



CS

ANA HEp-2

REF FA2500A

IVD

Rx Only



URČENÉ POUŽITÍ

ANA HEp-2 je nepřímý imunofluorescenční test pro kvalitativní detekci a semikvantitativní stanovení IgG protilátek proti jaderným antigenům v lidském séru pomocí manuální fluorescenční mikroskopie nebo s automatizovaným mikroskopem diFine®. Přítomnost protilátek proti jaderným antigenům může být použita ve spojení s dalšími sérologickými testy a klinickými nálezy k podpoře diagnostiky systémového lupus erythematoses a dalších systémových revmatických onemocnění.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Nepřímý imunofluorescenční test (IFA) byl široce používán pro detekci přítomnosti antinukleárních protilátek (ANA) v séru pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE) a jinými klinicky podobnými onemocněními pojivové tkáně (1–5). ANA mohou být také spojeny s četnými léky indukovanými lupusovými syndromy (6–7), které klinicky napodobují spontánní formu SLE. Technika IFA byla přizpůsobena pro testování ANA několika výzkumníky (8–9) na základě základních metod původně popsanych Coonsem (10). ANA jsou převážně tvořeny protilátkami třídy IgG; nicméně mohou být detekovány také ANA třídy IgA a IgM (11). V současnosti je známo, že pro testování ANA může být použito mnoho zdrojů jaderného materiálu jako substrátu. Ačkoli většina původního výzkumu ANA byla prováděna za použití tkáňových řezů jater nebo ledvin potkana či myši, použití lidských nebo zvířecích embryonálních buněčných kultur jako substrátů poskytlo spolehlivou a snadno interpretovatelnou alternativu pro testování ANA. Buněčná linie HEp-2 pochází z epidermálního karcinomu hrtanu člověka. Použití buněk HEp-2 jako substrátu v IFA zvýšilo citlivost detekce autoprotilátek a přispělo k diagnostice systémových autoimunitních onemocnění a popisu nových díky možnosti detekce více než 100 antigenů v jejich jádře a cytoplazmě. Existuje několik různých vzorů jaderné a cytoplazmatické imunofluorescence. **diFine® byl naprogramován tak, aby navrhoval osm běžných vzorů ANA.**

Těchto osm vzorů a jejich základ lze vyhodnotit pomocí systému diFine® i manuálním čtenářem následovně:

- Homogenní (AC-1)** – Homogenní nebo difuzní zbarvení jádra je v souladu s přítomností autoprotilátek proti nativní DNA (nDNA), histonům a/nebo deoxyribonukleoproteinu (DNP) (12, 13). Chromozomy mitotických buněk (dělicích se buněk) jsou důležitými ukazateli homogenního vzoru, protože se barví jako nepravidelně tvarované útvary s intenzivněji zbarveným vnějším okrajem.
- Tečkovaný (AC-2, AC-4, and AC-5)** – Tečkovaný vzor je nejčastěji pozorovaným ANA vzorem. Rovnoměrný „pravý tečkovaný“ vzor může být pozorován u centromerických protilátek v buňkách, které nejsou v dělení. Hustý tečkovaný vzor může být pozorován u protilátek proti n-RNP, Sm a SSB/La.
Jemný tečkovaný vzor, chromozom-negativní (AC-4): Početné malé a rovnoměrné body fluorescence rovnoměrně rozptýlené po celém jádře. Jádérka obvykle zůstávají nezbarvená. Mitotické buňky mohou vykazovat několik teček v cytoplazmě, ale chromozomy budou negativní.
Hrubý tečkovaný vzor, chromozom-negativní (AC-5): Středně velké body fluorescence jsou rozptýleny po celém jádře s výraznými jadernými okraji. Mohou být pozorovány i větší body fluorescence; jejich počet je však příliš vysoký a velikost příliš variabilní na to, aby byly identifikovány jako jadérový vzor. Chromozomy v mitotických buňkách budou negativní.
Jaderný hustý jemný tečkovaný vzor (AC-2): Početné jemné tečky s hustou distribucí v jádře, s výjimkou jadérek. Je spojován s protilátkami anti-DFS70, které se mohou vyskytovat u zdravých jedinců a mají omezený význam v souvislosti s autoimunitními onemocněními.
Harmon a kol. (17) prokázali, že vzorky séra obsahující vysoce monospecifické anti-SSA/Ro protilátky vykazují v IF-ANA testu vzor diskrétních jaderných teček u široké škály lidských buněk a nádorových jader. Tyto sérové vzorky s monospecifickými anti-SSA/Ro produkovaly velmi málo cytoplazmatického zbarvení substrátových buněk. Byl popsán výrazný, velký, variabilní tečkovaný vzor s 3 až 10 velkými tečkami v jádře. Tito pacienti s velkými, variabilními tečkami mají nedefinované revmatické syndromy s protilátkami IgM proti histonu FH-3 (18).
- Centromera (AC-3)** – Diskrétní tečkovaný vzor, chromozom (specifita na centromeru) pozitivní: Chromozomy budou pozitivní v mitotických buňkách; diskrétní tečky budou shlukovány pouze v mase chromozomů, což jasně ukazuje jednotlivé fáze mitózy. Centromerický vzor je znám jako spojený se syndromem CREST, což je mírnější varianta progresivní systémové sklerózy (PSS). Centromerický vzor vykazuje diskrétní a rovnoměrné body fluorescencečních teček rozptýlené po celém jádře. Mitotické buňky budou pozitivní a budou vykazovat shlukování centromer v chromozomech v různých uspořádáních v závislosti na fázi mitózy.
- Homogenní jadérový (AC-8)** – Jadérový vzor vykazuje homogenní nebo tečkované zbarvení jádérka. Tento vzor je často doprovázen matnou, homogenní fluorescencí ve zbytku jádra. Chromozomy v mitotických buňkách jsou negativní. Jadérový vzor naznačuje přítomnost autoprotilátek proti PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nukleofosminu, nukleolinu, No55/SC65. Fluorescence jadérka se může jevit jako homogenní, shlukovaná nebo tečkovaná, v závislosti na antigenu, na který autoprotilátka reaguje.

Protilátky proti jádru se vyskytují především v séru pacientů se sklerodermií, systémovým lupus erythematoses, Sjögrenovým syndromem nebo Raynaudovým fenoménem (19).

5. **Vícenásobné jaderné tečky (AC-6)** – Malý počet jaderných teček v rozmezí od 6 do 20 je nejčastěji spojován s primární biliární cholangitidou.
6. **Jaderná membrána (AC-11)** – *Antijaderná membrána (jaderná lamina): Vzor antijaderné membrány se objevuje jako lem kolem jádra a připomíná okrajový vzor; od okrajového vzoru se však liší tím, že ve fázi metafáze jsou chromozomy negativní. Tuto autoprotílátku je důležité uvádět, protože je známo, že je spojena s autoimunitním onemocněním jater.*
7. **Cytoplazmatický (ribosomální) (AC-19)**– Ribosomální vzor je charakterizován četnými cytoplazmatickými tečkami s nejvyšší koncentrací kolem jádra. Od mitochondriálního vzoru se odlišuje menší velikostí teček a jejich vyšší hustotou. Význam tohoto vzoru není znám.
8. **Cytoplazmatický (mitochondriální) (AC-21)** – Tento vzor je charakteristický četnými cytoplazmatickými tečkami s nejvyšší koncentrací v perinukleární oblasti. Vzor lze pozorovat v buňkách v interfázi i mitóze. Klinický význam AMA (antimitochondriálních protilátek) je nejčastěji spojován s primární biliární cholangitidou, zejména pokud je AMA přítomna ve vysokém titru.

Doplňkové vzory uvedené níže nelze identifikovat pomocí systému dIFine® a musí být interpretovány vyškoleným pracovníkem v souladu se standardy nomenklatury ICAP.

Doplňkové jaderné vzory

1. **Jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA) pattern (AC-13):** Vzor jaderného antigenu proliferujících buněk (PCNA) se projevuje jako jemné až hrubé jaderné tečkování u 30–60 % buněk v interfázi a negativní zbarvení chromozomální oblasti v mitotických buňkách. PCNA je specifický pro pacienty se systémovým lupus erythematoses (SLE), ale nebývá detekován u jiných onemocnění pojivové tkáně.
2. **Vzor centrioly (AC-24):** Vzor centrioly je charakterizován dvěma výraznými body fluorescence v jádře mitotických buněk nebo jedním výrazným bodem fluorescence v klidové buňce. Význam tohoto vzoru není znám; nicméně byl pozorován u pacientů s progresivní systémovou sklerózou (PSS).
3. **Vzor dělicího vřeténka (AC-25):** *Chromozom-pozitivní. Vzor dělicího vřeténka je jedinečný pro buňky procházející mitózou, kde fluoreskuje pouze aparát vřeténka. Tento vzor má vzhled „pavučiny“, která se rozprostírá od centrioly ke centromerám. Vzor naznačuje přítomnost autoprotílátek proti mikrotubulům a jeho význam není dosud jasný.*
4. **Vzor středního tělíska (midbody) (AC-27):** Vzor středního tělíska se projevuje jako hustě zbarvená oblast poblíž štěpné rýhy telofázových buněk, tedy v místě, kde dochází k oddělení dvou dceřiných buněk. Klinický význam tohoto vzoru není znám; nicméně byl zaznamenán u vybraných pacientů se systémovou sklerózou.

Doplňkové cytoplazmatické vzory

1. Cytoplazmatický fibrilární lineární – aktinu podobný (AC-15): Cytoskeletální vzor je charakterizován výrazným „pavučinovým“ nebo vláknitým vzhledem po celé buňce. Byl popsán jako spojený s autoimunitním onemocněním jater (protilátky proti hladké svalovině).
2. Lysozomální vzor (AC-18): Lysozomální vzor se projevuje jako několik diskrétních teček řidce rozptýlených v cytoplazmě. Tento vzor je pozorován v cytoplazmě buněk v interfázi i mitóze. Klinický význam tohoto vzoru není znám.
3. Polární/Golgiho-vzor (AC-22): Vzor Golgiho aparátu je charakterizován pozitivním cytoplazmatickým zbarvením, které je soustředěno pouze na jedné straně perinukleární oblasti. Klinický význam tohoto vzoru je nejistý, avšak literatura naznačuje možnou souvislost se systémovým lupus erythematoses (SLE) a Sjögrenovým syndromem.

