



IT

## ddsDNA (Crithidia I.)

REF FA1001

IVD

Rx Only



### DESTINAZIONE D'USO

Il kit dsDNA (Crithidia I.) è un test di immunofluorescenza indiretta che utilizza *Crithidia lucilliae* per la determinazione qualitativa e semi-quantitativa degli anticorpi IgG anti-DNA a doppio filamento (dsDNA) nel siero umano, mediante microscopia a fluorescenza manuale o con il microscopio automatizzato diFine®. La presenza di anticorpi anti-dsDNA, in combinazione con altri risultati sierologici e clinici, può essere utile per aiutare nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico (LES).

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Gli anticorpi anti-dsDNA (DNA a doppio filamento) sono frequentemente presenti nei sieri di pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) spontaneo attivo e nelle malattie da lupus indotto da farmaci (1-9). La presenza di anticorpi anti-dsDNA è indicativa di LES attivo e correla strettamente con l'insorgenza di nefrite lupica (5, 10-13). La specificità degli anticorpi anti-dsDNA per il LES è molto maggiore rispetto agli anticorpi antinucleo (ANA) (5, 12). Pertanto, il rilevamento degli anticorpi anti-dsDNA fornisce informazioni diagnostiche e prognostiche preziose per la diagnosi differenziale del LES (5, 10-13).

Gli anticorpi anti-DNA sono stati scoperti nei sieri di pazienti con LES diversi decenni fa (1-4). Da allora, questi anticorpi sono stati studiati con varie tecniche, tra cui diffusione su gel (1, 14-15), fissazione del complemento (2, 14, e 16), agglutinazione (17, 18), test su macchia di DNA (13, 19), radioimmuno-elettroforesi (20), controimmuno-elettroforesi (21, 22), precipitazione con solfato di ammonio (10, 23, e 24) e test ELISA (38). Sono stati compiuti notevoli sforzi per determinare la specificità degli anticorpi anti-DNA.

È ormai evidente che sono stati trovati anticorpi che reagiscono sia con dsDNA che con DNA a singolo filamento denaturato (sDNA), o con entrambi (8, 12, 14 e 20). Si ritiene che gli anticorpi anti-dsDNA correlino con l'attività clinica della malattia (2, 5, 10, 25, 39, 40). Inoltre, gli anticorpi anti-dsDNA sono stati eluibili dai reni di pazienti con LES, e un rapporto ha dimostrato la presenza di complessi DNA-anti-dsDNA nei sieri di pazienti con LES attivo (26). Tuttavia, questi anticorpi sono stati riscontrati sia in pazienti con nefrite lupica attiva sia in quelli senza (27, 28).

Il test immunofluorescente indiretto (IFA) anti-dsDNA (Crithidia I.) si basa sull'uso del substrato del cinetoplasto di *Crithidia lucilliae*, descritto per la prima volta da Aarden et al. (29). Questo metodo è un test di laboratorio utile per rilevare gli anticorpi anti-dsDNA in pazienti con lupus eritematoso sistemico (30-33).

### PRINCIPIO DEL TEST

Il kit dsDNA (Crithidia I.) è un test anticorpale fluorescente indiretto (IFA) per la determinazione qualitativa e semi-quantitativa degli anticorpi IgG anti-dsDNA nel siero umano. La reazione avviene in due fasi:

1. Primo passaggio: Se sono presenti gli anticorpi anti-dsDNA, si verifica una reazione tra gli anticorpi anti-dsDNA e il cinetoplasto del substrato di *Crithidia I.* nel primo passaggio.
2. Secondo passaggio: Si aggiunge il coniugato di anticorpo di capra anti-immunoglobuline umane marcato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) al substrato. Se il siero del paziente contiene anticorpi anti-dsDNA IgG, una reazione positiva di antigene-anticorpo fluorescente di colore verde mela sarà osservata quando i vetrini vengono esaminati con un microscopio a fluorescenza. Una reazione positiva è riconosciuta come una reazione di colorazione intensa nei piccoli cinetoplasti dell'organismo *Crithidia I.*

### REAGENTI

#### Materiali forniti:

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

**NOTA: Il coniugato e i controlli contengono una combinazione di proclin (0,05% v/v) e azide di sodio (<0,1% p/v) come conservanti.**

<b>SLD</b>	1	Vetrini di substrato Crithidia I.: Dieci vetrini da 10 pozzetti con carta assorbente.
<b>CONJ</b>	2	Coniugato: Anticorpo di capra anti-immunoglobuline umane marcata con FITC. Contiene tampone fosfato con BSA e colorante di contrasto. Due flaconi da 3,5 mL con tappo ambrato. Pronti all'uso.
<b>CTRL +</b>	3	Controllo Positivo (Siero umano): Produce una colorazione positiva verde mela del cinetoplasto negli organismi Crithidia I. Una fiala da 0,5 mL con tappo rosso. Pronta all'uso.
<b>CTRL -</b>	4	Controllo Negativo (Siero umano): Non produce alcuna colorazione rilevabile del dsDNA. Una fiala da 0,5 mL con tappo verde. Pronta all'uso.

<b>BUF</b>	<b>PBS</b>	5	Tampone fosfato salino (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Svotare il contenuto di ogni confezione di tampone in un litro di acqua distillata o deionizzata. Mescolare fino a sciogliere completamente tutti i sali. Due bustine, sufficienti per preparare 2 litri.
<b>MNTMED</b>		6	Mezzo di montaggio (glicerolo tamponato): Una fiala da 3,0 mL con tappo bianco e contagocce.
<b>COVGLS</b>		7	Coprivetrini. Confezione da dodici, 24 x 60 mm, spessore #1.

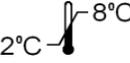
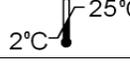
#### NOTE:

I seguenti componenti non dipendono dal numero di lotto del kit e possono essere utilizzati in modo intercambiabile con i prodotti IFA di Sebia, a condizione che i numeri di prodotto siano identici: Mezzo di montaggio (Codice prodotto: FA0009S), Controllo Negativo (Codice prodotto: FA2005-IUNC), Coprivetrino (Codice prodotto: S8007) e PBS (Codice prodotto: 0008S).

#### MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

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

#### INDICAZIONI DI CONSERVAZIONE

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

#### PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Seguire le normali precauzioni durante la manipolazione dei reagenti di laboratorio. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico. Indossare abbigliamento protettivo adeguato, guanti e protezione per occhi e viso. Non respirare i vapori. Smaltire i rifiuti seguendo tutte le normative locali, statali e federali.
3. I pozzetti del vetrino non contengono organismi vitali. Tuttavia, considerare il vetrino come **materiali potenzialmente a rischio biologico** e trattarlo di conseguenza.
4. I controlli sono **materiali potenzialmente a rischio biologico**. I materiali di partenza da cui sono stati ricavati questi prodotti sono risultati negativi all'antigene HIV-1, all'HBsAg e agli anticorpi contro HCV e HIV con metodi di analisi approvati. Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi può offrire una garanzia completa dell'assenza di agenti infettivi, questi prodotti devono essere manipolati al livello di biosicurezza 2, come raccomandato per qualsiasi siero umano potenzialmente infettivo o campione di sangue nel manuale del Center for Disease Control/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (edizione attuale) e nello Standard OSHA per i patogeni trasmessi per via ematica (20).
5. Il rispetto dei tempi e della temperatura di incubazione indicati è essenziale per ottenere risultati accurati. **Tutti i reagenti devono essere lasciati raggiungere la temperatura ambiente (20 - 25°C) prima di iniziare il test.** Restituire immediatamente i reagenti non utilizzati nei loro contenitori originali e seguire le indicazioni per la conservazione.
6. Un lavaggio improprio potrebbe causare risultati falsi positivi o falsi negativi. Assicurarsi di minimizzare la quantità di PBS residuo, tamponando, prima di aggiungere il coniugato. Non permettere che i pozzetti si asciughino tra le incubazioni.
7. Il coniugato e i controlli contengono Azide di sodio a una concentrazione di <0,1% (p/v). È stato riferito che l'azide di sodio può formare azidi di piombo o rame negli impianti idraulici di laboratorio, il che potrebbe causare esplosioni se colpiti. Per prevenire ciò, sciacquare accuratamente il lavandino con acqua dopo aver smaltito soluzioni contenenti azide di sodio. Questo conservante potrebbe essere tossico se ingerito.
8. La diluizione o adulterazione di questi reagenti potrebbe generare risultati errati.
9. Non pipettare mai con la bocca. Evitare il contatto dei reagenti e dei campioni del paziente con la pelle e le mucose.
10. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti. Risultati errati potrebbero verificarsi.
11. La contaminazione incrociata dei reagenti e/o dei campioni potrebbe causare risultati errati.
12. Il vetro riutilizzabile deve essere lavato e sciacquato accuratamente per rimuovere tutti i detersivi.
13. Evitare schizzi o la formazione di aerosol.
14. Non esporre i reagenti alla luce intensa durante la conservazione o l'incubazione.

