



ES

ANA HEp-2

REF FA2500A

IVD

Rx Only



## USO PREVISTO

ANA HEp-2 es un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección cualitativa y la determinación semicuantitativa de anticuerpos antinucleares IgG en suero humano mediante microscopía de fluorescencia manual o con microscopio automatizado diFine®. La presencia de anticuerpos antinucleares se puede utilizar junto con otras pruebas serológicas y hallazgos clínicos para ayudar en el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades reumáticas sistémicas.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se ha utilizado ampliamente para detectar la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y otros trastornos del tejido conectivo clínicamente similares (1-5). Además, los ANA pueden estar asociados a numerosos síndromes lúpicos inducidos por fármacos (6-7) que clínicamente imitan la forma espontánea del LES. Varios investigadores adaptaron la técnica de IFI a las pruebas de ANA siguiendo los métodos básicos descritos originalmente por Coons (10). Los ANA están compuestos principalmente por anticuerpos IgG, pero también pueden detectarse ANA IgA e IgM (11). Actualmente se reconoce que muchas fuentes de material nuclear pueden emplearse como sustrato para las pruebas de ANA. Aunque la mayor parte de la investigación original sobre ANA se llevó a cabo utilizando sustratos de secciones de tejido hepático o renal de rata o ratón, el uso de sustratos de cultivo de células de tejido embrionario humano o animal ha proporcionado un sustrato alternativo fiable y fácil de interpretar para las pruebas de ANA. La línea celular HEp-2 se deriva de un carcinoma epidérmico de laringe humana. El uso del sustrato de células HEp-2 en la IFI aumentó la sensibilidad de la detección de autoanticuerpos y contribuyó al diagnóstico de enfermedades autoinmunes sistémicas y a la descripción de otras nuevas, gracias a la posibilidad de detectar más de 100 antígenos en su núcleo y citoplasma. Existen varios patrones diferentes de inmunofluorescencia nuclear y citoplasmática, y **el programa diFine® sugiere ocho patrones comunes de ANA. Estos ocho patrones y la base para que puedan ser evaluados por diFine® y el lector manual son los siguientes:**

- Homogéneo (AC-1)** - Los patrones de tinción homogéneos o difusos del núcleo son consistentes con autoanticuerpos contra el ADN nativo (nDNA), las histonas y/o la desoxirribonucleoproteína (DNP) (12, 13). Los cromosomas de las células mitóticas (células en división) son indicadores importantes de un patrón homogéneo, ya que se teñirán como masas de formas irregulares con un borde exterior más intensamente teñido.
- Moteado (AC-2, AC-4 y AC-5):** el patrón moteado es el patrón de ANA que se observa con mayor frecuencia. Se puede observar un patrón "moteado verdadero" uniforme con anticuerpos contra el centrómero en células que no se están dividiendo. Se puede observar un patrón moteado denso con anticuerpos contra n-RNP, Sm y SSB/La. Patrón moteado fino, cromosoma negativo (AC-4): numerosos puntos pequeños y uniformes de fluorescencia distribuidos uniformemente por todo el núcleo. Los nucléolos generalmente no se tiñen. Las células mitóticas pueden mostrar algunas motas en su citoplasma, pero los cromosomas serán negativos. Patrón moteado grueso, cromosoma negativo (AC-5): puntos de fluorescencia de tamaño mediano se encuentran dispersos por todo el núcleo con márgenes nucleares definidos. También se pueden observar puntos de fluorescencia de mayor tamaño; sin embargo, son demasiado numerosos y de tamaño variable para ser identificados como un patrón nucleolar. Los cromosomas en las células mitóticas serán negativos. Moteado fino denso nuclear (AC-2): numerosos motas finas con una distribución densa en el núcleo, excluyendo los nucléolos. Asociado con anticuerpos anti-DFS70, que pueden presentarse en individuos sanos y tienen implicaciones limitadas en enfermedades autoinmunes. Harmon et al. (17) demostraron que las muestras de suero con anticuerpos anti-SSA/Ro altamente monoespecíficos producían un patrón de prueba IF-ANA de motas nucleares discretas en una amplia variedad de células humanas y núcleos tumorales. Tales muestras de suero con anticuerpos anti-SSA/Ro monoespecíficos producían muy poca tinción citoplasmática de las células del sustrato. Se ha descrito un patrón moteado distinto, grande y variable de 3 a 10 motas grandes en el núcleo. Estos pacientes con motas grandes y variables presentan síndromes de enfermedad reumática indiferenciada con anticuerpos IgM antigénicos histona FH-3 (18).
- Centrómero (AC-3):** moteado discreto, cromosoma (especificidad centromérica) positivo: Los cromosomas serán positivos en las células mitóticas; de hecho, los motes discretos solo estarán agrupados en la masa cromosómica, demostrando claramente las diversas etapas de la mitosis. Se ha reconocido que el patrón centromérico está asociado con el síndrome CREST, que es una variante más leve de la esclerosis sistémica progresiva (PSS). El patrón centromérico mostrará puntos discretos y uniformes de motes fluorescentes dispersos por todo el núcleo. Las células mitóticas serán positivas, demostrando un agrupamiento de los centrómeros en los cromosomas en diferentes disposiciones según la etapa mitótica.
- Nucleolo homogéneo (AC-8):** el patrón nucleolar demuestra una tinción homogénea o moteada del nucléolo. Este patrón a menudo se asocia con una fluorescencia opaca y homogénea en el resto del núcleo. Los cromosomas de las células mitóticas son negativos. El patrón nucleolar sugiere autoanticuerpos contra PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleofosmina, nucleolina, No55/SC65. La fluorescencia nucleolar aparecerá homogénea, agrupada o moteada, según el antígeno al que reacciona el autoanticuerpo. Los anticuerpos antinucleolares se producen principalmente en el suero de pacientes con esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o fenómeno de Raynaud (19).
- Múltiples puntos nucleares (AC-6):** una pequeña cantidad de puntos nucleares que oscilan entre 6 y 20 se asocian más comúnmente con la colangitis biliar primaria.
- Membrana nuclear (AC-11):** Membrana antinuclear (portaobjetos nucleares): el patrón de la membrana antinuclear aparece como un borde alrededor del núcleo y se asemeja a un patrón de borde; sin embargo, se distingue del patrón de borde por el hecho de que la etapa cromosómica en metafase es negativa. Es importante informar sobre este autoanticuerpo porque se reconoce que está asociado con la enfermedad hepática autoinmune.
- Citoplásmico (ribosomal) (AC-19):** el patrón ribosómico se caracteriza por numerosas motas citoplasmáticas con la mayor concentración alrededor del núcleo. Se distingue del patrón mitocondrial por tener motas más pequeñas y mayor densidad. Se desconoce el significado del patrón.
- Citoplasmático (mitocondrial) (AC-21):** el patrón tendrá característicamente numerosas motas citoplasmáticas con la mayor concentración en el área perinuclear. El patrón se puede observar en células en interfase y mitóticas. La importancia clínica de AMA es más frecuentemente una asociación con colangitis biliar primaria, especialmente cuando el título de AMA es alto.

Los patrones adicionales que se enumeran a continuación no se pueden identificar utilizando dIFine® y deben ser interpretados por un operador capacitado, de acuerdo con los estándares de nomenclatura ICAP.

#### Patrones nucleares adicionales

1. **Patrón de antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (AC-13):** El patrón de antígeno nuclear de células en proliferación se observa como una fina mancha nuclear en el 30 - 60% de las células en interfase y una tinción negativa de la región cromosómica. de células mitóticas. La PCNA es específica para pacientes con LES pero no se detecta en otros trastornos de enfermedades del tejido conectivo.
2. **Patrón centriolo (AC-24):** El patrón centriolo se caracteriza por dos puntos distintos de fluorescencia en el núcleo de las células mitóticas o un punto distinto de fluorescencia en la célula en reposo. Se desconoce el significado de este patrón; sin embargo, se ha observado en PSS.
3. **Patrón de fibras del huso (AC-25):** Cromosoma positivo: el patrón de fibras del huso es exclusivo de las células que experimentan mitosis donde solo el aparato del huso emite fluorescencia. Este patrón tiene una apariencia de "telaraña" que se extiende desde el centriolo hasta los centrómeros. El patrón sugiere autoanticuerpos contra los microtúbulos y su significado no está claro.
4. **Patrón de la mitad del cuerpo (AC-27):** El patrón de la mitad del cuerpo es una región densamente teñida cerca del surco de escisión de las células telofase, es decir, en el área donde se separan las dos células hijas. Se desconoce la importancia clínica del patrón; sin embargo, el patrón se ha reconocido en pacientes seleccionados con esclerosis sistémica.

#### Patrón Citoplásmico Adicional

1. Tipo de actina lineal fibrilar citoplasmática (AC-15): el patrón citoesquelético se caracteriza por una "tela de araña" distintiva o apariencia fibrosa en toda la célula. Se ha informado que está asociado con enfermedad hepática autoinmune (antimúsculo liso).
2. Patrón lisosomal (AC-18): el patrón lisosomal se observa como unas pocas motas discretas escasamente espaciadas en todo el citoplasma. El patrón se observa en el citoplasma de las células en interfase y mitóticas. Se desconoce la importancia clínica.
3. Polar/similar a Golgi (AC-22): el patrón del aparato de Golgi se caracteriza por una tinción citoplasmática positiva que se concentra en un solo lado de la región perinuclear. La importancia clínica es incierta, pero los informes en la literatura han sugerido una asociación con el LES y el síndrome de Sjögren.

#### PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ANA HEp-2 está diseñado para detectar la presencia de ANA circulantes en sueros humanos. El ensayo emplea un sustrato de cultivo de células tisulares e inmunoglobulina antihumana de cabra ajustada para un uso óptimo y libre de tinciones de fondo no específicas. La reacción ocurre en dos pasos:

1. El primer paso es la incubación de la muestra, donde cualquier ANA presente en la muestra del paciente puede unirse al sustrato celular, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente se eliminan por lavado otros componentes del suero.
2. El segundo paso es la incubación del conjugado, donde se permite que la inmunoglobulina antihumana marcada con FITC reaccione con cualquier inmunoglobulina humana que se haya unido al sustrato durante la incubación de la muestra. Esto formará un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado estable en el lugar donde el anticuerpo inicial del paciente se unió al sustrato celular. A continuación se eliminó el exceso de conjugado. Los resultados del ensayo se pueden visualizar utilizando un microscopio fluorescente o dIFine® debidamente equipado. Cualquier reacción positiva aparecerá como una tinción fluorescente de color verde manzana dentro de la célula. Si la muestra no tenía ANA específicos, no habrá una tinción nuclear distinta de la célula.

## REACTIVOS

### Materiales proporcionados:

Cada kit contiene los siguientes componentes en cantidades suficientes para realizar la cantidad de pruebas indicadas en la etiqueta del empaque.

