



DE

## ANA HEP-2

REF FA2500A

IVD

Rx Only



### VERWENDUNGSZWECK

ANA HEP-2 ist ein indirekter Immunfluoreszenztest für den qualitativen Nachweis und die semiquantitative Bestimmung von IgG-Anti-Nuklear-Antikörpern in Humanserum mittels manueller Fluoreszenzmikroskopie oder mit dem automatisierten Mikroskop dIFine®. Das Vorhandensein von antinukleären Antikörpern kann in Verbindung mit anderen serologischen Tests und klinischen Befunden verwendet werden, um die Diagnose von systemischem Lupus erythematoses und anderen systemischen rheumatischen Erkrankungen zu erleichtern.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFA) wurde ausgiebig zum Nachweis des Vorhandenseins von antinukleären Antikörpern (ANA) in den Seren von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) und anderen klinisch ähnlichen Bindegewebserkrankungen eingesetzt (1 - 5). Darüber hinaus kann ANA mit zahlreichen medikamenteninduzierten Lupussyndromen assoziiert sein (6 - 7), die klinisch die spontane Form von SLE nachahmen. Die IFA-Technik wurde von mehreren Forschern (8 - 9) nach den ursprünglich von Coons beschriebenen grundlegenden Methoden an ANA-Tests angepasst (10). ANA bestehen hauptsächlich aus IgG-Antikörpern; es können jedoch auch IgA- und IgM-ANA nachgewiesen werden (11). Es ist inzwischen anerkannt, dass viele Quellen von Kernmaterial als Substrat für ANA-Tests verwendet werden können. Obwohl der größte Teil der ursprünglichen ANA-Forschung unter Verwendung von Ratten- oder Mausleber- oder Nierengewebesubstrat durchgeführt wurde, hat die Verwendung von humanen oder tierischen embryonalen Gewebezellkultursubstraten ein zuverlässiges und einfach zu interpretierendes alternatives Substrat für ANA-Tests bereitgestellt. Die HEP-2-Zelllinie stammt aus einem humanen Kehlkopfepidermkarzinom. Die Verwendung des HEP-2-Zellsubstrats in IFA erhöhte die Empfindlichkeit des Nachweises von Autoantikörpern und trug zur Diagnose systemischer Autoimmunerkrankungen und zur Beschreibung neuer Erkrankungen bei, da über 100 Antigene in ihrem Zellkern und Zytoplasma nachgewiesen werden konnten. Es gibt verschiedene Muster der nukleären und zytoplasmatischen Immunfluoreszenz. dIFine® wurde so programmiert, dass es acht gängige ANA-Muster vorschlägt. **Diese acht Muster und die Grundlage dafür, die von dIFine® und Manual Reader ausgewertet werden können, lauten wie folgt:**

- 1. Homogene (AC-1)** - Homogene oder diffuse Färbemuster des Zellkerns stimmen mit Autoantikörpern gegen native DNA (nDNA) -Histone und / oder Desoxyribonukleoprotein (DNP) überein (12, 13). Die Chromosomen der mitotischen Zellen (sich teilende Zellen) sind wichtige Indikatoren für ein homogenes Muster, da sie sich als unregelmäßig geformte Massen mit stärker gefärbtem Außenrand anfärben.
- 2. Gesprenkelt (AC-2, AC-4 und AC-5)** - Das gesprenkelte Muster ist das am häufigsten beobachtete ANA-Muster. Ein einheitliches "echtes gesprenkeltes" Muster kann bei Zentromer-Antikörpern in Zellen beobachtet werden, die sich nicht teilen. Ein dichtes gesprenkeltes Muster kann mit Antikörpern gegen n-RNP, Sm und SSB / La gesehen werden.  
Fein gesprenkeltes Muster, chromosomennegativ (AC-4): Zahlreiche kleine und gleichmäßige Fluoreszenzpunkte, die gleichmäßig über den Kern verteilt sind. Die Nukleolen erscheinen im Allgemeinen ungefärbt. Die mitotischen Zellen können einige Flecken in ihrem Zytoplasma aufweisen, aber die Chromosomen sind negativ.  
Grobes gesprenkeltes Muster, chromosomennegativ (AC-5): Mittelgroße Fluoreszenzpunkte werden über die Kerne mit ausgeprägten Kernrändern gestreut. Es können auch größere Fluoreszenzpunkte beobachtet werden; Sie sind jedoch zu zahlreich und variabel in der Größe, um als nukleolares Muster identifiziert zu werden. Die Chromosomen in den mitotischen Zellen werden negativ sein.  
Nuclear Dense fine Speckled (AC-2): Zahlreiche feine Sprengel mit dichter Verteilung im Kern, ausgenommen Nukleolen. Assoziiert mit Anti-DFS70-Antikörpern, die bei gesunden Personen auftreten können und begrenzte Auswirkungen auf Autoimmunerkrankungen haben.  
Harmon et al. (17) zeigten, dass Serumproben, die hoch monospezifische Anti-SSA / Ro enthielten, ein IF-ANA-Testmuster von diskreten Kernsprengeln auf einer Vielzahl von menschlichen Zellen und Tumorkernen ergaben. Solche Serumproben mit monospezifischem Anti-SSA / Ro erzeugten sehr wenig zytoplasmatische Färbung von Substratzellen. Ein ausgeprägtes, großes, variables gesprenkeltes Muster von 3 bis 10 großen Flecken im Kern wurde beschrieben. Diese Patienten mit großen, variablen Sprengeln haben undifferenzierte rheumatische Krankheitssyndrome mit IgM- und Histon-FH-3-Antikörpern (18).
- 3. Zentromer (AC-3)** - Diskret gesprenkelt, Chromosom (Zentromerspezifität) positiv: Die Chromosomen sind in mitotischen Zellen positiv; Tatsächlich werden die diskreten Flecken nur in der Chromosomenmasse geclustert, was die verschiedenen Stadien der Mitose deutlich zeigt. Es wurde erkannt, dass das Zentromermuster mit dem CREST-Syndrom assoziiert ist, einer milderer Variante der progressiven systemischen Sklerose (PSS). Das Zentromermuster zeigt diskrete und gleichmäßige

Punkte fluoreszierender Flecken, die im gesamten Kern verstreut sind. Mitotische Zellen werden positiv sein, was eine Clusterung der Zentromere in den Chromosomen in verschiedenen Anordnungen je nach Mitosestadium zeigt.

4. **Homogener Nukleolar (AC-8)** - Das Nukleolarmuster zeigt eine homogene oder gesprenkelte Färbung des Nukleolus. Dieses Muster ist oft mit einer matten, homogenen Fluoreszenz im Rest des Zellkerns verbunden. Die Chromosomen in den mitotischen Zellen sind negativ. Das nukleoläre Muster deutet auf Autoantikörper gegen PM / Scl-75, PM/ Scl-100, Th / To, B23 / Nucleophosmin, Nucleolin, No55 / SC65 hin. Die nukleolare Fluoreszenz erscheint homogen, verklumpt oder gesprenkelt, abhängig von dem Antigen, auf das der Autoantikörper reagiert. Antinukleoläre Antikörper treten hauptsächlich in den Seren von Patienten mit Sklerodermie, systemischem Lupus erythematoses, Sjögren-Syndrom oder Raynaud-Phänomen auf (19).
5. **Multiple Kernpunkte (AC-6)** - Eine kleine Anzahl von Kernpunkten im Bereich von 6 bis 20 ist am häufigsten mit einer primären biliären Cholangitis assoziiert.
6. **Kernmembran (AC-11)** - Antinukleäre Membran (Kernlamellen): Das antinukleäre Membranmuster erscheint als Rand um den Kern und ähnelt einem Randmuster; Es unterscheidet sich jedoch vom Randmuster dadurch, dass das Metaphasenchromosomenstadium negativ ist. Es ist wichtig, diesen Autoantikörper zu melden, da bekannt ist, dass er mit einer autoimmunen Lebererkrankung assoziiert ist.
7. **Zytoplasmatisch (ribosomal) (AC-19)**- Das ribosomale Muster ist durch zahlreiche zytoplasmatische Flecken mit der höchsten Konzentration um den Zellkern gekennzeichnet. Es unterscheidet sich vom mitochondrialen Muster aufgrund der kleineren Flecken und der höheren Dichte. Die Bedeutung des Musters ist unbekannt.
8. **Zytoplasmatisch (mitochondrial) (AC-21)** - Das Muster weist charakteristischerweise zahlreiche zytoplasmatische Flecken mit der höchsten Konzentration im perinukleären Bereich auf. Das Muster kann in Interphasen- und mitotischen Zellen beobachtet werden. Die klinische Bedeutung von AMA ist am häufigsten eine Assoziation mit primärer biliärer Cholangitis, insbesondere wenn die AMA einen hohen Titer aufweist.