PRINCIP ZKOUŠKY

ANA HEp-2 je navržen pro detekci přítomnosti cirkulujících ANA v lidském séru. Test využívá substrát z tkáňové buněčné kultury a kozí anti-lidský imunoglobulin upravený pro optimální použití a bez nespecifického pozadí zbarvení. Reakce probíhá ve dvou krocích:

1. Krok jedna je inkubace vzorku, během které se případně ANA přítomné ve vzorku pacienta mohou navázat na buněčný substrát a vytvořit komplex antigen–protilátka. Ostatní složky séra jsou následně odplaveny.
2. Krok dva je inkubace s konjugátem, během které je anti-lidský imunoglobulin značený FITC ponechán reagovat s lidským imunoglobulinem, který se navázal na substrát během inkubace vzorku. Tím se vytvoří stabilní komplex antigen–protilátka–konjugát v místě, kde se původní protilátka pacienta navázala na buněčný substrát. Přebytný konjugát je následně odplaven. Výsledky testu lze vizualizovat pomocí vhodně vybaveného fluorescenčního mikroskopu nebo systému dIFine®. Jakékoli pozitivní reakce se projeví jako jablkově zelené fluorescenční zbarvení uvnitř buňky. Pokud vzorek neobsahuje specifické ANA, nedojde k žádnému zřetelnému jadernému zbarvení buňky.

REAGENCIE

Poskytnuté materiály:

Každá sada obsahuje následující komponenty v dostatečném množství pro provedení počtu testů uvedeného na etiketě obalu.

POZNÁMKA: Konjugát a kontroly obsahují kombinaci Proclinu (0.05 % v/v) a azidu sodného (<0.1 % w/v) jako konzervační látky.

Zorba-NS® obsahuje azid sodný (<0.1 % w/v) jako konzervační látku.

SLD	ANA HEP-2 Substrátové sklíčka: Dvacet 12jamkových sklíček s absorpčním papírem a sáčkem se sušidlem.
CONJ	Konjugát: Kozí anti-lidský IgG značený fluoresceinisotiokyanátem (FITC). Obsahuje fosfátový pufr s BSA a kontrastním barvivem. Tři hnědé lahvičky, každá obsahuje 3.5 mL. Připraveno k použití.
CTRL +	ANA (homogenní) pozitivní kontrola (lidské sérum): Vyvolá pozitivní jablkově zelené, homogenní zbarvení buněčného jádra. Jedna lahvička s červeným uzávěrem, 0.5 mL. Připraveno k použití.
CTRL -	Negativní kontrola (lidské sérum): Nevvolá žádné detekovatelné jaderné zbarvení. Jedna lahvička se zeleným uzávěrem, 0.5 mL. Připraveno k použití.
DIL SPE	Zorba-NS® Ředící roztok vzorku: Čtyři lahvičky se zeleným uzávěrem, každá o objemu 25 mL. Připraveno k použití.
BUF PBS	Fosfátový pufr (PBS): pH 7.2 ± 0.2. Obsah každého sáčku s pufrům vysypte do jednoho litru destilované nebo deionizované vody. Míchejte, dokud se všechny soli důkladně nerozpustí. Čtyři sáčky, dostačující k přípravě 4 litrů.
MNTMED	Montovací médium (pufrovaný glycerol): Dvě lahvičky s bílým uzávěrem a kapátkem, každá o objemu 3.0 ml.
COVGLS	Krycí sklíčka: Balení dvaceti čtyř kusů, 24 × 60 mm, tloušťka č. 1.

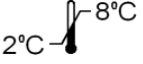
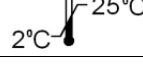
POZNÁMKY:

- Následující komponenty nejsou závislé na čísle šarže soupravy a mohou být zaměnitelně používány se soupravami Sebia IFA, pokud jsou čísla produktů identická: Zorba-NS® (číslo produktu: FA025S), montovací médium (číslo produktu: FA0009S), PBS (číslo produktu: 0008S) a krycí sklíčko (číslo produktu: S8008)

MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEDODANÝ

- Automatizovaný mikroskop dIFine® nebo vhodně vybavený fluorescenční mikroskop s FITC filtrem (450–490 nm).
- Pipet(a) schopná pipetovat objemy mezi 10 a 200 µL.
- Jednorázové špičky na pipety.
- Malé zkumavky, ředicí destička nebo podobné pomůcky pro přípravu ředění vzorků.
- Oplachovač sklíček nebo velká barvicí nádoba s magnetickou míchačkou pro mytí sklíček mezi inkubačními kroky.
- Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Odměrný válec o objemu 1 litr.
- Laboratorní časovač pro sledování inkubačních kroků.
- Odkapávací nádoba, jednorázové rukavice a dezinfekční prostředek (např. 10% běžné domácí bělidlo – 0,5% chlornan sodný).

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ

	Neotevřená souprava:
	Montovací médium, konjugát, sklíčka, Zorba-NS®, sklíčka*, pozitivní a negativní kontroly.
	Rehydratovaný PBS (stabilní po dobu 30 dnů).
	Sáčky s fosfátovým pufrům (PBS).
*Po otevření musí být sklíčka použita tentýž den. Ostatní hotové reagenty, s výjimkou PBS, mohou být používány až do uvedeného data expirace.	

OPATŘENÍ

1. Pouze pro diagnostiku in vitro.
2. Dodržujte běžná laboratorní opatření při manipulaci s reagensiemi. Při zasažení očí okamžitě vypláchněte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Noste vhodný ochranný oděv, rukavice a ochranu očí/obličeje. Nevdechujte páry. Likvidujte odpad v souladu se všemi místními, státními a federálními předpisy.
3. Jamky na sklíčku neobsahují životaschopné organismy. Přesto je třeba se sklíčkem zacházet jako s **potenciálně biologicky nebezpečným materiálem**.
4. Kontroly jsou **potenciálně biologicky nebezpečné materiály**. Zdrojové materiály, ze kterých byly tyto produkty získány, byly testovány s negativním výsledkem na antigen HIV-1, HBsAg a protilátky proti HCV a HIV pomocí schválených testovacích metod. Přestože žádná metoda nemůže zaručit absolutní nepřítomnost infekčních agens, mělo by se s těmito produkty zacházet podle úrovně biologické bezpečnosti 2, jak doporučuje CDC/NIH v příručce „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ (aktuální vydání) a podle standardu OSHA pro krevně přenosné patogeny (20).
5. Dodržení předepsaného času a teploty inkubací je nezbytné pro přesné výsledky. **Všechny reagensie musí dosáhnout pokojové teploty (20–25 °C) před zahájením testu.** Nepoužité reagensie ihned vraťte do původních obalů a dodržujte skladovací pokyny.
6. Nesprávné promývání může způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Před přidáním konjugátu důkladně odsajte zbytky PBS. Nenechte jamky vyschnout mezi inkubacemi.
7. Konjugát, Zorba-NS® a kontroly obsahují azid sodný v koncentraci <0.1 % (w/v). Bylo hlášeno, že azid sodný může v laboratorním potrubí tvořit výbušné azidy olova nebo mědi. Pro prevenci po vylití roztoků s azidem sodným důkladně opláchněte dřez vodou. Tento konzervant může být toxický při požití.
8. Ředění nebo úprava těchto reagensií může vést k chybným výsledkům.
9. Nikdy nepipetujte ústy. Zabraňte kontaktu reagensií a patientských vzorků s pokožkou a sliznicemi.
10. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagensií. Může vést k nesprávným výsledkům.
11. Křížová kontaminace reagensií a/nebo vzorků může způsobit chybné výsledky.
12. Znovupoužitelné skleněné nádoby musí být důkladně omyto a zbaveno všech detergentů.
13. Zabraňte rozstříkávání a tvorbě aerosolů.
14. Nevystavujte reagensie silnému světlu během skladování ani inkubace.
15. Před otevřením ochranného obalu nechte balení se sklíčky vyrovnat na pokojovou teplotu, aby se zabránilo kondenzaci na jamky a podložce.
16. Promývací roztok sbírejte do odpadní nádoby. Ošetřete jej dezinfekcí (např. 10 % běžného domácího bělidla – 0.5 % chlornan sodný). Zabraňte kontaktu reagensií s výparů z bělidla.
17. Nevystavujte žádné reaktivní reagensie roztokům obsahujícím bělidlo ani jejich silným výparům. I stopové množství chlornanu sodného může zničit biologickou aktivitu mnoha reaktivních složek této soupravy.
18. Nepoužívejte tlak na obal se sklíčky. Může poškodit substrát.
19. Komponenty této soupravy jsou sladěny pro optimální citlivost a reprodukovatelnost. Nepoužívejte reagensie od jiných výrobců. Pečlivě dodržujte návod k použití.
20. Neotevřené i otevřené komponenty zůstávají stabilní do data expirace uvedeného na etiketě, pokud jsou přesně dodrženy doporučené podmínky skladování. Nepoužívejte po datu expirace. Nezamrazujte.
21. Evansova modř použitá jako kontrastní barvivo je potenciální karcinogen. Při kontaktu s pokožkou opláchněte vodou. Likvidujte podle místních předpisů.
22. Během testu nenechte sklíčka vyschnout. V závislosti na podmínkách v laboratoři může být nutné během inkubací umístit sklíčka do vlhké komory.