**NOTA: El conjugado y los controles contienen una combinación de Proclin (0,05 % v/v) y azida sódica (<0,1 % p/v) como conservantes. Zorba-NS® contiene azida sódica (<0,1% p/v) como conservante.**

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SLD</b>            | Portaobjetos de sustrato ANA HEP-2: veinte portaobjetos de 12 pocillos con papel secante absorbente y b desecante.                                                                                                                                                    |
| <b>CONJ</b>           | Conjugado: IgG antihumana de cabra marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Contiene tamp fosfato con BSA y contratinción. Tres frascos de color ámbar, que contienen 3,5 ml. Preparado para usar.                                                           |
| <b>CTRL</b> <b>+</b>  | ANA (homogénea) Control positivo (suero humano): producirá una tinción homogénea y positiva de col verde manzana del núcleo celular. Un vial de 0,5 ml con tapa roja. Preparado para usar.                                                                            |
| <b>CTRL</b> <b>-</b>  | Control negativo (suero humano): No produce tinción nuclear detectable. Un vial de 0,5 ml con tapa ver Preparado para usar.                                                                                                                                           |
| <b>DIL</b> <b>SPE</b> | Diluyente de muestras Zorba-NS®: cuatro botellas de 25 ml con tapa verde. Preparado para usar.                                                                                                                                                                        |
| <b>BUF</b> <b>PBS</b> | Solución salina tamponada con fosfato (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Vacíe el contenido de cada paquete de tamp un litro de agua destilada o desionizada. Mezcle hasta que todas las sales estén completamente disuelt Paquetes para horno, suficientes para preparar 4 litros. |
| <b>MNTMED</b>         | Medios de montaje (glicerol tamponado): dos viales con gotero y tapa blanca de 3,0 ml.                                                                                                                                                                                |
| <b>COVGLS</b>         | Cubierta de cristal. Paquete de veinticuatro, 24 x 60 mm, espesor #1.                                                                                                                                                                                                 |

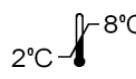
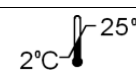
### NOTAS:

- Los siguientes componentes no dependen del número de lote del kit y pueden usarse indistintamente con los kits Sebia IFA, siempre que los números de producto sean idénticos: Zorba-NS® (Número de producto: FA025S), Medios de montaje (Número de producto: FA0009S), PBS (Número de producto: 0008S) y cubreobjetos (número de producto: S8008)

### MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Microscopio automatizado diFine® o un microscopio de fluorescencia debidamente equipado.
- Pipetas capaces de pipetear volúmenes entre 10 y 200 uL.
- Puntas de pipeta desechables.
- Pequeños tubos de ensayo, placa de dilución o similar para preparar diluciones de muestras.
- Lavador de portaobjetos o un plato de tinción grande con una placa de agitación magnética para lavar portaobjetos entre los pasos de incubación.
- Agua destilada o desionizada.
- Cilindro Graduado de 1 Litro.
- Temporizador de laboratorio para monitorear los pasos de incubación.
- Recipiente para desechos, guantes desechables y desinfectante (es decir, 10 % de lejía doméstica – 0,5 % de hipoclorito de sodio).

### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

|                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                              | Kit sin abrir<br>Medios de montaje, conjugado, portaobjetos, Zorba-NS®, portaobjetos*, controles positivos y negativos.<br>PBS rehidratado (Estable por 30 días). |
|                                                                              | Paquetes de solución salina tamponada con fosfato (PBS).                                                                                                          |
| *Una vez abiertos, los portaobjetos deben utilizarse ese día. Se pueden utilizar otros reactivos listos para usar, excepto PBS, hasta su fecha de cad indicada. |                                                                                                                                                                   |

### PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Siga las precauciones normales que se toman al manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico. Utilice ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y la cara. No respirar vapor. Deseche los residuos respetando todas las leyes locales, estatales y federales.
- Los pocillos del portaobjetos no contienen organismos viables. Sin embargo, considere el tobogán como material **potencialmente biopeligroso** y manipúlelo en consecuencia.

4. Los controles son **materiales potencialmente biopeligrosos**. Los materiales de origen de los que se derivaron estos productos resultaron negativos para el antígeno VIH-1, HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH mediante métodos de prueba aprobados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que no haya agentes infecciosos, estos productos deben manipularse en el nivel de bioseguridad 2, como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en los centros para el control de enfermedades/institutos nacionales de salud. manual "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos": edición actual; y la Norma de OSHA para patógenos transmitidos por la sangre (20).
5. El cumplimiento del tiempo y la temperatura de incubación especificados es esencial para obtener resultados precisos. **Se debe permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de comenzar el ensayo.** Devuelva los reactivos no utilizados a sus contenedores originales inmediatamente y siga los requisitos de almacenamiento.
6. Un lavado inadecuado podría provocar resultados falsos positivos o falsos negativos. Asegúrese de minimizar la cantidad de PBS residual, mediante transferencia, antes de agregar el conjugado. No permita que los pocillos se sequen entre incubaciones.
7. El conjugado, Zorba NS® y los controles contienen azida sódica en una concentración de <0,1 % (p/v). Se ha informado que la azida de sodio forma azidas de plomo o cobre en las tuberías de los laboratorios, lo que puede provocar explosiones al martillar. Para evitarlo, enjuague bien el fregadero con agua después de desechar la solución que contiene azida de sodio. Este conservante puede resultar tóxico si se ingiere.
8. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
9. Nunca pipetear con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
10. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Pueden producirse resultados incorrectos.
11. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría provocar resultados erróneos.
12. La cristalería reutilizable debe lavarse y enjuagarse completamente sin ningún tipo de detergente.
13. Evitar salpicaduras o generación de aerosoles.
14. No exponga los reactivos a una luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
15. Permitir que el paquete de portaobjetos alcance la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector protegerá los pocillos y el papel secante de la condensación.
16. Recoja la solución de lavado en un recipiente de eliminación. Trate la solución residual con desinfectante (es decir, 10 % lejía doméstica - 0,5 % hipoclorito de sodio). Evite la exposición de los reactivos a los vapores de lejía.
17. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía ni a olores fuertes de soluciones que contengan lejía. Trazas de lejía (hipoclorito de sodio) pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos contenidos en este kit.
18. No aplique presión al sobre deslizante. Esto podría dañar el sustrato.
19. Los componentes de este kit están combinados para lograr una sensibilidad y reproducibilidad óptimas. No se deben intercambiar reactivos de otros fabricantes. Siga atentamente el prospecto.
20. Los componentes abiertos/sin abrir son estables hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta, siempre que se sigan estrictamente las condiciones de almacenamiento recomendadas. No lo use más allá de la fecha de vencimiento. Dos noches heladas.
21. La contratinción azul de Evans es un carcinógeno potencial. Si se produce contacto con la piel, enjuague con agua. Eliminar de acuerdo con las regulaciones locales.
22. No permita que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento. Según las condiciones del laboratorio, puede ser necesario colocar los portaobjetos en una cámara húmeda durante las incubaciones.

## RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

1. Lleve a cabo la recolección de muestras de acuerdo con el documento CLSI M29: Protección de los trabajadores de laboratorio contra enfermedades infecciosas adquiridas ocupacionalmente. Ningún método de prueba conocido puede ofrecer una garantía total de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por tanto, todos los derivados sanguíneos deben considerarse potencialmente infecciosos.
2. Sólo sueros recién extraídos y adecuadamente refrigerados obtenidos mediante procedimientos de venopunción aséptica aprobados con este ensayo (30, 31). No se deben añadir anticoagulantes ni conservantes. Evite el uso de sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
3. Guarde la muestra a temperatura ambiente durante no más de 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, se puede almacenar entre 2 y 8°C, por no más de 48 horas. Si se prevé un retraso en la prueba, almacene la prueba por la noche a -20 °C o menos. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que pueden causar pérdida de actividad de anticuerpos y dar resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual utilizar todas las referencias disponibles y/o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (38).

## PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Retire los portaobjetos del lugar refrigerado y déjelos calentar a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Abra el sobre protector y retire las diapositivas. **No aplique presión a los lados planos del sobre protector.**
2. Identifique cada pocillo con los sueros y controles de paciente adecuados. **NOTA: Los controles están diseñados para usarse sin diluir.** Prepare una dilución 1:40 (por ejemplo: 10 µL de suero + 390 µL de Zorba-NS®) de cada suero de paciente.  
**Opciones de dilución:**
  - a. Los usuarios pueden valorar el control positivo hasta el punto final para que sirva como control semicuantitativo (1+ mínimamente reactivo). En tales casos, el control debe diluirse dos veces en PBS, **no en Zorba-NS®**. Se establece una dilución de punto final y se imprime en el vial de control positivo (± una dilución). Cabe señalar que debido a variaciones dentro del laboratorio (equipo, etc.), cada laboratorio debe establecer su propio título de punto final esperado para cada lote de control positivo.
  - b. Al valorar muestras de pacientes, las diluciones iniciales deben prepararse en Zorba-NS® y todas las diluciones posteriores deben prepararse únicamente en PBS. **Las valoraciones no deben prepararse en Zorba-NS®.**
3. Con un dispensador adecuado (mencionado anteriormente), dispense de 20 a 40 µL de cada control y de cada suero de paciente diluido en los pocillos correspondientes.
4. Incubar los portaobjetos a temperatura ambiente (20 - 25°C) durante 35±5 minutos.
5. Enjuague suavemente los portaobjetos con PBS. **No dirija una corriente de PBS a los pocillos de prueba.**
6. Lave los portaobjetos durante dos intervalos de cinco minutos, cambiando el PBS entre lavados. Los portaobjetos pueden remojar durante cada lavado por hasta cinco minutos. **NOTA: Para aquellos que usan lavadoras automáticas, configure la lavadora para que lave cada pocillo tres veces con un remojo de cero a cinco minutos.**
7. Retire las diapositivas de PBS una a la vez. Invierta los pocillos del portaobjetos y de la llave en los agujeros de los secantes proporcionados. Seque el portaobjetos limpiando el reverso con una toallita absorbente.  
**PRECAUCIÓN:** Coloque el papel secante y deslícelo sobre una superficie dura y plana. Secar sobre toallas de papel puede destruir la matriz del portaobjetos. **No permita que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento de prueba.**

8. Agregue de 20 a 40 µl de conjugado a cada pocillo.
9. Repita los pasos del 4 al 7.
10. Aplique de 3 a 5 gotas de medio de montaje en cada portaobjetos (entre los pocillos) y aplique el cubreobjetos. Alternativamente, se puede aplicar una pequeña cantidad de medio de montaje a cada pocillo y aplicar cubreobjetos. El medio de montaje debe agregarse dentro de las dos horas posteriores a completar el último ciclo de lavado.
11. Examine los portaobjetos inmediatamente con un microscopio de fluorescencia adecuado. Esto se puede lograr manualmente usando un microscopio fluorescente tradicional o con dIFine®. Si utiliza dIFine®, consulte el manual del instrumento para obtener instrucciones de funcionamiento. **Se recomienda examinar los portaobjetos el mismo día de la prueba.**

#### NOTAS:

- a. **Si no es posible ver las diapositivas inmediatamente, las diapositivas se pueden almacenar hasta por 48 horas a 2 – 8°C.**
- b. **Si los portaobjetos no se examinarán dentro de un período de 48 horas, selle el cubreobjetos con esmalte de uñas transparente y guárdelo en el refrigerador.**

### CONTROL DE CALIDAD

1. Cada vez que se realiza el ensayo, se deben incluir un control positivo y un control negativo.
2. Se recomienda leer los controles antes de evaluar las muestras de prueba. Si los controles no aparecen como se describen, es posible que los resultados no sean válidos.
  - a. Control negativo: caracterizado por la ausencia de fluorescencia específica y una tinción de fondo roja o verde opaca de todas las células debido a la contratinción.
  - b. Control positivo (patrón homogéneo): caracterizado por una fluorescencia verde manzana. El patrón de tinción homogéneo es una tinción uniforme y difusa de todo el núcleo.
3. Se pueden probar controles adicionales de acuerdo con las pautas o requisitos de las regulaciones u organizaciones de acreditación locales, estatales y/o federales.