**Die unten aufgeführten zusätzlichen Muster können mit dIFine® nicht identifiziert werden und müssen von einem geschulten Bediener gemäß den ICAP-Nomenklaturstandards interpretiert werden.**

#### **Zusätzliche nukleare Muster**

1. **Muster des proliferierenden Zellkernantigens (PCNA) (AC-13):** Das Muster des proliferierenden Zellkernantigens wird als fein bis verlaufende Kernsprengung in 30 - 60% der Zellen in der Interphase und als negative Färbung der Chromosomenregion mitotischer Zellen beobachtet. Die PCNA ist spezifisch für Patienten mit SLE, wird jedoch bei anderen Erkrankungen des Bindegewebes nicht nachgewiesen.
2. **Zentriolmuster (AC-24):** Das Zentriolmuster ist durch zwei verschiedene Fluoreszenzpunkte im Kern der mitotischen Zellen oder einen bestimmten Fluoreszenzpunkt in der ruhenden Zelle gekennzeichnet. Die Bedeutung dieses Musters ist nicht bekannt; Es wurde jedoch in PSS beobachtet.
3. **Spindelfasermuster (AC-25):** Chromosomenpositiv: Das Spindelfasermuster ist einzigartig für Zellen, die sich einer Mitose unterziehen, bei der nur der Spindelapparat fluoresziert. Dieses Muster hat ein "Spinnennetz" -Aussehen, das sich von der Zentriole bis zu den Zentromern erstreckt. Das Muster deutet auf Autoantikörper gegen die Mikrotubuli hin und seine Bedeutung ist unklar.
4. **Mittelkörpermuster (AC-27):** Das Mittelkörpermuster ist eine dicht färbende Region in der Nähe der Spaltfurche von Telophasenzellen, dh in dem Bereich, in dem sich die beiden Tochterzellen trennen. Die klinische Bedeutung des Musters ist unbekannt; Das Muster wurde jedoch bei ausgewählten Patienten mit systemischer Sklerose erkannt.

#### **Zusätzliche zytoplasmatische Muster**

1. **Cytoplasmatisch fibrillär linear-aktinartig (AC-15):** Das Zytoskelettmuster ist durch ein ausgeprägtes "Spinnennetz" oder faseriges Erscheinungsbild in der gesamten Zelle gekennzeichnet. Es wurde berichtet, dass es mit einer autoimmunen Lebererkrankung (Anti-glatte Muskulatur) assoziiert ist.
2. **Lysosomales Muster (AC-18):** Das lysosomale Muster wird als einige diskrete Flecken beobachtet, die dünn über das Zytoplasma verteilt sind. Das Muster wird im Zytoplasma von Interphasen- und mitotischen Zellen beobachtet. Die klinische Bedeutung ist unbekannt.
3. **Polar / Golgi-ähnlich (AC-22):** Das Golgi-Apparatmuster ist durch eine positive zytoplasmatische Färbung gekennzeichnet, die nur auf einer Seite der perinukleären Region konzentriert ist. Die klinische Bedeutung ist ungewiss, aber Berichte in der Literatur deuten auf einen Zusammenhang mit SLE und Sjögren-Syndrom hin.

### **PRINZIP DES ASSAYS**

Das ANA HEP-2 wurde entwickelt, um das Vorhandensein von zirkulierender ANA in menschlichen Seren nachzuweisen. Der Assay verwendet Gewebezellkultursubstrat und Ziegen-Anti-Human-Immunglobulin, das für eine optimale Verwendung eingestellt und frei von unspezifischer Hintergrundfärbung ist. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten:

1. Schritt eins ist die Probeninkubation, bei der jedes in der Patientenprobe vorhandene ANA an das Zellsubstrat binden und einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden kann. Andere Serumbestandteile werden anschließend abgewaschen.
2. Schritt zwei ist die Konjugatinkubation, bei der das mit FITC markierte Anti-Human-Immunglobulin mit jedem humanen Immunglobulin reagieren darf, das während der Probeninkubation an das Substrat gebunden hat. Dies bildet einen stabilen Antigen-Antikörper-Konjugat-Komplex an der Stelle, an der der anfängliche Patientenantikörper an das Zellsubstrat gebunden hat. Überschüssiges Konjugat wird anschließend weggespült. Die Ergebnisse des Assays können mit einem

entsprechend ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop oder diFine® visualisiert werden. Alle positiven Reaktionen erscheinen als apfelgrüne Fluoreszenzfärbung in der Zelle. Wenn die Probe keine spezifische ANA aufwies, wird es keine eindeutige Kernfärbung der Zelle geben.

## REAGENS

### Bereitgestellte Materialien:

Jedes Kit enthält die folgenden Komponenten in ausreichenden Mengen, um die auf dem Verpackungsetikett angegebene Anzahl von Tests durchzuführen.

**HINWEIS: Konjugat und Kontrollen enthalten eine Kombination aus Proclin (0,05% v /v) und Natriumazid (<0,1% w /v) als Konservierungsmittel. Zorba-NS® enthält Natriumazid (<0,1% w/v) als Konservierungsmittel.**

|   |   |  |
|---|---|--|
|    | 1 | ANA HEP-2 Substratträger: Zwanzig 12-Well-Objektträger mit saugfähigem Löschpapier und Trockenmittelbeutel.  |
|    | 2 | Konjugat: Ziegen-Anti-Human-IgG, markiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Enthält Phosphatpuffer mit BSA und Gegenfärbung. Drei bernsteinfarbene Flaschen mit 3,5 ml Inhalt. Einsatzbereit.   |
|    | 3 | ANA (Homogen) Positiv-Kontroll (humanes Serum): Führt zu einer positiven apfelgrünen, homogenen Färbung des Zellkerns. Eine 0,5 ml-Durchstechflasche mit rotem Verschluss. Einsatzbereit.  |
|    | 4 | Negative Kontrolle (Human serum): Erzeugt keine nachweisbare Nuklear färbung. Ein 0,5-ml-Fläschchen mit grünem Deckel. Gebrauchsfertig.  |
|    | 5 | Zorba-NS® Probenverdünnungsmittel: Vier Flaschen mit grünem Verschluss, 25 ml. Einsatzbereit.  |
|   | 6 | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Leeren Sie den Inhalt jedes Pufferpakets in einen Liter destilliertes oder deionisiertes Wasser. Mischen, bis alle Salze vollständig aufgelöst sind. vier Päckchen, ausreichend für die Zubereitung von 4 Litern. |
|  | 7 | Eindeckmedium (gepuffertes Glycerin): Zwei 3,0 ml weiß verschlossene Tropfer-Tripper-Fläschchen.   |
|  | 8 | Deckglas. Paket von vierundzwanzig, 24 x 60 mm, Dicke #1.  |

### NOTIZEN:

- Die folgenden Komponenten sind nicht chargennummernabhängig und können austauschbar mit den Sebia IFA-Kits verwendet werden, sofern die Produktnummern identisch sind: Zorba-NS® (Produktnummer: FA025S), Eindeckmedien (Produktnummer: FA0009S), PBS (Produktnummer: 0008S) und Abdeckglas (Produktnummer: S8008)

### BENÖTIGTE, ABER NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

- diFine® automatisiertes Mikroskop oder ein entsprechend ausgestattetes Fluoreszenzmikroskop.
- Pipetten, die Volumina zwischen 10 und 200 µl pipettieren können.
- Einweg-Pipettenspitzen.
- Kleine Reagenzgläser, Verdünnungsplatten oder ähnliches zur Vorbereitung von Probenverdünnungen.
- Objektträgerwaschmaschine oder eine große Färbeschale mit Magnetrührplatte zum Waschen von Objektträgern zwischen den Inkubationsschritten.
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- 1 Liter Messzylinder.
- Labor-Timer zur Überwachung der Inkubationsschritte.
- Entsorgungsbecken, Einweghandschuhe und Desinfektionsmittel (z. B.: 10% Haushaltsbleiche – 0,5% Natriumhypochlorit).

