFine® e devono essere interpretati da un operatore esperto, in conformità agli standard di nomenclatura ICAP.

Pattern nucleari aggiuntivi

1. **Pattern dell'antigene nucleare delle cellule proliferanti (PCNA) (AC-13)**: *Il pattern dell'antigene nucleare proliferante delle cellule (PCNA) si osserva come una macchiatura nucleare fine o grossolana nel 30-60% delle cellule in interfase, e una colorazione negativa della regione cromosomica delle cellule mitotiche. Il PCNA è specifico per i pazienti con lupus eritematoso sistemico (SLE), ma non viene rilevato in altre malattie del tessuto connettivo.*
2. **Pattern dei centrioli (AC-24)**: *Il pattern dei centrioli è caratterizzato da due punti distinti di fluorescenza nel nucleo delle cellule mitotiche o da un punto distinto di fluorescenza nella cellula a riposo. Il significato di questo pattern non è noto; tuttavia, è stato osservato nella PSS.*
3. **Pattern delle fibre del fuso (AC-25)**: *Cromosoma positivo*: Il pattern a fibre di fuso è unico nelle cellule in fase di mitosi, dove solo l'apparato del fuso è fluorescente. Questo pattern ha un aspetto a "ragnatela" che si estende dal centriolo ai centromeri. Il pattern è suggestivo di autoanticorpi contro i microtubuli e il suo significato non è chiaro.
4. **Pattern del corpo intermedio (AC-27)**: Il pattern del corpo intermedio è una regione densamente colorata vicino al solco di clivaggio delle cellule in telofase, cioè nell'area in cui le due cellule figlie si separano. Il significato clinico del pattern è sconosciuto; tuttavia, il pattern è stato riconosciuto in pazienti selezionati con sclerosi sistemica.

Pattern citoplasmatici aggiuntivi

1. **Citoplasmatica fibrillare lineare-actina simile (AC-15)**: Il pattern citoscheletrico è caratterizzato da un distinto aspetto "a ragnatela" o fibroso in tutta la cellula. È stato segnalato come associato a una malattia epatica autoimmune (anti-muscolo liscio).
2. **Pattern lisosomiale (AC-18)**: Il pattern lisosomiale si presenta come alcune chiazze discrete sparse nel citoplasma. Il pattern si osserva nel *citoplasma* delle cellule in interfase e mitotiche. Il significato clinico è sconosciuto.
3. **Polare/Golgi-like (AC-22)**: Il pattern dell'apparato di Golgi è caratterizzato da una colorazione citoplasmatica positiva che si concentra su un solo lato della regione perinucleare. Il significato clinico è incerto, ma in letteratura è stata riportata un'associazione con il LES e la sindrome di Sjögren.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test ANA HEP-2 è progettato per rilevare la presenza di ANA circolanti nei sieri umani. Il test impiega un substrato di coltura cellulare e anticorpo di capra anti-immunoglobuline umane regolate per un uso ottimale e privo di colorazioni di fondo non specifiche. La reazione avviene in due fasi:

1. La prima fase consiste nell'incubazione del campione, dove gli ANA eventualmente presenti nel campione del paziente possono legarsi al substrato cellulare, formando un complesso antigene-anticorpo. Gli altri componenti del siero vengono successivamente lavati via.
2. La fase due è l'incubazione del coniugato, in cui l'immunoglobulina antiumana marcata con FITC può reagire con qualsiasi immunoglobulina umana che si è legata al substrato durante l'incubazione del campione. In questo modo si forma un complesso antigene-anticorpo-coniugato stabile nel punto in cui l'anticorpo iniziale del paziente si è legato al substrato cellulare. Il coniugato in eccesso viene successivamente lavato via. I risultati del test possono essere visualizzati con un microscopio a fluorescenza adeguatamente attrezzato o con diFine®. Eventuali reazioni positive appariranno come una colorazione fluorescente verde mela all'interno della cellula. Se il campione non presenta ANA specifici, non vi sarà alcuna colorazione nucleare distinta della cellula.

REAGENTI

Materiali forniti:

Ogni kit contiene i seguenti componenti in quantità sufficiente per eseguire il numero di test indicato sull'etichetta della confezione.

NOTA: Il coniugato e i controlli contengono una combinazione di Proclin (0,05% v/v) e Sodio Azide (<0,1% w/v) come conservanti.

Zorba-NS® contiene Sodio Azide (<0,1% p/v) come conservante.

SLD	1	ANA HEp-2 Vetrini di substrato: Venti vetrini da 12 pozzetti con tampone assorbente e sacchetto essiccante.
CONJ	2	Coniugato: Anticorpo di capra anti-immunoglobuline umane (polivalente) marcata con isotiocianato di fluoresceina (FITC). Contiene tampone fosfato con BSA e contro stampa. Tre flaconi ambrati da 3,5 mL. Pronti all'uso.
CTRL +	3	ANA (omogenea) Controllo Positivo (Siero umano): Produce una colorazione positiva verde mela, omogenea, del nucleo cellulare. Una fiala da 0,5 mL, con tappo rosso. Pronta all'uso.
CTRL -	4	Controllo Negativo (Siero umano): Non produce alcuna colorazione nucleare rilevabile. Una fiala da 0,5 mL, con tappo verde. Pronta all'uso.
DIL SPE	5	Diluyente per campioni Zorba-NS®: Quattro flaconi da 25 mL, con tappo verde. Pronti all'uso.
BUF PBS	6	Fosfato-salino tamponato (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Svuotare il contenuto di ogni confezione di tampone in un litro di acqua distillata o deionizzata. Mescolare fino a sciogliere completamente tutti i sali. Quattro bustine, sufficienti per preparare 4 litri.
MNTMED	7	Mezzo di montaggio (glicerolo tamponato): Una fiala da 3,0 mL con tappo bianco e contagocce.
COVGLS	8	Coprivetrini. Confezione da dodici, 24 x 60 mm, spessore #1.

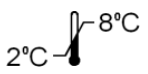
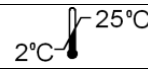
NOTE:

1. I seguenti componenti non dipendono dal numero di lotto del kit e possono essere utilizzati in modo intercambiabile con i prodotti IFA di Sebia, a condizione che i numeri di prodotto siano identici: Zorba-NS® (Codice prodotto: FA025S), Mezzo di montaggio (Codice prodotto: FA0009S), PBS (Codice prodotto: 0008S), e Coprivetrino (Codice prodotto: S8008)

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Microscopio automatico di Fine® o un microscopio a fluorescenza adeguatamente attrezzato.
2. Pipettatori in grado di pipettare volumi tra 10 e 200 µL.
3. Puntali per pipette monouso.
4. Piccole provette, piastre di diluizione o simili per preparare le diluizioni dei campioni.
5. Lavavetrini, o una vasca di colorazione con una piastra di agitazione magnetica per lavare i vetrini tra le fasi di incubazione.
6. Acqua distillata o deionizzata.
7. Cilindro graduato da 1 litro.
8. Timer da laboratorio per monitorare i tempi di incubazione.
9. Bacinella di smaltimento, guanti monouso e disinfettante (es.: candeggina domestica al 10% - 0,5% di ipoclorito di sodio).

INDICAZIONI DI CONSERVAZIONE

	Kit sigillato.
	Mezzo di montaggio, Coniugato, Vetrini, Zorba-NS®, Vetrini*, Controlli positivi e negativi.
	PBS reidratato (stabile per 30 giorni).
	Pacchetti di tampone fosfato salino (PBS).

*Una volta aperti, i vetrini devono essere utilizzati il giorno stesso. Gli altri reagenti pronti all'uso, a eccezione del PBS, possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata.

PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Seguire le normali precauzioni durante la manipolazione dei reagenti di laboratorio. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Indossare abbigliamento protettivo adeguato, guanti e protezione per occhi e viso. Non respirare i vapori. Smaltire i rifiuti seguendo tutte le normative locali, statali e federali.
3. I pozzetti del vetrino non contengono organismi vitali. Tuttavia, considerare il vetrino come **materiali potenzialmente a rischio biologico** e trattarlo di conseguenza.
4. I controlli sono **materiali potenzialmente a rischio biologico**. I materiali di partenza da cui sono stati ricavati questi prodotti sono risultati negativi all'antigene HIV-1, all'HBsAg e agli anticorpi contro HCV e HIV con metodi di analisi approvati. Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi può offrire una garanzia completa dell'assenza di agenti infettivi, questi prodotti devono essere manipolati al livello di biosicurezza 2, come raccomandato per qualsiasi siero umano potenzialmente infettivo o campione di sangue nel manuale del Center for Disease Control/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (edizione attuale) e nello Standard OSHA per i patogeni trasmessi per via ematica (20).
5. Il rispetto dei tempi e della temperatura di incubazione indicati è essenziale per ottenere risultati accurati. **Tutti i reagenti devono essere lasciati raggiungere la temperatura ambiente (20 - 25°C) prima di iniziare il test.** Restituire immediatamente i reagenti non utilizzati nei loro contenitori originali e seguire le indicazioni per la conservazione.
6. Un lavaggio improprio potrebbe causare risultati falsi positivi o falsi negativi. Assicurarsi di minimizzare la quantità di PBS residuo, tamponando, prima di aggiungere il coniugato. Non permettere che i pozzetti si asciughino tra le incubazioni.
7. Il coniugato e i controlli contengono Azide di sodio a una concentrazione di <0,1% (p/v). È stato riferito che l'azide di sodio può formare azidi di piombo o rame negli impianti idraulici di laboratorio, il che potrebbe causare esplosioni se colpiti. Per prevenire ciò, sciacquare accuratamente il lavandino con acqua dopo aver smaltito soluzioni contenenti azide di sodio. Questo conservante potrebbe essere tossico se ingerito.
8. La diluizione o adulterazione di questi reagenti potrebbe generare risultati errati.
9. Non pipettare mai con la bocca. Evitare il contatto dei reagenti e dei campioni del paziente con la pelle e le mucose.
10. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti. Risultati errati potrebbero verificarsi.
11. La contaminazione incrociata dei reagenti e/o dei campioni potrebbe causare risultati errati.
12. Il vetro riutilizzabile deve essere lavato e sciacquato accuratamente per rimuovere tutti i detersivi.
13. Evitare schizzi o la formazione di aerosol.
14. Non esporre i reagenti alla luce intensa durante la conservazione o l'incubazione.
15. Lasciare che il pacchetto dei vetrini si equilibri alla temperatura ambiente prima di aprire la busta protettiva per proteggere i pozzetti e la carta assorbente dalla condensazione.
16. Raccogliere la soluzione di lavaggio in un contenitore di smaltimento. Trattare la soluzione di scarto con un disinfettante (ad esempio: candeggina domestica al 10% - 0,5% di Ipoclorito di Sodio). Evitare l'esposizione dei reagenti ai vapori di candeggina.
17. Non esporre nessuno dei reagenti reattivi a soluzioni contenenti candeggina o a forti odori derivanti da soluzioni contenenti candeggina. Piccole tracce di candeggina (Ipoclorito di Sodio) potrebbero distruggere l'attività biologica di molti dei reagenti reattivi in questo sistema di test.
18. Non applicare pressione alla busta dei vetrini. Ciò potrebbe danneggiare il substrato.
19. I componenti di questo sistema di test sono abbinati per ottenere la massima sensibilità e riproducibilità. I reagenti di altri produttori non devono essere scambiati. Seguire attentamente le istruzioni nel foglio illustrativo.
20. I componenti non aperti/aperti sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta, a condizione che vengano seguite scrupolosamente le condizioni di conservazione raccomandate. Non utilizzare oltre la data di scadenza. Non congelare.
21. La colorazione di contrasto blu di Evans è un potenziale cancerogeno. Se viene a contatto con la pelle, sciacquare con acqua. Smaltire secondo le normative locali.
22. Non lasciare che i vetrini si asciughino durante la procedura. A seconda delle condizioni di laboratorio, potrebbe essere necessario mettere i vetrini in una camera umida durante le incubazioni.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

1. Eseguire la raccolta del campione in conformità con il documento CLSI M29: Protezione dei lavoratori di laboratorio dalle malattie infettive acquisite per lavoro. Nessun metodo di test conosciuto può garantire completamente che i campioni di sangue umano non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i derivati del sangue devono essere considerati potenzialmente infettivi.
2. Utilizzare solo siero prelevato di recente e correttamente refrigerato ottenuto mediante procedure di venipuntura aseptica approvate per questo test (30, 31). Non devono essere aggiunti anticoagulanti o conservanti. Evitare di utilizzare siero emolizzato, lipemico o contaminato battericamente.
3. Conservare il campione a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non viene eseguito entro 8 ore, il siero può essere conservato tra 2 - 8°C, per un massimo di 48 ore. Se si prevede un ritardo nel test, conservare il siero a -20°C o inferiore. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo che possono causare perdita di attività degli anticorpi e dare risultati errati. È responsabilità del laboratorio utilizzare tutti i riferimenti disponibili e/o i propri studi per determinare i criteri di stabilità per il proprio laboratorio (38).

PROCEDURA DEL TEST

1. Rimuovere i vetrini e gli altri componenti del kit dalla conservazione in frigorifero e lasciarli riscaldare a temperatura ambiente (20 - 25°C). Aprire la busta protettiva e rimuovere i vetrini. **Non applicare pressione sui lati piatti della busta protettiva.**
2. Identificare ogni pozzetto con il siero del paziente e i controlli appropriati. **NOTA: I controlli sono destinati ad essere usati non diluiti.** Preparare una diluizione (ad esempio 10µL di siero + 390µL di Zorba-NS®) di ciascun siero del paziente.

Opzioni di diluizione:

- a. Gli utenti possono titolare il controllo Positivo fino all'endpoint per fungere da controllo semiquantitativo (1+ minimamente reattivo). In questi casi, il controllo deve essere diluito due volte in PBS, **non in Zorba-NS®**. Una diluizione finale è stabilita e stampata sulla fiala del controllo Positivo (± una diluizione). Si noti che, a causa delle variazioni all'interno del laboratorio (apparecchiature, ecc.), ogni laboratorio deve stabilire il proprio titolo finale previsto per ogni lotto di controllo Positivo.
 - b. Quando si titolano i campioni dei pazienti, le diluizioni iniziali devono essere preparate in Zorba-NS® e tutte le diluizioni successive devono essere preparate solo in PBS. **Le titolazioni non devono essere preparate in Zorba-NS®.**
3. Con un dispensatore adeguato (elencato sopra), distribuire 20 - 40µL di ciascun controllo e di ciascun siero diluito del paziente nei pozzetti appropriati.
 4. Incubare i vetrini a temperatura ambiente (20 - 25°C) per 35 ± 5 minuti.
 5. Risciacquare delicatamente i vetrini con PBS. **Non indirizzare un getto di PBS nei pozzetti di test.**
 6. Lavare i vetrini per due intervalli di 5 minuti, cambiando PBS tra i lavaggi. I vetrini possono rimanere in ammollo durante ciascun lavaggio per un massimo di cinque minuti. **NOTA: per chi utilizza lavatrici automatiche, impostare la lavatrice per lavare ogni pozzetto tre volte con un'immersione da zero a cinque minuti.**
 7. Rimuovere i vetrini dal PBS uno alla volta. Invertire il vetrino e collegare i pozzetti ai fori dei tamponi in dotazione. Tamponare il vetrino strofinando il retro con un panno assorbente. **ATTENZIONE:** posizionare il tampone e il vetrino su una superficie dura e piana. La tamponatura su carta assorbente può distruggere la matrice del vetrino. **Non lasciare che i vetrini si asciughino durante la procedura di test.**
 8. Aggiungere 20-40 µL di coniugato in ogni pozzetto.
 9. Ripetere i passaggi da 4 a 7.
 10. Applicare 3-5 gocce di mezzo di montaggio su ogni vetrino (tra i pozzetti) e applicare il coprivetrino. In alternativa, si può applicare una piccola quantità di mezzo di montaggio in ogni pozzetto e applicare il coprivetrino. Il mezzo di montaggio deve essere aggiunto entro due ore dal completamento dell'ultimo ciclo di lavaggio.
 11. Esaminare immediatamente i vetrini con un microscopio a fluorescenza appropriato. Questa operazione può essere eseguita manualmente con un microscopio a fluorescenza tradizionale o con diFine®. Se si utilizza diFine®, consultare il manuale dello strumento per le istruzioni operative. **Si raccomanda di esaminare i vetrini il giorno stesso del test.**

NOTE:

- a. **Se non è possibile visionare immediatamente i vetrini, questi possono essere conservati fino a 48 ore a 2-8°C.**
- b. **Se i vetrini non saranno esaminati entro 48 ore, sigillare il coprivetrino con uno smalto trasparente e conservarlo in frigorifero.**

CONTROLLO QUALITÀ

1. Ogni volta che il test viene eseguito, devono essere inclusi un controllo Positivo e un controllo Negativo.
2. Si raccomanda di leggere i controlli prima di valutare i campioni da analizzare. Se i controlli non appaiono come descritto, i risultati potrebbero non essere validi.
 - a. Controllo Negativo - caratterizzato dall'assenza di fluorescenza specifica e da una colorazione di fondo rossa, o verde opaca, di tutte le cellule dovuta alla controcolorazione.
 - b. Controllo Positivo (pattern omogeneo) - caratterizzato da una fluorescenza verde mela. Il pattern di colorazione omogeneo è una colorazione uniforme e diffusa dell'intero nucleo.
3. Possono essere testati ulteriori controlli secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.