15. Lasciare che il pacchetto dei vetrini si equilibri alla temperatura ambiente prima di aprire la busta protettiva per proteggere i pozzetti e la carta assorbente dalla condensazione.
16. Raccogliere la soluzione di lavaggio in un contenitore di smaltimento. Trattare la soluzione di scarto con un disinfettante (ad esempio: candeggina domestica al 10% – 0,5% di Ipoclorito di Sodio). Evitare l'esposizione dei reagenti ai vapori di candeggina.
17. Non esporre nessuno dei reagenti reattivi a soluzioni contenenti candeggina o a forti odori derivanti da soluzioni contenenti candeggina. Piccole tracce di candeggina (Ipoclorito di Sodio) potrebbero distruggere l'attività biologica di molti dei reagenti reattivi in questo sistema di test.
18. Non applicare pressione alla busta dei vetrini. Ciò potrebbe danneggiare il substrato.
19. I componenti di questo sistema di test sono abbinati per ottenere la massima sensibilità e riproducibilità. I reagenti di altri produttori non devono essere scambiati. Seguire attentamente le istruzioni nel foglio illustrativo.
20. I componenti non aperti/aperti sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta, a condizione che vengano seguite scrupolosamente le condizioni di conservazione raccomandate. Non utilizzare oltre la data di scadenza. Non congelare.
21. L'Evans Blue Counterstain è un potenziale cancerogeno. Se viene a contatto con la pelle, sciacquare con acqua. Smaltire secondo le normative locali.
22. Non lasciare che i vetrini si asciughino durante la procedura. A seconda delle condizioni di laboratorio, potrebbe essere necessario mettere i vetrini in una camera umida durante le incubazioni.

## RACCOLTA DEL CAMPIONE

1. Eseguire la raccolta del campione in conformità con il documento CLSI M29: Protezione dei lavoratori di laboratorio dalle malattie infettive acquisite per lavoro. Nessun metodo di test conosciuto può garantire completamente che i campioni di sangue umano non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i derivati del sangue devono essere considerati potenzialmente infettivi.
2. Utilizzare solo siero prelevato di recente e correttamente refrigerato ottenuto mediante procedure di venipuntura asettica approvate per questo test (34, 35). Non devono essere aggiunti anticoagulanti o conservanti. Evitare di utilizzare siero emolizzato, lipemico o contaminato battericamente.
3. Conservare il campione a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non viene eseguito entro 8 ore, il siero può essere conservato tra 2 - 8°C, per un massimo di 48 ore. Se si prevede un ritardo nel test, conservare il siero a -20°C o inferiore. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo che possono causare perdita di attività degli anticorpi e dare risultati errati. È responsabilità del laboratorio utilizzare tutti i riferimenti disponibili e/o i propri studi per determinare i criteri di stabilità per il proprio laboratorio (37).

## PROCEDURA DEL TEST

1. Rimuovere i vetrini e gli altri componenti del kit dalla conservazione in frigorifero e lasciarli riscaldare a temperatura ambiente (20 - 25°C). Aprire la busta protettiva e rimuovere i vetrini. **Non applicare pressione sui lati piatti della busta protettiva.**
2. Identificare ogni pozzetto con il siero del paziente e i controlli appropriati. **NOTA: I controlli sono destinati ad essere usati non diluiti.** Preparare una diluizione 1:10 (ad esempio: 10 µL di siero + 90 µL di PBS) di ciascun siero del paziente.

### Opzioni Semi-Quantitative:

- a. Gli utenti possono titolare il controllo Positivo fino all'endpoint per fungere da controllo semiquantitativo (1+ minimamente reattivo). In tal caso, il controllo deve essere diluito due volte in PBS. Una diluizione finale è stabilita e stampata sulla fiala del controllo Positivo (± una diluizione). Si noti che, a causa delle variazioni all'interno del laboratorio (apparecchiature, ecc.), ogni laboratorio deve stabilire il proprio titolo finale previsto per ogni lotto di controllo Positivo.
- b. Quando si titolano i campioni dei pazienti, le diluizioni iniziali 1:10 devono essere preparate in PBS e tutte le successive diluizioni devono essere anch'esse preparate in PBS.
3. Con un dispensatore adeguato, distribuire 20µL di ciascun controllo e di ciascun siero diluito del paziente nei pozzetti appropriati.
4. Incubare i vetrini a temperatura ambiente (20 - 25°C) per 35 ± 5 minuti.
5. Risciacquare delicatamente i vetrini con PBS. Se il lavaggio è manuale, **non indirizzare un getto di PBS nei pozzetti di test.**
6. Lavare i vetrini per due intervalli di 5 minuti, cambiando PBS tra i lavaggi.
7. Rimuovere i vetrini dal PBS uno alla volta. Invertire il vetrino e collegare i pozzetti ai fori dei tamponi in dotazione. Tamponare il vetrino strofinando il retro con un panno assorbente **ATTENZIONE:** posizionare il tampone e il vetrino su una superficie dura e piana. La tamponatura su carta assorbente può distruggere la matrice del vetrino. **Non lasciare che i vetrini si asciughino durante la procedura di test.**
8. Aggiungere 20-40 µL di coniugato in ogni pozzetto.
9. Ripetere i passaggi da 4 a 7.
10. Applicare 3-5 gocce di mezzo di montaggio su ogni vetrino tra i pozzetti e applicare il coprivetrino. In alternativa, si può applicare una piccola quantità di mezzo di montaggio in ogni pozzetto e applicare il coprivetrino. Esaminare immediatamente i vetrini con un microscopio a fluorescenza appropriato.

**NOTA: Se si prevede un ritardo nell'esame dei vetrini, sigillare il coprivetrino con dello smalto trasparente e conservare in frigorifero. Si consiglia di esaminare i vetrini lo stesso giorno del test.**

## CONTROLLO QUALITÀ

1. Ogni volta che il test viene eseguito, devono essere inclusi un controllo Positivo e un controllo Negativo.
2. È consigliato leggere i controlli positivo e negativo prima di valutare i risultati del test. Questo aiuterà a stabilire i riferimenti necessari per interpretare i campioni del test. Se i controlli non appaiono come descritto, i risultati sono invalidi.
  - a. Controllo Negativo - caratterizzato dall'assenza di colorazione fluorescente del kinetoplasto. La colorazione solo del nucleo e/o la colorazione del corpo basale devono essere interpretate come un test negativo.
  - b. Controllo Positivo - caratterizzato da qualsiasi colorazione fluorescente verde-apple del kinetoplasto. La colorazione del corpo basale **in concomitanza con** il kinetoplasto deve essere considerata un risultato positivo.