#### NOTAS:

- a. **Puede existir una retención de reactivos no específicos. Es importante lavar adecuadamente los portaobjetos para eliminar los resultados falsos positivos.**
- b. **La intensidad de la fluorescencia observada puede variar según el microscopio y el sistema de filtrado utilizados.**
- c. **Se puede observar tinción no nuclear del sustrato celular con algunos sueros humanos.**

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. La interpretación de los resultados depende del patrón observado, el título del autoanticuerpo y la edad del paciente. Los ancianos, especialmente las mujeres, son propensos a desarrollar autoanticuerpos de titulación baja (<1:80) en ausencia de enfermedad autoinmune clínica. La experiencia sugiere que una dilución 1:40 es una buena dilución para detectar ANA. Los resultados positivos de titulación baja pueden ocurrir en personas aparentemente sanas; por lo tanto, los resultados de ANA siempre deben interpretarse a la luz de la presentación clínica total del paciente.
2. Los títulos inferiores a 1:40 se consideran negativos.
3. Prueba positiva: una reacción positiva es la presencia de cualquier patrón de tinción nuclear verde manzana observado en una dilución 1:40 basada en una escala de intensidad de tinción de 1+ a 4+. 1+ se considera una reacción débil y 4+ una reacción fuerte. Todos los sueros positivos a 1:40 deben titularse hasta la dilución final. Esto se logra haciendo diluciones seriadas de 1:40, 1:80, 1:160, etc. de todos los positivos. El título de punto final es la dilución más alta que produce una reacción positiva de 1+.
4. Con frecuencia se encuentran patrones homogéneos con acentuación periférica en sueros de pacientes con LES.

|                                          | Enfermedad que se encuentra con mayor frecuencia                                               | Referencia             |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Homogéneo:<br>Título alto<br>Título bajo | LES<br>Artritis reumatoide y otras enfermedades                                                | (3, 8, 9, y 16)<br>(1) |
| Centrómetro                              | Variante del síndrome CREST del síndrome de SPS                                                | (27)                   |
| Moteado                                  | Esclerodermia, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, Enfermedad mixta del tejido conectivo | (34 – 36)              |
| Nucleolar                                | Esclerodermia                                                                                  | (37)                   |
| Periferal                                | LES                                                                                            | (2, 8, 9 y 16)         |

### LIMITACIONES DEL ENSAYO

1. El ANA HEP-2 es una ayuda diagnóstica de laboratorio y sus resultados no son diagnósticos por sí mismos. Se pueden encontrar ANA positivos en individuos aparentemente sanos. Por lo tanto, es imperativo que los resultados de ANA se interpreten junto con otras pruebas serológicas y hallazgos clínicos.
2. Los pacientes con LES sometidos a terapia con esteroides pueden tener resultados negativos en las pruebas (40).
3. Muchos medicamentos comúnmente recetados pueden inducir ANA (6, 7).
4. Un patrón de autoanticuerpos puede ocultar parcial o totalmente las características diagnósticas del otro. En tales casos, es necesario titular el suero.
5. Con este producto no se pretende establecer una asociación definitiva entre el patrón de fluorescencia nuclear y ningún estado patológico específico.

### RESULTADOS ESPERADOS

El valor esperado en la población normal es negativo o menor de 1:40. Sin embargo, individuos aparentemente sanos pueden contener ANA en sus sueros (36). Este porcentaje aumenta con la edad, particularmente en la séptima década de la vida.

### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

**NOTA: Al establecer las características de rendimiento del ANA HEP-2, los portaobjetos se interpretaron utilizando tres métodos diferentes, como se describe a continuación:**

| Método de interpretación                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Método A.</b> El método A fue un método de interpretación completamente manual. Se llevó a cabo utilizando un microscopio fluorescente tradicional equipado con lentes oculares y objetivos. La determinación del resultado cualitativo y del patrón se realizó mediante técnicos de laboratorio capacitados. |
| <b>Método B.</b> El método B se llevó a cabo escaneando los portaobjetos con dIFine® y, posteriormente, haciendo que un técnico de laboratorio capacitado interpretara la imagen digital resultante (cualitativa y de patrón si era positiva) que aparecía en el monitor de la computadora.                      |

**Método C.** El método C es el **resultado sugerido** predicho por dIFine®; el método C predice el resultado cualitativo y, si es positivo, el patrón si es uno de los ocho patrones que el sistema ha sido programado para llamar. Si el método C es "UNC" (incierto), el nivel de fluorescencia medido por dIFine está entre positivo y negativo. El método C debe ser "validado" o aceptado por el técnico de laboratorio o modificado o invalidado por completo. Para los datos presentados a continuación, el **método C** se registra "TAL CUAL" sin ninguna modificación por parte del técnico de laboratorio, se presenta sólo con fines informativos.

## 1. Estudios de rendimiento analítico:

### a. Linealidad:

Se identificaron muestras positivas fuertes para cada uno de los siguientes ocho patrones de ANA: homogéneo, moteado, centrómero, nucleolar, puntos nucleares, membrana nuclear, citoplasmático (ribosómico) y citoplasmático (mitocondrial). Cada una de las muestras se analizó a 1:40 y se tituló a 1:20480 y se interpretó mediante los tres métodos indicados anteriormente. Este estudio se llevó a cabo internamente en ZEUS Scientific. A continuación, se presentan los puntos finales de cada muestra y cada método:

| Muestra                     | Método A | Método B | Método C |
|-----------------------------|----------|----------|----------|
| Homogéneo                   | 1:1280   | 1:1280   | 1:1280   |
| Moteado                     | 1:5120   | 1:5120   | 1:5120   |
| Centrómero                  | 1:5120   | 1:5120   | 1:5120   |
| Nucleolar                   | 1:2560   | 1:5120   | 1:2560   |
| Puntos nucleares            | 1:640    | 1:640    | 1:640    |
| Citoplásmico (Ribosomal)    | 1:320    | 1:320    | 1:320    |
| Citoplásmico (Mitocondrial) | 1:10240  | 1:10240  | 1:10240  |

Resumen: En el 100% de los casos, el patrón llamado fue el esperado y concordante independientemente del método de interpretación. Asimismo, la determinación del punto final fue la esperada  $\pm$  una dilución para el 100% de las determinaciones independientemente del método de interpretación.

### b. Reproducibilidad entre lotes:

Se identificaron una muestra moderadamente positiva y una muestra fuertemente positiva para cada uno de los siguientes ocho patrones de ANA: homogéneo, moteado, centrómero, nucleolar, puntos nucleares, membrana nuclear, citoplasmático (ribosómico) y citoplasmático (mitocondrial). Además, se incluyeron nueve muestras negativas, lo que elevó el grupo total a 25 muestras. Este grupo de 25 muestras se analizó en tres lotes diferentes de ANA HEP-2 y se interpretó mediante los tres métodos indicados anteriormente. Además, los dieciséis miembros positivos se titularon hasta el punto final y se interpretaron mediante los tres métodos.

#### Resultados:

**i. Concordancia cualitativa:** Hubo una concordancia del 100% en los resultados cualitativos en la dilución de detección de las 25 muestras en los tres lotes del kit, y hubo una concordancia del 100% en los tres métodos de interpretación, independientemente del lote del kit de reactivos.

**ii. Concordancia de los títulos de los puntos finales:** Las 16 muestras positivas dieron como resultado los mismos títulos de los puntos finales  $\pm$  una dilución, independientemente del lote del kit de reactivos o la interpretación del método.

**iii. Concordancia de patrones:** Para las diluciones que arrojaron un resultado positivo en los tres métodos de interpretación, hubo una concordancia de patrones del 100% para el lote uno y el lote dos para los tres métodos de interpretación. Para el lote tres hubo una concordancia de patrones del 100% entre el Método A y el Método B, con una muestra homogénea medianamente positiva como el único valor atípico al comparar el Método C con los Métodos A y B.

### c. Estudio de Rango de Referencia:

Se obtuvieron ciento ochenta muestras de suero al azar de donantes sanos en el noreste de los EE. UU. Las muestras se analizaron con una dilución de detección de 1:40 y se interpretaron mediante los tres métodos. Las muestras que arrojaron un resultado positivo con una dilución de 1:40 se titularon e interpretaron mediante los tres métodos. Los resultados de la prueba de detección se resumen a continuación:

| Método de interpretación | Número de positivos | % Positivo | Número de negativos | % negativo | Número de inciertos | % incierto |
|--------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
| A                        | 19                  | 10,56      | 161                 | 89,44      | NA                  | NA         |
| B                        | 19                  | 10,56      | 161                 | 89,44      | NA                  | NA         |
| C                        | 14                  | 7,78       | 162                 | 84,44      | 14                  | 7,78       |

### d. Estudio de repetibilidad de veinte días:

Se identificaron una muestra positiva baja (punto final de  $\sim$ 1:40), una muestra positiva media (punto final de  $\sim$ 1:160 a 1:320) y una muestra positiva fuerte (punto final de  $>$ 1:640) para cada uno de los siguientes ocho patrones de ANA: homogéneo, moteado, centrómero, nucleolar, puntos nucleares, membrana nuclear, citoplasmático (ribosómico) y citoplasmático (mitocondrial). También se incluyó una muestra negativa de ANA, lo que elevó el grupo de muestras a un total de 25. Estas 25 muestras se analizaron (dilución de detección 1:40) en ZEUS Scientific por triplicado, en diez días diferentes, lo que produjo 30 resultados por muestra. Los portaobjetos se interpretaron mediante los tres métodos.

Para la evaluación dentro del método, los resultados del acuerdo cualitativo y el acuerdo de patrón se muestran a continuación: hubo un acuerdo cualitativo del 100% en todas las muestras cuando se leyeron utilizando los métodos A y B. Para el método C, 22 de 25 muestras mostraron un acuerdo cualitativo del 100%; las muestras homogéneas de bajo positivo, nucléolo de bajo positivo y membrana nuclear de bajo positivo no tuvieron un acuerdo cualitativo completo. Además, hubo un acuerdo de patrón del 100% dentro de los métodos A y B. Para el método C, hubo un acuerdo de patrón del 100% para 21 de 25 muestras con valores atípicos observados en muestras homogéneas de bajo positivo, nucléolo de bajo positivo y membrana nuclear de bajo positivo y membrana nuclear de alto positivo.