NOTE:

- a. **È possibile che si verifichi un intrappolamento non specifico dei reagenti. È importante lavare adeguatamente i vetrini per eliminare i risultati falsi positivi.**
- b. **L'intensità della fluorescenza osservata può variare a seconda del microscopio e del sistema di filtri utilizzato.**
- c. **Con alcuni sieri umani è possibile osservare una colorazione non nucleare del substrato cellulare.**

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. L'interpretazione dei risultati dipende dal pattern osservato, dal titolo dell'autoanticorpo e dall'età del paziente. Gli anziani, soprattutto le donne, sono inclini a sviluppare autoanticorpi a basso titolo (<1:80) in assenza di malattia autoimmune clinica. L'esperienza suggerisce che una diluizione di 1:40 è una buona diluizione per lo screening degli ANA. Risultati positivi a basso titolo possono verificarsi in persone apparentemente sane; pertanto, i risultati degli ANA devono sempre essere interpretati alla luce della presentazione clinica complessiva del paziente.
2. Titoli inferiori a 1:40 sono considerati negativi.
3. Test positivo: Una reazione positiva è la presenza di un qualsiasi pattern di colorazione nucleare verde mela osservato a una diluizione 1:40 sulla base di una scala di intensità di colorazione da 1+ a 4+. 1+ è considerato una reazione debole e 4+ una reazione forte. Tutti

i sieri positivi a 1:40 devono essere titolati alla diluizione endpoint. A tal fine, si eseguono diluizioni seriali 1:40, 1:80, 1:160, ecc. di tutti i sieri positivi. Il titolo finale è la diluizione più alta che produce una reazione positiva 1+.

4. Pattern omogenei con accentuazione periferica sono frequentemente riscontrati nei sieri di pazienti con LES.

	Malattia più frequentemente riscontrata in	Referenza
Omogeneo: Alto titolo Basso titolo	LES Artrite reumatoide e altre malattie	(3, 8, 9, e 16) (1)
Centromero	Sindrome CREST variante della PSS	(27)
Punteggiata	Sclerodermia, sindrome di Raynaud, sindrome di Sjögren, Malattia mista del tessuto connettivo	(34 - 36)
Nucleolare	Sclerodermia	(37)
Periferia	LES	(2, 8, 9, e 16)

LIMITAZIONI DEL TEST

1. L'ANA HEP-2 è un ausilio diagnostico di laboratorio e i suoi risultati non sono di per sé diagnostici. Gli ANA positivi possono essere riscontrati in individui apparentemente sani. È quindi fondamentale che i risultati degli ANA siano interpretati insieme ad altri test sierologici e ai risultati clinici.
2. I pazienti affetti da LES sottoposti a terapia steroidea possono avere risultati negativi (40).
3. Molti farmaci comunemente prescritti possono indurre gli ANA (6, 7).
4. Un pattern autoanticorpale può oscurare parzialmente o completamente le caratteristiche diagnostiche dell'altro. In questi casi, è necessario titolare il siero.
5. Con questo prodotto non si intende stabilire un'associazione definitiva tra il pattern di fluorescenza nucleare e uno stato patologico specifico.

RISULTATI ATTESI

Il valore atteso nella popolazione normale è negativo o inferiore a 1:40. Tuttavia, individui apparentemente sani possono contenere ANA nei loro sieri (36). Questa percentuale aumenta con l'invecchiamento, in particolare nella settima decade di vita.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

NOTA: Quando sono state stabilite le caratteristiche di prestazione ANA HEP-2, i vetrini sono stati interpretati utilizzando tre metodi diversi come descritto di seguito:

Metodo di Interpretazione:
Metodo A. Il Metodo A è un metodo di interpretazione completamente manuale. È stato eseguito utilizzando un microscopio fluorescente tradizionale, dotato di obiettivi e oculari. La determinazione del risultato qualitativo è stata effettuata da tecnici di laboratorio qualificati.
Metodo B. Il metodo B è stato eseguito scansionando i vetrini con dIFine® e successivamente il risultato qualitativo è stato interpretato da un tecnico di laboratorio, utilizzando l'immagine digitale (qualitativa e di pattern, se positiva) visibile sul monitor del computer.
Metodo C. Il Metodo C è il risultato proposto previsto da dIFine®; il Metodo C predice il risultato qualitativo e, se positivo, il pattern se è uno degli otto pattern che il sistema è stato programmato per richiamare. Se il Metodo C è "UNC" (incerto), significa che il livello di fluorescenza misurato da dIFine® è al limite tra positivo e negativo. Il Metodo C deve essere "validato" o accettato dal tecnico di laboratorio, oppure modificato o completamente invalidato. Per scopi di questo studio e dei dati presentati di seguito, il Metodo C è registrato "COSÌ COM'È" senza alcuna modifica da parte del tecnico di laboratorio. Pertanto, viene presentato solo a scopo informativo.

1. Studi sulle Prestazioni Analitiche:

a. Linearità:

I campioni fortemente positivi sono stati identificati per ciascuno dei seguenti otto pattern ANA: Omogeneo, a chiazze, centromero, nucleare, punti nucleari, membrana nucleare, citoplasmatico (ribosomiale) e citoplasmatico (mitocondriale). Ciascun campione è stato analizzato a 1:40 e titolato a 1:20480 e interpretato con i tre metodi sopra indicati. Questo studio è stato condotto internamente a ZEUS Scientific. I punti finali per ciascun campione e ciascun metodo sono presentati di seguito:

Campione	Metodo A	Metodo B	Metodo C
Omogeneo	1:1280	1:1280	1:1280
A chiazze	1:5120	1:5120	1:2560
Centromero	1:5120	1:5120	1:5120
Nucleolare	1:2560	1:5120	1:2560
Puntini nucleari	1:640	1:640	1:640
Membrana nucleare	1:2560	1:2560	1:2560
Citoplasma (Ribosomiale)	1:320	1:320	1:320
Citoplasma (mitocondriale)	1:10240	1:10240	1:10240

Riepilogo: nel 100% dei casi, il pattern richiamato era quello previsto e in concordanza indipendentemente dal metodo di interpretazione. Allo stesso modo, la determinazione dell'endpoint era quella prevista ± una diluizione per il 100% delle determinazioni, indipendentemente dal metodo di interpretazione.

b. Riproducibilità da lotto a lotto:

Un campione moderatamente positivo e un campione fortemente positivo sono stati identificati per ciascuno dei seguenti otto pattern ANA: omogeneo, a chiazze, centromero, nucleare, punti nucleari, membrana nucleare, citoplasmatico (ribosomiale) e citoplasmatico (mitocondriale). Inoltre, sono stati inclusi nove campioni negativi, portando il gruppo totale a 25 campioni. Questo gruppo di 25 campioni è stato analizzato su tre diversi lotti di ANA HEP-2 e interpretato con i tre metodi sopra indicati. Inoltre, tutti i sedici membri positivi sono stati titolati fino all'endpoint e interpretati con tutti e tre i metodi.

Risultati:

- i. Concordanza qualitativa:** C'è stata una concordanza del 100% nei risultati qualitativi alla diluizione di screening di tutti i 25 campioni in tutti e tre i lotti di kit, e c'è stata una concordanza del 100% in tutti e tre i metodi di interpretazione, indipendentemente dal lotto del kit di reagenti.
- ii. Concordanza sul titolo endpoint:** Tutti i 16 campioni positivi hanno mostrato gli stessi titoli finali, con una variazione di ± una diluizione, indipendentemente dal lotto del reagente o dal metodo di interpretazione.
- iii. Concordanza del pattern:** Per le diluizioni che hanno dato un risultato positivo in tutti e tre i metodi di interpretazione, c'è stata una concordanza di pattern del 100% per il lotto uno e il lotto due per tutti e tre i metodi di interpretazione. Per il terzo lotto c'è stata una concordanza di pattern del 100% tra il metodo A e il metodo B, con un campione omogeneo medio positivo come unica anomalia nel confronto tra il metodo C e i metodi A e B.

c. Studio della gamma di riferimento:

Sono stati acquisiti centottanta campioni casuali di siero da donatori sani nel nord-est degli Stati Uniti. I campioni sono stati analizzati alla diluizione di screening 1:10 e interpretati con tutti e tre i metodi. Tutti i campioni che hanno dato un risultato positivo a 1:40 sono stati titolati e interpretati con tutti e tre i metodi. I risultati del test di screening sono riassunti di seguito:

Metodo di interpretazione	Numero di positivi	% di positivi	Numero di negativi	% di negativi	Numero di incerti	% di incerti
A	19	10,56	161	89,44	NA	NA
B	19	10,56	161	89,44	NA	NA
C	14	7,78	152	84,44	14	7,78

d. Studio di Ripetibilità su Venti Giorni:

Sono stati identificati un campione a bassa positività (endpoint ~1:40), un campione a media positività (endpoint ~1:160-1:320) e un campione a forte positività (endpoint > 1:640) per ciascuno dei seguenti otto pattern ANA: Omogeneo, a chiazze, centromero, nucleolare, punti nucleari, membrana nucleare, citoplasmatico (ribosomiale) e citoplasmatico (mitocondriale). È stato incluso anche un campione ANA negativo, per un totale di 25 campioni. Questi 25 campioni sono stati analizzati (diluizione di screening 1:40) presso ZEUS Scientific in triplo, in dieci giorni diversi, producendo 30 risultati per campione. I vetrini sono stati interpretati con tutti e tre i metodi.