### LAGERUNGSBEDINGUNGEN

|  |  |
|--|--|
|   | Ungeöffnetes Kit.  |
|  | Eindeckmedien, Konjugat, Objektträger, Zorba-NS®, Objektträger*, Positiv- und Negativkontrollen.<br>Rehydriertes PBS (30 Tage stabil). |
|   | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) -Pakete.  |
| * Nach dem Öffnen müssen die Folien an diesem Tag verwendet werden. Andere gebrauchsfertige Reagenzien, außer PBS, können bis zu ihrem angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. |  |

## VORKEHRUNG

1. Für die In-vitro-Diagnostik.
2. Befolgen Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Laborreagenzien. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Dampf nicht einatmen. Entsorgen Sie Abfälle unter Beachtung aller lokalen, staatlichen und bundesstaatlichen Gesetze.
3. Die Vertiefungen des Objektträgers enthalten keine lebensfähigen Organismen. **Berücksichtigen Sie jedoch die Folie** potenziell biogefährdende Materialien und behandeln Sie sie entsprechend.
4. Die Kontrollen sind **potenziell biogefährdende Materialien**. Ausgangsmaterialien, aus denen diese Produkte gewonnen wurden, wurden nach zugelassenen Testmethoden als negativ für HIV-1-Antigen, HBsAg und für Antikörper gegen HCV und HIV befunden. Da jedoch keine Testmethode die vollständige Sicherheit bieten kann, dass keine Infektionserreger vorhanden sind, sollten diese Produkte auf der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden, wie sie für potenziell infektiöse Humanserum- oder Blutproben in den Zentren für Krankheitskontrolle / National Institutes of Health empfohlen wird Handbuch "Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboratorien": aktuelle Ausgabe; und OSHA-Standard für durch Blut übertragene Krankheitserreger (20).
5. Die Einhaltung der angegebenen Inkubationszeit und -temperatur ist für genaue Ergebnisse unerlässlich. **Alle Reagenzien müssen vor Beginn des Assays Raumtemperatur (20 – 25 U.C.) erreichen**. Geben Sie nicht verwendete Reagenzien sofort in ihre Originalbehälter zurück und befolgen Sie die Lagerungsvorschriften.
6. Unsachgemäßes Waschen kann zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Achten Sie darauf, die Menge an restlichem PBS durch Blotzen zu minimieren, bevor Sie Konjugat hinzufügen. Lassen Sie die Vertiefungen zwischen den Inkubationen nicht austrocknen.
7. Das Konjugat, Zorba NS® und Kontrollen enthalten Natriumazid in einer Konzentration von <0,1% (w/v). Es wurde berichtet, dass Natriumazid in Laborleitungen Blei- oder Kupferazide bildet, die beim Hämmern Explosionen verursachen können. Um dies zu verhindern, spülen Sie die Spüle nach der Entsorgung der natriumazidhaltigen Lösung gründlich mit Wasser ab. Dieses Konservierungsmittel kann bei Verschlucken giftig sein.
8. Eine Verdünnung oder Verfälschung dieser Reagenzien kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
9. Niemals mit dem Mund pipettieren. Vermeiden Sie den Kontakt von Reagenzien und Patientenproben mit Haut und Schleimhäuten.
10. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden. Es können falsche Ergebnisse auftreten.
11. Kreuzkontaminationen von Reagenzien und/oder Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
12. Wiederverwendbare Glaswaren müssen gewaschen und gründlich frei von allen Reinigungsmitteln gespült werden.
13. Spritzer oder Aerosolbildung vermeiden.
14. Setzen Sie die Reagenzien während der Lagerung oder Inkubation keinem starken Licht aus.
15. Wenn Sie das Objektträgerpaket vor dem Öffnen der Schutzhülle auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen, werden die Vertiefungen und der Löschpapier vor Kondensation geschützt.
16. Sammeln Sie die Waschlösung in einem Entsorgungsbecken. Behandeln Sie die Abfalllösung mit Desinfektionsmittel (d. H.: 10% Haushaltsbleiche - 0,5% Natriumhypochlorit). Vermeiden Sie die Einwirkung von Bleichdämpfen auf die Reagenzien.
17. Setzen Sie keines der reaktiven Reagenzien bleichmittelhaltigen Lösungen oder starken Gerüchen aus bleichmittelhaltigen Lösungen aus. Spuren von Bleichmittel (Natriumhypochlorit) können die biologische Aktivität vieler der reaktiven Reagenzien in diesem Kit zerstören.
18. Üben Sie keinen Druck auf den Folienumschlag aus. Dies kann den Untergrund beschädigen.
19. Die Komponenten dieses Kits sind auf optimale Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit abgestimmt. Reagenzien anderer Hersteller sollten nicht ausgetauscht werden. Befolgen Sie die Packungsbeilage sorgfältig.
20. Ungeöffnete / geöffnete Komponenten sind bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar, sofern die empfohlenen Lagerungsbedingungen strikt eingehalten werden. Nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden. Nicht einfrieren.
21. Evans-Blau-Gegenfärbung ist ein potenzielles Karzinogen. Bei Hautkontakt mit Wasser spülen. Entsorgung gemäß den örtlichen Vorschriften.
22. Lassen Sie die Objektträger während des Eingriffs nicht trocknen. Abhängig von den Laborbedingungen kann es erforderlich sein, Objektträger während der Inkubation in eine feuchte Kammer zu legen.

## PROBENENTNAHME

1. Probenentnahme gemäß CLSI-Dokument M29: Schutz des Laborpersonals vor beruflich erworbenen Infektionskrankheiten durchführen. Keine bekannte Testmethode kann vollständige Sicherheit bieten, dass menschliche Blutproben keine Infektion übertragen. Daher sollten alle Blutderivate als potenziell infektiös angesehen werden.
2. Nur frisch entnommene und ordnungsgemäß gekühlte Seren, die mit diesem Test durch zugelassene aseptische Venenpunktionsverfahren gewonnen wurden (30, 31). Es sollten keine Antikoagulanzen oder Konservierungsmittel zugesetzt werden. Vermeiden Sie hämolysierte, lipämische oder bakteriell kontaminierte Seren.

3. Lagern Sie die Probe nicht länger als 8 Stunden bei Raumtemperatur. Wenn der Test nicht innerhalb von 8 Stunden durchgeführt wird, können die Seren zwischen 2 und 8°C nicht länger als 48 Stunden gelagert werden. Wenn eine Verzögerung des Tests zu erwarten ist, lagern Sie die Testseren bei -20 °C oder niedriger. Vermeiden Sie mehrfache Einfrier- / Auftauzyklen, die zu einem Verlust der Antikörperaktivität und zu fehlerhaften Ergebnissen führen können. Es liegt in der Verantwortung des einzelnen Labors, alle verfügbaren Referenzen und/oder seine eigenen Studien zu verwenden, um Stabilitätskriterien für sein Labor zu bestimmen (38).

## TESTVERFAHREN

1. Objektträger aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur (20 - 25°C) erwärmen lassen. Schutzumschlag aufreißen und Objektträger entnehmen. **Üben Sie keinen Druck auf die flachen Seiten der Schutzhülle aus.**
2. Identifizieren Sie jede Vertiefung mit den entsprechenden Patientenserum und Kontrollen. **HINWEIS: Die Kontrollen sollen unverdünnt verwendet werden.** Bereiten Sie von jedem Patientenserum eine 1:40-Verdünnung (z. B.: 10 µl Serum + 390 µl Zorba-NS®) vor.