3. Possono essere testati ulteriori controlli secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.

**NOTE:**

- a. **L'intensità della fluorescenza osservata può variare in base al microscopio e al sistema di filtri utilizzato.**
- b. **Il kinetoplasto è generalmente situato più vicino al corpo basale rispetto al nucleo; tuttavia, a causa della natura fluida dell'endoplasma, la posizione del kinetoplasto può variare da cellula a cellula (36).**
- c. **Leggere solo gli organismi singoli e ben definiti in ogni campo. Non tutti gli organismi appariranno ottimali; la morfologia può variare tra gli organismi a causa della fissazione, dei loro stadi di crescita e/o della loro orientazione sul vetrino mentre si asciugano (36).**

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

1. Titoli inferiori a 1:10 sono considerati negativi.
2. Test Positivo: Qualsiasi colorazione verde mela osservata nel piccolo kinetoplasto dell'organismo del substrato Crithidia I., a una diluizione di 1:10, secondo una scala da 1+ a 4+. 1+ è considerato una reazione debole, mentre 4+ è una reazione forte.
3. Per risultati semiquantitativi, tutti i sieri positivi a 1:10 devono essere titolati alla diluizione endpoint. Questo si ottiene facendo una diluizione seriale di 1:10, 1:20, 1:40, ecc., di tutti i campioni positivi dei pazienti. L'endpoint è la diluizione più alta che produce una reazione positiva.
4. La colorazione sia del piccolo kinetoplasto che del nucleo più grande e adiacente di Crithidia I. simultaneamente dovrebbe essere interpretata come un test positivo.
5. La colorazione polare alla base dei flagelli non è significativa.
6. La colorazione del solo nucleo non dovrebbe essere interpretata come un test positivo.

**LIMITAZIONI DEL TEST**

1. Il kit dsDNA (Crithidia I.) è un ausilio diagnostico. È quindi fondamentale che i risultati degli anticorpi anti-dsDNA siano interpretati alla luce delle condizioni cliniche del paziente da un'autorità medica.
2. I pazienti con SLE sottoposti a terapia steroidea potrebbero ottenere risultati negativi al test (5, 8 e 9).
3. Alcuni farmaci, in particolare l'idralazina, possono indurre la produzione di anticorpi anti-dsDNA (5, 6 e 8).

**RISULTATI ATTESI**

I valori attesi in una popolazione normale sono negativi a una diluizione iniziale di 1:10. Tuttavia, alcuni farmaci potrebbero indurre un test positivo per gli anticorpi anti-dsDNA (5, 6).

**CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE**

**NOTA: Quando sono state stabilite le caratteristiche di prestazione del dsDNA (Crithidia I.), i vetrini sono stati interpretati utilizzando tre metodi diversi come descritto di seguito:**

<b>Metodo di Interpretazione:</b>
<b>Metodo A.</b> Il Metodo A è un metodo di interpretazione completamente manuale. È stato eseguito utilizzando un microscopio fluorescente tradizionale, dotato di obiettivi e oculari. La determinazione del risultato qualitativo è stata effettuata da tecnici di laboratorio qualificati.
<b>Metodo B.</b> Il Metodo B è stato eseguito scansionando i vetrini con dIFine® e successivamente il risultato qualitativo è stato interpretato da un tecnico di laboratorio, utilizzando l'immagine digitale visibile sul monitor del computer.
<b>Metodo C.</b> Il Metodo C è il <b>risultato proposto</b> previsto dal sistema dIFine®. Il Metodo C predice il risultato qualitativo. Se il Metodo C è "UNC" (incerto), significa che il livello di fluorescenza misurato da dIFine® è al limite tra positivo e negativo, oppure ci sono altre caratteristiche all'interno del pozzetto del vetrino che hanno impedito una proposta definitiva. Il Metodo C deve essere "validato" o accettato dal tecnico di laboratorio, oppure modificato o completamente invalidato. Per scopi di questo studio e dei dati presentati di seguito, il <b>Metodo C</b> è registrato "COSÌ COM'È" senza alcuna modifica da parte del tecnico di laboratorio. Pertanto, viene presentato solo a scopo informativo.

**1. Studi sulle Prestazioni Analitiche:**

- a. **Linearità:** Sono stati identificati due campioni di siero a bassa positività (~1:10-1:20 endpoint), due campioni di siero a positività media (~1:40-1:80 endpoint) e due campioni di siero a forte positività (>1:320 endpoint). I sei campioni sono stati testati a una diluizione di screening di 1:10, oltre che a diluizioni seriali che vanno da 1:20 fino a 1:5120, successivamente interpretati con tutti e tre i metodi sopra descritti. Questo studio è stato condotto internamente dal produttore. Gli endpoint per ciascun campione e ciascun metodo sono riportati di seguito:

Campione	Metodo A	Metodo B	Metodo C
Basso Positivo-1	1:10	1:20	1:20
Basso Positivo-2	1:20	1:40	1:40*
Medio Positivo-1	1:40	1:80	1:80
Medio Positivo-2	1:40	1:80	1:80
Alto Positivo-1	1:640	1:640	1:640
Alto Positivo-2	1:640	1:640	1:640

\*\*1 risultato UNC alla diluizione 1:80 per il campione Basso Positivo-2 conteggiato come Positivo

Campione	Metodo A	Metodo B	Metodo C
Basso Positivo-1	1:10	1:20	1:20
Basso Positivo-2	1:20	1:40	1:80**
Medio Positivo-1	1:40	1:80	1:80
Medio Positivo-2	1:40	1:80	1:80
Alto Positivo-1	1:640	1:640	1:640
Alto Positivo-2	1:640	1:640	1:640

\*\*1 risultato UNC alla diluizione 1:80 per il campione Basso Positivo-2 conteggiato come Positivo

Per i Metodi A e B, l'intensità della fluorescenza è stata registrata ad ogni diluizione utilizzando una scala da 4 (molto intensa) a 0 (nessuna fluorescenza). Le diluizioni dei campioni e le relative intensità di fluorescenza sono riassunte nelle tabelle che appaiono di seguito:

		Intensità della fluorescenza (4+ a 0); Metodo A									
Campione no.	Descrizione	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
1	Basso Positivo-1	1	0	0	0	0	NT	NT	NT	NT	NT
2	Basso Positivo-2	2	1	0	0	0	NT	NT	NT	NT	NT
3	Medio Positivo-1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4	Medio Positivo-2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
5	Alto Positivo-1	4	3	3	2	2	1	1	0	0	0
6	Alto Positivo-2	4	3	3	2	2	1	1	0	0	0
NT: Non Testato											

		Intensità della fluorescenza (4+ a 0); Metodo B									
Campione no.	Descrizione	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
1	Basso Positivo-1	1	1	0	0	0	NT	NT	NT	NT	NT
2	Basso Positivo-2	2	1	1	0	0	NT	NT	NT	NT	NT
3	Medio Positivo-1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
4	Medio Positivo-2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
5	Alto Positivo-1	4	3	3	2	2	1	1	0	0	0
6	Alto Positivo-2	4	3	3	2	2	1	1	0	0	0
NT: Non Testato											

#### b. Riproducibilità da lotto a lotto::

Sono stati identificati nove campioni di siero negativi, due campioni di siero debolmente positivi (~1:10-1:20 endpoint), due campioni di siero moderatamente positivi (~1:40-1:80 endpoint) e due campioni di siero fortemente positivi (> 1:320 endpoint). Questo gruppo di 15 campioni è stato esaminato a una diluizione di screening 1:10. Per i 6 campioni positivi, sono state effettuate ulteriori diluizioni seriali, da 1:20 a 1:5120, che sono state anch'esse esaminate e interpretate con tutti e tre i metodi indicati sopra, per determinare l'endpoint.