Per la valutazione all'interno del metodo, i risultati della concordanza qualitativa e della concordanza di pattern sono illustrati di seguito: c'è stata una concordanza qualitativa del 100% in tutti i campioni letti con i metodi A e B. Per il metodo C, 22 campioni su 25 hanno mostrato una concordanza qualitativa del 100%; i campioni omogenei poco positivi, nucleolari poco positivi e con membrana nucleare poco positiva non hanno avuto una concordanza qualitativa completa. Inoltre, è stata riscontrata una concordanza di pattern del 100% nell'ambito dei metodi A e B. Per il metodo C, è stata riscontrata una concordanza di pattern del 100% per 21 campioni su 25, con valori anomali osservati nei campioni omogenei a bassa positività, nucleolari a bassa positività, a membrana nucleare a bassa positività e a membrana nucleare ad alta positività.

Concordanza dei Risultati Qualitativi all'Interno del Metodo

Campione	Concordanza Metodo A (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)
Omogeneo Basso Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	76,7% (59,1 – 88,2%)
Omogeneo Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Omogeneo Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

Campione	Concordanza Metodo A (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)
Centromero Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	96,7% (83,3 – 99,4%)
Nucleare Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Puntini nucleari Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Puntini nucleari Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Puntini nucleari Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Negativo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

Concordanza dei risultati del pattern all'interno del metodo (Tecnico 2)

Campione	Concordanza Metodo A (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)
Omogeneo Basso Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	73,3% (55,6 – 85,8%)
Omogeneo Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Omogeneo Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

Campione	Concordanza Metodo A (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)
A chiazze Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	96,7% (83,3 – 99,4%)
Nucleare Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	86,67% (70,3 – 94,7%)
Membrana nucleare Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	96,7% (83,3 – 99,4%)
Puntini nucleari Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Puntini nucleari Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Punti nucleari Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

Per quanto riguarda la concordanza tra i metodi, è stata riscontrata una concordanza qualitativa e di pattern del 100% tra il metodo A e il metodo B. Tuttavia, solo 22 campioni su 25 hanno mostrato una concordanza qualitativa del 100% nel confronto tra il metodo B e il metodo C e tra il metodo A e il metodo C; i campioni discordanti erano i campioni omogenei poco positivi, nucleolari poco positivi e con membrana nucleare poco positiva. Inoltre, solo 21 campioni su 25 hanno mostrato una concordanza di pattern del 100% nei confronti tra il Metodo B e il Metodo C e il Metodo A e il Metodo C; i campioni discordanti erano quelli omogenei a bassa positività, quelli nucleolari a bassa positività, quelli a membrana nucleare a bassa positività e quelli a membrana nucleare ad alta positività.

Concordanza dei Risultati Qualitativi tra i Metodi

Campione	Concordanza Metodo A vs Metodo B (95% CI)	Concordanza Metodo A vs Metodo C (95% CI)	Concordanza Metodo B vs Metodo C (95% CI)
Omogeneo Basso Positivo	100% (88,7 – 100%)	76,67% (59,1 – 88,2%)	76,67% (59,1 – 88,2%)
Omogeneo Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Omogeneo Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	96,67% (83,3 – 99,4%)	96,67% (83,3 – 99,4%)
Nucleare Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	90% (74,4 – 96,5%)
Membrana nucleare Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Puntini nucleari Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Puntini nucleari Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Punti nucleari Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Negativo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi

Campione	Concordanza Metodo A vs Metodo B (95% CI)	Concordanza Metodo A vs Metodo C (95% CI)	Concordanza Metodo B vs Metodo C (95% CI)
Omogeneo Basso Positivo	100% (88,7 – 100%)	73,3% (55,6 – 85,9%)	73,3% (55,6 – 85,9%)
Omogeneo Medio positivo	100% (88,65 – 100%)	100% (88,65 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Omogeneo Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
A chiazze Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Medio positivo	100% (88,65 – 100%)	100% (88,65 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centromero Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	96,7% (83,3 – 99,4%)	96,7% (83,3 – 99,4%)
Nucleare Medio positivo	100% (88,65 – 100%)	100% (88,65 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondriale Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	86,7% (70,3 – 94,7)	86,7% (70,3 – 94,7%)
Membrana nucleare Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana nucleare Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	96,7% (83,3 – 99,4%)
Puntini nucleari Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Puntini nucleari Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Punti nucleari Alto positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Basso positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Medio positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribosomiale Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

e. Studio di Riproducibilità su Cinque Giorni e Multi-Sito:

Sono stati identificati un campione a bassa positività (endpoint ~1:40), un campione a media positività (endpoint ~1:160 - 1:320) e un campione a forte positività (endpoint > 1:640) per ciascuno dei seguenti otto pattern ANA: Omogeneo, a chiazze, centromero, nucleolare, punti nucleari, membrana nucleare, citoplasmatico (ribosomiale) e citoplasmatico (mitocondriale). È stato incluso anche un campione ANA negativo, per un totale di 25 campioni. Questi 25 campioni sono stati analizzati (diluizione di screening 1:40) in triplo, due volte al giorno in cinque giorni diversi e in tre laboratori diversi, producendo 30 risultati per campione, per sede. I vetrini sono stati interpretati con tutti e tre i metodi. In ogni sito, il Metodo A e il Metodo B sono stati interpretati da due diversi tecnici di laboratorio. I risultati della concordanza qualitativa e della concordanza dei pattern sono illustrati di seguito:

i. Concordanza dei risultati qualitativi complessivi

- a. All'interno del Metodo:** La concordanza qualitativa all'interno del metodo per i metodi A e B è stato del 100% per tutti e tre i siti e tutti i tecnici. Per il metodo C, la concordanza è stata del 100% per 24 dei 25 campioni in tutti i siti e per tutti i tecnici: un campione a bassa positività della membrana nucleare è stato l'unico campione discrepante nel sito 2.
- b. Tra metodi:** C'è stata una concordanza qualitativa del 100% per tutti i 25 campioni tra il Metodo A e il Metodo B e tra il Metodo A e il Metodo C. In particolare, c'è stata una concordanza qualitativa del 100% tra il Metodo B e il Metodo C per 24 dei 25 campioni, con il campione a bassa positività per la membrana nucleare nel sito 2 che rappresenta un'anomalia.

ii. Concordanza dei Risultati dei Pattern

- a. All'interno del Metodo:** La concordanza dei pattern all'interno del metodo per i metodi A e B è stata del 100% per tutti e tre i siti e tutti i tecnici. Per il metodo C, la concordanza è stata del 100% per 24 dei 25 campioni, con l'unico campione anomalo a metà del centromero.
- b. Tra metodi:** Per tutti i 25 campioni c'è stata una concordanza del 100% tra il Metodo A e il Metodo B per tutti i siti e tutti i tecnici. Per il Metodo A rispetto al Metodo C, c'erano due campioni discordanti: un campione centromerico medio nel sito 1 e un campione di membrana nucleare bassa nel sito 2. Analogamente, per il Metodo B rispetto al Metodo C, vi erano due campioni discordanti: un campione centromero medio nel sito 1 e un campione di membrana nucleare bassa nel sito 2.

f. Studio di Interferenza:

Sono stati identificati un campione a media positività (da ~1:160 a 1:320 endpoint) e un campione a forte positività (> 1:640 endpoint) per ciascuno dei seguenti otto pattern ANA: Omogeneo, a chiazze, centromero, nucleolare, punti nucleari, membrana nucleare, citoplasmatico (ribosomiale) e citoplasmatico (mitocondriale). È stato incluso anche un campione ANA negativo, per un totale di 17 campioni. Questi 17 campioni sono stati sottoposti a spike con due diverse concentrazioni (spike basso e spike alto) di dodici diversi possibili interferenti, come indicato nella tabella seguente. Tutti i campioni sono stati valutati con l'ANA HEp-2 e interpretati con i tre metodi sopra indicati.

Interferente	Concentrazioni di test interferenti	
	Bassa	Alta
Intralipidi	3 mg/mL	7,50 mg/mL
Colesterolo	1,5 mg/mL	2,5 mg/mL
Albumina	35 mg/1mL	50 mg/1mL
Ibuprofene	0,5 mg/mL	2 mg/mL
Prednisone	0,2 mg/mL	0,8 mg/mL
Idrossiclorochina	0,006 mg/mL	0,2 mg/mL
Simvastatina	4 ug/mL	20 ug/mL
Ciclofosfamide	1 mg/mL	4 mg/mL
Fattore reumatoide	200 U/mL	400 U/mL
Emoglobina	100 mg/mL	200 mg/mL
Trigliceridi	1,5 mg/mL	5 mg/mL
Bilirubina	0,01 mg/mL	0,15 mg/mL

Risultati: Per i metodi A e B, né la concordanza qualitativa né il pattern risultante sono stati influenzati dall'aggiunta dei possibili interferenti. Il metodo C ha dato un risultato incerto in un campione di membrana nucleare poco positivo quando è stato addizionato di albumina. Pertanto, si può concludere che i risultati dell'ANA HEp-2 non presentano un rischio significativo di risultati errati dovuti alla presenza degli interferenti testati.