#### Concordancia de los resultados cualitativos entre métodos

| Muestra        | Concordancia Método A<br>(IC del 95%) | Concordancia Método B<br>(IC del 95%) | Concordancia Método C<br>(IC del 95%) |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Homogéneo      | 100%                                  | 100%                                  | 76,7%                                 |
| Bajo positivo  | (88,7 – 100%)                         | (88,7 – 100%)                         | (59,1 – 88,2%)                        |
| Homogéneo      | 100%                                  | 100%                                  | 100%                                  |
| Medio positivo | (88,7 – 100%)                         | (88,7 – 100%)                         | (88,7 – 100%)                         |
| Homogéneo      | 100%                                  | 100%                                  | 100%                                  |
| Alto positivo  | (88,7 – 100%)                         | (88,7 – 100%)                         | (88,7 – 100%)                         |

| <b>Muestra</b>                      | <b>Concordancia Método A<br/>(IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método B<br/>(IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método C<br/>(IC del 95%)</b> |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Moteado<br>Bajo positivo            | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Moteado<br>Medio positivo           | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Moteado<br>Alto positivo            | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Centrómero<br>Positivo bajo         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Centrómero<br>Positivo medio        | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Centrómero<br>Positivo alto         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Nucleolar<br>Positivo bajo          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 96,7%<br>(83,3 – 99,4%)                       |
| Nucleolar<br>Positivo medio         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Nucleolar<br>Positivo alto          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Mitocondrias<br>Positivo bajo       | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Mitocondrial<br>Positivo medio      | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Mitocondrial<br>Positivo alto       | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Membrana nuclear<br>Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Membrana nuclear<br>Positivo alto   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Membrana nuclear<br>Positivo alto   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares<br>Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares<br>Positivo medio  | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares<br>Positivos altos | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal<br>Positivo bajo          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal<br>Positivo medio         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal<br>Positivo alto          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Negativo                            | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |

#### Concordancia de resultados de patrones dentro del método (Técnico 2)

| <b>Muestra</b>               | <b>Concordancia Método A<br/>(IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método B<br/>(IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método C<br/>(IC del 95%)</b> |
|------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Homogéneo<br>Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 73,3%<br>(55,6 – 85,8%)                       |
| Homogéneo<br>Positivo medio  | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Homogéneo<br>Positivo alto   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Moteado<br>Positivo bajo     | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Moteado<br>Positivo medio    | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Moteado<br>Positivo alto     | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Centrómero<br>Positivo bajo  | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Centrómero<br>Positivo medio | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Centrómero<br>Positivo alto  | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |

| <b>Muestra</b>                      | <b>Concordancia Método A<br/>(IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método B<br/>(IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método C<br/>(IC del 95%)</b> |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Nucleolar<br>Positivo bajo          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 96,7%<br>(83,3 – 99,4%)                       |
| Nucleolar<br>Positivo medio         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Nucleolar<br>Positivo alto          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Mitocondrias<br>Positivo bajo       | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Mitocondrial<br>Positivo alto       | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Membrana nuclear<br>Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 86,67%<br>(70,3 – 94,7%)                      |
| Membrana nuclear<br>Positiva media  | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Membrana nuclear<br>Positivo alto   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 96,7%<br>(83,3 – 99,4%)                       |
| Puntos nucleares<br>Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares<br>Positivo medio  | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares<br>Positivos altos | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal<br>Positivo bajo          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal<br>Positivo medio         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal<br>Positivo alto          | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |

En cuanto a la concordancia entre métodos, hubo un 100 % de concordancia cualitativa y de patrón entre el método A y el método B. Sin embargo, solo 22 de las 25 muestras mostraron un 100 % de concordancia cualitativa en las comparaciones entre el método B y el método C, y el método A y el método C; las muestras discrepantes fueron las muestras homogéneas de bajo positivo, las muestras nucleolares de bajo positivo y las muestras de membrana nuclear de bajo positivo. Además, solo 21 de las 25 muestras mostraron un 100 % de concordancia de patrón en las comparaciones entre el método B y el método C, y el método A y el método C; las muestras discrepantes fueron las muestras homogéneas de bajo positivo, las muestras nucleolares de bajo positivo y las muestras de membrana nuclear de bajo positivo y de alto positivo.

#### Concordancia de resultados cualitativos entre métodos

| <b>Muestra</b>                | <b>Concordancia Método<br/>A frente a Método B (IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método A<br/>frente a Método C (IC del 95%)</b> | <b>Concordancia Método B<br/>frente a C (IC del 95%)</b> |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Homogéneo<br>Positivo bajo    | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 76,67%<br>(59,1 – 88,2%)                                        | 76,67%<br>(59,1 – 88,2%)                                 |
| Homogéneo<br>Positivo medio   | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Homogéneo<br>Positivo alto    | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Moteado<br>Positivo bajo      | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Moteado<br>Positivo medio     | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Moteado<br>Positivo alto      | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Centrómero<br>Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Centrómero<br>Positivo medio  | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Centrómero<br>Positivo alto   | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Nucleolar<br>Positivo bajo    | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 96,67%<br>(83,3 – 99,4%)                                        | 96,67%<br>(83,3 – 99,4%)                                 |
| Nucleolar<br>Positivo medio   | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Nucleolar<br>Positivo alto    | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |
| Mitocondrias<br>Positivo bajo | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                    |

| Muestra                          | Concordancia Método A frente a Método B (IC del 95%) | Concordancia Método A frente a Método C (IC del 95%) | Concordancia Método B frente a C (IC del 95%) |
|----------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Mitocondrial Positivo medio      | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Mitocondrial Positivo alto       | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Membrana nuclear Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 90%<br>(74,4 – 96,5%)                         |
| Membrana nuclear Positiva media  | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Membrana nuclear Positivo alto   | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares Positivo bajo   | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares Positivo medio  | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Puntos nucleares Positivos altos | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal Positivo bajo          | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal Positivo medio         | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Ribosomal Positivo alto          | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |
| Negativo                         | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                         |

**Concordancia entre patrones y resultados de los métodos**

| Muestra                         | Método A frente a Método B Concordancia (IC del 95%) | Método A frente a Método C Concordancia (IC del 95%) | Método B frente a Método C Concordancia (IC del 95%) |
|---------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Homogéneo Bajo positivo         | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 73,3%<br>(55,6 – 85,9%)                              | 73,3%<br>(55,6 – 85,9%)                              |
| Homogéneo Medio positivo        | 100%<br>(88,65 – 100%)                               | 100%<br>(88,65 – 100%)                               | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Homogéneo Alto positivo         | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Moteado Bajo positivo           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Moteado Medio positivo          | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Moteado Alto positivo           | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Centrómero Bajo positivo        | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Centrómero Medio positivo       | 100%<br>(88,65 – 100%)                               | 100%<br>(88,65 – 100%)                               | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Centrómero Alto positivo        | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Nucleolar Bajo positivo         | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 96,7%<br>(83,3 – 99,4%)                              | 96,7%<br>(83,3 – 99,4%)                              |
| Nucleolar Medio positivo        | 100%<br>(88,65 – 100%)                               | 100%<br>(88,65 – 100%)                               | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Nucleolar Alto positivo         | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Mitocondrial Bajo positivo      | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Mitocondrial Medio positivo     | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Mitocondrial Alto positivo      | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |
| Membrana nuclear Bajo positivo  | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 86,7%<br>(70,3 – 94,7%)                              | 86,7%<br>(70,3 – 94,7%)                              |
| Membrana nuclear Medio positivo | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                | 100%<br>(88,7 – 100%)                                |

| Muestra                            | Método A frente a<br>Método B Concordancia<br>(IC del 95%) | Método A frente a<br>Método C Concordancia<br>(IC del 95%) | Método B frente a<br>Método C Concordancia<br>(IC del 95%) |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Membrana nuclear<br>Alto positivo  | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 96,7%<br>(83,3 - 99,4%)                                    |
| Puntos nucleares<br>Bajo positivo  | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      |
| Puntos nucleares<br>Medio positivo | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      |
| Puntos nucleares<br>Alto positivo  | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      |
| Ribosomal<br>Bajo positivo         | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      |
| Ribosomal<br>Medio positivo        | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      |
| Ribosomal<br>Alto positivo         | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      | 100%<br>(88,7 - 100%)                                      |

**e. Estudio de reproducibilidad en múltiples centros de cinco días de duración:**

Se identificaron una muestra positiva baja (punto final de ~1:40), una muestra positiva media (punto final de ~1:160 a 1:320) y una muestra positiva fuerte (punto final de >1:640) para cada uno de los siguientes ocho patrones de ANA: homogéneo, moteado, centrómero, nucleolar, puntos nucleares, membrana nuclear, citoplasmático (ribosomal) y citoplasmático (mitocondrial). También se incluyó una muestra negativa de ANA, lo que elevó el grupo total a 25 muestras. Estas 25 muestras se analizaron (dilución de cribado 1:40) por triplicado, dos veces al día, en cinco días y tres laboratorios diferentes, lo que arrojó 30 resultados por muestra y lugar. Las láminas se interpretaron mediante los tres métodos. En cada centro, el método A y el método B también fueron interpretados por dos técnicos de laboratorio distintos. A continuación se muestran los resultados de la concordancia cualitativa y la concordancia de patrones:

**i. Concordancia global de resultados cualitativos**

- Intramétodo:** La concordancia cualitativa intramétodo para los métodos A y B fue del 100% para los tres centros y todos los técnicos. Para el método C, hubo un 100% de concordancia para 24 de 25 muestras en todos los centros y todos los técnicos: una muestra de membrana nuclear de bajo positivo fue la única muestra discrepante en el centro 2.
- Entre métodos:** Hubo una concordancia cualitativa del 100% para las 25 muestras entre los métodos A y B y entre los métodos A y C. En particular, hubo una concordancia cualitativa del 100% entre los métodos B y C para 24 de las 25 muestras, siendo la muestra con baja positividad de la membrana nuclear un caso atípico en el centro 2.

**ii. Concordancia entre patrones y resultados**

- Intramétodo:** La concordancia entre los patrones de los métodos A y B fue del 100% en los tres centros y para todos los técnicos. Para el método C, hubo una concordancia del 100% para 24 de las 25 muestras, con la muestra del centrómero medio como único valor atípico.
- Entre métodos:** La concordancia entre los patrones de las 25 muestras fue del 100% entre los métodos A y B para todos los centros y todos los técnicos. Para el método A frente al método C, había dos muestras discrepantes: una muestra media del centrómero en el centro 1 y una muestra baja de la membrana nuclear en el centro 2. Del mismo modo, para el método B frente al método C, había dos muestras discrepantes: una muestra media del centrómero en el centro 1 y una muestra baja de la membrana nuclear en el centro 2.