Risultati:

**i. Concordanza qualitativa:** C'è stata una concordanza del 100% nei risultati qualitativi alla diluizione di screening di tutti i 15 campioni attraverso tutti i 3 lotti del kit, per i metodi di interpretazione A e B. Per il lotto 3, è stato ottenuto un risultato UNC tramite il metodo di interpretazione C alla diluizione di screening 1:10 per uno dei campioni positivi deboli.

**ii. Concordanza sul titolo endpoint:** Tutti i 6 campioni positivi hanno mostrato gli stessi titoli finali, con una variazione di  $\pm$  una diluizione, indipendentemente dal lotto del reagente o dal metodo di interpretazione.

#### c. Studio della gamma di riferimento:

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

Metodo di interpretazione	Numero di positivi	% di positivi	Numero di negativi	% di negativi	Numero di incerti	% di incerti
A	2	1,11%	178	98,89%	N/A	N/A
B	2	1,11%	178	98,89%	N/A	N/A
C	1	0,56%	176	97,78%	3	1,67%

**d. Studio di Ripetibilità a Ventidue Giorni:**

Sono stati identificati due campioni di siero negativi, due campioni di siero con bassa positività (~1:10-1:20 endpoint), due campioni di siero con media positività (~1:40-1:80 endpoint) e due campioni di siero con alta positività (>1:320 endpoint). Questi otto campioni sono stati esaminati con una diluizione di screening 1:10 in triplicato, per venti giorni differenti. I risultati qualitativi sono stati interpretati da due tecnici per i Metodi A e B, e da un singolo strumento di Fine per il Metodo C. Le identità dei campioni sono state mascherate e randomizzate indipendentemente prima di ogni giorno di analisi.

I valori di Concordeza sui risultati qualitativi per la valutazione della ripetibilità all'interno del metodo sono riportati nelle tabelle sottostanti e riassunti come segue: c'è stata una Concordeza del 100% nei risultati qualitativi all'interno del metodo per tutti gli otto campioni quando interpretati tramite i Metodi A e B, per entrambi i tecnici. Per il Metodo C, il campione con media positività-1, il campione con alta positività-2 e entrambi i campioni negativi hanno mostrato una Concordeza del 100% nei risultati qualitativi all'interno del metodo. Il campione con bassa positività-1, il campione con bassa positività-2, il campione con media positività-2 e il campione con alta positività-1 hanno mostrato valori di Concordeza del 96,7%, 98,3%, 98,3% e 95,0% rispettivamente. Per i campioni che hanno mostrato meno del 100% di Concordeza all'interno del metodo, tutti i risultati sono stati etichettati come "UNC" (incerti) per le interpretazioni del Metodo C.

**Concordeza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 1)**

Campione	Concordeza Metodo A (95% CI)	Concordeza Metodo B (95% CI)
Basso Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Basso Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Medio Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Medio Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Alto Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Alto Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)

**Concordeza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 2)**

Campione	Concordeza Metodo A (95% CI)	Concordeza Metodo B (95% CI)
Basso Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Basso Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Medio Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Medio Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Alto Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Alto Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)

**Concordanza del Risultato Qualitativo all'interno del Metodo (n = 2 Tecnici Aggregati)**

Campione	Titolazione Endpoint	Concordanza Metodo A (95% CI)	Concordanza Metodo B (95% CI)
Negativo-1	N/A	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Negativo-2	N/A	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Basso Positivo-1	1:10 - 1:20	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Basso Positivo-2	1:20 - 1:40	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Medio Positivo-1	1:40 - 1:80	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Medio Positivo-2	1:40 - 1:80	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Alto Positivo-1	1:320 - 1:640	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Alto Positivo-2	1:160 - 1:320	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)

Campione	Concordanza Metodo B (95% CI)
Basso Positivo-1	96,7% (88,6 - 99,1%)
Basso Positivo-2	98,3% (91,1 - 99,7%)
Medio Positivo-1	100% (88,7 - 100%)
Medio Positivo-2	98,3% (91,1 - 99,7%)
Alto Positivo-1	95,0% (86,3 - 98,3%)
Alto Positivo-2	100% (88,7 - 100%)
Negativo-1	100% (88,7 - 100%)
Negativo-2	100% (88,7 - 100%)

I valori di concordanza dei risultati qualitativi per la valutazione della ripetibilità tra metodi sono riportati nelle tabelle sottostanti e riassunti come segue: c'è stata una concordanza del 100% nei risultati qualitativi all'interno del metodo per tutti gli otto campioni quando interpretati con il Metodo A rispetto al Metodo B, per entrambi i tecnici. Quando il Metodo A e il Metodo B sono stati confrontati con il Metodo C, il campione Medio Positivo-1, il campione Alto Positivo-2 e entrambi i campioni Negativo-1 e Negativo-2 hanno mostrato una concordanza del 100% nei risultati qualitativi tra i metodi. Il campione Basso Positivo-1, il campione Basso Positivo-2, il campione Medio Positivo-2 e il campione Alto Positivo-1 hanno mostrato valori di concordanza nei risultati qualitativi tra i metodi rispettivamente del 96,7%, 98,3%, 98,3% e 95,0%. Per i campioni che hanno mostrato meno del 100% di concordanza tra i metodi, tutti i risultati sono stati etichettati come "UNC" (incerti) nelle interpretazioni del Metodo C.

**Concordanza dei Risultati Qualitativi tra i Metodi (Tecnico 1)**

<b>Campione</b>	<b>Concordanza Metodo A vs Metodo B (95% CI)</b>	<b>Concordanza Metodo A vs Metodo C (95% CI)</b>	<b>Concordanza Metodo B vs Metodo C (95% CI)</b>
Basso Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	96,7% (88,6 - 99,1%)	96,7% (88,6 - 99,1%)
Basso Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	98,3% (91,1 - 99,7%)	98,3% (91,1 - 99,7%)
Medio Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Medio Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	98,3% (91,1 - 99,7%)	98,3% (91,1 - 99,7%)
Alto Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	95,0% (86,3 - 98,3%)	95,0% (86,3 - 98,3%)
Alto Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)

**Concordanza dei Risultati Qualitativi tra i Metodi (Tecnico 2)**

<b>Campione</b>	<b>Concordanza Metodo A vs Metodo B (95% CI)</b>	<b>Concordanza Metodo A vs Metodo C (95% CI)</b>	<b>Concordanza Metodo B vs Metodo C (95% CI)</b>
Basso Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	96,7% (88,6 - 99,1%)	96,7% (88,6 - 99,1%)
Basso Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	98,3% (91,1 - 99,7%)	98,3% (91,1 - 99,7%)
Medio Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Medio Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	98,3% (91,1 - 99,7%)	98,3% (91,1 - 99,7%)
Alto Positivo-1	100% (88,7 - 100%)	95,0% (86,3 - 98,3%)	95,0% (86,3 - 98,3%)
Alto Positivo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-1	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo-2	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)

**Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi (n = 2 Tecnici Aggregati)**

Campione	Titolazione Endpoint	Concordanza Metodo A vs Metodo B (95% CI)	Concordanza Metodo A vs Metodo C (95% CI)	Concordanza Metodo B vs Metodo C (95% CI)
Basso Positivo-1	N/A	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Basso Positivo-2	N/A	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Medio Positivo-1	1:10 - 1:20	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	116/120 = 96,7% (91,7 - 98,7%)	116/120 = 96,7% (91,7 - 98,7%)
Medio Positivo-2	1:20 - 1:40	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	118/120 = 98,3% (94,1 - 99,5%)	118/120 = 98,3% (94,1 - 99,5%)
Alto Positivo-1	1:40 - 1:80	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)
Alto Positivo-2	1:40 - 1:80	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	118/120 = 98,3% (94,1 - 99,5%)	118/120 = 98,3% (94,1 - 99,5%)
Negativo-1	1:320 - 1:640	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	114/120 = 95% (89,5 - 97,7%)	114/120 = 95% (89,5 - 97,7%)
Negativo-2	1:160 - 1:320	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)	120/120 = 100% (96,9 - 100%)

**e. Studio di Riproducibilità Multisito di Cinque Giorni:**

Sono stati identificati due campioni di siero negativi, due campioni di siero a bassa positività (<math>-1:10-1:20</math> endpoint), due campioni di siero a media positività (<math>-1:40-1:80</math> endpoint) e due campioni di siero a forte positività (<math>>1:320</math> endpoint). Questi otto campioni sono stati analizzati in una diluizione di screening di 1:10, in triplicato, due volte al giorno, per cinque giorni diversi, in tre laboratori differenti. I risultati qualitativi sono stati interpretati da due tecnici per ciascun laboratorio per i Metodi A e B, e da uno strumento dFine in ciascun laboratorio per il Metodo C. Le identità dei campioni sono state mascherate e randomizzate indipendentemente prima di ogni giorno di test.