Un secondo studio di interferenza è stato condotto concentrandosi sul valore soglia del test e includendo alcuni potenziali interferenti aggiuntivi. Sono stati selezionati campioni per ciascuno degli otto pattern ANA (Omogeneo, A chiazze, Centromerico, Nucleolare, Punti Nucleari, Membrana Nucleare, Citoplasmatico (Ribosomiale) e Citoplasmatico (Mitocondriale)) che mostravano un titolo finale compreso tra 1:40 e 1:80 (vicino al valore soglia del test), oltre a un campione negativo per ANA. Questi nove campioni sono stati arricchiti con due diverse concentrazioni degli interferenti elencati di seguito.

Interferente	Concentrazioni di test interferenti	
	Bassa	Alta
Bilirubina (non coniugata)	0,02 mg/mL	0,15 mg/mL
Colesterolo (totale)	1,5 mg/mL	2,2 mg/mL
Trigliceridi	1 mg/mL	2,5 mg/mL
Albumina	35 mg/mL	52 mg/mL
Emoglobina	100 mg/mL	200 mg/mL
Intralipidi	2,0 mg/mL	20 mg/mL
Fattore reumatoide	200 U/mL	400 mg/mL
Ciclofosfamide	0,183 mg/mL	0,549 mg/mL
Ibuprofene	0,073 mg/mL	0,219 mg/mL
Idrossiclorochina	0,006 mg/mL	0,024 mg/mL
Simvastatina	0,0000277 mg/mL	0,000083 mg/mL
Prednisone	0,000033 mg/mL	0,000099 mg/mL
Azatioprina	0,00086 mg/mL	0,00258 mg/mL
Diltiazem	0,0003 mg/mL	0,0009 mg/mL
Micofenolato mofetile	0,012 mg/mL	0,048 mg/mL
Rituximab	0,5 mg/mL	2 mg/mL
Belimumab	2 mg/mL	8 mg/mL

Risultati: Anche in questo caso, né la concordanza qualitativa né il pattern risultante sono stati influenzati dall'aggiunta dei possibili interferenti, indipendentemente dal metodo di interpretazione. Pertanto, si può concludere che i risultati dell'ANA HEP-2 non presentano un rischio significativo di risultati errati a causa della presenza degli interferenti testati.

2. Progettazione dello Studio di Prestazione Clinica:

Sono stati acquisiti 380* campioni clinicamente caratterizzati, come indicato nella tabella seguente. Questi 380 campioni sono stati divisi e inviati a tre diversi laboratori per la valutazione degli ANA HEP-2. Tutti e tre i laboratori hanno valutato i vetrini con i tre metodi sopra indicati. Tutti e tre i laboratori hanno valutato i vetrini con i tre metodi sopra indicati. Inoltre, l'interpretazione dei vetrini Metodo A e Metodo B è stata ripetuta due volte in ciascun sito clinico da due diversi tecnici di laboratorio. In ciascun sito clinico, i 380 campioni sono stati prima esaminati a una diluizione 1:40 per una valutazione dello stato qualitativo dei 380 campioni. Tutti i campioni che hanno dato un risultato positivo alla diluizione di screening 1:40 (per uno qualsiasi dei tre metodi di interpretazione) sono stati poi titolati e interpretati nuovamente con tutti e tre i metodi per determinare l'endpoint e il pattern. ***NOTA: il secondo sito ha analizzato un numero inferiore di campioni di Celiachia e Vasculite, per un totale di 350 campioni nel secondo sito.**

I risultati sono stati utilizzati per valutare la specificità clinica (potenziale reattività crociata), la sensibilità clinica, la concordanza qualitativa tra i metodi all'interno dei siti, l'interpretazione del Metodo C tra i siti (ad es. confronto tra diFine® e diFine® al microscopio automatico), la concordanza sul titolo dell'endpoint e la concordanza sul pattern.

Malattie Associate agli ANA	n, Tutti i Siti
<i>Malattie del tessuto connettivo:</i>	
Lupus eritematoso sistemico (LES)	40
Sindrome di Sjogren (SS)	30
Sclerodermia	20
Miosite autoimmune (AM)	20
Malattia mista del tessuto connettivo (MCTD)	20
CREST	20
<i>Altre malattie autoimmuni associate agli ANA:</i>	
Epatite autoimmune (AIH)	20
Lupus indotto da farmaci (DIL)	20
Totale	190

Malattie Non Associate agli ANA	n, Sito 1 e Sito 3	n, Sito 2
<i>Altre malattie autoimmuni:</i>		
Celiachia	22	10
Vasculite ANCA-associata	28	10
Malattia di Crohn	10	10
Artrite reumatoide	30	30
Tiroidite autoimmune	30	30
Malattie infiammatorie intestinali (IBD)	10	10
Colite ulcerosa	10	10
<i>Altre malattie:</i>		
Malignità/Cancro	20	20
Fibromialgia	10	10
Malattie infettive	10	10
Totale	190	160

3. Sensibilità Clinica e Specificità Clinica:

La sensibilità clinica è stata calcolata in ciascun sito sul LES separatamente e sulla combinazione delle malattie del tessuto connettivo (CTD: LES+ SS + sclerodermia+ CREST+ MCTD+ AM) più altre malattie associate agli ANA (epatite epatica autoimmune + Lupus indotto da farmaci). La specificità è stata calcolata utilizzando la popolazione di controllo totale delle malattie non associate agli ANA.

a. Prestazione Clinica al Sito 1

Sensibilità Diagnostica e Specificità		% Sensibilità (95% CI)	% Sensibilità 95% CI)	% Sensibilità (95% CI)	
		LES (n = 40)	CTD + malattie associate agli ANA (n = 190)	Malattie Non Associate agli ANA (n = 190)	
Sito 1	Metodo A	Tecnico A	52,5% (37,5 - 67,1%)	53,2% (46,1 - 60,1%)	75,8% (69,2 - 81,3%)
	Metodo A	Tecnico B	57,5% (42,2 - 71,5%)	60,0% (52,9 - 66,7%)	73,2% (66,4 - 79,0%)
	Metodo B	Tecnico A	55,0% (39,8 - 69,3%)	54,7% (47,6 - 61,6%)	75,8% (69,2 - 81,3%)
	Metodo B	Tecnico B	52,5% (37,5 - 67,1%)	57,9% (50,8 - 64,7%)	74,2% (67,6 - 79,9%)
	Metodo C	dIFine	55,0% (39,8 - 69,3%)	57,4% (50,3 - 64,2%)	67,4% (60,4 - 73,6%)

b. Prestazione Clinica al Sito 2

Sensibilità Diagnostica e Specificità		% Sensibilità (95% CI)	% Sensibilità 95% CI)	% Sensibilità (95% CI)	
		LES (n = 40)	CTD + malattie associate agli ANA (n = 190)	Malattie Non Associate agli ANA (n = 160)	
Sito 2	Metodo A	Tecnico A	50,0% (35,2 - 64,8%)	51,6% (44,5 - 58,6%)	83,1% (76,6 - 88,1%)
	Metodo A	Tecnico B	55,0% (39,8 - 69,3%)	56,3% (49,2 - 63,2%)	80,0% (73,1 - 85,5%)
	Metodo B	Tecnico A	52,5% (37,5 - 67,1%)	56,8% (49,7 - 63,7%)	81,3% (74,5 - 86,5%)
	Metodo B	Tecnico B	55,0% (39,8 - 69,3%)	58,4% (51,3 - 65,2%)	80,6% (73,8 - 86,0%)
	Metodo C	dIFine	52,5% (37,5 - 67,1%)	55,8% (48,7 - 62,7%)	74,4% (67,1 - 80,5%)

c. Prestazione Clinica al Sito 3

Sensibilità Diagnostica e Specificità		% Sensibilità (95% CI)	% Sensibilità 95% CI)	% Sensibilità (95% CI)	
		LES (n = 40)	CTD + malattie associate agli ANA (n = 190)	Malattie Non Associate agli ANA (n = 190)	
Sito 3	Metodo A	Tecnico A	47,5% (32,9 - 62,5%)	53,2% (46,1 - 60,1%)	76,8% (70,4 - 82,3%)
	Metodo A	Tecnico B	55,0% (39,8 - 69,3%)	57,4% (50,3 - 64,2%)	74,2% (67,6 - 79,9%)
	Metodo B	Tecnico A	45,0% (30,7 - 60,2%)	52,6% (45,6 - 59,6%)	78,9% (72,6 - 84,1%)
	Metodo B	Tecnico B	57,5% (42,2 - 71,5%)	56,3% (49,2 - 63,2%)	74,7% (68,1% - 80,4%)
	Metodo C	dIFine	55,0% (39,8 - 69,3%)	54,2% (47,1 - 61,1%)	67,5% (63,1 - 76,1%)

La sensibilità della coorte di pazienti affetti da LES variava da un minimo del 45,0% a un massimo del 57,5% in tutti e tre i metodi e in tutti e tre i siti. La prevalenza di ANA osservata in questa coorte di pazienti affetti da LES sembrava inferiore a quella tipicamente osservata. Secondo i reumatologi che hanno collaborato alla raccolta di questi campioni, ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la maggior parte di questi pazienti era in trattamento con forti immunosoppressori e aveva una bassa attività di malattia o era in remissione. La bassa prevalenza di ANA osservata è stata ulteriormente confermata utilizzando un altro prodotto commerciale ANA HEP-2 IFA approvato dalla FDA. La sensibilità clinica nella coorte CTD + malattie associate agli ANA variava da un minimo del 51,6% a

un massimo del 60,0% con tutti e tre i metodi e in tutti e tre i siti. La specificità clinica nella coorte delle malattie non associate agli ANA variava da un minimo del 67,4% a un massimo dell'83,1% per tutti e tre i metodi, in tutti e tre i siti. Facendo una media di tutti i metodi di interpretazione nei tre siti, la sensibilità clinica nel gruppo LES è stata in media del 53,2%, la sensibilità clinica nel gruppo CTD + Malattie associate agli ANA è stata in media del 55,7% e la specificità clinica nel gruppo Malattie non associate agli ANA è stata in media del 75,9%.