- f. Estudio de interferencias:** Se identificó una muestra medio positiva (punto final ~1:160 a 1:320) y una muestra fuertemente positiva (punto final > 1:640) para cada uno de los ocho patrones de ANA siguientes: homogéneo, moteado, centrómero, nucleolar, puntos nucleares, membrana nuclear, citoplasmático (ribosomal) y citoplasmático (mitocondrial). También se incluyó una muestra negativa de ANA, con lo que el grupo de muestras ascendió a un total de 17. A estas 17 muestras se les añadieron dos concentraciones diferentes (baja concentración y alta concentración) de doce posibles interferentes diferentes, como se indica en la tabla siguiente. Todas las muestras se evaluaron con ANA HEP-2 y se interpretaron mediante los tres métodos mencionados anteriormente.

| Interferencia     | Concentraciones de interferencias en pruebas |            |
|-------------------|----------------------------------------------|------------|
|                   | Baja                                         | Alta       |
| Intralípidos      | 3 mg/ml                                      | 7,50 mg/ml |
| Colesterol        | 1,5 mg/ml                                    | 2,5 mg/ml  |
| Albúmina          | 35 mg/lml                                    | 50 mg/lml  |
| Ibuprofeno        | 0,5 mg/ml                                    | 2 mg/ml    |
| Prednisona        | 0,2 mg/ml                                    | 0,8 mg/ml  |
| Hidroxiclороquina | 0,006 mg/ml                                  | 0,2 mg/ml  |
| Simvastatina      | 4 ug/ml                                      | 20 ug/ml   |
| Ciclofosfamida    | 1 mg/ml                                      | 4 mg/ml    |
| Factor reumatoide | 200 U/ml                                     | 400 U/ml   |
| Hemoglobina       | 100 mg/ml                                    | 200 mg/ml  |
| Triglicéridos     | 1,5 mg/ml                                    | 5 mg/ml    |
| Bilirrubina       | 0,01 mg/ml                                   | 0,15 mg/ml |

**Resultados:** Para los métodos A y B, ni la concordancia cualitativa ni el patrón resultante se vieron afectados por la adición de las posibles interferencias. El método C arrojó un resultado incierto en una muestra de membrana nuclear positiva baja cuando se le

añadió albúmina. Por lo tanto, se puede concluir que los resultados del ANA HEP-2 no presentan un riesgo significativo de resultados erróneos por la presencia de las interferencias analizadas.

Se realizó un segundo estudio de interferencias que se centró en el corte del ensayo e incluyó algunas posibles interferencias adicionales. Se seleccionaron muestras para cada uno de los ocho patrones de ANA (homogéneo, moteado, centrómero, nucleolar, puntos nucleares, membrana nuclear, citoplasmático (ribosomal) y citoplasmático (mitocondrial)) que presentaban un título en el punto final de 1:40-1:80 (cerca del punto de corte del ensayo), así como una muestra negativa para ANA. Estas nueve muestras se enriquecieron con dos concentraciones diferentes de las interferencias que se indican a continuación.

| Interferencia              | Concentraciones de interferencias en pruebas |                |
|----------------------------|----------------------------------------------|----------------|
|                            | Baja                                         | Alta           |
| Bilirrubina (no conjugada) | 0,02 mg/ml                                   | 0,15 mg/ml     |
| Colesterol (total)         | 1,5 mg/ml                                    | 2,2 mg/ml      |
| Triglicéridos              | 1 mg/ml                                      | 2,5 mg/ml      |
| Albúmina                   | 35 mg/ml                                     | 52 mg/ml       |
| Hemoglobina                | 100 mg/ml                                    | 200 mg/ml      |
| Intralípidos               | 2,0 mg/ml                                    | 20 mg/ml       |
| Factor reumatoide          | 200 U/ml                                     | 400 mg/ml      |
| Ciclofosfamida             | 0,183 mg/ml                                  | 0,549 mg/ml    |
| Ibuprofeno                 | 0,073 mg/ml                                  | 0,219 mg/ml    |
| Hidroxicloroquina          | 0,006 mg/ml                                  | 0,024 mg/ml    |
| Simvastatina               | 0,0000277 mg/ml                              | 0,000083 mg/ml |
| Prednisona                 | 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 de mofetilo   | 0,012 mg/ml                                  | 0,048 mg/ml    |
| Rituximab                  | 0,5 mg/ml                                    | 2 mg/ml        |
| Belimumab                  | 2 mg/ml                                      | 8 mg/ml        |

**Resultados:** Una vez más, ni la concordancia cualitativa ni el patrón resultante se vieron afectados por la adición de las posibles interferencias, independientemente del método de interpretación. Por lo tanto, se puede concluir que los resultados del ANA HEP-2 no presentan un riesgo significativo de resultados erróneos por la presencia de las interferencias analizadas.

## 2. Diseño del estudio de rendimiento clínico:

Se adquirió un total de 380\* muestras caracterizadas clínicamente, como se indica en la tabla siguiente. Estas 380 muestras se tomaron alícuotas y se enviaron a tres laboratorios diferentes para su evaluación mediante el ANA HEP-2. Los tres laboratorios evaluaron las láminas mediante los tres métodos mencionados. Además, los métodos A y B de interpretación de láminas fueron repetidos dos veces en cada centro clínico por dos técnicos de laboratorio diferentes. En cada centro clínico, las 380 muestras se analizaron primero con una dilución de 1:40 para evaluar el estado cualitativo de las 380 muestras. Cualquier muestra que generara un resultado positivo en la dilución de cribado de 1:40 (para cualquiera de los tres métodos de interpretación) se tituló e interpretó de nuevo mediante los tres métodos para determinar el punto final, así como el patrón. **\*NOTA: el centro 2 analizó un menor número de muestras de celiaquía y vasculitis, lo que dio un total de 350 muestras en el centro 2.**

Los resultados se utilizaron para evaluar la especificidad clínica (reactividad cruzada potencial), la sensibilidad clínica, la concordancia cualitativa entre métodos dentro de los centros, la interpretación del método C entre centros (es decir, comparación de microscopio automatizado dIFine® con dIFine®), la concordancia de títulos en el punto final y la concordancia de patrones.

| Enfermedades asociadas a los ANA                           | n,<br>Todos<br>los<br>centros |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Enfermedades del tejido conjuntivo:</i>                 |                               |
| Lupus eritematoso sistémico (LES)                          | 40                            |
| Síndrome de Sjogren (SS)                                   | 30                            |
| Dermatosclerosis                                           | 20                            |
| Miositis Autoinmune (AM)                                   | 20                            |
| Enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC)              | 20                            |
| CREST                                                      | 20                            |
| <i>Otras enfermedades autoinmunes asociadas a los ANA:</i> |                               |
| Hepatitis autoinmune (AIH)                                 | 20                            |
| Lupus inducido por fármacos (LID)                          | 20                            |
|                                                            |                               |
|                                                            |                               |
| <b>Total</b>                                               | <b>190</b>                    |

| Enfermedades no asociadas a los ANA      | n,<br>Centros 1 y 3 | n,<br>Centro<br>2 |
|------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| <i>Otras enfermedades autoinmunes:</i>   |                     |                   |
| Enfermedad celíaca                       | 22                  | 10                |
| Vasculitis asociada a ANCA               | 28                  | 10                |
| Enfermedad de Crohn                      | 10                  | 10                |
| Artritis reumatoide                      | 30                  | 30                |
| Tiroiditis autoinmune                    | 30                  | 30                |
| Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) | 10                  | 10                |
| Colitis ulcerosa                         | 10                  | 10                |
| <i>Otras enfermedades:</i>               |                     |                   |
| Malignidad/Cáncer                        | 20                  | 20                |
| Fibromialgia                             | 10                  | 10                |
| Enfermedades infecciosas                 | 10                  | 10                |
| <b>Total</b>                             | <b>190</b>          | <b>160</b>        |

## 3. Sensibilidad y especificidad clínicas:

La sensibilidad clínica se calculó en cada centro sobre el LES por separado, y sobre la combinación de las enfermedades del tejido conjuntivo (CTD: LES+ SS + dermatosclerosis+ CREST+ EMTC+ AM) más otras enfermedades asociadas a ANA (hepatitis hepática autoinmune + Lupus inducido por fármacos). La especificidad se calculó utilizando la población de control total de enfermedades no asociadas a los ANA.

### a. Rendimiento clínico en el Centro 1

| Sensibilidad y especificidad diagnósticas |          |           | % Sensibilidad<br>(IC del 95%) | % Sensibilidad<br>(IC del 95%)                     | % Especificidad<br>(IC del 95%)                     |
|-------------------------------------------|----------|-----------|--------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                           |          |           | LES<br>(n = 40)                | MTC + Enfermedades<br>asociadas a ANA<br>(n = 190) | Enfermedades no asociadas<br>a los ANA<br>(n = 190) |
| Centro 1                                  | Método A | Técnico A | 52,5%<br>(37,5 - 67,1%)        | 53,2%<br>(46,1 - 60,1%)                            | 75,8%<br>(69,2 - 81,3%)                             |
|                                           | Método A | Técnico B | 57,5%<br>(42,2 - 71,5%)        | 60,0%<br>(52,9 - 66,7%)                            | 73,2%<br>(66,4 - 79,0%)                             |
|                                           | Método B | Técnico A | 55,0%<br>(39,8 - 69,3%)        | 54,7%<br>(47,6 - 61,6%)                            | 75,8%<br>(69,2 - 81,3%)                             |
|                                           | Método B | Técnico B | 52,5%<br>(37,5 - 67,1%)        | 57,9%<br>(50,8 - 64,7%)                            | 74,2%<br>(67,6 - 79,9%)                             |
|                                           | Método C | dIFine    | 55,0%<br>(39,8 - 69,3%)        | 57,4%<br>(50,3 - 64,2%)                            | 67,4%<br>(60,4 - 73,6%)                             |

**b. Rendimiento clínico en el Centro 2**

| Sensibilidad y especificidad diagnósticas |          |           | % Sensibilidad<br>(IC del 95%) | % Sensibilidad<br>(IC del 95%)                     | % Especificidad<br>(IC del 95%)                     |
|-------------------------------------------|----------|-----------|--------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                           |          |           | LES<br>(n = 40)                | MTC + Enfermedades<br>asociadas a ANA<br>(n = 190) | Enfermedades no asociadas<br>a los ANA<br>(n = 160) |
| Centro 2                                  | Método A | Técnico A | 50,0%<br>(35,2 - 67,1%)        | 51,6%<br>(44,5 - 58,6%)                            | 83,1%<br>(76,6 - 88,1%)                             |
|                                           | Método A | Técnico B | 55,0%<br>(39,8 - 69,3%)        | 56,3%<br>(49,2 - 63,2%)                            | 80,0%<br>(73,1 - 85,5%)                             |
|                                           | Método B | Técnico A | 52,5%<br>(37,5 - 67,1%)        | 56,8%<br>(49,7 - 63,7%)                            | 81,3%<br>(74,5 - 86,5%)                             |
|                                           | Método B | Técnico B | 55,0%<br>(39,8 - 69,3%)        | 58,4%<br>(51,3 - 65,2%)                            | 80,6%<br>(73,8 - 86,0%)                             |
|                                           | Método C | dIFine    | 52,5%<br>(37,5 - 67,1%)        | 55,8%<br>(48,7 - 62,7%)                            | 74,4%<br>(67,1 - 80,5%)                             |