I risultati della concordanza qualitativa sono riportati di seguito:

**i. Concordanza dei Risultati Qualitativi**

**a. All'interno del Metodo**

**Sito 1 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 1)**

Campione	Metodo A (IC 95%)	Metodo B (IC 95%)
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 1 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 2)**

Campione	Metodo A (IC 95%)	Metodo B (IC 95%)
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 1 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo**

Campione	Metodo C (IC 95%)
Basso Positivo-1	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Basso Positivo-2	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Negativo-1	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Negativo-2	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)

**Sito 2 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 1)**

Campione	Metodo A (IC 95%)	Metodo B (IC 95%)
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 2 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 2)**

Campione	Metodo A (IC 95%)	Metodo B (IC 95%)
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 2 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo**

Campione	Metodo C (IC 95%)
Basso Positivo-1	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Basso Positivo-2	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 3 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 1)**

Campione	Metodo A (IC 95%)	Metodo B (IC 95%)
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 3 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo (Tecnico 2)**

Campione	Metodo A (IC 95%)	Metodo B (IC 95%)
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 1 - Concordanza dei Risultati Qualitativi all'interno del Metodo**

Campione	Metodo C (IC 95%)
Basso Positivo-1	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)
Basso Positivo-2	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)
Alto Positivo-1	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**a. Tra Metodi:**

**Sito 1 - Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi (Tecnico 1)**

Campione	Metodo A vs Metodo B (95% CI)	Metodo A vs Metodo C (95% CI)	Metodo B vs Metodo C (95% CI)
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)

**Sito 1 - Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi (Tecnico 2)**

<b>Campione</b>	<b>Metodo A vs Metodo B (95% CI)</b>	<b>Metodo A vs Metodo C (95% CI)</b>	<b>Metodo B vs Metodo C (95% CI)</b>
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)

**Sito 2 - Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi (Tecnico 1)**

<b>Campione</b>	<b>Metodo A vs Metodo B (95% CI)</b>	<b>Metodo A vs Metodo C (95% CI)</b>	<b>Metodo B vs Metodo C (95% CI)</b>
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 2 - Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi (Tecnico 2)**

<b>Campione</b>	<b>Metodo A vs Metodo B (95% CI)</b>	<b>Metodo A vs Metodo C (95% CI)</b>	<b>Metodo B vs Metodo C (95% CI)</b>
Basso Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)	28/30 - 93,33% (78,68 - 98,15%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 3 - Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi (Tecnico 1)**

<b>Campione</b>	<b>Metodo A vs Metodo B (95% CI)</b>	<b>Metodo A vs Metodo C (95% CI)</b>	<b>Metodo B vs Metodo C (95% CI)</b>
Basso Positivo-1	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)	26/30 - 86,67% (70,32 - 94,69%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

**Sito 3 - Concordanza dei Risultati Qualitativi tra Metodi (Tecnico 2)**

<b>Campione</b>	<b>Metodo A vs Metodo B (95% CI)</b>	<b>Metodo A vs Metodo C (95% CI)</b>	<b>Metodo B vs Metodo C (95% CI)</b>
Basso Positivo-1	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)	26/30 - 86,67% (70,32 - 94,69%)
Basso Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Medio Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Medio Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)	27/30 - 90,00% (74,38 - 96,54%)
Alto Positivo-1	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Alto Positivo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)
Negativo-1	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	29/30 - 96,67% (83,33 - 99,41%)
Negativo-2	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)	30/30 - 100% (88,65 - 100,00%)

Se si combinano tutti gli otto campioni, per un totale di 240 risultati, i risultati qualitativi possono essere riassunti come segue:

**Riproducibilità Multisito del Metodo A:**

**Risultati qualitativi provenienti da tre siti e due tecnici per sito, confrontando sito per sito e tecnico per tecnico.**

			Sito 1		Sito 2		Sito 3				
			Tecnico 1	Tecnico 2	Tecnico 1	Tecnico 2	Tecnico 1	Tecnico 2			
			Metodo A		Metodo A		Metodo A				
Sito 1	Tecnico 1	Metodo A		240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)			
	Tecnico 2			240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)				
Sito 2	Tecnico 1	Metodo A				240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)		
	Tecnico 2					240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)		
Sito 3	Tecnico 1	Metodo A								240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)
	Tecnico 2									240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)

**Riproducibilità Multisito del Metodo B:**

**Risultati qualitativi provenienti da tre siti e due tecnici per sito, confrontando sito per sito e tecnico per tecnico.**

			Sito 1		Sito 2		Sito 3															
			Tecnico 1	Tecnico 2	Tecnico 1	Tecnico 2	Tecnico 1	Tecnico 2														
			Metodo B		Metodo B		Metodo B															
Sito 1	Tecnico 1	Metodo B						240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)										
	Tecnico 2							240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)										
Sito 2	Tecnico 1	Metodo B											240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)					
	Tecnico 2												240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)	238/240 - 99,17% (97,01 - 99,77)					
Sito 3	Tecnico 1	Metodo B																			240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)
	Tecnico 2																				240/240 - 100% (98,42 - 100,00)	240/240 - 100% (98,42 - 100,00)

**Riproducibilità multisito del Metodo C: confronto tra sito e sito**

		Sito 1	Sito 2	Sito 3
		Metodo C		
Sito 1	Metodo C		227/240 - 94,58% (90,95 - 96,81)	230/240 - 95,83% (92,50 - 97,72)
Sito 2			231/240 - 96,25% (93,03 - 98,01)	
Sito 3				

**f. Studio di Interferenza:**

Sono stati identificati due campioni di siero negativi, due campioni di siero a bassa positività (~1:10-1:20 endpoint), due campioni di siero a media positività (~1:40-1:80 endpoint) e due campioni di siero a forte positività (> 1:320 endpoint). Questi 8 campioni sono stati arricchiti con due diverse concentrazioni (arricchimento basso e arricchimento alto) di diciannove interferenti diversi, come indicato nella tabella sottostante. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato utilizzando il kit dsDNA (Crithidia I.) e interpretati con i tre metodi sopra menzionati. I risultati qualitativi sono stati interpretati da due tecnici per i Metodi A e B e da uno strumento diFine per il Metodo C.