ODBĚR VZORKŮ

1. Odběr vzorků provádějte v souladu s dokumentem CLSI M29: Ochrana laboratorních pracovníků před infekčními chorobami získanými v zaměstnání. Žádná známá testovací metoda nemůže poskytnout úplnou záruku, že vzorky lidské krve nepřenášejí infekci. Proto by měly být všechny deriváty krve považovány za potenciálně infekční.
2. Používejte pouze čerstvě odebrané a správně chlazené sérum získané schválenou aseptickou venepunkcí. Do vzorku se nesmí přidávat žádná antikoagulantia ani konzervační látky. Vyhněte se použití hemolytického, lipemického nebo bakteriálně kontaminovaného séra.
3. Vzorek skladujte při pokojové teplotě maximálně po dobu 8 hodin. Pokud testování neproběhne do 8 hodin, sérum lze skladovat při teplotě 2–8 °C maximálně 48 hodin. Pokud se očekává delší prodleva v testování, skladujte vzorky séra při –20 °C nebo nižší teplotě. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování, které může způsobit ztrátu aktivity protilátek a vést k chybným výsledkům. Je odpovědností jednotlivé laboratoře, aby s využitím dostupných referencí a/nebo vlastních studií stanovila kritéria stability vzorků pro své potřeby (38).

POSTUP TESTU

1. Vyjměte sklíčka z chlazeného úložiště a nechte je zahřát na pokojovou teplotu (20–25 °C). Opatrně roztrhněte ochranný obal a vyjměte sklíčka. **Nepoužívejte tlak na ploché strany ochranného obalu.**

2. Označte každou jamku odpovídajícím patientským sérem a kontrolami. **POZNÁMKA: Kontroly jsou určeny k použití neředěné.** Připravte ředění 1:40 (např.: 10 µL séra + 390 µL Zorba-NS®) pro každé patientské sérum.

Možnosti ředění:

- a. Uživatelé mohou titrovat pozitivní kontrolu až do koncového bodu a použít ji jako semikvantitativní kontrolu (1+ minimálně reaktivní). V takových případech by měla být kontrola ředěna dvojité v PBS, **nikoliv v Zorba-NS®**. Koncové ředění je stanoveno vytištěno na lahvičce s pozitivní kontrolou ($\pm$ jedno ředění). Je však třeba poznamenat, že vzhledem k variacím v rámci laboratoře (vybavení apod.) by si každá laboratoř měla stanovit svůj vlastní očekávaný titrační konečný bod pro každou šarži pozitivní kontroly.
- b. Při titraci patientských vzorků by počáteční ředění mělo být připraveno v Zorba-NS® a všechna následující ředění by měla být připravena pouze v PBS.. **Titrace nesmí být připravovány v Zorba-NS®.**
3. Pomocí vhodného dávkovače (uvedeného výše) pipetujte 20–40 µL každé kontroly a každého nařazeného patientského séra do příslušných jamek..
4. Inkubujte sklíčka při pokojové teplotě (20–25 °C) po dobu 35 $\pm$ 5 minut.
5. Jemně opláchněte sklíčka pomocí PBS.. **Do not direct a stream of PBS into the test wells.**
6. Omyjte sklíčka dvakrát po dobu pěti minut, přičemž mezi jednotlivými promýváními vyměňte PBS. Sklíčka mohou být namočena v roztoku při každém promývání maximálně pět minut. **POZNÁMKA: Při použití automatických oplachovačů nastavte oplachování každé jamky třikrát, s dobou máčení od nuly do pěti minut.**
7. Vyjměte sklíčka z PBS po jednom. Otočte sklíčko a zároveň je jamky s otvory v přiloženém savém podkladu. Osušte sklíčko otřením zadní strany savým ubrouskem.
- UPOZORNĚNÍ: Umístěte podklad a sklíčko na tvrdý, rovný povrch. Osušování na papírových utěrkách může poškodit matrici sklíčka.
- Nenechte sklíčka během testu vyschnout.**
8. Přidejte 20–40 µL konjugátu do každé jamky.
9. Opakujte kroky 4 až 7.
10. Naneste 3–5 kapek montovacího média mezi jamky každého sklíčka a přiložte krycí sklíčko. Alternativně lze nanést malé množství montovacího média přímo do každé jamky a poté přiložit krycí sklíčko. Montovací médium musí být přidáno do dvou hodin po dokončení posledního promývacího cyklu.
11. Sklíčka ihned prohlédněte pomocí vhodného fluorescenčního mikroskopu. To lze provést ručně pomocí tradičního fluorescenčního mikroskopu nebo pomocí systému dIFine®. Pokud používáte dIFine®, řiďte se návodem k použití přístroje. **Doporučuje se prohlédnout sklíčka tentýž den, kdy bylo provedeno testování.**

POZNÁMKY:

- a. **Pokud není možné sklíčka prohlédnout ihned, lze je skladovat až 48 hodin při teplotě 2–8 °C.**
- b. **Pokud sklíčka nebudou prohlédnuta do 48 hodin, utěsněte krycí sklíčko čirým lakem na nehty a uložte do chladničky.**

KONTROLA KVALITY

1. Při každém provedení testu musí být zahrnuta pozitivní a negativní kontrola.
2. Doporučuje se odečíst kontroly před vyhodnocením testovaných vzorků. Pokud kontroly nevykazují očekávaný výsledek, mohou být výsledky testu neplatné.
- a. Negativní kontrola – charakterizována nepřítomností specifické fluorescence a červeným nebo matně zeleným pozadím zbarvení všech buněk v důsledku kontrastního barviva.
- b. Pozitivní kontrola (homogenní vzor) – charakterizována jablokově zelenou fluorescencí. Homogenní zbarvení je difuzní a rovnoměrné po celém jádře.
3. Další kontroly mohou být testovány v souladu s pokyny nebo požadavky místních, státních a/nebo federálních předpisů nebo akreditačních organizací.

NOTES:

- a. **Non-specific reagent trapping may exist. It is important to adequately wash slides to eliminate false positive results.**
- b. **The intensity of the observed fluorescence may vary with the microscope and filter system used.**
- c. **Non-nuclear staining of the cell substrate may be observed with some human sera.**

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

1. Interpretace výsledků závisí na pozorovaném vzoru, titru autoprotílátky a věku pacienta. Starší osoby, zejména ženy, mají tendenci vytvářet autoprotílátky s nízkým titrem (<1:80) i bez přítomnosti klinického autoimunitního onemocnění. Zkušenosti ukazují, že ředění 1:40 je vhodné pro screening ANA. Slabě pozitivní výsledky s nízkým titrem se mohou vyskytovat i u zjevně zdravých osob, proto je vždy nutné výsledky ANA interpretovat v kontextu celkového klinického obrazu pacienta.
2. Titr nižší než 1:40 je považován za negativní.
3. Pozitivní test: Pozitivní reakce je přítomnost jakéhokoli jaderného vzoru s jablokově zeleným zbarvením pozorovaného při ředění 1:40, hodnoceného podle škály intenzity zbarvení od 1+ do 4+. Hodnota 1+ je považována za slabou reakci, 4+ za silnou reakci. Všechna séra pozitivní při 1:40 by měla být titrována až do koncového ředění. To se provádí postupným ředěním 1:40, 1:80, 1:160 atd. Koncový titr je nejvyšší ředění, které stále vykazuje reakci 1+.
4. Homogenní vzory s periferním zvýrazněním se často nacházejí v sérech pacientů se systémovým lupus erythematos (SLE).

	Onemocnění, u kterých se nejčastěji vyskytuje	Reference
Homogenní: Vysoký titr Nízký titr	SLE Rheumatoid Arthritis and other diseases	(3, 8, 9, a 16) (1)
Centromera	Varianta CREST syndromu při PSS (progresivní systémová skleróza)	(27)
Tečkovaný	Sklerodermie, Raynaudův syndrom, Sjögrenův syndrom, Smíšené onemocnění pojivové tkáně	(34 – 36)
Jadérkový	Sklerodermie	(37)
Periferní	SLE	(2, 8, 9, a 16)

OMEZENÍ TESTU

1. ANA HEP-2 je laboratorní diagnostická pomůcka a její výsledky samy o sobě nejsou diagnostické. Pozitivní ANA se mohou vyskytovat i u zjevně zdravých jedinců. Je proto nezbytné, aby byly výsledky ANA interpretovány ve spojení s dalšími sérologickými testy a klinickými nálezy.
2. Pacienti se SLE, kteří podstupují terapii steroidy, mohou mít negativní výsledky testu (40).
3. Mnohé běžně předepisované léky mohou indukovat tvorbu ANA (6, 7).
4. Jeden vzor autoprotlátky může částečně nebo zcela překrýt diagnostické znaky jiného. V takových případech je nutné provést titraci séra.
5. Tento produkt nemá za cíl stanovit jednoznačnou souvislost mezi vzorem jaderné fluorescence a konkrétním onemocněním.

OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Očekávaná hodnota v běžné populaci je negativní nebo nižší než 1:40. U zjevně zdravých jedinců se však mohou ANA ve vzorcích séra vyskytovat (36). Toto procento stoupá s věkem, zejména v sedmé dekádě života.

VÝKONOVÉ CHARAKTERISTIKY

POZNÁMKA: Při stanovování výkonových charakteristik testu ANA HEP-2 byla sklíčka interpretována pomocí tří různých metod, jak je uvedeno níže:

Metoda Interpretace:
Metoda A. Metoda A byla plně manuální interpretační metoda. Byla prováděna pomocí tradičního fluorescenčního mikroskopu vybaveného objektivem a okuláry. Stanovení kvalitativního výsledku a vzoru bylo prováděno školenými laboratorními technikami.
Metoda B. Metoda B byla prováděna naskenováním sklíček pomocí systému dIFine® a následnou interpretací výsledného digitálního obrazu (kvalitativně a vzor, pokud pozitivní) zobrazeného na monitoru počítače školeným laboratorním technikem.
Metoda C. Metoda C představuje navržený výsledek předpovězený systémem dIFine®; metoda C předpovídá kvalitativní výsledek a – pokud je pozitivní – také vzor, pokud jde o jeden z osmi vzorů, které má systém naprogramovány. Pokud je výsledek Metoda C „UNC“ (nejistý), úroveň fluorescence změřená systémem dIFine je na hranici mezi pozitivní a negativní. Metodu C musí laboratorní technik „validovat“ (potvrdit), případně upravit nebo zcela zamítnout. Pro účely této studie a níže uvedených údajů byla Metoda C zaznamenána „TAK, JAK JE“, bez jakýchkoli úprav laboratorním technikem. Je tedy uvedena pouze pro informativní účely.