**c. Rendimiento clínico en el Centro 3**

| Sensibilidad y especificidad diagnósticas |          |           | % Sensibilidad<br>(IC del 95%) | % Sensibilidad<br>(IC del 95%)                     | % Especificidad<br>(IC del 95%)                     |
|-------------------------------------------|----------|-----------|--------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                           |          |           | LES<br>(n = 40)                | MTC + Enfermedades<br>asociadas a ANA<br>(n = 190) | Enfermedades no asociadas a<br>los ANA<br>(n = 190) |
| Centro 3                                  | Método A | Técnico A | 47,5%<br>(32,9 - 62,5%)        | 53,2%<br>(46,1 - 60,1%)                            | 76,8%<br>(70,4 - 82,3%)                             |
|                                           | Método A | Técnico B | 55,0%<br>(39,8 - 69,3%)        | 57,4%<br>(50,3 - 64,2%)                            | 74,2%<br>(67,6 - 79,9%)                             |
|                                           | Método B | Técnico A | 45,0%<br>(30,7 - 60,2%)        | 52,6%<br>(45,6 - 59,6%)                            | 78,9%<br>(72,6 - 84,1%)                             |
|                                           | Método B | Técnico B | 57,5%<br>(42,2 - 71,5%)        | 56,3%<br>(49,2 - 63,2%)                            | 74,7%<br>(68,1% - 80,4%)                            |
|                                           | Método C | dIFine    | 55,0%<br>(39,8 - 69,3%)        | 54,2%<br>(47,1 - 61,1%)                            | 67,5%<br>(63,1 - 76,1%)                             |

La sensibilidad de la cohorte de LES varió entre un mínimo del 45,0 % y un máximo del 57,5 % en los tres métodos y en los tres sitios. La prevalencia de ANA observada en esta cohorte de LES parecía inferior a la habitual. Según los reumatólogos que ayudaron con la recolección de estas muestras, esto puede deberse a que la mayoría de estos pacientes estaban bajo fuertes tratamientos inmunosupresores, tenían baja actividad de la enfermedad o se encontraban en remisión. Esta baja prevalencia de ANA se confirmó además utilizando otro producto comercial de IFA ANA HEP-2 aprobado por la FDA. La sensibilidad clínica entre la cohorte de enfermedades asociadas a CTD + ANA varió de un mínimo del 51,6 % a un máximo del 60,0 % en los tres métodos, en los tres sitios. La especificidad clínica entre la cohorte de

enfermedades no asociadas a ANA varió de un mínimo del 67,4 % a un máximo del 83,1 % en los tres métodos, en los tres sitios. Si se promedian todos los métodos de interpretación en los tres sitios, la sensibilidad clínica en el grupo de LES fue del 53,2 %, la sensibilidad clínica en el grupo de enfermedades asociadas a CTD + ANA fue del 55,7 % y la especificidad clínica en el grupo de enfermedades no asociadas a ANA fue del 75,9 %.

#### 4. Frecuencia de ANA detectada por grupo de enfermedad:

Además de una determinación positiva o negativa, el Método C puede dar como resultado una determinación «Incierta» si diFine® no pudo identificar el resultado como claramente positivo o negativo. Los resultados inciertos se consideraron negativos en este resumen (es decir, no fueron positivos). La siguiente tabla muestra el porcentaje de cada categoría de enfermedad que cada técnico calificó como cualitativamente positivo en cada sitio y con cada método. Esta tabla resume la frecuencia de ANA encontrada en cada categoría de enfermedad y la consistencia de dicha determinación de ANA en todos los métodos.

##### Centro 1

| Enfermedades                    | Técnico A |          | Técnico B |          | Método C |
|---------------------------------|-----------|----------|-----------|----------|----------|
|                                 | Método A  | Método B | Método A  | Método B |          |
| Enfermedades asociadas a ANA    |           |          |           |          |          |
| SLE                             | 52,5%     | 55,0%    | 57,5%     | 52,5%    | 55,0%    |
| Sjögren's                       | 50,0%     | 50,0%    | 56,7%     | 53,3%    | 53,3%    |
| Esclerodermia                   | 75,0%     | 70,0%    | 80,0%     | 80,0%    | 80,0%    |
| Miositis autoinmune             | 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%    |
| Hepatitis autoinmune            | 45,0%     | 50,0%    | 60,0%     | 55,0%    | 50,0%    |
| Lupus inducido por fármac       | 35,0%     | 40,0%    | 35,0%     | 35,0%    | 35,0%    |
| Enfermedades no asociadas a ANA |           |          |           |          |          |
| Tiroiditis autoinmune           | 23,3%     | 16,7%    | 16,7%     | 16,7%    | 16,7%    |
| Cáncer                          | 15,0%     | 15,0%    | 20,0%     | 20,0%    | 15,0%    |
| Enfermedad celíaca              | 45,5%     | 45,5%    | 45,5%     | 45,5%    | 45,5%    |
| Enfermedad de Crohn             | 30,0%     | 30,0%    | 30,0%     | 30,0%    | 30,0%    |
| Fibromialgia                    | 30,0%     | 40,0%    | 50,0%     | 40,0%    | 40,0%    |
| Enfermedad infecciosa           | 5,0%      | 5,0%     | 5,0%      | 5,0%     | 5,0%     |
| Enfermedad inflamatoria intest  | 40,0%     | 30,0%    | 40,0%     | 20,0%    | 20,0%    |
| Artritis reumatoide             | 16,7%     | 23,3%    | 23,3%     | 23,3%    | 16,7%    |
| Colitis ulcerosa                | 30,0%     | 30,0%    | 50,0%     | 60,0%    | 40,0%    |
| Vasculitis                      | 17,9%     | 14,3%    | 14,3%     | 14,3%    | 14,3%    |

##### Centro 2

| Enfermedades                       | Técnico A |          | Técnico B |          | Método C |
|------------------------------------|-----------|----------|-----------|----------|----------|
|                                    | Método A  | Método B | Método A  | Método B |          |
| Enfermedades asociadas a ANA       |           |          |           |          |          |
| SLE                                | 50,0%     | 52,5%    | 55,0%     | 55,0%    | 52,5%    |
| Sjögren's                          | 53,3%     | 53,3%    | 56,7%     | 56,7%    | 53,3%    |
| Esclerodermia                      | 75,0%     | 80,0%    | 75,0%     | 80,0%    | 80,0%    |
| Miositis autoinmune                | 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%    |
| Hepatitis autoinmune               | 40,0%     | 45,0%    | 45,0%     | 45,0%    | 45,0%    |
| Lupus inducido por fármacos        | 35,0%     | 40,0%    | 40,0%     | 40,0%    | 40,0%    |
| Enfermedades no asociadas a ANA    |           |          |           |          |          |
| Tiroiditis autoinmune              | 13,3%     | 16,7%    | 16,7%     | 16,7%    | 16,7%    |
| Cáncer                             | 10,0%     | 15,0%    | 15,0%     | 15,0%    | 15,0%    |
| Enfermedad celiaca                 | 20,0%     | 30,0%    | 20,0%     | 30,0%    | 30,0%    |
| Enfermedad de Crohn                | 30,0%     | 30,0%    | 30,0%     | 30,0%    | 30,0%    |
| Fibromialgia                       | 40,0%     | 40,0%    | 40,0%     | 40,0%    | 40,0%    |
| Enfermedad infecciosa              | 5,0%      | 5,0%     | 5,0%      | 5,0%     | 5,0%     |
| Enfermedad inflamatoria intestinal | 20,0%     | 20,0%    | 20,0%     | 20,0%    | 20,0%    |
| Artritis reumatoide                | 16,7%     | 16,7%    | 16,7%     | 16,7%    | 16,7%    |
| Colitis ulcerosa                   | 40,0%     | 40,0%    | 60,0%     | 40,0%    | 40,0%    |
| Vasculitis                         | 0,0%      | 0,0%     | 10,0%     | 10,0%    | 0,0%     |

**Centro 3**

| Enfermedades                       | Técnico A |          | Técnico B |          | Método C |
|------------------------------------|-----------|----------|-----------|----------|----------|
|                                    | Método A  | Método B | Método A  | Método B |          |
| Enfermedades asociadas a ANA       |           |          |           |          |          |
| SLE                                | 47,5%     | 45,0%    | 55,0%     | 57,5%    | 52,5%    |
| Sjögren's                          | 46,7%     | 50,0%    | 60,0%     | 53,3%    | 50,0%    |
| Esclerodermia                      | 75,0%     | 75,0%    | 80,0%     | 75,0%    | 75,0%    |
| Miositis autoinmune                | 55,0%     | 65,0%    | 65,0%     | 70,0%    | 60,0%    |
| MCTD                               | 60,0%     | 60,0%    | 60,0%     | 60,0%    | 60,0%    |
| CREST                              | 80,0%     | 80,0%    | 75,0%     | 75,0%    | 75,0%    |
| Hepatitis autoinmune               | 45,0%     | 40,0%    | 50,0%     | 50,0%    | 45,0%    |
| Lupus inducido por fármacos        | 35,0%     | 35,0%    | 35,0%     | 35,0%    | 35,0%    |
| Enfermedades no asociadas a ANA    |           |          |           |          |          |
| Tiroiditis autoinmune              | 16,7%     | 13,3%    | 20,0%     | 16,7%    | 16,7%    |
| Cáncer                             | 20,0%     | 20,0%    | 20,0%     | 25,0%    | 15,0%    |
| Enfermedad celíaca                 | 45,5%     | 45,5%    | 45,5%     | 45,5%    | 45,5%    |
| Enfermedad de Crohn                | 30,0%     | 20,0%    | 30,0%     | 30,0%    | 30,0%    |
| Fibromialgia                       | 40,0%     | 40,0%    | 50,0%     | 50,0%    | 40,0%    |
| Enfermedad infecciosa              | 5,0%      | 5,0%     | 5,0%      | 5,0%     | 5,0%     |
| Enfermedad inflamatoria intestinal | 30,0%     | 30,0%    | 30,0%     | 30,0%    | 20,0%    |
| Artritis reumatoide                | 23,3%     | 16,7%    | 26,7%     | 20,0%    | 16,7%    |
| Colitis ulcerosa                   | 40,0%     | 40,0%    | 60,0%     | 60,0%    | 40,0%    |
| Vasculitis                         | 10,7%     | 10,7%    | 10,7%     | 14,3%    | 14,3%    |

La frecuencia de ANA detectada en la cohorte de personas con enfermedad celíaca parecía más alta de lo esperado. Hay estudios que respaldan la presencia de ANA elevada en pacientes con enfermedad celíaca (39). Además, se analizaron estas muestras en otro ANA comercial aprobado por la FDA (HEP-2) y se confirmó la presencia de ANA en ese producto.