<b>Sostanze Endogene</b>		
<b>Sostanza</b>	<b>Bassa Concentrazione</b>	<b>Alta Concentrazione</b>
Bilirubina (non coniugata)	0,02 mg/mL	0,15 mg/mL
Colesterolo (totale)	1,5 mg/mL	2,2 mg/mL
Trigliceridi (totali)	1 mg/mL	2,5 mg/mL
Albumina	35 mg/mL	52 mg/mL
Emoglobina	100 mg/mL	200 mg/mL
Fattore Reumatoide (RF)	200 U/mL	400 U/mL
<b>Sostanze Esogene</b>		
<b>Sostanza</b>	<b>Bassa Concentrazione</b>	<b>Alta Concentrazione</b>
Intralipidi	2,0 mg/mL	20 mg/mL
Ciclofosfamide	0,183 mg/mL	0,549 mg/mL
Ibuprofene	0,073 mg/mL	0,219 mg/mL
Idrossiclorochina	0,006 mg/mL	0,024 mg/mL
Simvastatina	0,0000277 mg/mL	0,000083 mg/mL
Prednisone	0,000033 mg/mL	0,000099 mg/mL
Azatioprina	0,00086 mg/mL	0,00258 mg/mL
Diltiazem	0,0003 mg/mL	0,0009 mg/mL
Micofenolato mofetile	0,012 mg/mL	0,048 mg/mL
Rituximab	0,5 mg/mL	2 mg/mL
Belimumab	2 mg/mL	8 mg/mL
Metotrexato	0,454 mg/mL	1,36 mg/mL
Naprossene	0,12 mg/mL	0,36 mg/mL
Enalapril	Not tested	819 ng/mL
Voclosporina	Not tested	210 ng/mL

Nessuno degli interferenti ha influenzato i risultati attesi di nessun campione quando letti con i Metodi A e B. Quando le combinazioni interferente/campione sono state testate, il Metodo C ha prodotto risultati incerti in diversi campioni: campione "basso negativo-2" arricchito con alta concentrazione di ciclofosfamide, campione "basso positivo-2" arricchito con concentrazione bassa e alta di idrossiclorochina, campione "medio positivo-2" arricchito con concentrazione bassa di azatioprina e alta concentrazione di bilirubina, campione "alto positivo-1" arricchito con concentrazione bassa di trigliceridi e alta concentrazione di albumina. In generale, si può concludere che il kit dsDNA (Crithidia I.) non è a rischio di generare risultati errati a causa della presenza degli interferenti testati.

**2. Studio delle prestazioni cliniche:**

I 660 campioni clinicamente caratterizzati utilizzati sono descritti nella tabella sottostante. Questi 660 campioni sono stati aliquotati, mascherati, randomizzati e valutati con una diluizione di screening 1:10 tramite il dsDNA (Crithidia I.), in combinazione con il sistema di microscopio automatizzato diFine®, presso tre laboratori indipendenti. I risultati qualitativi sono stati interpretati da due tecnici per ciascun laboratorio per i Metodi A e B, e da uno strumento diFine® per ciascun laboratorio per il Metodo C. I campioni positivi tramite i Metodi di interpretazione A e B alla diluizione di screening 1:10 sono stati successivamente diluiti serialmente per determinare una diluizione di endpoint tramite tutti e tre i metodi di interpretazione.

Per ciascun laboratorio, i risultati sono stati utilizzati per valutare la specificità clinica (potenziale reattività crociata), la sensibilità clinica, la concordanza qualitativa tra i metodi di interpretazione e la concordanza del titolo endpoint tra i metodi di interpretazione.

Malattia Target		n	
Lupus Eritematoso Sistemico		300	
Malattie di Controllo	Malattie Associate agli ANA	n	
	Malattie del Tessuto Connettivo	Sindrome di Sjögren	30
		Esclerodermia	20
		MioSito Autoimmune	30
		Malattia Mista del Tessuto Connettivo	20
		CREST	20
	Altre Malattie Autoimmuni Associate agli ANA	Epatite Autoimmune	20
		Colangite Biliare Primaria	10
		Lupus Indotto da Farmaci	20
	Malattie Non Associate agli ANA	n	
	Altre Malattie Autoimmuni	Celiachia	20
		Vasculite (ANCA)	30
		Malattia di Crohn	10
		Artrite Reumatoide	30
		Tiroidite Autoimmune	30
Malattia Infiammatoria Intestinale		10	
Colite Ulcerosa		10	
Altre Malattie	Fibromialgia	10	
	Malattia Infettiva	20	
	Malignità/Cancro	20	
<b>Totale:</b>		<b>660</b>	

### 3. Sensibilità Clinica e Specificità Clinica:

La sensibilità clinica è stata calcolata in ogni sito utilizzando i risultati qualitativi derivanti dai campioni di Lupus Eritematoso Sistemico (n = 300). La specificità è stata calcolata utilizzando il set combinato di risultati qualitativi derivanti dai campioni delle malattie di controllo (n = 360).

#### a. Prestazione Clinica al Sito 1

Sensibilità Diagnostica e Specificità			SLE (n = 300)	Malattie di Controllo (n = 360)
			% Sensibilità (95% CI)	% Specificità (95% CI)
Sito 1	Metodo A	Tecnico A	26,67 (21,98 – 31,94)	99,17 (97,58 – 99,72)
	Metodo A	Tecnico B	27,00 (22,29 – 32,29)	99,72 (98,44 – 99,95)
	Metodo B	Tecnico A	26,67 (21,98 – 31,94)	99,17 (97,58 – 99,72)
	Metodo B	Tecnico B	27,00 (22,29 – 32,29)	99,44 (98,00 – 99,85)
	Metodo C	dIFine	27,00 (22,29 – 32,29)	99,17 (97,58 – 99,72)

#### b. Prestazione Clinica al Sito 2

Sensibilità Diagnostica e Specificità			SLE (n = 300)	Malattie di Controllo (n = 360)
			% Sensibilità (95% CI)	% Specificità (95% CI)
Sito 2	Metodo A	Tecnico A	24,33 (19,82 – 29,49)	99,72 (98,44 – 99,95)
	Metodo A	Tecnico B	25,00 (20,44 – 30,20)	99,17 (97,58 – 99,72)
	Metodo B	Tecnico A	25,00 (20,44 – 30,20)	99,72 (98,44 – 99,95)
	Metodo B	Tecnico B	24,33 (19,82 – 29,49)	99,17 (97,58 – 99,72)
	Metodo C	dIFine	22,33 (17,99 – 27,38)	99,17 (97,58 – 99,72)

#### c. Prestazione Clinica al Sito 3

Sensibilità Diagnostica e Specificità			SLE (n = 300)	Malattie di Controllo (n = 360)
			% Sensibilità (95% CI)	% Specificità (95% CI)
Sito 3	Metodo A	Tecnico A	25,33 (20,74 – 30,55)	98,89 (97,18 – 99,57)
	Metodo A	Tecnico B	25,67 (21,05 – 30,90)	99,17 (97,58 – 99,72)
	Metodo B	Tecnico A	25,33 (20,74 – 30,55)	97,78 (95,68 – 98,87)
	Metodo B	Tecnico B	25,67 (21,05 – 30,90)	97,50 (95,32 – 98,68)
	Metodo C	dIFine	24,33 (19,82 – 29,49)	97,50 (95,32 – 98,68)

I valori di sensibilità per il gruppo SLE sono variati dal 22,33% al 27,0% attraverso tutti e tre i metodi e tutti e tre i siti. La percentuale di positività osservata nel gruppo SLE sembrava inferiore a quella attesa; tuttavia, era in linea con i riassunti FDA 510k di dispositivi simili. La percentuale di positività inferiore potrebbe essere dovuta a una varietà di fattori dipendenti dai pazienti al momento della raccolta del siero, come: la

presenza di trattamenti immunosoppressivi forti, bassa attività della malattia o remissione della malattia. La percentuale di positività in questo gruppo SLE è stata ulteriormente confermata utilizzando un altro prodotto IFA Crithidia I. anti-dsDNA approvato dalla FDA. La specificità clinica tra il gruppo delle malattie di controllo è variata dal 97,5% al 99,72% attraverso tutti e tre i metodi e tutti e tre i siti. Se si calcola la media di tutti i metodi di interpretazione su tutti e tre i siti, la sensibilità clinica nel gruppo SLE è risultata in media del 25,44% e la specificità clinica nel gruppo delle malattie di controllo è risultata in media del 99,06%.