### Verdünnungsoptionen:

- a. Anwender können die Positivkontrolle auf den Endpunkt titrieren, um als semiquantitative (1+ Minimal reaktive) Kontrolle zu dienen. In solchen Fällen sollte die Kontrolle zweifach in PBS verdünnt werden, nicht in **Zorba-NS®**. Eine Endpunktverdünnung wird festgelegt und auf die Positivkontrollflasche gedruckt ( $\pm$  eine Verdünnung). Es ist zu beachten, dass aufgrund von Abweichungen innerhalb des Labors (Ausrüstung usw.), sollte jedes Labor seinen eigenen erwarteten Endpunkttiter für jede Charge der Positivkontrolle festlegen.
  - b. Bei der Titration von Patientenproben sollten Anfangsverdünnungen in Zorba-NS® und alle nachfolgenden Verdünnungen nur in PBS hergestellt werden. **Titrationen dürfen nicht in Zorba-NS® vorbereitet werden.**
3. Geben Sie mit einem geeigneten Spender (siehe oben) 20-40 µl jeder Kontrolle und jedes verdünnten Patientenseres in die entsprechenden Vertiefungen.
  4. Objektträger 35±5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25°C) inkubieren.
  5. Objektträger vorsichtig mit PBS abspülen. **Leiten Sie keinen PBS-Strom in die Testvertiefungen.**
  6. Waschen Sie die Objektträger in Abständen von zwei bis fünf Minuten und wechseln Sie die PBS zwischen den Wäschen. Objektträger können bei jedem Waschen bis zu fünf Minuten einweichen. **HINWEIS: Wenn Sie automatische Waschmaschinen verwenden, stellen Sie die Waschmaschine so ein, dass jede Vertiefung dreimal mit einer Einweichzeit von null bis fünf Minuten gewaschen wird.**
  7. Entfernen Sie die Folien einzeln aus dem PBS. Schieben Sie die Objektträger- und Schlüsselschächte in die Löcher der mitgelieferten Löschblätter. Tupfen Sie den Objektträger ab, indem Sie die Rückseite mit einem saugfähigen Tuch abwischen. VORSICHT: Positionieren Sie den Löschzettel und schieben Sie ihn auf eine harte, ebene Oberfläche. Flecken auf Papiertüchern können die Objektträgermatrix zerstören. **Lassen Sie die Objektträger während des Testvorgangs nicht trocknen.**
  8. Gib 20 - 40µL Konjugat in jede Vertiefung.
  9. Wiederholen Sie die Schritte 4 bis 7.
  10. Tragen Sie 3 - 5 Tropfen Eindeckmedium auf jeden Objektträger (zwischen den Vertiefungen) auf und bringen Sie das Deckglas an. Alternativ kann man eine kleine Menge Eindeckmedium auf jede Vertiefung auftragen und Deckglas auftragen. Das Eindeckmittel muss innerhalb von zwei Stunden nach Abschluss des letzten Waschyklus zugegeben werden.
  11. Objektträger sofort mit einem geeigneten Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Dies kann manuell mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop oder mit dIFine® erfolgen. Wenn Sie dIFine® verwenden, lesen Sie bitte die Bedienungsanleitung des Geräts. **Es wird empfohlen, die Objektträger am selben Tag wie die Tests zu untersuchen.**

### NOTIZEN:

- a. **Wenn es nicht möglich ist, die Objektträger sofort zu betrachten, können die Objektträger bis zu 48 Stunden bei 2 - 8°C gelagert werden.**
- b. **Wenn die Objektträger nicht innerhalb von 48 Stunden untersucht werden, versiegeln Sie das Deckglas mit klarem Nagellack und lagern Sie es im Kühlschrank.**

## QUALITÄTSKONTROLLE

1. Jedes Mal, wenn der Test durchgeführt wird, müssen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle beigefügt werden.
2. Es wird empfohlen, die Kontrollen vor der Auswertung der Testproben zu lesen. Wenn die Steuerelemente nicht wie beschrieben angezeigt werden, sind die Ergebnisse möglicherweise ungültig.
  - a. Negativkontrolle - gekennzeichnet durch das Fehlen spezifischer Fluoreszenz und eine rote oder mattgrüne Hintergrundfärbung aller Zellen aufgrund von Gegenfärbung.
  - b. Positivkontrolle (homogenes Muster) - gekennzeichnet durch apfelgrüne Fluoreszenz. Das homogene Färbemuster ist eine diffuse gleichmäßige Färbung des gesamten Zellkerns.
3. Zusätzliche Kontrollen können gemäß den Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher und / oder bundesstaatlicher Vorschriften oder Akkreditierungsorganisationen getestet werden.

### NOTIZEN:

- a. **Es kann ein unspezifischer Reagenzienfang vorliegen. Es ist wichtig, die Objektträger ausreichend zu waschen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.**
- b. **Die Intensität der beobachteten Fluoreszenz kann mit dem verwendeten Mikroskop und Filtersystem variieren.**
- c. **Bei einigen humanen Seren kann eine nichtnukleare Färbung des Zellsubstrats beobachtet werden.**

### INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

1. Die Interpretation der Ergebnisse hängt vom beobachteten Muster, dem Titer des Autoantikörpers und dem Alter des Patienten ab. Ältere Menschen, insbesondere Frauen, neigen dazu, niedrig titrierte Autoantikörper (<1:80) zu entwickeln, wenn keine klinische Autoimmunerkrankung vorliegt. Erfahrungsgemäß ist eine Verdünnung von 1:40 eine gute Verdünnung für das ANA-Screening. Niedertiterpositive Ergebnisse können bei scheinbar gesunden Personen auftreten; Daher müssen die ANA-Ergebnisse immer im Lichte des gesamten klinischen Erscheinungsbilds des Patienten interpretiert werden.
2. Titer unter 1:40 gelten als negativ.
3. Positiver Test: Eine positive Reaktion ist das Vorhandensein eines Musters nuklearer apfelgrüner Färbung, das bei einer Verdünnung von 1: 40 auf der Grundlage einer Färbungsintensitätsskala von 1+ bis 4+ beobachtet wird. 1+ wird als schwache Reaktion und 4+ als starke Reaktion angesehen. Alle nach 1:40 positiven Seren sollten bis zur Endpunktverdünnung titriert werden. Dies wird erreicht, indem 1:40, 1:80, 1:160, usw. serielle Verdünnungen aller positiven. Der Endpunkttiter ist die höchste Verdünnung, die eine 1+ positive Reaktion hervorruft.
4. Homogene Muster mit peripherer Akzentuierung finden sich häufig in Seren von Patienten mit SLE.

|  | Krankheit am häufigsten gefunden in  | Referenz                 |
|--|--|--------------------------|
| Homogen:<br>Hoher Titer<br>Niedriger Titer | SLE<br>Rheumatoide Arthritis und andere Krankheiten                                | (3, 8, 9, and 16)<br>(1) |
| Zentromer                                  | CREST-Syndrom-Variante von PSS   | (27)                     |
| Gesprenkelt                                | Sklerodermie, Raynaud-Syndrom, Sjögren-Syndrom,<br>Gemischte Bindegewebserkrankung | (34 - 36)                |
| Gesprengt                                  | Sklerodermie   | (37)                     |
| Peripheren                                 | SLE  | (2, 8, 9, and 16)        |

### EINSCHRÄNKUNGEN DES ASSAYS

1. Das ANA HEP-2 ist ein labordiagnostisches Hilfsmittel, und seine Ergebnisse sind nicht allein diagnostisch. Eine positive ANA kann bei scheinbar gesunden Personen gefunden werden. Es ist daher unerlässlich, dass ANA-Ergebnisse in Verbindung mit anderen serologischen Tests und klinischen Befunden interpretiert werden.
2. SLE-Patienten, die sich einer Steroidtherapie unterziehen, können negative Testergebnisse aufweisen (40).
3. Viele häufig verschriebene Medikamente können ANA auslösen (6, 7).
4. Ein Autoantikörpermuster kann die diagnostischen Merkmale des anderen teilweise oder vollständig verdecken. In solchen Fällen ist es notwendig, das Serum zu titrieren.
5. Mit diesem Produkt ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Muster der Kernfluoreszenz und einem bestimmten Krankheitszustand beabsichtigt.

### ERWARTETE ERGEBNISSE

Der Erwartungswert in der Normalbevölkerung ist negativ oder kleiner als 1:40. Anscheinend gesunde Personen können jedoch ANA in ihren Seren enthalten (36). Dieser Prozentsatz steigt mit zunehmendem Alter, insbesondere im 7. Lebensjahrzehnt.