**5. Comparaciones de métodos de interpretación:**

Se analizaron 350 muestras clínicas en los tres centros. Se analizaron 30 muestras adicionales de vasculitis y enfermedad celíaca caracterizadas clínicamente en los centros uno y tres. Por último, se analizaron 12 muestras adicionales recolectadas retrospectivamente que presentaban el patrón de puntos nucleares o membrana nuclear en los centros uno y tres. Con estas 392 muestras, hubo un total de 2268 casos en los que se pudieron comparar los resultados de los métodos A, B y C. A continuación se incluyen unas tablas con un resumen de esas comparaciones cualitativas:

**a. Comparaciones de métodos de interpretación:**

| Método A frente a Método B |           | Concordancia de muestra positiva<br>(IC del 95%) | Concordancia de muestra negativa<br>(IC del 95%) | Concordancia de muestra total<br>(IC del 95%) |
|----------------------------|-----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Centro 1                   | Técnico A | 95,6% (152/159)<br>(91,2 - 97,9%)                | 95,7% (223/233)<br>(92,3 - 97,7%)                | 95,7% (375/392)<br>(93,2 - 97,3%)             |
|                            | Técnico B | 94,9% (168/177)<br>(90,6 - 97,3%)                | 98,6% (212/215)<br>(95,9 - 99,5%)                | 96,9% (380/392)<br>(94,7 - 98,2%)             |
| Centro 2                   | Técnico A | 99,2% (124/125)<br>(95,6 - 99,9%)                | 93,8% (211/225)<br>(89,8 - 96,3%)                | 95,7% (335/350)<br>(93,1 - 97,4%)             |
|                            | Técnico B | 98,6% (137/139)<br>(94,9 - 99,6%)                | 97,6% (206/211)<br>(94,6 - 98,95%)               | 98,0% (343/350)<br>(95,9 - 99,0%)             |
| Centro 3                   | Técnico A | 95,5% (148/155)<br>(90,9 - 97,8%)                | 98,7% (234/237)<br>(96,4 - 99,65%)               | 97,5% (382/392)<br>(95,4 - 98,6%)             |
|                            | Técnico B | 95,9% (162/169)<br>(91,7 - 97,9%)                | 97,8% (218/223)<br>(94,9 - 99,0%)                | 96,9% (380/392)<br>(94,7 - 98,2%)             |

**b. Concordancia cualitativa combinada para el método A frente al método B Todos los sitios/Todos los técnicos**

|          |          | Método A |          |
|----------|----------|----------|----------|
|          |          | Positivo | Negativo |
| Método B | Positivo | 891      | 40       |
|          | Negativo | 33       | 1304     |

Concordancia porcentual positiva = 96,43% (891 / 924)

Concordancia porcentual negativa = 97,02% (1304 / 1344)

Concordancia porcentual total = 96,78% (2195 / 2268)

95% Intervalo de confianza = 95,03 - 97,45%

95% Intervalo de confianza = 95,97 - 97,81%

95% Intervalo de confianza = 95,97 - 97,43%

**c. Comparación cualitativa entre el método A y el método C**

Dado que el método C arrojó resultados inciertos para muchas muestras, se calculó el porcentaje de concordancia positiva y negativa utilizando ambos escenarios aplicables:

**Incierto contabilizado como positivo**

| Método A frente a Método C |           | Concordancia de muestra positiva (IC del 95 %) | Concordancia de muestra negativa (IC del 95 %) | Concordancia total de la muestra (IC del 95 %) |
|----------------------------|-----------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Centro 1                   | Técnico A | 97,5% (155/159)<br>(93,7 - 99,0%)              | 80,3% (187/233)<br>(74,7 - 84,9%)              | 87,2% (342/392)<br>(83,6 - 90,2%)              |
|                            | Técnico B | 98,3% (174/177)<br>(95,1 - 99,4%)              | 87,4% (188/215)<br>(82,4 - 91,2%)              | 92,4% (362/392)<br>(89,3 - 94,6%)              |
| Centro 2                   | Técnico A | 100% (125/125)<br>(97,0 - 100,0%)              | 85,3% (192/225)<br>(80,1 - 89,4%)              | 90,6% (317/350)<br>(87,1 - 93,2%)              |
|                            | Técnico B | 100% (139/139)<br>(97,3 - 100,0%)              | 91,0% (192/211)<br>(86,4 - 94,2%)              | 94,6% (331/350)<br>(91,7 - 96,5%)              |
| Centro 3                   | Técnico A | 100% (155/155)<br>(97,6 - 100,0%)              | 87% (206/237)<br>(82,0 - 90,7%)                | 92,1% (361/392)<br>(88,9 - 94,4%)              |
|                            | Técnico B | 98,8% (167/169)<br>(95,8 - 99,7%)              | 91,9% (205/223)<br>(87,6 - 94,8%)              | 94,9% (372/392)<br>(92,3 - 96,7%)              |

d. Los resultados del método A frente al método C para todos los centros y todos los técnicos combinados se presentan a continuación:

|          |          | Método A |          |
|----------|----------|----------|----------|
|          |          | Positivo | Negativo |
| Método C | Positivo | 915      | 174      |
|          | Negativo | 9        | 1170     |

Concordancia porcentual positiva: 99,03 % (915/924) IC del 95 %: 98,39 - 99,55%

Concordancia porcentual negativa: 87,05 % (1170/1344) IC del 95 %: 85,15 - 88,74%

Concordancia porcentual total: 91,93 % (2085/2268) IC del 95 %: 90,74 - 92,98%

Incierto contabilizado como negativo

| Método A frente a Método C |           | Concordancia de muestra positiva (IC del 95%) | Concordancia de muestra negativa (IC del 95%) | Concordancia total de la muestra (IC del 95%) |
|----------------------------|-----------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Centro 1                   | Técnico A | 93,1% (148/159)<br>(88,0 - 96,1%)             | 94,0% (219/233)<br>(90,2 - 96,4%)             | 93,6% (367/392)<br>(90,8 - 96,5%)             |
|                            | Técnico B | 90,4% (160/177)<br>(85,2 - 93,9%)             | 99,1% (213/215)<br>(96,7 - 99,7%)             | 95,2% (373/392)<br>(92,6 - 96,9%)             |
| Centro 2                   | Técnico A | 99,2% (124/125)<br>(95,1 - 99,9%)             | 94,7% (213/225)<br>(90,9 - 96,9%)             | 96,3% (337/350)<br>(93,8 - 97,8%)             |
|                            | Técnico B | 95,0% (132/139)<br>(89,9 - 97,5%)             | 98,1% (207/211)<br>(95,2 - 99,3%)             | 96,9% (339/350)<br>(94,5 - 98,2%)             |
| Centro 3                   | Técnico A | 96,1% (149/155)<br>(91,8 - 98,2%)             | 97,1% (230/237)<br>(94,4 - 98,1%)             | 96,7% (379/392)<br>(94,4 - 98,1%)             |
|                            | Técnico B | 90,5% (153/169)<br>(85,2 - 94,1%)             | 98,7% (220/223)<br>(96,1 - 99,5%)             | 95,2% (373/392)<br>(92,6 - 96,9%)             |

e. Los resultados del método A frente al método C para todos los centros y todos los técnicos combinados se presentan a continuación:

|          |          | Método A |          |
|----------|----------|----------|----------|
|          |          | Positivo | Negativo |
| Método C | Positivo | 866      | 42       |
|          | Negativo | 58       | 1302     |

Concordancia porcentual positiva: 93,72 % (866/924) IC del 95 %: 91,97 - 95,11%

Concordancia porcentual negativa: 96,88% (1302/1344) IC del 95 %: 95,80 - 97,68%

Concordancia porcentual total: 95,59 % (2168/2268) IC del 95 %: 94,67 - 96,36%

f. Comparación cualitativa entre el método B y el método C

Dado que el método C puede producir un resultado incierto (UNC) además de un resultado cualitativo positivo o negativo, la concordancia entre los métodos se calculó utilizando muestras UNC consideradas positivas y luego negativas:

La UNC consideró positiva cada centro y cada técnico.

| Método B frente a Método C |           | Concordancia de muestra positiva (IC del 95%) | Concordancia de muestra negativa (IC del 95%) | Concordancia total de la muestra (IC del 95%) |
|----------------------------|-----------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Centro 1                   | Técnico A | 100,0% (162/162)<br>(97,7 - 100,0%)           | 83,0% (191/230)<br>(77,7 - 87,3%)             | 90,1% (353/392)<br>(86,7 - 92,7%)             |
|                            | Técnico B | 99,4% (170/171)<br>(96,8 - 99,9%)             | 86,4% (191/221)<br>(81,3 - 90,3%)             | 91,8% (360/392)<br>(88,7 - 94,2%)             |
| Centro 2                   | Técnico A | 100,0% (138/138)<br>(97,3 - 100,0%)           | 90,6% (192/212)<br>(85,9 - 93,8%)             | 94,3% (330/350)<br>(91,3 - 96,3%)             |

|          |           |                                     |                                   |                                   |
|----------|-----------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|          | Técnico B | 100,0% (142/142)<br>(97,4 - 100,0%) | 92,3% (192/208)<br>(87,9 - 95,2%) | 95,4% (334/350)<br>(92,7 - 97,2%) |
| Centro 3 | Técnico A | 99,3% (150/151)<br>(96,3 - 99,9%)   | 85,5% (206/241)<br>(80,5 - 89,4%) | 89,9% (356/392)<br>(86,5 - 92,5%) |
|          | Técnico B | 99,4% (166/167)<br>(96,7 - 99,9%)   | 91,6% (206/225)<br>(87,2 - 94,5%) | 94,9% (372/392)<br>(92,3 - 96,7%) |

**Concordancia cualitativa combinada entre el método B y el método C para todos los centros/todos los técnicos (UNC como positivos):**

|          |          | Método B |          | Total |
|----------|----------|----------|----------|-------|
|          |          | Positivo | Negativo |       |
| Método C | Positivo | 928      | 160      | 1088  |
|          | Negativo | 3        | 1177     | 1180  |
| Total    |          | 931      | 1337     | 2268  |

Concordancia porcentual positiva: 99,7 % (928/931)

IC del 95 %: 99,1 - 99,9%

Concordancia porcentual negativa: 88,0 % (1177/1337)

IC del 95 %: 86,2 - 89,7%

Concordancia porcentual total: 92,8% (2105/2268)

IC del 95 %: 91,7 - 93,8%

**La UNC se considera negativa para cada centro y cada técnico**

| Método B frente a Método C |           | Concordancia de muestra positiva (IC del 95%) | Concordancia de muestra negativa (IC del 95%) | Concordancia total de la muestra (IC del 95%) |
|----------------------------|-----------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Centro 1                   | Técnico A | 95,7% (155/162)<br>(91,4 - 97,9%)             | 97,0% (223/230)<br>(93,9 - 98,5%)             | 96,4% (378/392)<br>(94,1 - 97,9%)             |
|                            | Técnico B | 94,2% (161/171)<br>(89,6 - 96,8%)             | 99,6% (220/221)<br>(97,5 - 99,9%)             | 97,2% (381/392)<br>(95,1 - 98,4%)             |
| Centro 2                   | Técnico A | 98,6% (136/138)<br>(94,9 - 99,60%)            | 100,0% (212/212)<br>(98,2 - 100,0%)           | 99,4% (348/350)<br>(97,9 - 99,8%)             |
|                            | Técnico B | 95,8% (136/142)<br>(91,1 - 98,1%)             | 100,00% (208/208)<br>(98,2 - 100,0%)          | 98,3% (344/350)<br>(96,3 - 99,2%)             |
| Centro 3                   | Técnico A | 98,0% (148/151)<br>(94,3 - 99,3%)             | 96,7% (233/241)<br>(93,6 - 98,3%)             | 97,2% (381/392)<br>(95,1 - 98,4%)             |
|                            | Técnico B | 92,8% (155/167)<br>(87,9 - 95,8%)             | 99,56% (224/225)<br>(97,5 - 99,9%)            | 96,68% (379/392)<br>(94,4 - 98,1%)            |