#### 4. Confronto tra i Metodi di Interpretazione:

Sono stati testati 660 campioni clinici presso tutti e tre i siti clinici. Considerando le interpretazioni registrate da tutti e tre i siti per questi 660 campioni, ci sono stati un totale di 3.960 casi in cui è stato possibile confrontare i risultati tra il Metodo A e il Metodo B, il Metodo A e il Metodo C, e il Metodo B e il Metodo C. Un riassunto di questi confronti qualitativi appare nelle tabelle sottostanti:

##### a. Confronto Qualitativo tra il Metodo A e il Metodo B

Metodo A vs Metodo B		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	83/83, 100,00% (95,58 - 100,00)	577/577, 100,00% (99,34 - 100,00)	660/660, 100,00% (99,42 - 100,00)
	Tecnico B	81/82, 98,78% (93,41 - 99,78)	576/578, 99,65% (98,75 - 99,91)	657/660, 99,55% (98,67 - 99,85)
Sito 2	Tecnico A	74/74, 100,00% (95,07 - 100,00)	584/586, 99,66% (98,76 - 99,91)	658/660, 99,70% (98,90 - 99,92)
	Tecnico B	76/78, 97,44% (91,12 - 99,29)	582/582, 100,00% (99,34 - 100,00)	658/660, 99,70% (98,90 - 99,92)
Sito 3	Tecnico A	80/80, 100,00% (95,42 - 100,00)	576/580, 99,31% (98,24 - 99,73)	656/660, 99,39% (98,45 - 99,76)
	Tecnico B	80/80, 100,00% (95,42 - 100,00)	574/580, 98,97% (97,76 - 99,53)	654/660, 99,09% (98,03 - 99,58)

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

Metodo B		Metodo A	
		Positivo	Negativo
Positivo		474	14
Negativo		3	3469
Concordanza Percentuale Positiva =		99,37% (474/477)	95% Intervallo di Confidenza = 98,17 - 99,79%
Concordanza Percentuale Negativa =		99,60% (3469/3483)	95% Intervallo di Confidenza = 99,33 - 99,76%
Concordanza Percentuale Totale =		99,57% (3943/3960)	95% Intervallo di Confidenza = 99,31 - 99,73%

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

Per i confronti tra il Metodo A e il Metodo C, questi sono stati calcolati due volte: una volta assumendo che tutti i risultati del Metodo C classificati come UNC (incerti) fossero considerati "negativi" e una volta assumendo che tutti i risultati del Metodo C classificati come UNC fossero considerati "positivi".

Metodo A vs Metodo C (UNC=neg)		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	79/83, 95,18% (88,25 - 98,11)	572/577, 99,13% (97,99 - 99,63)	651/660, 98,64% (97,43 - 99,28)
	Tecnico B	77/82, 93,90% (86,51 - 97,37)	571/578, 98,79% (97,52 - 99,41)	648/660, 98,18% (96,85 - 98,96)
Sito 2	Tecnico A	68/84, 91,89% (83,42 - 96,23)	585/586, 99,83% (99,04 - 99,97)	653/660, 98,94% (97,83 - 99,49)
	Tecnico B	69/78, 88,46% (79,50 - 93,81)	582/582, 100,00% (99,34 - 100,00)	651/660, 98,64% (97,43 - 99,28)
Sito 3	Tecnico A	77/80, 96,25% (89,55 - 98,72)	580/580, 100,00% (99,34 - 100,00)	657/660, 99,55% (98,67 - 99,86)
	Tecnico B	76/80, 95,00% (87,84 - 98,04)	579/580, 99,83% (99,03 - 99,97)	655/660, 99,24% (98,24 - 99,68)

Metodo A vs Metodo C (UNC=POS)		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	81/83, 97,59% (91,63 - 99,34)	568/577, 98,44% (97,06 - 99,18)	649/660, 98,33% (97,04 - 99,07)
	Tecnico B	79/83, 95,18% (88,25 - 98,11)	568/578, 98,10% (96,63 - 98,93)	646/660, 97,88% (96,47 - 98,73)
Sito 2	Tecnico A	73/74, 98,65% (92,73 - 99,76)	577/586, 98,46% (97,11 - 99,19)	650/660, 98,48% (97,23 - 99,17)
	Tecnico B	76/78, 97,44% (91,13 - 99,29)	576/582, 98,97% (97,77 - 99,53)	652/660, 98,79% (97,63 - 99,38)
Sito 3	Tecnico A	78/80, 97,50% (91,34 - 99,31)	571/580, 98,45% (97,08 - 99,18)	649/660, 98,33% (97,04 - 99,07)
	Tecnico B	77/80, 96,25% (89,55 - 98,72)	570/580, 98,28% (96,86 - 99,06)	647/660, 98,03% (96,66 - 98,85)

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

		Metodo A	
		Positivo	Negativo
<b>Metodo C (Se UNC = Neg)</b>	Positivo	446	14
	Negativo	31	3469

Concordanza Percentuale Positiva = 93,50% (446/477)      95% Intervallo di Confidenza = 90,92 - 95,38%  
 Concordanza Percentuale Negativa = 99,60% (3469/3483)      95% Intervallo di Confidenza = 99,33 - 99,76%  
 Concordanza Percentuale Totale = 98,31% (3893/3960)      95% Intervallo di Confidenza = 97,86 - 98,66%

		Metodo A	
		Positivo	Negativo
<b>Metodo C (Se UNC = POS)</b>	Positivo	464	54
	Negativo	13	3429

Concordanza Percentuale Positiva = 97,27% (464/477)      95% Intervallo di Confidenza = 95,39 - 98,40%  
 Concordanza Percentuale Negativa = 98,45% (3429/3483)      95% Intervallo di Confidenza = 97,98 - 98,81%  
 Concordanza Percentuale Totale = 98,31% (3893/3960)      95% Intervallo di Confidenza = 97,86 - 98,66%

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

Per i confronti tra il Metodo B e il Metodo C, questi sono stati calcolati due volte: una volta assumendo che tutti i risultati del Metodo C che erano UNC venissero considerati "negativi" e una volta assumendo che tutti i risultati del Metodo C che erano UNC venissero considerati "positivi".

Metodo B vs Metodo C (UNC=neg)		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	79/83, 95,18% (88,25 - 98,11)	572/577, 99,13% (97,99 - 99,63)	651/660, 98,64% (97,43 - 99,28)
	Tecnico B	78/83, 93,98% (86,66 - 97,40)	571/577, 98,96% (97,55 - 99,52)	649/660, 98,33% (97,04 - 99,07)
Sito 2	Tecnico A	68/76, 89,47% (80,58 - 94,57)	583/594, 99,83% (99,04 - 99,97)	651/660, 98,64% (97,43 - 99,28)
	Tecnico B	69/76, 90,79% (82,19 - 95,47)	584/584, 100,00% (99,35 - 100,00)	653/660, 98,94% (97,83 - 99,49)
Sito 3	Tecnico A	77/84, 91,67% (83,78 - 95,90)	576/576, 100,00% (99,34 - 100,00)	653/660, 98,94% (97,83 - 99,49)
	Tecnico B	77/86, 89,53% (81,29 - 94,40)	574/574, 100,00% (99,34 - 100,00)	651/660, 98,64% (97,43 - 99,28)

Metodo B vs Metodo C (UNC=POS)		Concordanza tra Campioni Positivi (95% IC)	Concordanza tra Campioni Negativi (95% IC)	Concordanza Totale tra i Campioni (95% IC)
Sito 1	Tecnico A	81/83, 97,59% (91,63 - 99,34)	568/577, 98,44% (97,06 - 99,18)	649/660, 98,33% (97,04 - 99,07)
	Tecnico B	80/83, 96,39% (89,90 - 98,76)	567/577, 98,27% (96,84 - 99,06)	647/660, 98,03% (96,66 - 98,85)
Sito 2	Tecnico A	74/76, 97,37% (90,90 - 99,28)	576/584, 98,63% (97,32 - 99,30)	650/660, 98,48% (97,23 - 99,17)
	Tecnico B	75/76, 98,68% (92,92 - 99,77)	577/584, 98,80% (97,55 - 99,42)	652/660, 98,79% (97,63 - 99,38)
Sito 3	Tecnico A	81/84, 96,43% (90,02 - 98,78)	570/576, 98,96% (97,75 - 99,52)	651/660, 98,64% (97,43 - 99,28)
	Tecnico B	82/86, 95,35% (88,64 - 98,18)	569/574, 99,13% (97,98 - 99,63)	651/660, 98,64% (97,43 - 99,28)