### LEISTUNGSMERKMALE

**HINWEIS: Bei der Ermittlung der Leistungsmerkmale des ANA HEP-2 wurden die Objektträger mit drei verschiedenen Methoden interpretiert, wie unten beschrieben:**

| Interpretationsmethode:  |
|--|
| <b>Methode A.</b> Methode A war eine vollständig manuelle Interpretationsmethode. Dies wurde mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop erreicht, das mit Objektiv- und Okularlinsen ausgestattet war. Die Bestimmung des qualitativen Ergebnisses und des Musters wurde mit ausgebildeten Labortechnikern durchgeführt.   |
| <b>Methode B.</b> Methode B wurde durchgeführt, indem die Objektträger mit diFine® gescannt und anschließend von einem ausgebildeten Labortechniker das resultierende digitale Bild (qualitativ und Muster, falls positiv) auf dem Computermonitor interpretiert wurde.  |
| <b>Methode C.</b> Methode C ist das vorgeschlagene Ergebnis, das von diFine® vorhergesagt wird; Methode C sagt das qualitative Ergebnis und, falls positiv, das Muster voraus, wenn es eines der acht Muster ist, für die das System programmiert wurde. Wenn Methode C "UNC" (unsicher) ist, liegt der mit diFine gemessene Fluoreszenzgrad grenzwertig zwischen positiv und negativ. Methode C muss vom Laboranten "validiert" oder akzeptiert oder modifiziert oder vollständig ungültig gemacht werden. Für die Zwecke dieser Studie und der unten dargestellten Daten wird <b>Methode C</b> "WIE besehen" ohne Änderungen durch den /die Labortechniker/in protokolliert. Es wird daher nur zu Informationszwecken präsentiert. |

**I. Analytische Leistungsstudien:**

**a. Geradlinigkeit:**

Für jedes der folgenden acht ANA-Muster wurden stark positive Proben identifiziert: Homogen, gesprenkelt, Zentromer, nukleolar, Kernpunkte, Kernmembran, zytoplasmatisch (ribosomal) und zytoplasmatisch (mitochondrial). Jede der Proben wurde bei 1:40 analysiert und auf 1:20480 titriert und mit allen drei oben genannten Methoden interpretiert. Diese Studie wurde intern bei ZEUS Scientific durchgeführt. Die Endpunkte für jede Probe und jede Methode sind nachstehend aufgeführt:

| Probe                           | Methode A | Methode B | Methode C |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Homogen                         | 1:1280    | 1:1280    | 1:1280    |
| Gesprenkelt                     | 1:5120    | 1:5120    | 1:2560    |
| Zentromer                       | 1:5120    | 1:5120    | 1:5120    |
| Nukleolar                       | 1:2560    | 1:5120    | 1:2560    |
| Nukleare Punkte                 | 1:640     | 1:640     | 1:640     |
| Kernmembran                     | 1:2560    | 1:2560    | 1:2560    |
| Zytoplasmatisch (ribosomal)     | 1:320     | 1:320     | 1:320     |
| Zytoplasmatisch (mitochondrial) | 1:10240   | 1:10240   | 1:10240   |

Zusammenfassung: In 100% der Fälle war das aufgerufene Muster erwartungsgemäß und übereinstimmend, unabhängig von der Interpretationsmethode. Ebenso war die Endpunktbestimmung erwartungsgemäß ± eine Verdünnung für 100% der Bestimmungen, unabhängig von der Interpretationsmethode.

**b. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge:**

Eine mäßig positive Probe und eine stark positive Probe wurden für jedes der folgenden acht ANA-Muster identifiziert: Homogen, gesprenkelt, Zentromer, nukleolar, Kernpunkte, Kernmembran, zytoplasmatisch (ribosomal) und zytoplasmatisch (mitochondrial). Zusätzlich wurden neun negative Proben eingeschlossen, was die Gesamtgruppe auf 25 Proben erhöhte. Diese Gruppe von 25 Proben wurde mit drei verschiedenen Chargen ANA HEP2 untersucht und mit allen drei oben genannten Methoden interpretiert. Zusätzlich wurden alle sechzehn positiven Mitglieder bis zum Endpunkt titriert und mit allen drei Methoden interpretiert.

**Ergebnisse:**

- I. Qualitative Übereinstimmung: Es gab eine 100% ige Übereinstimmung in den qualitativen Ergebnissen bei der Screening-Verdünnung aller 25 Proben in allen drei Kit-Chargen, und es gab eine 100% ige Übereinstimmung in allen drei Interpretationsmethoden, unabhängig von der Reagenzien-Kit-Charge.
- II. Übereinstimmung der Endpunkttiter: Alle 16 positiven Proben ergaben dieselben Endpunkttiter ± eine Verdünnung, unabhängig von der Charge des Reagenzienkits oder der Interpretation der Methode.
- III. Musterübereinstimmung: Für Verdünnungen, die über alle drei Interpretationsmethoden hinweg ein positives Ergebnis ergaben, bestand für Los eins und Los zwei für alle drei Interpretationsmethoden eine Musterübereinstimmung von 100%. Für Los drei bestand eine 100% ige Musterübereinstimmung zwischen Methode A und Methode B, wobei eine homogene mittelpositive Probe der einzige Ausreißer beim Vergleich von Methode C mit den Methoden A und B war.

**c. Referenzbereichsstudie:**

Einhundertachtzig zufällige Serumproben wurden von gesunden Spendern im Nordosten der USA entnommen. Die Proben wurden mit einer Screening-Verdünnung von 1:40 untersucht und mit allen drei Methoden interpretiert. Alle Proben, die um 1:40 Uhr ein positives Ergebnis lieferten, wurden titriert und mit allen drei Methoden interpretiert. Die Ergebnisse des Screening-Tests sind nachstehend zusammengefasst:

| Interpretationsmethode | Anzahl der positiven | % Positiv | Anzahl der Negative | % Negativ | Anzahl unsicherer | % Uncertain |
|------------------------|----------------------|-----------|---------------------|-----------|-------------------|-------------|
| 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. Twenty-day Repeatability Study:**

Eine niedrig positive Probe (Endpunkt ~ 1:40), eine mittelpositive Probe (Endpunkt ~ 1:160 bis 1:320) und eine stark positive Probe (Endpunkt > 1: 640) wurden für jedes der folgenden acht ANA-Muster identifiziert: Homogen, gesprenkelt, Zentromer, nukleolar, Kernpunkte, Kernmembran, zytoplasmatisch (ribosomal) und zytoplasmatisch (mitochondrial). Eine ANA-negative Probe wurde ebenfalls eingeschlossen, wodurch die Probengruppe auf insgesamt 25 erhöht wurde. Diese 25 Proben wurden bei ZEUS Scientific in dreifacher Ausfertigung an zehn verschiedenen Tagen untersucht (Screening-Verdünnung 1:40) und ergaben 30 Ergebnisse pro Probe. Die Folien wurden mit allen drei Methoden interpretiert.

Für die methodeninterne Bewertung sind die Ergebnisse der qualitativen Übereinstimmung und der Musterübereinstimmung nachstehend dargestellt: Es gab eine qualitative Übereinstimmung von 100% in allen Proben,

wenn sie mit den Methoden A und B gelesen wurden. Für Methode C zeigten 22 von 25 Proben eine qualitative Übereinstimmung von 100%; homogene niedrig positive, nukleolare niedrig positive und niedrig positive Proben mit Kernmembran wiesen keine vollständige qualitative Übereinstimmung auf. Zusätzlich gab es eine 100% ige Musterübereinstimmung innerhalb der Methoden A und B. Für Methode C gab es eine 100%ige Musterübereinstimmung für 21 von 25 Proben mit Ausreißern, die in homogenen niedrig positiven, nukleolaren niedrig positiven und niedrig positiven Kernmembranproben und hoch positiven Kernmembranproben beobachtet wurden.

**Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse innerhalb der Methode**

| <b>Probe</b>                          | <b>Methode A Übereinstimmung (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode B (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode C (95% KI)</b> |
|---------------------------------------|---|--|--|
| Homogen<br>Niedrig Positiv            | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 76.7%<br>(59.1 - 88.2%)                        |
| Homogen<br>Mitte Positiv              | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Homogen<br>Hoch Positiv               | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Gesprenkelt<br>Niedrig Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Gesprenkelt<br>Mitte Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Gesprenkelt<br>Hoch Positiv           | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Zentromer<br>Niedrig Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Zentromer<br>Mitte Positiv            | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Zentromer<br>Hoch Positiv             | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nukleolar<br>Niedrig Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 96.7%<br>(83.3 - 99.4%)                        |
| Nukleolar<br>Mitte Positiv            | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nukleolar<br>Hoch Positiv             | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Mitochondrien<br>Niedrig Positiv      | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Mitochondriale<br>Mitte Positiv       | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Mitochondriale<br>Hoch Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Kernmembran<br>Niedrig Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Kernmembran<br>Mitte Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Kernmembran<br>Hoch Positiv           | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nukleare<br>Punkte<br>Niedrig Positiv | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nukleare<br>Punkte<br>Mitte Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nukleare<br>Punkte<br>Mitte Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |

| <b>Probe</b>                 | <b>Methode A Übereinstimmung (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode B (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode C (95% KI)</b> |
|------------------------------|---|--|--|
| Ribosomal<br>Niedrig Positiv | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Ribosomal<br>Mitte Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Ribosomal<br>Hoch Positiv    | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Negativ                      | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |

**Within-Method Pattern Result Agreement (Technician 2)**

| <b>Probe</b>                            | <b>Methode A Übereinstimmung (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode B (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode C (95% KI)</b> |
|---|---|--|--|
| Compliance<br>with method C<br>(95% CI) | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 73.3%<br>(55.6 – 85.8%)                        |
| Homogen<br>Mitte Positiv                | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Homogen<br>Hoch Positiv                 | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Homogeneous<br>Highly Positive          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Gesprenkelt<br>Mitte Positiv            | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Speckled<br>Mid-Positive                | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Gesprenkelt<br>Mittel positiv           | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Speckled<br>Medium<br>positive          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Gesprenkelt<br>Mittel positiv           | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Speckled<br>Medium<br>positive          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 96.7%<br>(83.3 – 99.4%)                        |
| Gesprenkelt<br>Mittel positiv           | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nukleolar<br>Hoch Positiv               | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nucleolar<br>Highly Positive            | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Mitochondriale<br>Mitte Positiv         | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Mitochondriale<br>Hoch Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Kernmembran<br>Niedrig Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 86.67%<br>(70.3 – 94.7%)                       |
| Mitochondriale<br>Sehr positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Kernmembran<br>Hoch Positiv             | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 96.7%<br>(83.3 – 99.4%)                        |
| Mitochondriale<br>Sehr positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |

| <b>Probe</b>                  | <b>Methode A Übereinstimmung (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode B (95% KI)</b> | <b>Übereinstimmung nach Methode C (95% KI)</b> |
|-------------------------------|---|--|--|
| Nukleare Punkte Mitte Positiv | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Nukleare Punkte Hoch Positiv  | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Ribosomal Niedrig Positiv     | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Ribosomal Mitte Positiv       | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |
| Ribosomal Hoch Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                     | 100%<br>(88.7 – 100%)                          | 100%<br>(88.7 – 100%)                          |

Für die Übereinstimmung zwischen den Methoden bestand eine qualitative und Musterübereinstimmung von 100% zwischen Methode A und Methode B. Jedoch zeigten nur 22 von 25 Proben 100% Qualität in den Vergleichen zwischen Methode B und Methode C und Methode A und Methode C; Die diskrepanten Proben waren die homogenen niedrig positiven, nukleolaren niedrig positiven und niedrig positiven Proben der Kernmembran. Zusätzlich zeigten nur 21 von 25 Proben eine 100% ige Musterübereinstimmung in den Vergleichen zwischen Methode B und Methode C und Methode A und Methode C; die abweichenden Proben waren die homogenen niedrig positiven, nukleolaren niedrig positiven und niedrig positiven Kernmembranproben und hochpositiven Kernmembranproben.

**Qualitative Ergebnisvereinbarung zwischen den Methoden**

| <b>Probe</b>                  | <b>Methode A gegen Vereinbarung nach Methode B (95% KI)</b> | <b>Methode A gegen Methode C Vereinbarung (95% KI)</b> | <b>Methode B gegen Methode C Vereinbarung (95% KI)</b> |
|-------------------------------|---|--|--|
| Homogen Niedrig Positiv       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 76.67%<br>(59.1 - 88.2%)                               | 76.67%<br>(59.1 - 88.2%)                               |
| Homogen Mitte Positiv         | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Homogen Hoch Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Homogen Sehr positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Gesprenkelt Mitte Positiv     | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Gesprenkelt Hoch Positiv      | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Zentromer Niedrig Positiv     | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Zentromer Mitte Positiv       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Zentromer Hoch Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Nukleolar Niedrig Positiv     | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 96.67%<br>(83.3 - 99.4%)                               | 96.67%<br>(83.3-99.4%)                                 |
| Nukleolar Mitte Positiv       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Nukleolar Hoch Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Mitochondrien Niedrig Positiv | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Mitochondriale Mitte Positiv  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |
| Mitochondriale Hoch Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)                                       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  | 100%<br>(88.7 – 100%)                                  |

| <b>Probe</b>                          | <b>Methode A gegen<br/>Vereinbarung nach Methode B<br/>(95% KI)</b> | <b>Methode A gegen<br/>Methode C Vereinbarung<br/>(95% KI)</b> | <b>Methode B gegen<br/>Methode C Vereinbarung<br/>(95% KI)</b> |
|---------------------------------------|---|--|--|
| Kernmembran<br>Niedrig Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 90%<br>(74.4 - 96.5%)  |
| Kernmembran<br>Mitte Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Kernmembran<br>Hoch Positiv           | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Nukleare<br>Punkte<br>Niedrig Positiv | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Nukleare<br>Punkte<br>Mitte Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Nukleare<br>Punkte<br>Hoch Positiv    | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Ribosomal<br>Niedrig Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Ribosomal<br>Mitte Positiv            | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Ribosomal<br>Hoch Positiv             | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Negativ                               | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |

**Between Method Pattern Result Agreement**

| <b>Probe</b>                   | <b>Methode A gegen<br/>Vereinbarung nach Methode<br/>B<br/>(95% KI)</b> | <b>Methode A gegen<br/>Methode C Vereinbarung<br/>(95% KI)</b> | <b>Methode B gegen<br/>Methode C Vereinbarung<br/>(95% KI)</b> |
|--------------------------------|---|--|--|
| Homogen<br>Niedrig Positiv     | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 73.3%<br>(55.6 - 85.9%)  | 73.3%<br>(55.6 - 85.9%)  |
| Homogeneous<br>Low Positive    | 100%<br>(88.65 – 100%)  | 100%<br>(88.65 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Homogen<br>Hoch Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Gesprenkelt<br>Niedrig Positiv | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Gesprenkelt<br>Mitte Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Gesprenkelt<br>Hoch Positiv    | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Zentromer<br>Niedrig Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Zentromer<br>Mitte Positiv     | 100%<br>(88.65 – 100%)  | 100%<br>(88.65 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Centromere<br>Mid-Positive     | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Zentromer<br>Mittel positiv    | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 96.7%<br>(83.3 - 99.4%)  | 96.7%<br>(83.3 - 99.4%)  |
| Nukleolar<br>Mitte Positiv     | 100%<br>(88.65 – 100%)  | 100%<br>(88.65 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  |
| Nukleolar<br>Hoch Positiv      | 100%<br>(88.7 – 100%)   | 100%<br>(88.7 – 100%)  | 100%<br>(88.7 – 100%)  |

| Probe                                 | Methode A gegen Vereinbarung nach Methode B (95% KI) | Methode A gegen Methode C Vereinbarung (95% KI) | Methode B gegen Methode C Vereinbarung (95% KI) |
|---------------------------------------|--|---|---|
| Mitochondrien<br>Niedrig Positiv      | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Mitochondriale<br>Mitte Positiv       | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Mitochondriale<br>Hoch Positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Mitochondrial<br>Highly Positive      | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 86.7%<br>(70.3 – 94.7)                          | 86.7%<br>(70.3 – 94.7%)                         |
| Mitochondriale<br>Sehr positiv        | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Kernmembran<br>Hoch Positiv           | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 96.7%<br>(83.3 – 99.4%)                         |
| Nukleare<br>Punkte<br>Niedrig Positiv | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Nukleare<br>Punkte<br>Mitte Positiv   | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Nukleare<br>Punkte<br>Hoch Positiv    | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Ribosomal<br>Niedrig Positiv          | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Ribosomal<br>Mitte Positiv            | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |
| Ribosomal<br>Hoch Positiv             | 100%<br>(88.7 – 100%)                                | 100%<br>(88.7 – 100%)                           | 100%<br>(88.7 – 100%)                           |