4. Frequenza degli ANA rilevati per gruppo di malattie:

Oltre a una determinazione positiva o negativa, il Metodo C può dare luogo a una chiamata "Incerto" se dIFine® non è riuscito a identificare il risultato come chiaramente positivo o chiaramente negativo. I risultati incerti sono stati considerati negativi per questo riepilogo (cioè non positivi). La tabella seguente mostra la percentuale di ogni categoria di malattia che è stata definita qualitativamente positiva da ogni tecnico in ogni sito e con ogni metodo. Questa tabella riassume la frequenza degli ANA riscontrati in ciascuna categoria di malattia e la coerenza della determinazione degli ANA tra i vari metodi.

Sito 1:

Malattie	Tecnico A		Tecnico B		Metodo C
	Metodo A	Metodo B	Metodo A	Metodo B	
Malattie associate agli ANA					
LES	52,5%	55,0%	57,5%	52,5%	55,0%
Sjögren	50,0%	50,0%	56,7%	53,3%	53,3%
Sclerodermia	75,0%	70,0%	80,0%	80,0%	80,0%
Miosite autoimmune	50,0%	55,0%	65,0%	60,0%	60,0%
MCTD	40,0%	40,0%	50,0%	55,0%	50,0%
CREST	80,0%	80,0%	80,0%	80,0%	80,0%
Epatite autoimmune	45,0%	50,0%	60,0%	55,0%	50,0%
Lupus indotto da farmaci	35,0%	40,0%	35,0%	35,0%	35,0%
Malattie non associate agli ANA					
Tiroidite autoimmune	23,3%	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%
Cancro	15,0%	15,0%	20,0%	20,0%	15,0%
Celiachia	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%
Malattia di Crohn	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%
Fibromialgia	30,0%	40,0%	50,0%	40,0%	40,0%
Malattia infettiva	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Malattie infiammatorie intestinali	40,0%	30,0%	40,0%	20,0%	20,0%
Artrite reumatoide	16,7%	23,3%	23,3%	23,3%	16,7%
Colite ulcerosa	30,0%	30,0%	50,0%	60,0%	40,0%
Vasculite	17,9%	14,3%	14,3%	14,3%	14,3%

Sito 2:

Malattie	Tecnico A		Tecnico B		Metodo C
	Metodo A	Metodo B	Metodo A	Metodo B	
Malattie associate agli ANA					
LES	50,0%	52,5%	55,0%	55,0%	52,5%
Sjögren	53,3%	53,3%	56,7%	56,7%	53,3%
Sclerodermia	75,0%	80,0%	75,0%	80,0%	80,0%
Miosite autoimmune	55,0%	65,0%	65,0%	70,0%	60,0%
MCTD	30,0%	45,0%	35,0%	45,0%	45,0%
CREST	75,0%	80,0%	80,0%	80,0%	75,0%
Epatite autoimmune	40,0%	45,0%	45,0%	45,0%	45,0%
Lupus indotto da farmaci	35,0%	40,0%	40,0%	40,0%	40,0%
Malattie non associate agli ANA					
Tiroidite autoimmune	13,3%	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%
Cancro	10,0%	15,0%	15,0%	15,0%	15,0%
Celiachia	20,0%	30,0%	20,0%	30,0%	30,0%
Malattia di Crohn	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%
Fibromialgia	40,0%	40,0%	40,0%	40,0%	40,0%
Malattia infettiva	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Malattie infiammatorie intestinali	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%
Artrite reumatoide	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%
Colite ulcerosa	40,0%	40,0%	60,0%	40,0%	40,0%
Vasculite	0,0%	0,0%	10,0%	10,0%	0,0%

Sito 3:

Malattie	Tecnico A		Tecnico B		Metodo A
	Metodo A	Metodo B	Metodo A	Method B	
Malattie associate agli ANA					
LES	47,5%	45,0%	55,0%	57,5%	52,5%
Sjögren	46,7%	50,0%	60,0%	53,3%	50,0%
Sclerodermia	75,0%	75,0%	80,0%	75,0%	75,0%
Miosite autoimmune	60,0%	60,0%	60,0%	60,0%	60,0%
MCTD	45,0%	45,0%	45,0%	45,0%	45,0%
CREST	80,0%	80,0%	75,0%	75,0%	75,0%
Epatite autoimmune	45,0%	40,0%	50,0%	50,0%	45,0%
Lupus indotto da farmaci	35,0%	35,0%	35,0%	35,0%	35,0%
Malattie non associate agli ANA					
Tiroidite autoimmune	16,7%	13,3%	20,0%	16,7%	16,7%
Cancro	20,0%	20,0%	20,0%	25,0%	15,0%
Celiachia	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%
Malattia di Crohn	30,0%	20,0%	30,0%	30,0%	30,0%
Fibromialgia	40,0%	40,0%	50,0%	50,0%	40,0%
Malattia infettiva	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Malattie infiammatorie intestinali	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%	20,0%
Artrite reumatoide	23,3%	16,7%	26,7%	20,0%	16,7%
Colite ulcerosa	40,0%	40,0%	60,0%	60,0%	40,0%
Vasculite	10,7%	10,7%	10,7%	14,3%	14,3%

La frequenza di ANA rilevata nella coorte della celiachia è sembrata più alta del previsto. Esiste una letteratura che sostiene la presenza di ANA elevati nei pazienti affetti da celiachia (39). Inoltre, questi campioni sono stati analizzati su un altro ANA HEP-2 commerciale autorizzato dalla FDA e l'ANA è stato confermato su tale prodotto.

5. Confronto dei metodi di interpretazione:

Sono stati analizzati 350 campioni clinici in tutti e tre i siti clinici. Altri 30 campioni di celiachia e vasculite clinicamente caratterizzati sono stati analizzati presso il primo e il terzo sito. Infine, sono stati raccolti retrospettivamente altri 12 campioni che presentavano il pattern della membrana nucleare o dei punti nucleari e che sono stati analizzati nei siti uno e tre. Con questi 392 campioni, c'è stato un totale di 2268 casi in cui è stato possibile confrontare i risultati tra il Metodo A e il Metodo B, il Metodo A e il Metodo C e il Metodo B e il Metodo C. Un riepilogo di questi confronti qualitativi è riportato nelle tabelle che seguono:

a. Confronto dei metodi di interpretazione:

Metodo A vs Metodo B		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	95,6% (152/159) (91,2 - 97,9%)	95,7% (223/233) (92,3 - 97,7%)	95,7% (375/392) (93,2 - 97,3%)
	Tecnico B	94,9% (168/177) (90,6 - 97,3%)	98,6% (212/215) (95,9 - 99,5%)	96,9% (380/392) (94,7 - 98,2%)
Sito 2	Tecnico A	99,2% (124/125) (95,6 - 99,9%)	93,8% (211/225) (89,8 - 96,3%)	95,7% (335/350) (93,1 - 97,4%)
	Tecnico B	98,6% (137/139) (94,9 - 99,6%)	97,6% (206/211) (94,6 - 98,95%)	98,0% (343/350) (95,9 - 99,0%)
Sito 3	Tecnico A	95,5% (148/155) (90,9 - 97,8%)	98,7% (234/237) (96,4 - 99,65%)	97,5% (382/392) (95,4 - 98,6%)
	Tecnico B	95,9% (162/169) (91,7 - 97,9%)	97,8% (218/223) (94,9 - 99,0%)	96,9% (380/392) (94,7 - 98,2%)

b. Concordanza qualitativa combinata per il Metodo A vs Metodo B su tutti i siti/tutti i tecnici

		Metodo A	
		Positivo	Negativo
Metodo B	Positivo	891	40
	Negativo	33	1304

Concordanza Percentuale Positiva = 96,43% (891 / 924) 95% Intervallo di Confidenza = 95,03 - 97,45%
 Concordanza Percentuale Negativa = 97,02% (1304 / 1344) 95% Intervallo di Confidenza = 95,97 - 97,81%
 Concordanza Percentuale Totale = 96,78% (2195 / 2268) 95% Intervallo di Confidenza = 95,97 - 97,43%

c. Confronto Qualitativo tra il Metodo A e il Metodo C

Poiché il metodo C ha dato risultati incerti per molti campioni, è stata calcolata la concordanza percentuale positivo e negativo utilizzando entrambi gli scenari applicabili:

Incerti contati come i positivi

Metodo A vs Metodo C		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	97,5% (155/159) (93,7 - 99,0%)	80,3% (187/233) (74,7 - 84,9%)	87,2% (342/392) (83,6 - 90,2%)
	Tecnico B	98,3% (174/177) (95,1 - 99,4%)	87,4% (188/215) (82,4 - 91,2%)	92,4% (362/392) (89,3 - 94,6%)
Sito 2	Tecnico A	100% (125/125) (97,0 - 100,0%)	85,3% (192/225) (80,1 - 89,4%)	90,6% (317/350) (87,1 - 93,2%)
	Tecnico B	100% (139/139) (97,3 - 100,0%)	91,0% (192/211) (86,4 - 94,2%)	94,6% (331/350) (91,7 - 96,5%)
Sito 3	Tecnico A	100% (155/155) (97,6 - 100,0%)	87% (206/237) (82,0 - 90,7%)	92,1% (361/392) (88,9 - 94,4%)
	Tecnico B	98,8% (167/169) (95,8 - 99,7%)	91,9% (205/223) (87,6 - 94,8%)	94,9% (372/392) (92,3 - 96,7%)

d. Concordanza qualitativa combinata per il Metodo A vs Metodo C su tutti i siti/tutti i tecnici:

		Metodo A	
		Positivo	Negativo
Metodo C	Positivo	915	174
	Negativo	9	1170

Concordanza Percentuale Positiva: 99,03 % (915/924) 95% CI: 98,39 - 99,55%
 Concordanza Percentuale Negativa: 87,05 % (1170/1344) 95% CI: 85,15 - 88,74%
 Concordanza Percentuale Totale: 91,93 % (2085/2268) 95% CI: 90,74 - 92,98%

Incerti contati come negativi

Metodo A vs Metodo C		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	93,1% (148/159) (88,0 - 96,1%)	94,0% (219/233) (90,2 - 96,4%)	93,6% (367/392) (90,8 - 96,5%)
	Tecnico B	90,4% (160/177) (85,2 - 93,9%)	99,1% (213/215) (96,7 - 99,7%)	95,2% (373/392) (92,6 - 96,9%)
Sito 2	Tecnico A	99,2% (124/125) (95,1 - 99,9%)	94,7% (213/225) (90,9 - 96,9%)	96,3% (337/350) (93,8 - 97,8%)
	Tecnico B	95,0% (132/139) (89,9 - 97,5%)	98,1% (207/211) (95,2 - 99,3%)	96,9% (339/350) (94,5 - 98,2%)
Sito 3	Tecnico A	96,1% (149/155) (91,8 - 98,2%)	97,1% (230/237) (94,4 - 98,1%)	96,7% (379/392) (94,4 - 98,1%)
	Tecnico B	90,5% (153/169) (85,2 - 94,1%)	98,7% (220/223) (96,1 - 99,5%)	95,2% (373/392) (92,6 - 96,9%)

e. I risultati del Metodo A vs il Metodo C per tutti i siti e tutti i tecnici combinati sono presentati di seguito:

		Metodo A	
		Positivo	Negativo
Metodo C	Positivo	866	42
	Negativo	58	1302

Concordanza Percentuale Positiva: 93,72 % (866/924) 95% CI: 91,97 - 95,11%
 Concordanza Percentuale Negativa: 96,88% (1302/1344) 95% CI: 95,80 - 97,68%
 Concordanza Percentuale Totale: 95,59 % (2168/2268) 95% CI: 94,67 - 96,36%

f. **Confronto qualitativo tra il Metodo B e il Metodo C**

Poiché il metodo C può dare un risultato incerto (UNC) oltre a un risultato qualitativo positivo o negativo, la concordanza tra i metodi è stata calcolata utilizzando i campioni UNC considerati positivi e quelli considerati negativi:

UNC considerati Positivi per ogni sito e per ogni tecnico.

Metodo B vs Metodo C		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	100,0% (162/162) (97,7 - 100,0%)	83,0% (191/230) (77,7 - 87,3%)	90,1% (353/392) (86,7 - 92,7%)
	Tecnico B	99,4% (170/171) (96,8 - 99,9%)	86,4% (191/221) (81,3 - 90,3%)	91,8% (360/392) (88,7 - 94,2%)
Sito 2	Tecnico A	100,0% (138/138) (97,3 - 100,0%)	90,6% (192/212) (85,9 - 93,8%)	94,3% (330/350) (91,3 - 96,3%)
	Tecnico B	100,0% (142/142) (97,4 - 100,0%)	92,3% (192/208) (87,9 - 95,2%)	95,4% (334/350) (92,7 - 97,2%)
Sito 3	Tecnico A	99,3% (150/151) (96,3 - 99,9%)	85,5% (206/241) (80,5 - 89,4%)	89,9% (356/392) (86,5 - 92,5%)
	Tecnico B	99,4% (166/167) (96,7 - 99,9%)	91,6% (206/225) (87,2 - 94,5%)	94,9% (372/392) (92,3 - 96,7%)

Concordanza qualitativa combinata per il Metodo B vs Metodo C su tutti i siti/tutti i tecnici (UNC come Positivi):

		Metodo B		Totale
		Positivo	Negativo	
Metodo C	Positivo	928	160	1088
	Negativo	3	1177	1180
Totale		931	1337	2268

Concordanza Percentuale Positiva: 99,7 % (928/931) 95% CI: 99,1 - 99,9%
 Concordanza Percentuale Negativa: 88,0 % (1177/1337) 95% CI: 86,2 - 89,7%
 Concordanza Percentuale Totale: 92,8% (2105/2268) 95% CI: 91,7 - 93,8%

UNC considerati Negativi per ogni sito e per ogni tecnico

Metodo B vs Metodo C		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	95,7% (155/162) (91,4 - 97,9%)	97,0% (223/230) (93,9 - 98,5%)	96,4% (378/392) (94,1 - 97,9%)
	Tecnico B	94,2% (161/171) (89,6 - 96,8%)	99,6% (220/221) (97,5 - 99,9%)	97,2% (381/392) (95,1 - 98,4%)
Sito 2	Tecnico A	98,6% (136/138) (94,9 - 99,60%)	100,0% (212/212) (98,2 - 100,0%)	99,4% (348/350) (97,9 - 99,8%)
	Tecnico B	95,8% (136/142) (91,1 - 98,1%)	100,00% (208/208) (98,2 - 100,0%)	98,3% (344/350) (96,3 - 99,2%)
Sito 3	Tecnico A	98,0% (148/151) (94,3 - 99,3%)	96,7% (233/241) (93,6 - 98,3%)	97,2% (381/392) (95,1 - 98,4%)
	Tecnico B	92,8% (155/167) (87,9 - 95,8%)	99,56% (224/225) (97,5 - 99,9%)	96,68% (379/392) (94,4 - 98,1%)

Concordanza qualitativa combinata per il Metodo B vs Metodo C su tutti i siti/tutti i tecnici (UNC come Negati):

		Metodo B		Totale
		Positivo	Negativo	
Metodo C	Positivo	891	17	908
	Negativo	40	1320	1360
Totale		931	1337	2268

Concordanza Percentuale Positiva: 95,7% (891/931) 95% CI: 94,2 - 96,8%
 Concordanza Percentuale Negativa: 98,7% (1320/1337) 95% CI: 98,0 - 99,2%
 Concordanza Percentuale Totale: 97,5% (2211/2268) 95% CI: 96,8 - 98,1%

In tutti i casi, la concordanza qualitativa tra i metodi di interpretazione è piuttosto elevata, a indicare che tutti e tre i metodi (microscopio manuale, lettura digitale dello scanner diFine® e chiamata automatica dallo scanner diFine®) sono ben correlati tra loro e presentano poche discrepanze.