1. Studie analytického výkonu:

a. Linearita:

Silně pozitivní vzorky byly identifikovány pro každý z následujících osmi ANA vzorů: homogenní, tečkovaný, centromerický, jadérkový, jaderné tečky, jaderná membrána, cytoplazmatický (ribozomální) a cytoplazmatický (mitochondriální). Každý ze vzorků byl testován při ředění 1:40 a titrován až do 1:20480 a interpretován všemi třemi výše uvedenými metodami. Tato studie byla provedena interně ve společnosti ZEUS Scientific. Koncové body pro každý vzorek a každou metodu jsou uvedeny níže:

Vzorek	Metoda A	Metoda B	Metoda C
Homogenní	1:1280	1:1280	1:1280
Tečkovaný	1:5120	1:5120	1:2560
Centromerický	1:5120	1:5120	1:5120
Jadérkový	1:2560	1:5120	1:2560
Jaderné tečky	1:640	1:640	1:640
Jaderná membrána	1:2560	1:2560	1:2560
Cytoplazmatický (ribozomální)	1:320	1:320	1:320
Cytoplazmatický (mitochondriální)	1:10240	1:10240	1:10240

Souhrn: Ve 100 % případů byl stanovený vzor očekávaný a v souladu bez ohledu na použitou metodu interpretace. Stejně tak určení koncového ředění odpovídalo očekávání ± jedno ředění ve 100 % určení, bez ohledu na použitou metodu interpretace.

b. Mezilotová reprodukovatelnost:

Středně pozitivní vzorek a silně pozitivní vzorek byly identifikovány pro každý z následujících osmi ANA vzorů: homogenní, tečkovaný, centromerický, jadérkový, jaderné tečky, jaderná membrána, cytoplazmatický (ribozomální) a cytoplazmatický (mitochondriální). Kromě toho bylo zahrnuto devět negativních vzorků, čímž celkový počet činil 25 vzorků. Tato skupina 25 vzorků byla testována na třech různých šaržích ANA HEp-2 a interpretována všemi třemi výše uvedenými metodami. Navíc všech šestnáct pozitivních vzorků bylo titrováno až do koncového ředění a interpretováno všemi třemi metodami.

Výsledky:

- i. **Kvalitativní shoda:** Ve všech třech šaržích souprav byla u všech 25 vzorků při počátečním ředění dosažena 100% shoda kvalitativních výsledků a rovněž byla dosažena 100% shoda napříč všemi třemi metodami interpretace bez ohledu na šarži reagensů.
- ii. **Shoda koncového titru:** Všechny 16 pozitivních vzorků mělo stejné koncové titry $\pm$ jedno ředění bez ohledu na šarži reagensů nebo metodu interpretace.
- iii. **Shoda vzorů:** U ředění, která vykazovala pozitivní výsledek napříč všemi třemi metodami interpretace, byla dosažena 100% shoda vzorů u první a druhé šarže pro všechny tři Metody interpretace. U třetí šarže byla 100% shoda vzorů mezi Metodou A a Metodou B, přičemž jeden středně pozitivní homogenní vzorek představoval jedinou odchylku při porovnání Metoda C s Metodami A a B.

c. Studie referenčního rozmezí:

Sto osmdesát náhodně vybraných vzorků séra bylo získáno od zdravých dárců ze severovýchodní části USA. Vzorky byly testovány při počátečním ředění 1:40 a interpretovány všemi třemi metodami. Jakýkoli vzorek, který vykázal pozitivní výsledek při ředění 1:40, byl dále titrován a interpretován všemi třemi metodami. Výsledky screeningového testu jsou shrnuty níže:

Metoda interpretace	Počet pozitivních	% pozitivních	Počet negativních	% negativních	Počet neurčitých	% neurčitých
A	19	10.56	161	89.44	NA	NA
B	19	10.56	161	89.44	NA	NA
C	14	7.78	152	84.44	14	7.78

d. Dvacetidenní studie opakovatelnosti:

Nízkopozitivní vzorek (~1:40 koncové ředění), středně pozitivní vzorek (~1:160 až 1:320 koncové ředění) a silně pozitivní vzorek (>1:640 koncové ředění) byly identifikovány pro každý z následujících osmi ANA vzorů: homogenní, tečkovaný, centromerický, jadérkový, jaderné tečky, jaderná membrána, cytoplazmatický (ribozomální) a cytoplazmatický (mitochondriální). Jeden ANA negativní vzorek byl také zahrnut, čímž celkový počet vzorků činil 25. Těchto 25 vzorků bylo testováno (počáteční ředění 1:40) ve společnosti ZEUS Scientific ve trojím provedení během deseti různých dnů, což přineslo 30 výsledků na vzorek. Snímky byly interpretovány všemi třemi metodami. Pro hodnocení v rámci jednotlivých metod jsou výsledky kvalitativní shody a shody vzorů uvedeny níže: při čtení pomocí Metod A a B byla dosažena 100% kvalitativní shoda u všech vzorků. U Metoda C vykazovalo 22 z 25 vzorků 100% kvalitativní shodu; vzorky s nízkou pozitivitou pro homogenní, jadérkový a jadernou membránu nevykazovaly úplnou kvalitativní shodu. Kromě toho byla u Metod A a B dosažena 100% shoda vzorů. U Metoda C byla 100% shoda vzorů dosažena u 21 z 25 vzorků; odchylky byly pozorovány u vzorků s nízkou pozitivitou pro homogenní, jadérkový a jadernou membránu a u vzorku s vysokou pozitivitou pro jadernou membránu.

Shoda kvalitativních výsledků v rámci jednotlivých metod

Vzorek	Shoda Metoda A (95% CI)	Shoda Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda C (95% CI)
Homogenní – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	76.7% (59.1 – 88.2%)
Homogenní – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Homogenní – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

Vzorek	Shoda Metoda A (95% CI)	Shoda Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda C (95% CI)
Centromerický – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérkový – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	96.7% (83.3 – 99.4%)
Jadérkový – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérkový – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Negativní	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

Shoda výsledků vzoru v rámci jednotlivých metod (Technik 2)

Vzorek	Shoda Metoda A (95% CI)	Shoda Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda C (95% CI)
Homogenní – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	73.3% (55.6 – 85.8%)
Homogenní – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Homogenní – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

Vzorek	Shoda Metoda A (95% CI)	Shoda Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda C (95% CI)
Centromerický – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérkový – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	96.7% (83.3 – 99.4%)
Jadérkový – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérkový – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	86.67% (70.3 – 94.7%)
Jaderná membrána – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	96.7% (83.3 – 99.4%)
Jaderné tečky – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

Pro shodu mezi metodami byla mezi Metodou A a Metodou B dosažena 100% kvalitativní i vzorová shoda. Avšak pouze 22 z 25 vzorků vykazovalo 100% kvalitativní shodu při porovnání Metoda B s Metodou C a Metoda A s Metodou C; neshodné vzorky byly homogenní s nízkou pozitivitou, jadérkový s nízkou pozitivitou a jaderná membrána s nízkou pozitivitou. Dále pouze 21 z 25 vzorků vykazovalo 100% vzorovou shodu při porovnání Metoda B s Metodou C a Metoda A s Metodou C; neshodné vzorky byly homogenní s nízkou pozitivitou, jadérkový s nízkou pozitivitou, jaderná membrána s nízkou pozitivitou a jaderná membrána s vysokou pozitivitou.

Shoda kvalitativních výsledků mezi metodami

Vzorek	Shoda Metoda A vs Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda A vs Metoda C (95% CI)	Shoda Metoda B vs Metoda C (95% CI)
Homogenní – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	76.67% (59.1 – 88.2%)	76.67% (59.1 – 88.2%)
Homogenní – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Homogenní – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

Vzorek	Shoda Metoda A vs Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda A vs Metoda C (95% CI)	Shoda Metoda B vs Metoda C (95% CI)
Centromerický – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérkový – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	96.67% (83.3 – 99.4%)	96.67% (83.3 – 99.4%)
Jadérkový – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérkový – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	90% (74.4 – 96.5%)
Jaderná membrána – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Negativní	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

Shoda výsledků vzoru mezi metodami

Vzorek	Shoda Metoda A vs Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda A vs Metoda C (95% CI)	Shoda Metoda B vs Metoda C (95% CI)
Homogenní – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	73.3% (55.6 – 85.9%)	73.3% (55.6 – 85.9%)
Homogenní – střední pozitivita	100% (88.65 – 100%)	100% (88.65 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Homogenní – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Tečkovaný – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

Vzorek	Shoda Metoda A vs Metoda B (95% CI)	Shoda Metoda A vs Metoda C (95% CI)	Shoda Metoda B vs Metoda C (95% CI)
Centromerický – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – střední pozitivita	100% (88.65 – 100%)	100% (88.65 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Centromerický – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérový – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	96.7% (83.3 – 99.4%)	96.7% (83.3 – 99.4%)
Jadérový – střední pozitivita	100% (88.65 – 100%)	100% (88.65 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jadérový – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Mitochondriální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	86.7% (70.3 – 94.7)	86.7% (70.3 – 94.7%)
Jaderná membrána – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderná membrána – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	96.7% (83.3 – 99.4%)
Jaderné tečky – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Jaderné tečky – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – nízká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – střední pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)
Ribozomální – vysoká pozitivita	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)	100% (88.7 – 100%)

e. Pětidenní studie reprodukovatelnosti na více pracovištích:

Nízkopozitivní vzorek (~1:40 koncové ředění), středně pozitivní vzorek (~1:160 – 1:320 koncové ředění) a silně pozitivní vzorek (>1:640 koncové ředění) byly identifikovány pro každý z následujících osmi ANA vzorů: homogenní, tečkovaný, centromerický, jadérový, jaderné tečky, jaderná membrána, cytoplazmatický (ribozomální) a cytoplazmatický (mitochondriální). Jeden ANA negativní vzorek byl rovněž zahrnut, čímž celkový počet vzorků činil 25. Těchto 25 vzorků bylo testováno (počáteční ředění 1:40) ve trojím provedení, dvakrát denně po dobu pěti různých dnů ve třech různých laboratořích, čímž vzniklo 30 výsledků na vzorek a místo. Snímky byly interpretovány všemi třemi metodami. Na každém Site byly Metoda A a Metoda B interpretovány dvěma různými laboranty. Výsledky kvalitativní shody a shody vzorů jsou uvedeny níže:

i. Celková shoda kvalitativních výsledků

- V rámci Metoda:** Kvalitativní shoda v rámci Metoda u Metoda A a Metoda B byla 100 % na všech třech pracovištích a u všech laborantů. U Metoda C byla dosažena 100% shoda u 24 z 25 vzorků na všech pracovištích a u všech laborantů; jediným neshodným vzorkem byl vzorek s nízkou pozitivitou pro jadernou membránu na Site 2.
- Mezi metodami:** Mezi Metodou A a Metodou B a mezi Metodou A a Metodou C byla dosažena 100% kvalitativní shoda u všech 25 vzorků. Pozoruhodně, mezi Metodou B a Metodou C byla dosažena 100% kvalitativní shoda u 24 z 25 vzorků, přičemž vzorek s nízkou pozitivitou pro jadernou membránu na Site 2 byl jedinou odchylkou.

ii. Shoda výsledků vzoru

- V rámci Metoda:** Shoda vzorů v rámci metod A a B byla 100 % na všech třech pracovištích a u všech laborantů. U Metoda C byla dosažena 100% shoda u 24 z 25 vzorků, přičemž vzorek se střední pozitivitou pro centromer byl jedinou odchylkou.

- b. Mezi metodami:** Mezi Metodou A a Metodou B byla dosažena 100% shoda vzorů u všech 25 vzorků na všech pracovištích a u všech laborantů. Při porovnání Metoda A s Metodou C byly zaznamenány dva neshodné vzorky: vzorek se střední pozitivitou pro centromeru na Site 1 a vzorek s nízkou pozitivitou pro jadernou membránu na Site 2. Podobně, při porovnání Metoda B s Metodou C byly zaznamenány dva neshodné vzorky: vzorek se střední pozitivitou pro centromeru na Site 1 a vzorek s nízkou pozitivitou pro jadernou membránu na Site 2.

f. Studie interferencí:

Středně pozitivní vzorek (~1:160 až 1:320 koncové ředění) a silně pozitivní vzorek (>1:640 koncové ředění) byly identifikovány pro každý z následujících osmi ANA vzorů: homogenní, tečkovaný, centromerický, jadérkový, jaderné tečky, jaderná membrána, cytoplazmatický (ribozomální) a cytoplazmatický (mitochondriální). Jeden ANA negativní vzorek byl rovněž zahrnut, čímž celkový počet vzorků činil 17. Těchto 17 vzorků bylo obohaceno dvěma různými koncentracemi (nízký a vysoký spike) dvanácti různých možných interferentů, jak je uvedeno v tabulce níže. Všechny vzorky byly hodnoceny pomocí ANA HEp-2 a interpretovány všemi třemi výše uvedenými metodami.

Interferent (Rušivá látka)	Koncentrace Testování Interferentů	
	Nízká	Vysoká
Intralipidy	3 mg/mL	7.50 mg/mL
Cholesterol	1.5 mg/mL	2.5 mg/mL
Albumin	35 mg/mL	50 mg/mL
Ibuprofen	0.5 mg/mL	2 mg/mL
Prednison	0.2 mg/mL	0.8 mg/mL
Hydroxychlorochin	0.006 mg/mL	0.2 mg/mL
Simvastatin	4 ug/mL	20 ug/mL
Cyklofosfamid	1 mg/mL	4 mg/mL
Revmatoidní faktor	200 U/mL	400 U/mL
Hemoglobin	100 mg/mL	200 mg/mL
Triglyceridy	1.5 mg/mL	5 mg/mL
Bilirubin	0.01 mg/mL	0.15 mg/mL

Výsledky: U Metod A a B nebyla kvalita výsledků ani výsledný vzor ovlivněn přidáním testovaných interferentů. Metoda C vykazala jeden neurčitý výsledek u vzorku s nízkou pozitivitou pro jadernou membránu po obohacení albuminem. Lze tedy konstatovat, že výsledky testu ANA HEp-2 nejsou při použití testovaných interferentů vystaveny významnému riziku chybných výsledků.

U Metod A a B nebyla kvalita výsledků ani výsledný vzor ovlivněn přidáním testovaných interferentů. Metoda C vykazala jeden neurčitý výsledek u vzorku s nízkou pozitivitou pro jadernou membránu po obohacení albuminem. Lze tedy konstatovat, že výsledky testu ANA HEp-2 nejsou při použití testovaných interferentů vystaveny významnému riziku chybných výsledků.

Interferent (Rušivá látka)	Koncentrace Testování Interferentů	
	Nízká	High
Bilirubin (nekonjugovaný)	0.02 mg/mL	0.15 mg/mL
Cholesterol (celkový)	1.5 mg/mL	2.2 mg/mL
Triglyceridy	1 mg/mL	2.5 mg/mL
Albumin	35 mg/mL	52 mg/mL
Hemoglobin	100 mg/mL	200 mg/mL
Intralipidy	2.0 mg/mL	20 mg/mL
Revmatoidní faktor	200 U/mL	400 mg/mL
Cyklofosfamid	0.183 mg/mL	0.549 mg/mL
Ibuprofen	0.073 mg/mL	0.219 mg/mL
Hydroxychlorochin	0.006 mg/mL	0.024 mg/mL
Simvastatin	0.0000277 mg/mL	0.000083 mg/mL
Prednison	0.000033 mg/mL	0.000099 mg/mL
Azathioprin	0.00086 mg/mL	0.00258 mg/mL
Diltiazem	0.0003 mg/mL	0.0009 mg/mL
Mykofenolát mofetil	0.012 mg/mL	0.048 mg/mL
Rituximab	0.5 mg/mL	2 mg/mL
Belimumab	2 mg/mL	8 mg/mL

Výsledky: Ani v tomto případě nebyla kvalita výsledků ani výsledný vzor ovlivněn přidáním možných interferentů, bez ohledu na použitou metodu interpretace. Lze tedy uzavřít, že výsledky testu ANA HEP-2 nejsou při přítomnosti testovaných interferentů vystaveny významnému riziku chybných výsledků.

2. Návrh klinické studie výkonnosti:

Celkem 380* klinicky charakterizovaných vzorků bylo získáno, jak je uvedeno v tabulce níže. Těchto 380 vzorků bylo rozděleno na alikvóty a zasláno do tří různých laboratoří k vyhodnocení pomocí ANA HEP-2. Všechny tři laboratoře hodnotily sklíčka pomocí všech tří výše uvedených metod. Navíc byla interpretace sklíček pomocí Metoda A a Metoda B opakována dvakrát na každém klinickém Site dvěma různými laboranty. Na každém klinickém Site byly všechny vzorky nejprve testovány při ředění 1:40 za účelem stanovení kvalitativního stavu 380 vzorků. Jakýkoli vzorek, který vykázal pozitivní výsledek při ředění 1:40 (u kterékoli ze tří metod interpretace), byl dále titrován a znovu interpretován všemi třemi metodami za účelem stanovení koncového ředění a vzoru.

POZNÁMKA: Site dvě testovalo menší počet vzorků na celiakii a vaskulitidu, což vedlo k celkovému počtu 350 vzorků na tomto Site.

Výsledky byly použity k posouzení klinické specifity (možná zkřížená reaktivita), klinické senzitivity, kvalitativní shody mezi metodami v rámci jednotlivých pracovišť, interpretace Metoda C mezi Site (tj. srovnání automatizovaných mikroskopů dIFine®), shody koncového titru a shody vzoru.

ANA-asociovaná onemocnění	n, Všechna Site
<i>Onemocnění pojivové tkáně:</i>	
Systémový lupus erythematoses (SLE)	40
Sjögrenův syndrom (SS)	30
Sklerodermie	20
Autoimunitní myositida (AM)	20
Smíšené onemocnění pojivové tkáně (MCTD)	20
CREST syndrom	20
<i>Další ANA-asociovaná autoimunitní onemocnění:</i>	
Autoimunitní hepatitida (AIH)	20
Léky indukovaný lupus (DIL)	20
Celkem	190

Ne-ANA-asociovaná onemocnění	n, Site 1 a Site 3	n, Site 2
<i>Jiná autoimunitní onemocnění</i>		
Celiakie	22	10
ANCA-asociovaná vaskulitida	28	10
Crohnova choroba	10	10
Revmatoidní artritida	30	30
Autoimunitní tyreoiditida	30	30
Idiopatické střevní záněty (IBD)	10	10
Ulcerózní kolitida	10	10
<i>Jiná onemocnění:</i>		
Malignita / Rakovina	20	20
Fibromyalgie	10	10
Infekční onemocnění	10	10
Celkem	190	160

3. Klinická senzitivita a klinická specifita:

Klinická senzitivita byla vypočítána na každém Site samostatně pro SLE a pro kombinaci onemocnění pojivové tkáně (CTD: SLE + SS + sklerodermie + CREST + MCTD + AM) spolu s dalšími ANA-asociovanými onemocněními (autoimunitní hepatitida jater + léky indukovaný lupus). Specifita byla vypočítána s využitím celkové kontrolní populace s ne-ANA-asociovanými onemocněními.