**f. Concordanza qualitativa combinata per il Metodo B vs Metodo C su tutti i siti/tutti i tecnici**

		Metodo A	
		Positivo	Negativo
<b>Metodo C (Se UNC = Neg)</b>	Positivo	448	12
	Negativo	40	3460

Concordanza Percentuale Positiva = 91,80% (448/488)      95% Intervallo di Confidenza = 89,03 - 93,92%  
 Concordanza Percentuale Negativa = 99,65% (3460/3472)      95% Intervallo di Confidenza = 99,40 - 99,80%  
 Concordanza Percentuale Totale = 98,69% (3908/3960)      95% Intervallo di Confidenza = 98,28 - 99,00%

		Metodo A	
		Positivo	Negativo
<b>Metodo C (Se UNC = POS)</b>	Positivo	473	45
	Negativo	15	3427

Concordanza Percentuale Positiva = 96,93% (473/488)      95% Intervallo di Confidenza = 94,99 - 98,13%  
 Concordanza Percentuale Negativa = 98,70% (3427/3472)      95% Intervallo di Confidenza = 98,27 - 99,03%  
 Concordanza Percentuale Totale = 98,48% (3900/3960)      95% Intervallo di Confidenza = 98,06 - 98,82%

In tutti i casi, la concordanza qualitativa tra i metodi di interpretazione è risultata piuttosto alta, indicando che tutti e tre i metodi (microscopio manuale, lettura digitale con dIFine® e chiamata automatica tramite dIFine®) sono ben correlati tra loro e hanno mostrato poche discrepanze.

Nel complesso, questi dati dimostrano che la chiamata automatica identificata da dIFine® (Metodo C) è in concordanza con il Metodo A e/o il Metodo B (metodi di identificazione non automatizzati) per la stragrande maggioranza dei campioni. Tuttavia, è sempre responsabilità dell'operatore qualificato prendere la decisione finale.

## REFERENZE

1. Robbins WC, Holman HR, Deicher HRG, *et al*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575, 1957.
2. Seligman M: Cr. Acad. Sci. (Paris), 245:243, 1957.
3. Ceppellini R, Polli E, Celada F: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:572, 1957.
4. Deicher HRG, Holman HR, Kunkel HG: J. Exp. Med. 109:97, 1959.
5. Dubois EL: J. Rheumatol. 2:204, 1975.
6. Epstein WV: J. Rheumatol. 2:215, 1975.
7. Blomgren SE: Seminars Heamtol. 10:345, 1973.
8. Alarcon-Segovia D, Fishbein E: J. Rheumatol. 2:167, 1975.
9. Klajman A, Farkas R, Gold E, Ben-Efraim S: Clin. Immunol. Immunopath. 3:525, 1975.
10. Pincus T, Schur PH, Rose JA: N. Engl. J. Med. 281:701, 1969.
11. Koffler D, Carr RI, Agnello V, *et al*: Science 166:1648, 1969.
12. Gershwin ME, Steinberg AD: Arthritis. Rheum. 17:947, 1974.
13. Casals SP, Friou GJ, Myers LI: Arthritis. Rheum. 7:379, 1964.
14. Arana R, Seligmann M: J. Clin. Invest. 46:1867, 1967.
15. Tan EM, Schur PH, Carr RI, *et al*: J. Clin. Invest. 45:1732, 1966.
16. Stollar D, Levine L, Leher HI, *et al*: Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 48:874, 1962.
17. Bosicevich J, Nasou JP, Kayhoe DE: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103:636, 1960.
18. Jokinen EJ, Julkunen H: Ann. Rheum. Dis. 24:477, 1965.
19. Matrer R, Helgeland SM, Tonder O: J. Immunol. Methods 5:345, 1974.
20. Bickel YB, Barnett EV, Pearson CM: Clin. Exp. Immunol. 3:641, 1968.
21. Davis JS, IV: Arthritis. Rheum. 14:377, 1971.
22. Johnson GD, Edmonds JP, Holbrow EJ: Lancet 2:883, 1973.
23. Wold RT, Young FE, Tan EM, *et al*: Science 161:806, 1968.
24. Farr Rd: J. Infect. Dis. 103:239, 1958.
25. Koffler D, Schur PH, Kunkel HG: J. Exp. Med. 126:607, 1967.
26. Harbeck RJ, Bardana EJ, Kohler PF, *et al*: J. Clin. Invest. 52:789, 1973.
27. Cohen SA, Hughes GRV, Noel GL, *et al*: Clin. Exp. Immunol. 8:551, 1971.
28. Natali PG, Tan EM: J. Clin. Invest. 51:345, 1972.
29. Aarden LA, deGroot ER, Feltkemp EW: Ann. NY Acad. Sci. 254:505, 1975.
30. Slater NGP, Cameron JS, and Lessof MH: Clin. Exp. Immunol. 25:480, 1976.
31. Stingl G, Meingassner JG, Swelty P, *et al*: Clin. Immunol. Immunopath. 6:131, 1976.
32. Davis P, Christian B, and Russel AS: J. Rheumatol. 4:15, 1977.
33. Tourville DR, and Benn V: Microbiological Proceeding, 1977.
34. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Second Edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
35. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
36. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
37. 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.
38. Admou B, Eddehbi FE, Elmoumou L, Elmojadili S, Salami A, Oujidi M, Brahim I, Hazime R. Anti-double stranded DNA antibodies: A rational diagnostic approach in limited-resource settings. Pract Lab Med. 2022 Jun 3;31:e00285. doi: 10.1016/j.plabm,2022.e00285. PMID: 35711387; PMCID: PMC9192786.
39. Pan N, Amigues I, Lyman S, Duculan R, Aziz F, Crow MK, Kirou KA. A surge in anti-dsDNA titer predicts a severe lupus flare within six months. Lupus. 2014 Mar;23(3):293-8. doi: 10.1177/0961203313515763. Epub 2013 Dec 6. PMID: 24316605.
40. Swaak AJ, Groenwold J, Aarden LA, Statius van Eps LW, Feltkamp EW. Prognostic value of anti-dsDNA in SLE. Ann Rheum Dis. 1982 Aug;41(4):388-95. doi: 10.1136/ard.41.4.388. PMID: 6981385; PMCID: PMC1000956.

## GLOSSARIO DEI SIMBOLI

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

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

### ZEUS Scientific.

200 Evans Way Branchburg, New Jersey, 08876  
USA  
Numero verde (Stati Uniti): 1 800 286-2111, Opzione 2  
Internazionale: +1 908 526 3744  
Fax: +1 908 526 2058  
Sito web: [www.zeusscientific.com](http://www.zeusscientific.com)

Per il servizio clienti negli Stati Uniti, contattare il distributore locale.  
Per supporto tecnico negli Stati Uniti, contattare ZEUS Scientific, chiamare gratuitamente o inviare un'email a [support@zeusscientific.com](mailto:support@zeusscientific.com).  
Per richieste di servizio clienti e supporto tecnico fuori dagli Stati Uniti, si prega di contattare il distributore locale.  
©2019 ZEUS Scientific. Tutti i diritti riservati.



EMERGO EUROPE  
Westervoortsedijk 60  
6827 AT Arnhem  
Paesi Bassi