Inoltre, le determinazioni dei pattern sono state correlate tra i diversi metodi di interpretazione; i campioni che non presentavano alcun pattern (cioè "negativi") o quelli che davano risultati incerti (cioè "UNC") sono stati inclusi nelle analisi di concordanza dei pattern tra i diversi metodi di interpretazione, presentate nella tabella seguente:

		Metodo A vs Metodo B	Metodo A vs Metodo C	Metodo B vs Metodo C
		Percentuale di concordanza (%) (#concordanza /Totale #) [95% CI]	Percentuale di concordanza (%) (#concordanza /Totale #) [95% CI]	Percentuale di concordanza (%) (#concordanza /Totale #) [95% CI]
Sito 1	Tecnico A	98,5 (386/392) [96,7 - 99,3%]	84,2 (330/392) [80,2 - 87,5%]	83,9 (329/392) [80,0 - 87,2%]
	Tecnico B	97,7 (383/392) [95,7 - 98,8%]	85,0 (333/392) [81,1 - 88,2%]	85,2 (334/392) [81,4 - 88,4%]
Sito 2	Tecnico A	96,9 (339/350) [94,5 - 98,2%]	86,0 (301/350) [82,0 - 89,3%]	86,9 (304/350) [82,9 - 90,0%]
	Tecnico B	97,7 (342/350) [95,6 - 98,8%]	86,6 (303/350) [82,6 - 89,8%]	87,1 (305/350) [83,2 - 90,3%]
Sito 3	Tecnico A	98,47 (386/392) [96,7 - 99,3%]	88,3 (346/392) [84,7 - 91,1%]	88,5 (347-392) [85,0 - 91,3%]
	Tecnico B	98,2 (385/392) [96,4 - 99,1%]	88,0 (345/392) [84,4 - 90,9%]	87,5 (343/392) [83,9 - 90,4%]

Combinando tutti e tre i siti si è ottenuto il seguente schema di concordanza:

	Numero concordanza del pattern/Campioni Totali	Percentuale di Concordanza (%)	95% CI
Metodo A vs Metodo B	2221/2268	98,0	97,3-98,4%
Metodo A vs Metodo C	1958/2268	86,3	84,9-87,7%
Metodo B vs Metodo C	1962/2268	86,5	85,0-87,9%

I campioni positivi a qualsiasi metodo in ciascun sito sono stati titolati all'endpoint e interpretati con tutti e tre i metodi. I campioni qualitativamente positivi a tutti e tre i metodi in un sito potevano essere confrontati per verificare la concordanza con l'endpoint. Nel primo sito sono stati titolati fino all'endpoint 156 campioni. Nel sito 2 sono stati titolati 133 campioni fino all'endpoint e nel sito 3 sono stati titolati 154 campioni fino all'endpoint. Considerando che in ogni sito erano presenti due tecnici per la lettura sia del metodo A che del metodo B, è stato possibile confrontare 886 volte le determinazioni dell'endpoint tra il metodo A e il metodo B, tra il metodo A e il metodo C e tra il metodo B e il metodo C. Il numero di volte in cui le determinazioni dell'endpoint corrispondevano più o meno a una diluizione di due volte è riportato nella tabella seguente:

Concordanza combinata del titolo all'end-point (tutti i siti/tutti i tecnici)			
Interpretazione	[± 1 diluizione]/Campioni Totali	Percentuale di Concordanza (%)	95% CI
Metodo A vs. Metodo B	880/886	99,32	98,53 - 99,69%
Metodo A vs. Metodo C	879/886	99,21	98,38 - 99,62%
Metodo B vs. Metodo C	880/886	99,32	98,53 - 99,69%

Questo confronto mostra che la determinazione dell'endpoint tra i metodi è elevata e ci sono stati pochissimi casi in cui la diluizione dell'endpoint determinata da un metodo risultava in una diluizione dell'endpoint maggiore di ± una diluizione da un altro metodo.

Nel complesso, questi dati dimostrano che il pattern di chiamata automatica identificato da diFine® (Metodo C) concorda con il Metodo A e/o il Metodo B (metodi di identificazione del pattern non automatizzati) per la maggior parte dei campioni. Tuttavia, è sempre responsabilità dell'operatore qualificato prendere la decisione finale.

REFERENZE

- Barnett EV: Mayo. Clin. Proc. 44:645, 1969.
- Burnham TK, Fine G, Neblett TR: Ann. Int. Med. 63:9, 1966.
- Casals SP, Friou GJ, Meyers LL: Arthritis Rheum. 7:379, 1964.
- Condemni JJ, Barnett EV, Atwater EC, et al: Arthritis Rheum. 8:1080, 1965.
- Dorsch CA, Gibbs CB, Stevens MB, Shelman LE: Ann. Rheum. Dis. 28:313, 1969.
- Dubois EL: J. Rheum. 2:204, 1975.
- Alarcon-Segovia D, Fishbein E: J. Rheum. 2:167, 1975.
- Friou GJ: J. Clin. Invest. 36:890, 1957.
- Friou GJ, Finch SC, Detre KD: J. Immunol. 80:324, 1958.
- Coons AH, Creech H, Jones RN, et al: J. Immunol. 80:324, 1958.
- Barnett EV, North AF, Condemni JJ, Jacox RF, Vaughn JH: Ann. Intern. Med. 63:100, 1965.
- Lachman PJ, Kunkel HG: Lancet 2:436, 1961.
- Friou GJ: Arthritis Rheum. 7:161, 1964.
- Beck JS: Scot. Med. J. 8:373, 1963.
- Anderson JR, Gray KG, Beck JS, et al: Ann. Rheum. Dis. 21:360, 1962.
- Luciano A, Rothfield NF: Ann. Rheum. Dis. 32:337, 1973.
- Harmon C, Deng JS, Peebles CL, et al: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. Arthritis Rheum. 27:166-173, 1984.
- Peebles CL, Molden DP, Klipple GL, Nakamura RM: An antibody to histone H3 which produces a variable large speckled (VLS) immunofluorescent pattern on mouse kidney. Arthritis Rheum. 27:S44, 1984.
- Ritchie RF: Antinuclear antibodies: Their frequency and diagnostic association. N. Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
- Deng JS, Sontheimer RD, Gilliam JN: Relationships between antinuclear and anti-Ro/SS-A antibodies in subacute cutaneous lupus erythematosus. J. Am. Acad. Dermatol. 11:494-499, 1984.
- Meyer O, Hauptmann G, Tappeiner G, Ochs HD, Mascart-Lemone F: Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro(SSA) antibodies. Clin. Exp. Immunol. 62:678-684, 1985.
- Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti-Ro(SS-A) antibodies. Arthritis Rheum. 26:1279-1282, 1983.
- Speirs C, Fielder AHL, Chapel H, et al: Complement system protein C4 and susceptibility to hydralazine-induced systemic lupus erythematosus. Lancet 1:922-924, 1989.
- Watson RM, Scheel JN, Petri M, et al: Neonatal lupus erythematosus syndrome: Analysis of C4 allotypes and C4 genes in 18 families. Medicine 71:84-95, 1992.
- Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C: Arthritis Rheum. Vol. 23 No. 6:617, 1980.
- Hall AP, Bardawil WA, Bayles TB, et al: N. Engl. J. Med. 263:769, 1960.
- Pollack VE: N. Engl. J. Med. 271:165, 1964.
- Raskin J: Arch. Derm. 89:569, 1964.
- Beck JS, Anderson JR, Gray KG, Rowell NR: Lancet 2:1188, 1963.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second Edition; Approved Standard (1984). Pubblicato dal National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Documento H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guidelines, 1990.
- Beck JS: Lancet, 1:1203, 1961.
- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, et al: Am. J. Med. 52:48, 1972.
- Burnham TK, Neblett TR, Fine G: Am. J. Clin. Path. 50:683, 1968.
- Textbook of Immunopathology, Vol. II, P Miescher and HJ Muller-Eberhard (Eds), Glune & Stratton, NY, 1969.
- Wittingham S, Irvin J, Mackay IR, et al: Aust. Ann. Med. 18:130, 1969.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Registro federale 56:64175-64182, 1991.















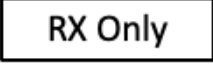





38. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Documento GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

39. Barton S, Murray J: Gastroenterol Clin North Am. 2008 June; 37(2):411-vii. doi:10.1016/j.gtc.2008.02.001

40. Weisbart RH, Colburn K: Effect of corticosteroids on serum antinuclear antibodies in man. Immunopharmacology. 1984 Oct;8(2):97-101. doi: 10.1016/0162-3109(84)90048-1. PMID: 6334672.

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

I seguenti simboli **potrebbero** essere stati utilizzati nell'etichettatura di questo prodotto.

Simbolo	Descrizione	Simbolo	Descrizione
	Produttore		Tenere lontano dalla luce solare
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>		Conformità alla Direttiva 98/79
	Numero di catalogo		Coprivetrino
	Sufficiente per n. test		Vetrino di supporto
	Codice lotto		Tampone fosfato salino PBS
	Da utilizzare entro		Mezzo di montaggio
	Limitazioni di temperatura di conservazione		Coniugato
	Da utilizzare solo su prescrizione medica		ANA (omogenea) Controllo Positivo (Siero umano)
	Consultare le istruzioni elettroniche per l'uso		Controllo Negativo
	Conservare in posizione verticale		Prodotto negli Stati Uniti

ZEUS Scientific.

200 Evans Way Branchburg, New Jersey, 08876
USA

Numero verde (Stati Uniti): 1 800 286-2111, Opzione 2
Internazionale: +1 908 526 3744

Fax: +1 908 526 2058

Sito web: www.zeusscientific.com

Per il servizio clienti negli Stati Uniti, contattare il distributore locale.

Per supporto tecnico negli Stati Uniti, contattare ZEUS Scientific, chiamare gratuitamente o inviare un'email a support@zeusscientific.com.

Per richieste di servizio clienti e supporto tecnico fuori dagli Stati Uniti, si prega di contattare il distributore locale.

©2019 ZEUS Scientific. Tutti i diritti riservati.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
Paesi Bassi