a. Klinická výkonnost na Site 1

Diagnostická senzitivita a specifita			% Senzitivita (95% CI)	% Senzitivita 95% CI)	% Senzitivita (95% CI)
			SLE (n = 40)	CTD + ANA- Asociovaná onemocnění (n = 190)	Non- ANA- Asociovaná onemocnění (n = 190)
Site 1	Metoda A	Technik A	52.5% (37.5 - 67.1%)	53.2% (46.1 - 60.1%)	75.8% (69.2 - 81.3%)
	Metoda A	Technik B	57.5% (42.2 - 71.5%)	60.0% (52.9 - 66.7%)	73.2% (66.4 - 79.0%)
	Metoda B	Technik A	55.0% (39.8 - 69.3%)	54.7% (47.6 - 61.6%)	75.8% (69.2 - 81.3%)
	Metoda B	Technik B	52.5% (37.5 - 67.1%)	57.9% (50.8 - 64.7%)	74.2% (67.6 - 79.9%)
	Metoda C	dIFine	55.0% (39.8 - 69.3%)	57.4% (50.3 - 64.2%)	67.4% (60.4 - 73.6%)

b. Klinická výkonnost na Site 2

Diagnostická senzitivita a specifická			% Senzitivita (95% CI)	% Senzitivita (95% CI)	% Senzitivita (95% CI)
			SLE (n = 40)	CTD + ANA- Asociovaná onemocnění (n = 190)	Non- ANA- Asociovaná onemocnění (n = 160)
Site 2	Metoda A	Technik A	50.0% (35.2 - 64.8%)	51.6% (44.5 - 58.6%)	83.1% (76.6 - 88.1%)
	Metoda A	Technik B	55.0% (39.8 - 69.3%)	56.3% (49.2 - 63.2%)	80.0% (73.1 - 85.5%)
	Metoda B	Technik A	52.5% (37.5 - 67.1%)	56.8% (49.7 - 63.7%)	81.3% (74.5 - 86.5%)
	Metoda B	Technik B	55.0% (39.8 - 69.3%)	58.4% (51.3 - 65.2%)	80.6% (73.8 - 86.0%)
	Metoda C	dIFine	52.5% (37.5 - 67.1%)	55.8% (48.7 - 62.7%)	74.4% (67.1 - 80.5%)

c. Klinická výkonnost na Site 3

Diagnostická senzitivita a specifická			% Senzitivita (95% CI)	% Senzitivita (95% CI)	% Senzitivita (95% CI)
			SLE (n = 40)	CTD + ANA- Associated Diseases (n = 190)	Non- ANA- Associated Diseases (n = 190)
Site 3	Metoda A	Technik A	47.5% (32.9 - 62.5%)	53.2% (46.1 - 60.1%)	76.8% (70.4 - 82.3%)
	Metoda A	Technik B	55.0% (39.8 - 69.3%)	57.4% (50.3 - 64.2%)	74.2% (67.6 - 79.9%)
	Metoda B	Technik A	45.0% (30.7 - 60.2%)	52.6% (45.6 - 59.6%)	78.9% (72.6 - 84.1%)
	Metoda B	Technik B	57.5% (42.2 - 71.5%)	56.3% (49.2 - 63.2%)	74.7% (68.1% - 80.4%)
	Metoda C	dIFine	55.0% (39.8 - 69.3%)	54.2% (47.1 - 61.1%)	67.5% (63.1 - 76.1%)

Senzitivita v kohortě pacientů se SLE se pohybovala od nejnižší hodnoty 45.0 % po nejvyšší hodnotu 57.5 % napříč všemi třemi metodami a všemi třemi Site. Prevalence ANA pozorovaná v této skupině pacientů se SLE byla nižší než obvykle. Podle revmatologů, kteří se podíleli na sběru těchto vzorků, to může být způsobeno tím, že většina těchto pacientů byla léčena silnými imunosupresivy a měla nízkou aktivitu onemocnění nebo byla v remisi. Tato nízká prevalence ANA byla dále potvrzena pomocí jiného, FDA schváleného, komerčního ANA HEp-2 IFA testu. Klinická senzitivita ve skupině CTD + ANA-asociovaná onemocnění se pohybovala od 51.6 % do 60.0 % napříč všemi třemi metodami a třemi Site. Klinická specifická ve skupině ne-ANA-asociovaných onemocnění se pohybovala od 67.4 % do 83.1 % napříč všemi třemi metodami a třemi Site. Při zprůměrování všech metod interpretace napříč třemi Site činila průměrná klinická senzitivita ve skupině SLE 53.2 %, klinická senzitivita ve skupině CTD + ANA-asociovaná onemocnění 55.7 % a klinická specifická ve skupině ne-ANA-asociovaných onemocnění 75.9 %.

4. Frekvence výskytu ANA podle skupiny onemocnění:

Kromě stanovení pozitivního nebo negativního výsledku může Metoda C vygenerovat výsledek „Neurčitý“, pokud systém dIFine® nedokáže výsledek jednoznačně určit jako pozitivní nebo negativní. Pro účely níže uvedeného shrnutí byly neurčité výsledky považovány za negativní (tj. nebyly klasifikovány jako pozitivní). Tabulka níže uvádí procento každé kategorie onemocnění, které bylo jednotlivými Techniky na jednotlivých pracovištích a podle jednotlivých metod vyhodnoceno jako kvalitativně pozitivní. Tato tabulka shrnuje frekvenci výskytu ANA v jednotlivých kategoriích onemocnění a konzistenci tohoto určení ANA napříč metodami.

Site 1:

Onemocnění	Technik A		Technik B		Metoda C
	Metoda A	Metoda B	Metoda A	Metoda B	
ANA- Asociovaná onemocnění					
SLE (Systémový lupus erythematoses)	52.5%	55.0%	57.5%	52.5%	55.0%
Sjögrenův syndrom	50.0%	50.0%	56.7%	53.3%	53.3%
Sklerodermie	75.0%	70.0%	80.0%	80.0%	80.0%
Autoimunitní myositida	50.0%	55.0%	65.0%	60.0%	60.0%
MCTD (Smíšené onemocnění pojivové tkáně)	40.0%	40.0%	50.0%	55.0%	50.0%
CREST syndrom	80.0%	80.0%	80.0%	80.0%	80.0%
Autoimunitní hepatitida	45.0%	50.0%	60.0%	55.0%	50.0%
Léky indukovaný lupus	35.0%	40.0%	35.0%	35.0%	35.0%
Non-ANA Asociovaná onemocnění					
Autoimunitní tyreoiditida	23.3%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%
Rakovina / Malignita	15.0%	15.0%	20.0%	20.0%	15.0%
Celiakie	45.5%	45.5%	45.5%	45.5%	45.5%
Crohnova choroba	30.0%	30.0%	30.0%	30.0%	30.0%
Fibromyalgie	30.0%	40.0%	50.0%	40.0%	40.0%
Infekční onemocnění	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%
Idiopatické střevní záněty (IBD)	40.0%	30.0%	40.0%	20.0%	20.0%
Revmatoidní artritida	16.7%	23.3%	23.3%	23.3%	16.7%
Ulcerózní kolitida	30.0%	30.0%	50.0%	60.0%	40.0%
Vaskulitida	17.9%	14.3%	14.3%	14.3%	14.3%

Site 2:

Onemocnění	Technik A		Technik B		Metoda C
	Metoda A	Metoda B	Metoda A	Method B	
ANA- Asociovaná onemocnění					
SLE (Systémový lupus erythematoses)	50.0%	52.5%	55.0%	55.0%	52.5%
Sjögrenův syndrom	53.3%	53.3%	56.7%	56.7%	53.3%
Sklerodermie	75.0%	80.0%	75.0%	80.0%	80.0%
Autoimunitní myositida	55.0%	65.0%	65.0%	70.0%	60.0%
MCTD (Smíšené onemocnění pojivové tkáně)	30.0%	45.0%	35.0%	45.0%	45.0%
CREST syndrom	75.0%	80.0%	80.0%	80.0%	75.0%
Autoimunitní hepatitida	40.0%	45.0%	45.0%	45.0%	45.0%
Léky indukovaný lupus	35.0%	40.0%	40.0%	40.0%	40.0%
Non-ANA Asociovaná onemocnění					
Autoimunitní tyreoiditida	13.3%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%
Rakovina / Malignita	10.0%	15.0%	15.0%	15.0%	15.0%
Celiakie	20.0%	30.0%	20.0%	30.0%	30.0%
Crohnova choroba	30.0%	30.0%	30.0%	30.0%	30.0%
Fibromyalgie	40.0%	40.0%	40.0%	40.0%	40.0%
Infekční onemocnění	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%
Idiopatické střevní záněty (IBD)	20.0%	20.0%	20.0%	20.0%	20.0%
Revmatoidní artritida	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%	16.7%
Ulcerózní kolitida	40.0%	40.0%	60.0%	40.0%	40.0%
Vaskulitida	0.0%	0.0%	10.0%	10.0%	0.0%

Site 3:

Onemocnění	Technik A		Technik B		Metoda C
	Metoda A	Metoda B	Metoda A	Method B	
ANA- Asociovaná onemocnění					
SLE (Systémový lupus erythematoses)	47.5%	45.0%	55.0%	57.5%	52.5%
Sjögrenův syndrom	46.7%	50.0%	60.0%	53.3%	50.0%
Sklerodermie	75.0%	75.0%	80.0%	75.0%	75.0%
Autoimunitní myositida	60.0%	60.0%	60.0%	60.0%	60.0%
MCTD (Smíšené onemocnění pojivové tkáně)	45.0%	45.0%	45.0%	45.0%	45.0%
CREST syndrom	80.0%	80.0%	75.0%	75.0%	75.0%
Autoimunitní hepatitida	45.0%	40.0%	50.0%	50.0%	45.0%
Léky indukovaný lupus	35.0%	35.0%	35.0%	35.0%	35.0%
Non-ANA Asociovaná onemocnění					
Autoimunitní tyreoiditida	16.7%	13.3%	20.0%	16.7%	16.7%
Rakovina / Malignita	20.0%	20.0%	20.0%	25.0%	15.0%
Celiakie	45.5%	45.5%	45.5%	45.5%	45.5%
Crohnova choroba	30.0%	20.0%	30.0%	30.0%	30.0%
Fibromyalgie	40.0%	40.0%	50.0%	50.0%	40.0%
Infekční onemocnění	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%
Idiopatické střevní záněty (IBD)	30.0%	30.0%	30.0%	30.0%	20.0%
Revmatoidní artritida	23.3%	16.7%	26.7%	20.0%	16.7%
Ulcerózní kolitida	40.0%	40.0%	60.0%	60.0%	40.0%
Vaskulitida	10.7%	10.7%	10.7%	14.3%	14.3%

Frekvence výskytu ANA u skupiny pacientů s celiakií se zdála být vyšší, než se očekávalo. V odborné literatuře existují důkazy podporující zvýšené hladiny ANA u pacientů s celiakií (39). Kromě toho byly tyto vzorky testovány také pomocí jiného komerčního ANA HEP-2 testu schváleného FDA, na kterém byl výskyt ANA potvrzen.