**e. Fünftägige Reproduzierbarkeitsstudie an mehreren Standorten:**

Eine niedrig positive Probe (Endpunkt ~ 1:40), eine mittelpositive Probe (Endpunkt ~ 1:160 – 1:320) und eine stark positive Probe (Endpunkt > 1: 640) wurden für jedes der folgenden acht ANA-Muster identifiziert: Homogen, gesprenkelt, Zentromer, nukleolar, Kernpunkte, Kernmembran, zytoplasmatisch (ribosomal) und zytoplasmatisch (mitochondrial). Eine ANA-negative Probe wurde ebenfalls eingeschlossen, wodurch die Probengruppe auf insgesamt 25 erhöht wurde. Diese 25 Proben wurden (1:40 Screening-Verdünnung) in dreifacher Ausfertigung, zweimal täglich an fünf verschiedenen Tagen und in drei verschiedenen Labors untersucht, wobei 30 Ergebnisse pro Probe und Standort erzielt wurden. Die Folien wurden mit allen drei Methoden interpretiert. An jedem Standort wurden Methode A und Methode B auch von zwei separaten Labortechnikern interpretiert. Die Ergebnisse der qualitativen Übereinstimmung und der Musterübereinstimmung sind unten dargestellt:

**i. Übereinstimmung des qualitativen Gesamtergebnisses**

- a. Innerhalb der Methode:** Innerhalb der Methode betrug die qualitative Übereinstimmung für Methode A und Methode B 100% für alle drei Standorte und alle Techniker. Für Methode C gab es eine 100%ige Übereinstimmung für 24 von 25 Proben an allen Standorten und allen Technikern: Eine Probe mit niedrigem Kernmembranpositiv war die einzige diskrepante Probe an Standort 2.
- b. Zwischen den Methoden:** Es gab eine qualitative Übereinstimmung von 100% für alle 25 Proben zwischen Methode A und Methode B und Methode A und Methode C. Insbesondere gab es eine qualitative Übereinstimmung von 100% zwischen Methode B und Methode C für 24 von 25 Proben, wobei die niedrig positive Probe der Kernmembran ein Ausreißer an Standort 2 war.

## ii. Mustenergebnisvereinbarung

- a. Innerhalb der Methode:** Innerhalb der Methode Die Musterübereinstimmung für Methode A und Methode B betrug für alle drei Standorte und alle Techniker 100%. Für Methode C gab es eine 100%ige Übereinstimmung für 24 von 25 Proben, wobei die Zentromer-Mittelprobe der einzige Ausreißer war.
- b. Zwischen Methode:** Es gab eine 100% ige Musterübereinstimmung für alle 25 Proben zwischen Methode A und B für alle Standorte und alle Techniker. Für Methode A und Methode C gab es zwei diskrepante Proben: eine Zentromer-Mid-Probe an Standort 1 und eine Kernmembran-Low-Probe an Standort 2. Ähnlich, für Methode B vs Methode C, Es gab zwei diskrepante Proben: eine Zentromer-Mittelprobe an Standort 1 und eine Kernmembran-Niedrigprobe an Standort 2

## f. Interferenzstudie:

Eine mittelpositive Probe (Endpunkt ~ 1:160 bis 1:320) und eine stark positive Probe (Endpunkt > 1: 640) wurden für jedes der folgenden acht ANA-Muster identifiziert: Homogen, gesprenkelt, Zentromer, nukleolar, Kernpunkte, Kernmembran, zytoplasmatisch (ribosomal) und zytoplasmatisch (mitochondrial). Eine ANA-negative Probe wurde ebenfalls eingeschlossen, wodurch die Probengruppe auf insgesamt 17 erhöht wurde. Diese 17 Proben wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen (niedriger Spike und hoher Spike) von zwölf verschiedenen möglichen Störstoffen versetzt, wie in der folgenden Tabelle dargestellt. Alle Proben wurden auf dem ANA HEp-2 ausgewertet und mit allen drei oben genannten Methoden interpretiert.

| Interferenz       | Interferenztestkonzentrationen |            |
|-------------------|--------------------------------|------------|
|                   | Niedrig                        | Hoch       |
| Intralipide       | 3 mg/mL                        | 7.50 mg/mL |
| Cholesterin       | 1.5 mg/mL                      | 2.5 mg/mL  |
| Albumin           | 35 mg/1mL                      | 50 mg/1mL  |
| 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  |
| Vardenafil        | 4 ug/mL                        | 20 ug/mL   |
| Cyclophosphamid   | 1 mg/mL                        | 4 mg/mL    |
| Rheumafaktor      | 200 U/mL                       | 400 U/mL   |
| Hämoglobin        | 100 mg/mL                      | 200 mg/mL  |
| Triglyceride      | 1.5 mg/mL                      | 5 mg/mL    |
| Bilirubin         | 0.01 mg/mL                     | 0.15 mg/mL |

**Ergebnisse:** Bei den Methoden A und B wurden weder die qualitative Übereinstimmung noch das resultierende Muster durch die Addition der möglichen Störstoffe beeinflusst. Methode C ergab ein unsicheres Ergebnis in einer niedrig positiven Kernmembranprobe, wenn sie mit Albumin versetzt wurde. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die Ergebnisse des ANA HEp-2 kein signifikantes Risiko für fehlerhafte Ergebnisse aufgrund des Vorhandenseins der getesteten Interferenzen aufweisen.

Es wurde eine zweite Interferenzstudie durchgeführt, die sich auf den Assay-Cutoff konzentrierte und einige zusätzliche potenzielle Interferenzen einschloss. Für jedes der acht ANA-Muster (homogen, gesprenkelt, Zentromer, nukleolar, Kernpunkte, Kernmembran, zytoplasmatisch (ribosomal) und zytoplasmatisch (mitochondrial)) wurden Proben ausgewählt, die einen Endpunkttiter von 1:40-1:80 (nahe dem Assay-Cut-off) sowie eine ANA-negative Probe aufwiesen. Diese neun Proben wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen der Störstoffe versetzt, wie unten aufgeführt.

| Interferenz              | Interferenztestkonzentrationen |                |
|--------------------------|--------------------------------|----------------|
|                          | Niedrig                        | Hoch           |
| Bilirubin (unkonjugiert) | 0.02 mg/mL                     | 0.15 mg/mL     |
| Cholesterin (gesamt)     | 1.5 mg/mL                      | 2.2 mg/mL      |
| Cholesterin (total)      | 1 mg/mL                        | 2.5 mg/mL      |
| Albumin                  | 35 mg/mL                       | 52 mg/mL       |
| Hemoglobin               | 100 mg/mL                      | 200 mg/mL      |
| Intralipids              | 2.0 mg/mL                      | 20 mg/mL       |
| Rheumafaktor             | 200 U/mL                       | 400 mg/mL      |
| Cyclophosphamid          | 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    |
| Vardenafil               | 0.0000277 mg/mL                | 0.000083 mg/mL |
| Vardenafil               | 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  |
| Mycophenolatmofetil | 0.012 mg/mL   | 0.048 mg/mL   |
| Rituximab           | 0.5 mg/mL     | 2 mg/mL       |
| Belimumab           | 2 mg/mL       | 8 mg/mL       |

Ergebnisse: Auch hier wurden weder die qualitative Übereinstimmung noch das resultierende Muster durch die Addition der möglichen Störfaktoren beeinflusst, unabhängig von der Interpretationsmethode. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die Ergebnisse des ANA HEp-2 kein signifikantes Risiko für fehlerhafte Ergebnisse aufgrund des Vorhandenseins der getesteten Interferenzen aufweisen.