**Acuerdo cualitativo combinado entre el método B y el método C para todos los centros/todos los técnicos (UNC como negativos):**

|          |          | Método B |          | Total |
|----------|----------|----------|----------|-------|
|          |          | Positivo | Negativo |       |
| Método C | Positivo | 891      | 17       | 908   |
|          | Negativo | 40       | 1320     | 1360  |
| Total    |          | 931      | 1337     | 2268  |

Concordancia porcentual positiva: 95,7% (891/931)

IC del 95 %: 94,2 - 96,8%

Concordancia porcentual negativa: 98,7% (1320/1337)

IC del 95 %: 98,0 - 99,2%

Concordancia porcentual total: 97,5% (2211/2268)

IC del 95 %: 96,8 - 98,1%

En todos los casos, la concordancia cualitativa entre los métodos de interpretación es bastante alta, lo que indica que los tres métodos (microscopio manual, lectura digital del escáner dIFine® y llamada automatizada del escáner dIFine®) se correlacionan bien entre sí y exhibieron pocas discrepancias.

Además, las determinaciones de patrones se correlacionaron entre diferentes métodos de interpretación; las muestras que no tenían patrón (es decir, "negativas") o las muestras que arrojaron resultados inciertos (es decir, "UNC") se incluyeron en los análisis de concordancia de patrones entre los diferentes métodos de interpretación y se presentan en la siguiente tabla:

|          |           | Método A frente a Método B                                              | Método A frente a Método C                                              | Método B frente a Método C                                              |
|----------|-----------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|          |           | Concordancia porcentual (%)<br>(# Concordancia/Total #)<br>[IC del 95%] | Concordancia porcentual (%)<br>(# Concordancia/Total #)<br>[IC del 95%] | Concordancia porcentual (%)<br>(# Concordancia/Total #)<br>[IC del 95%] |
| Centro 1 | Técnico A | 98,5<br>(386/392)<br>[96,7 - 99,3%]                                     | 84,2<br>(330/392)<br>[80,2 - 87,5%]                                     | 83,9<br>(329/392)<br>[80,0 - 87,2%]                                     |
|          | Técnico B | 97,7<br>(383/392)<br>[95,7 - 98,8%]                                     | 85,0<br>(333/392)<br>[81,1 - 88,2%]                                     | 85,2<br>(334/392)<br>[81,4 - 88,4%]                                     |
| Centro 2 | Técnico A | 96,9<br>(339/350)<br>[94,5 - 98,2%]                                     | 86,0<br>(301/350)<br>[82,0 - 89,3%]                                     | 86,9<br>(304/350)<br>[82,9 - 90,0%]                                     |
|          | Técnico B | 97,7                                                                    | 86,6                                                                    | 87,1                                                                    |

|          |           |                                      |                                     |                                     |
|----------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|          |           | (342/350)<br>[95,6 - 98,8%]          | (303/350)<br>[82,6 - 89,8%]         | (305/350)<br>[83,2 - 90,3%]         |
| Centro 3 | Técnico A | 98,47<br>(386/392)<br>[96,7 - 99,3%] | 88,3<br>(346/392)<br>[84,7 - 91,1%] | 88,5<br>(347-392)<br>[85,0 - 91,3%] |
|          | Técnico B | 98,2<br>(385/392)<br>[96,4 - 99,1%]  | 88,0<br>(345/392)<br>[84,4 - 90,9%] | 87,5<br>(343/392)<br>[83,9 - 90,4%] |

La combinación de los tres centros dio como resultado la siguiente concordancia de patrón:

|                            | Número de concordancia de patrón/Total de muestras | Concordancia porcentual (%) | IC del 95% |
|----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|------------|
| Método A frente a Método B | 2221/2268                                          | 98,0                        | 97,3-98,4% |
| Método A frente a Método C | 1958/2268                                          | 86,3                        | 84,9-87,7% |
| Método B frente a Método C | 1962/2268                                          | 86,5                        | 85,0-87,9% |

Las muestras que dieron positivo con cualquier método en cada punto se titularon hasta el punto final y se interpretaron con los tres métodos. Las muestras que dieron positivo cualitativamente con los tres métodos en cualquier punto se pudieron comparar para determinar la concordancia del punto final. En el sitio uno, hubo 156 muestras tituladas hasta el punto final. En el sitio dos hubo 133 y en el tres, 154. Teniendo en cuenta que había dos técnicos en cada sitio para leer con los métodos A y B, se realizaron 886 comparaciones entre las determinaciones del punto final del método A y el método B, del método A y el método C, y del método B y el método C. La cantidad de veces que coincidieron esas determinaciones del punto final con una dilución doble más o menos se muestra en la siguiente tabla:

| Concordancia de titulación de punto final combinado (todos los centros/todos los técnicos) |                                  |                             |                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------|
| Interpretación                                                                             | [± 1 dilución]/Total de muestras | Concordancia porcentual (%) | IC del 95%     |
| Método A frente a Método B                                                                 | 880/886                          | 99,32                       | 98,53 - 99,69% |
| Método A frente a Método C                                                                 | 879/886                          | 99,21                       | 98,38 - 99,62% |
| Método B frente a Método C                                                                 | 880/886                          | 99,32                       | 98,53 - 99,69% |

Esta comparación muestra que la determinación del punto final entre los métodos es alta y hubo muy pocos casos en los que la dilución del punto final determinada por un método fue superior a la dilución obtenida por otro método.

En conjunto, estos datos demuestran que el patrón de llamada automática identificado por dIFine® (método C) concuerda con los métodos A y B (métodos de identificación de patrones no automatizados) para la mayoría de las muestras. Sin embargo, sigue siendo responsabilidad del operador capacitado tomar la decisión final.

## REFERENCIAS

- Barnett EV: Proc. Clín. Mayo 44:645, 1969.
- Burnham TK, Fine G, Neblett TR: Anales de Med. Int. 63:9, 1966.
- Casals SP, Friou GJ, Meyers LL: Arthritis Reum. 7:379, 1964.
- Condemni JJ, Barnett EV, Atwater EC, et al: Arthritis Reum. 8:1080, 1965.
- Dorsch CA, Gibbs CV, Stevens MB, Shelman LE: Anales de Enf. Reum. 28:313, 1979.
- Dubois ELJ: Rheum. 2:204, 1975.
- Alarcón-Segovia D, Fishbein E: Rev. de Reum. 2:167, 1975.
- Friou GJ: Rev. de Invest. Clín. 36:890, 1957.
- Friou GJ, Finch SC, Detre KD: Rev. de Immuno. 80:324, 1958.
- Coons AH, Creech H, Jones RN, et al: Rev. de Immuno. 80:324, 1958.
- Barnett EV, North AF, Condemni JJ, Jacox RF, Vaughn JH: Anales de Med. Int. 63:100, 1965.
- Lachman PJ, Junkel HG: Lancet. 2:436, 1961.
- Friou GJ: Arthritis y Reum. 7:161, 1964.
- Beck JS: Scot. Med. J. 8:373, 1963.
- Anderson JR, Gray KG, Beck JS, et al: Anales de Enf. Reum. 21:360, 1962.
- Luciano A, Rothfield NF: Anales de Enf. Reum. 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.

28. Raskin J:Arch. Derm. 89:569, 1964.
29. Beck JS, Anderson JR, Gray KG, Rowell NR:Lancet 2:1188, 1963.
30. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second edition; Approved Standard (1984). Published by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.
31. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
32. Beck JS:Lancet, 1:1203, 1961.
33. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM,et al:Am. J. Med. 52:48, 1972.
34. Burnham TK, Neblett TR, Fine G:Am. J. Clin. Path. 50:683, 1968.
35. Textbook of Immunopathology, Vol II, P Miescher and HJ Muller-Eberhard (Eds), Glune & Stratton, NY, 1969.
36. Wittingham S. Irvin J, Mackay IR, et al:Aust. Ann. Med. 18:130, 1969.
37. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
38. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines - 4<sup>th</sup> Edition (2010). CLSI Document 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.

## GLOSARIO DE SÍMBOLOS

En el etiquetado de este producto **pueden** aparecer los siguientes símbolos.

| Símbolo                                                                             | Descripción                                       | Símbolo                                                                               | Descripción                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|    | Fabricante                                        | <b>S L D</b>                                                                          | Portaobjeto de sustrato                         |
| <b>IVD</b>                                                                          | Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> | <b>BUF</b> <b>PBS</b>                                                                 | Tampón PBS                                      |
| <b>REF</b>                                                                          | Número de catálogo                                | <b>MNTMED</b>                                                                         | Medios de montaje                               |
|  | Suficiente para <i>n</i> pruebas                  | <b>CONJ</b>                                                                           | Conjugado                                       |
| <b>LOT</b>                                                                          | Código de lote                                    | <b>CTRL</b> <b>+</b>                                                                  | ANA (homogénea) Control positivo (suero humano) |
|  | Usar antes de                                     | <b>CTRL</b> <b>-</b>                                                                  | Control negativo                                |
|  | Limitaciones de temperatura de almacenamiento     | <b>Fabricado en EE. UU.</b>                                                           | Fabricado en EE. UU.                            |
| <b>RX Only</b>                                                                      | Solo con receta médica                            |  | Guardar en posición vertical                    |
|  | Consulte las instrucciones electrónicas de uso    | <b>COVGLS</b>                                                                         | Tapa de cristal                                 |
|  | Mantener alejado de la luz solar                  | <b>CE</b>                                                                             | Conformidad con la Directiva 98/79              |

**ZEUS Scientific**

200 Evans Way, Branchburg, Nueva Jersey, 08876, EE. UU.

Llamada gratuita (EE. UU.): 1-800-286-2111, opción 2

Internacional: +1 908-526-3744

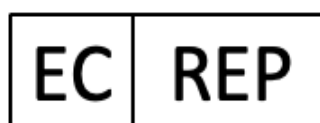
Fax: +1 908-526-2058

Para el servicio de atención al cliente en EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local.

Para el servicio de asistencia técnica en EE. UU., póngase en contacto con ZEUS Scientific, llamando al número gratuito o enviando un correo electrónico a [asupport@zeusscientific.com](mailto:asupport@zeusscientific.com).

Para consultas sobre el servicio de atención al cliente y asistencia técnica fuera de EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local.

**©2019 ZEUS Scientific. Todos los derechos reservados.**



EMERGO EUROPE  
Westervoortsedijk 60  
6827 AT Arnhem  
The Netherlands