5. Porovnání metod interpretace:

Celkem 350 klinických vzorků bylo testováno na všech třech klinických pracovištích. Dalších 30 klinicky charakterizovaných vzorků na celiakii a vaskulitidu bylo testováno na pracovištích jedna a tři. Nakonec bylo retrospektivně shromážděno dalších 12 vzorků vykazujících vzor jaderné membrány nebo jaderných teček, které byly testovány rovněž na pracovištích jedna a tři. S těmito 392 vzorky vzniklo celkem 2268 případů, kdy bylo možné porovnat výsledky Metoda A versus Metoda B, Metoda A versus Metoda C a Metoda B versus Metoda C. Souhrn těchto kvalitativních porovnání je uveden v tabulkách níže

a. Porovnání metod interpretace:

Metoda A vs Metoda B		Shoda u pozitivních vzorků (95% CI)	Shoda u negativních vzorků (95% CI)	Celková shoda vzorků (95% CI)
Site 1	Technik A	95.6% (152/159) (91.2 - 97.9%)	95.7% (223/233) (92.3 - 97.7%)	95.7% (375/392) (93.2 - 97.3%)
	Technik B	94.9% (168/177) (90.6 - 97.3%)	98.6% (212/215) (95.9 - 99.5%)	96.9% (380/392) (94.7 - 98.2%)
Site 2	Technik A	99.2% (124/125) (95.6 - 99.9%)	93.8% (211/225) (89.8 - 96.3%)	95.7% (335/350) (93.1 - 97.4%)
	Technik B	98.6% (137/139) (94.9 - 99.6%)	97.6% (206/211) (94.6 - 98.95%)	98.0% (343/350) (95.9 - 99.0%)
Site 3	Technik A	95.5% (148/155) (90.9 - 97.8%)	98.7% (234/237) (96.4 - 99.65%)	97.5% (382/392) (95.4 - 98.6%)
	Technik B	95.9% (162/169) (91.7 - 97.9%)	97.8% (218/223) (94.9 - 99.0%)	96.9% (380/392) (94.7 - 98.2%)

b. Kombinovaná kvalitativní shoda mezi Metodou A a Metodou B – všechna Site / všichni Technici

		Metoda A	
		Pozitivní	Negativní
Metoda B	Pozitivní	891	40
	Negativní	33	1304

Shoda pozitivních (%) = 96.43% (891 / 924) 95% Interval spolehlivosti = 95.03 – 97.45%
Shoda negativních (%) = 97.02% (1304 / 1344) 95% Interval spolehlivosti = 95.97 – 97.81%
Celková shoda (%) = 96.78% (2195 / 2268) 95% Interval spolehlivosti = 95.97 – 97.43%

c. Kvalitativní porovnání Metoda A vs Metoda C

Vzhledem k tomu, že Metoda C vykázala neurčité výsledky u mnoha vzorků, byla procentuální shoda pozitivních a negativních výsledků vypočítána podle obou relevantních scénářů:

Uncertain Counted Towards Positives

Metoda A vs Metoda B		Shoda u pozitivních vzorků (95% CI)	Shoda u negativních vzorků (95% CI)	Celková shoda vzorků (95% CI)
Site 1	Technik A	97.5% (155/159) (93.7 – 99.0%)	80.3% (187/233) (74.7 – 84.9%)	87.2% (342/392) (83.6 – 90.2%)
	Technik B	98.3% (174/177) (95.1 – 99.4%)	87.4% (188/215) (82.4 – 91.2%)	92.4% (362/392) (89.3 – 94.6%)
Site 2	Technik A	100% (125/125) (97.0 – 100.0%)	85.3% (192/225) (80.1 – 89.4%)	90.6% (317/350) (87.1 – 93.2%)
	Technik B	100% (139/139) (97.3 – 100.0%)	91.0% (192/211) (86.4 – 94.2%)	94.6% (331/350) (91.7 – 96.5%)
Site 3	Technik A	100% (155/155) (97.6 – 100.0%)	87% (206/237) (82.0 – 90.7%)	92.1% (361/392) (88.9 – 94.4%)
	Technik B	98.8% (167/169) (95.8 – 99.7%)	91.9% (205/223) (87.6 – 94.8%)	94.9% (372/392) (92.3 – 96.7%)

d. Výsledek porovnání Metoda A vs Metoda C pro všechna Site a všechny Techniky – souhrnně uvedeny níže:

		Metoda A	
		Pozitivní	Negativní
Metoda C	Pozitivní	915	174
	Negativní	9	1170

Shoda pozitivních výsledků: 99.03 % (915/924) 95% CI: 98.39 – 99.55%
Shoda negativních výsledků: 87.05 % (1170/1344) 95% CI: 85.15 – 88.74%
Celková shoda v procentech: 91.93 % (2085/2268) 95% CI: 90.74 – 92.98%

Neurčité výsledky započítány jako negativní

Metoda A vs Metoda B		Shoda u pozitivních vzorků (95% CI)	Shoda u negativních vzorků (95% CI)	Celková shoda vzorků (95% CI)
Site 1	Technik A	93.1% (148/159) (88.0 – 96.1%)	94.0% (219/233) (90.2 – 96.4%)	93.6% (367/392) (90.8 – 96.5%)
	Technik B	90.4% (160/177) (85.2 – 93.9%)	99.1% (213/215) (96.7 – 99.7%)	95.2% (373/392) (92.6 – 96.9%)
Site 2	Technik A	99.2% (124/125) (95.1 – 99.9%)	94.7% (213/225) (90.9 – 96.9%)	96.3% (337/350) (93.8 – 97.8%)
	Technik B	95.0% (132/139) (89.9 – 97.5%)	98.1% (207/211) (95.2 – 99.3%)	96.9% (339/350) (94.5 – 98.2%)
Site 3	Technik A	96.1% (149/155) (91.8 – 98.2%)	97.1% (230/237) (94.4 – 98.1%)	96.7% (379/392) (94.4 – 98.1%)
	Technik B	90.5% (153/169) (85.2 – 94.1%)	98.7% (220/223) (96.1 – 99.5%)	95.2% (373/392) (92.6 – 96.9%)

e. Výsledky porovnání Metoda A vs Metoda C pro všechna Site a všechny Techniky – souhrnně uvedeny níže:

		Metoda A	
		Pozitivní	Negativní
Metoda C	Pozitivní	866	42
	Negativní	58	1302

Shoda pozitivních výsledků: 93.72 % (866/924) 95% CI: 91.97 – 95.11%

Shoda negativních výsledků: 96.88% (1302/1344) 95% CI: 95.80 – 97.68%

Celková shoda v procentech: 95.59 % (2168/2268) 95% CI: 94.67 – 96.36%

f. Kvalitativní porovnání Metoda B vs Metoda C

Vzhledem k tomu, že Metoda C může kromě pozitivního nebo negativního výsledku produkovat také výsledek „neurčitý“ (UNC), byla shoda mezi metodami vypočítána ve dvou scénářích: jednou s tím, že neurčité výsledky byly považovány za pozitivní, a podruhé s tím, že byly považovány za negativní:

UNC považováno za pozitivní – pro každé Site a každého Technika

Metoda A vs Metoda B		Shoda u pozitivních vzorků (95% CI)	Shoda u negativních vzorků (95% CI)	Celková shoda vzorků (95% CI)
Site 1	Technik A	100.0% (162/162) (97.7 – 100.0%)	83.0% (191/230) (77.7 – 87.3%)	90.1% (353/392) (86.7 – 92.7%)
	Technik B	99.4% (170/171) (96.8 – 99.9%)	86.4% (191/221) (81.3 – 90.3%)	91.8% (360/392) (88.7 – 94.2%)
Site 2	Technik A	100.0% (138/138) (97.3 – 100.0%)	90.6% (192/212) (85.9 – 93.8%)	94.3% (330/350) (91.3 – 96.3%)
	Technik B	100.0% (142/142) (97.4 – 100.0%)	92.3% (192/208) (87.9 – 95.2%)	95.4% (334/350) (92.7 – 97.2%)
Site 3	Technik A	99.3% (150/151) (96.3 – 99.9%)	85.5% (206/241) (80.5 – 89.4%)	89.9% (356/392) (86.5 – 92.5%)
	Technik B	99.4% (166/167) (96.7 – 99.9%)	91.6% (206/225) (87.2 – 94.5%)	94.9% (372/392) (92.3 – 96.7%)

Kombinovaná kvalitativní shoda mezi Metodou B a Metodou C pro všechna Site / všechny Techniky (UNC považováno za pozitivní):

		Metoda B		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Metoda C	Pozitivní	928	160	1088
	Negativní	3	1177	1180
Celkem		931	1337	2268

Shoda pozitivních výsledků: 99.7 % (928/931) 95% CI: 99.1 – 99.9%

Shoda negativních výsledků: 88.0 % (1177/1337) 95% CI: 86.2 – 89.7%

Celková shoda v procentech: 92.8% (2105/2268) 95% CI: 91.7 – 93.8%

UNC považováno za negativní – pro každé Site a každého Technika

Metoda B vs Metoda C		Shoda u pozitivních vzorků (95% CI)	Shoda u negativních vzorků (95% CI)	Celková shoda vzorků (95% CI)
Site 1	Technik A	95.7% (155/162) (91.4 – 97.9%)	97.0% (223/230) (93.9 – 98.5%)	96.4% (378/392) (94.1 – 97.9%)
	Technik B	94.2% (161/171) (89.6 – 96.8%)	99.6% (220/221) (97.5 – 99.9%)	97.2% (381/392) (95.1 – 98.4%)
Site 2	Technik A	98.6% (136/138) (94.9 – 99.60%)	100.0% (212/212) (98.2 – 100.0%)	99.4% (348/350) (97.9 – 99.8%)
	Technik B	95.8% (136/142) (91.1 – 98.1%)	100.00% (208/208) (98.2 – 100.0%)	98.3% (344/350) (96.3 – 99.2%)
Site 3	Technik A	98.0% (148/151) (94.3 – 99.3%)	96.7% (233/241) (93.6 – 98.3%)	97.2% (381/392) (95.1 – 98.4%)
	Technik B	92.8% (155/167) (87.9 – 95.8%)	99.56% (224/225) (97.5 – 99.9%)	96.68% (379/392) (94.4 – 98.1%)

Kombinovaná kvalitativní shoda mezi Metodou B a Metodou C pro všechna Site / všechny Techniky (UNC považováno za negativní):

		Metoda B		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Metoda C	Pozitivní	891	17	908
	Negativní	40	1320	1360
	Celkem	931	1337	2268

Shoda pozitivních výsledků: 95.7% (891/931)

95% CI: 94.2 – 96.8%

Shoda negativních výsledků: 98.7% (1320/1337)

95% CI: 98.0 – 99.2%

Celková shoda v procentech: 97.5% (2211/2268)

95% CI: 96.8 – 98.1%

Ve všech případech byla kvalitativní shoda mezi metodami interpretace velmi vysoká, což naznačuje, že všechny tři Metoda (ruční mikroskop, digitální čtení ze skeneru diFine® a automatické vyhodnocení ze skeneru diFine®) spolu dobře korelují a vykazují jen velmi málo nesrovnalostí..

Navíc byly stanovené vzory porovnány napříč různými metodami interpretace; vzorky, které neměly žádný vzor (tj. „negativní“), a vzorky, které vykazaly neurčité výsledky (tj. „UNC“), byly zahrnuty do analýzy shody vzorů mezi různými metodami interpretace, jak je uvedeno v tabulce níže:

		Metoda A vs Metoda B	Metoda A vs Metoda C	Metoda B vs Metoda C
		Procentuální shoda (%) (#Shoda / Celkem#) [95% CI]	Procentuální shoda (%) (# Shoda / Celkem #) [95% CI]	Procentuální shoda (%) (# Shoda / Celkem #) [95% CI]
Site 1	Technik A	98.5 (386/392) [96.7 – 99.3%]	84.2 (330/392) [80.2 – 87.5%]	83.9 (329/392) [80.0 – 87.2%]
	Technik B	97.7 (383/392) [95.7 – 98.8%]	85.0 (333/392) [81.1 – 88.2%]	85.2 (334/392) [81.4 – 88.4%]
Site 2	Technik A	96.9 (339/350) [94.5 – 98.2%]	86.0 (301/350) [82.0 – 89.3%]	86.9 (304/350) [82.9 – 90.0%]
	Technik B	97.7 (342/350) [95.6 – 98.8%]	86.6 (303/350) [82.6 – 89.8%]	87.1 (305/350) [83.2 – 90.3%]
Site 3	Technik A	98.47 (386/392) [96.7 – 99.3%]	88.3 (346/392) [84.7 – 91.1%]	88.5 (347-392) [85.0 – 91.3%]
	Technik B	98.2 (385/392) [96.4 – 99.1%]	88.0 (345/392) [84.4 – 90.9%]	87.5 (343/392) [83.9 – 90.4%]

Kombinací všech tří pracovišť vznikla následující shoda vzorů:

	Počet shod vzorů / Celkový počet vzorků	Procentuální shoda (%)	95% CI
Metoda A vs Metoda B	2221/2268	98.0	97.3-98.4%
Metoda A vs Metoda C	1958/2268	86.3	84.9-87.7%
Metoda B vs Metoda C	1962/2268	86.5	85.0-87.9%

Vzorky, které byly pozitivní alespoň jednou metodou na každém Site, byly titrovány až do koncového ředění a interpretovány všemi třemi metodami. Vzorky, které byly kvalitativně pozitivní všemi třemi metodami na kterémkoli Site, mohly být porovnány z hlediska shody koncového ředění. Na Site 1 bylo titrováno 156 vzorků, na Site 2 celkem 133 vzorků a na Site 3 bylo titrováno 154 vzorků. Vzhledem k tomu, že na každém Site interpretovali výsledky dva Technici pomocí metod A a B, vzniklo celkem 886 případů, kdy bylo možné porovnat stanovení koncového ředění mezi Metodou A a Metodou B, Metodou A a Metodou C a Metodou B a Metodou C. Počet případů, kdy se tato stanovení shodovala včetně tolerance $\pm$ jedno dvojnásobné ředění, je uveden v tabulce níže:

Kombinovaná shoda koncového titru (všechna Site / všichni Technici)			
Interpretace	[$\pm$ 1 Ředění] / Celkový počet vzorků	Procentuální shoda (%)	95% CI
Metoda A vs. Metoda B	880/886	99.32	98.53 – 99.69%
Metoda A vs. Metoda C	879/886	99.21	98.38 – 99.62%
Metoda B vs. Metoda C	880/886	99.32	98.53 – 99.69%

Toto porovnání ukazuje, že shoda v určení koncového ředění mezi metodami je vysoká a že se vyskytlo jen velmi málo případů, kdy koncové ředění stanovené jednou metodou se lišilo o více než $\pm$ jedno ředění oproti jiné metodě..

Celkově tato data ukazují, že automaticky rozpoznávaný vzor pomocí systému dIFine® (Metoda C) souhlasí s výsledky Metoda A a/nebo Metoda B (neautomatizované Metoda rozpoznávání vzorů) u většiny vzorků. Nicméně konečné rozhodnutí stále zůstává v odpovědnosti vyškoleného pracovníka.

LITERATURA

1. Barnett EV: *Mayo Clin. Proc.* 44:645, 1969.
2. Burnham TK, Fine G, Neblett TR: *Ann. Intern. Med.* 63:9, 1966.
3. Casals SP, Friou GJ, Meyers LL: *Arthritis Rheum.* 7:379, 1964.
4. Condemí JJ, Barnett EV, Atwater EC, et al: *Arthritis Rheum.* 8:1080, 1965.
5. Dorsch CA, Gibbs CB, Stevens MB, Shelman LE: *Ann. Rheum. Dis.* 28:313, 1969.
6. Dubois EL: *J. Rheum.* 2:204, 1975.
7. Alarcon-Segovia D, Fishbein E: *J. Rheum.* 2:167, 1975.
8. Friou GJ: *J. Clin. Invest.* 36:890, 1957.
9. Friou GJ, Finch SC, Detre KD: *J. Immunol.* 80:324, 1958.
10. Coons AH, Creech H, Jones RN, et al: *J. Immunol.* 80:324, 1958.
11. Barnett EV, North AF, Condemí JJ, Jacox RF, Vaughn JH: *Ann. Intern. Med.* 63:100, 1965.
12. Lachman PJ, Kunkel HG: *Lancet* 2:436, 1961.
13. Friou GJ: *Arthritis Rheum.* 7:161, 1964.
14. Beck JS: *Scot. Med. J.* 8:373, 1963.
15. Anderson JR, Gray KG, Beck JS, et al: *Ann. Rheum. Dis.* 21:360, 1962.
16. Luciano A, Rothfield NF: *Ann. Rheum. Dis.* 32:337, 1973.
17. 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.
18. 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.
19. Ritchie RF: Antinucleolar antibodies: Their frequency and diagnostic association. *N. Engl. J. Med.* 282:1174–1178, 1970.
20. 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.
21. 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.
22. Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti-Ro(SS-A) antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279–1282, 1983.
23. 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.
24. 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.
25. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C: *Arthritis Rheum.* Vol. 23 No. 6:617, 1980.
26. Hall AP, Bardawil WA, Bayles TB, et al: *N. Engl. J. Med.* 263:769, 1960.
27. 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 H. J. Müller-Eberhard (Eds), Grune & 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 – 4th 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.

SEZNAM SYMBOLŮ

Následující symboly mohly být použity v označení tohoto výrobku.

Symbol	Popis	Symbol	Popis
	Výrobce		Chraňte před slunečním zářením
IVD	<i>In vitro diagnostický lékařský prostředek</i>	CE	Shoda s směrnicí 98/79
REF	Katalogové číslo	COVGLS	Krycí sklíčko
	Dostatečné pro n testů	SLD	Sklíčko se substrátem
LOT	Šaržový kód	BUF PBS	Pufr PBS
	Použít do	MNTMED	Montovací médium
	Omezení skladovací teploty	CONJ	Konjugát
RX Only	Pouze na lékařský předpis	CTRL +	Pozitivní kontrola
	Konzultovat do elektronického pokyny k použití	CTRL -	Negativní kontrola
	Skladujte ve vzpřímený poloze	Made in the USA	Vyrobeno v USA



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, Nový Jersey, 08876, USA

Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2

International: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Website: www.zeusscientific.com

Pro zákaznický servis v USA kontaktujte svého místního distributora.

Pro technickou podporu v USA kontaktujte společnost ZEUS Scientific – volejte bezplatně nebo pište na e-mail: support@zeusscientific.com.

Pro zákaznický servis a technickou podporu mimo USA kontaktujte svého místního distributora.

©2019 ZEUS Scientific. Všechna práva vyhrazena.



Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
Nizozemsko