## 2. Design der klinischen Leistungsstudie:

Insgesamt wurden 380\* klinisch charakterisierte Proben erworben, wie in der nachstehenden Tabelle dargestellt. Diese 380 Proben wurden aliquotiert und zur Auswertung durch ANA HEp-2 an drei verschiedene Laboratorien geschickt. Alle drei Labore bewerteten die Objektträger mit allen drei oben genannten Methoden. Zusätzlich wurden die Objektträgerinterpretationsmethode A und Methode B an jedem klinischen Standort zweimal wiederholt von zwei verschiedenen Labortechnikern. An jedem klinischen Standort wurden die 380 Proben zuerst in einer Verdünnung von 1:40 gescreent, um den qualitativen Status der 380 Proben zu beurteilen. Jede Probe, die bei der Screening-Verdünnung von 1:40 (für eine der drei Interpretationsmethoden) ein positives Ergebnis erbrachte, wurde dann titriert und erneut mit allen drei Methoden interpretiert, um den Endpunkt sowie das Muster zu bestimmen. \* **HINWEIS: Standort zwei testete eine geringere Anzahl von Zöliakie- und Vaskulitis-Proben, was zu insgesamt 350 Proben an Standort zwei führte.**

Die Ergebnisse wurden verwendet, um die klinische Spezifität (potenzielle Kreuzreaktivität), die klinische Sensitivität, die qualitative Übereinstimmung zwischen Methoden innerhalb von Standorten, die Interpretation von Methode C zwischen Standorten (d. h. automatisierter Mikroskopvergleich von dIFine® zu dIFine®), die Endpunkttiterübereinstimmung und die Musterübereinstimmung zu bewerten.

| ANA-assoziierte Erkrankungen                         | n,<br>Alle Standorte |
|--|----------------------|
| <i>Bindegewebserkrankungen:</i>                      |                      |
| Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)               | 40                   |
| Sjögren-Syndrom (SS)                                 | 30                   |
| Sklerodermie   | 20                   |
| Autoimmune Myositis (AM)                             | 20                   |
| Gemischte Bindegewebserkrankung (MCTD)               | 20                   |
| CREST  | 20                   |
| <i>Andere ANA-assoziierte Autoimmunerkrankungen:</i> |                      |
| Autoimmunhepatitis (AIH)                             | 20                   |
| Medikamenteninduzierter Lupus (DIL)                  | 20                   |
|  |                      |
|  |                      |
| <b>Insgesamt</b>                                     | <b>190</b>           |

| Nicht-ANA-assoziierte Erkrankungen | n,<br>Standort 1 und Standort 3 | n,<br>Standort 2 |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| <i>Drug-induced Lupus (DIL)</i>    |                                 |                  |
| Zöliakie                           | 22                              | 10               |
| ANCA-assoziierte Vaskulitis        | 28                              | 10               |
| Morbus Crohn                       | 10                              | 10               |
| Rheumatoide Arthritis              | 30                              | 30               |
| Autoimmunthyreoiditis              | 30                              | 30               |
| Entzündliche Darmerkrankung (IBD)  | 10                              | 10               |
| Colitis Ulcerosa                   | 10                              | 10               |
| <i>Andere Krankheiten:</i>         |                                 |                  |
| Malignität / Krebs                 | 20                              | 20               |
| Fibromyalgie                       | 10                              | 10               |
| Infektionskrankheit                | 10                              | 10               |
| <b>Insgesamt</b>                   | <b>190</b>                      | <b>160</b>       |

## 3. Klinische Sensitivität und klinische Spezifität:

Die klinische Sensitivität wurde an jeder Stelle des SLE separat und anhand der Kombination der Bindegewebserkrankungen (CTD: SLE + SS + Sklerodermie + CREST + MCTD + AM) plus anderer ANA-assoziiierter Erkrankungen (autoimmune Leberhepatitis + medikamenteninduzierter Lupus) berechnet. Die Spezifität wurde unter Verwendung der Gesamtkontrollpopulation mit nicht-ANA-assoziierten Krankheiten berechnet.

### a. Klinische Leistung an Standort 1

| Diagnostische Sensitivität und Spezifität |           |             | % Empfindlichkeit (95% KI) | % Sensitivity (95% CI)                       | % Empfindlichkeit (95% KI)                   |
|---|-----------|-------------|----------------------------|--|--|
|   |           |             | SLE (n = 40)               | CTD + ANA-assoziierte Erkrankungen (n = 190) | Nicht-ANA-assoziierte Erkrankungen (n = 190) |
| Site 1                                    | Methode A | Techniker A | 52.5%<br>(37.5 - 67.1%)    | 53.2%<br>(46.1 - 60.1%)                      | 75.8%<br>(69.2 - 81.3%)                      |
|   | Methode A | Techniker B | 57.5%<br>(42.2 - 71.5%)    | 60.0%<br>(52.9 - 66.7%)                      | 73.2%<br>(66.4 - 79.0%)                      |
|   | Methode B | Techniker A | 55.0%<br>(39.8 - 69.3%)    | 54.7%<br>(47.6 - 61.6%)                      | 75.8%<br>(69.2 - 81.3%)                      |
|   | Methode B | Techniker B | 52.5%<br>(37.5 - 67.1%)    | 57.9%<br>(50.8 - 64.7%)                      | 74.2%<br>(67.6 - 79.9%)                      |
|   | Methode C | dIFine      | 55.0%<br>(39.8 - 69.3%)    | 57.4%<br>(50.3 - 64.2%)                      | 67.4%<br>(60.4 - 73.6%)                      |

**b. Klinische Leistung an Standort 2**

| Diagnostische Sensitivität und Spezifität |           |             | % Empfindlichkeit (95% KI) | % Empfindlichkeit (95% KI)                   | % Besonderheit (95% KI)                 |
|---|-----------|-------------|----------------------------|--|---|
|   |           |             | SLE (n = 40)               | CTD + ANA-assoziierte Erkrankungen (n = 190) | CTD + ANA-associated diseases (n = 190) |
| Site 2                                    | Methode A | Techniker A | 50.0%<br>(35.2 - 64.8%)    | 51.6%<br>(44.5 - 58.6%)                      | 83.1%<br>(76.6 - 88.1%)                 |
|   | Methode A | Techniker B | 55.0%<br>(39.8 - 69.3%)    | 56.3%<br>(49.2 - 63.2%)                      | 80.0%<br>(73.1 - 85.5%)                 |
|   | Methode B | Techniker A | 52.5%<br>(37.5 - 67.1%)    | 56.8%<br>(49.7 - 63.7%)                      | 81.3%<br>(74.5 - 86.5%)                 |
|   | Methode B | Techniker B | 55.0%<br>(39.8 - 69.3%)    | 58.4%<br>(51.3 - 65.2%)                      | 80.6%<br>(73.8 - 86.0%)                 |
|   | Methode C | dIFine      | 52.5%<br>(37.5 - 67.1%)    | 55.8%<br>(48.7 - 62.7%)                      | 74.4%<br>(67.1 - 80.5%)                 |

**c. Klinische Leistung an Standort 3**

| Diagnostische Sensitivität und Spezifität |           |             | % Empfindlichkeit (95% KI) | % Empfindlichkeit (95% KI)                   | % Empfindlichkeit (95% KI)                   |
|---|-----------|-------------|----------------------------|--|--|
|   |           |             | SLE (n = 40)               | CTD + ANA-assoziierte Erkrankungen (n = 190) | Nicht-ANA-assoziierte Erkrankungen (n = 190) |
| Site 3                                    | Methode A | Techniker A | 47.5%<br>(32.9 - 62.5%)    | 53.2%<br>(46.1 - 60.1%)                      | 76.8%<br>(70.4 - 82.3%)                      |
|   | Methode A | Techniker B | 55.0%<br>(39.8 - 69.3%)    | 57.4%<br>(50.3 - 64.2%)                      | 74.2%<br>(67.6 - 79.9%)                      |
|   | Methode B | Techniker A | 45.0%<br>(30.7 - 60.2%)    | 52.6%<br>(45.6 - 59.6%)                      | 78.9%<br>(72.6 - 84.1%)                      |
|   | Methode B | Techniker B | 57.5%<br>(42.2 - 71.5%)    | 56.3%<br>(49.2 - 63.2%)                      | 74.7%<br>(68.1 - 80.4%)                      |
|   | Methode C | dIFine      | 55.0%<br>(39.8 - 69.3%)    | 54.2%<br>(47.1 - 61.1%)                      | 67.5%<br>(63.1 - 76.1%)                      |

Die Sensitivität in der SLE-Kohorte reichte von einem Tief von 45,0% bis zu einem Hoch von 57,5% über alle drei Methoden an allen drei Standorten hinweg. Die in dieser SLE-Kohorte beobachtete ANA-Prävalenz schien niedriger zu sein als die typischerweise beobachtete. Laut den Rheumatologen, die bei der Entnahme dieser Proben geholfen haben, könnte dies daran liegen, dass die Mehrheit dieser Patienten eine starke immunsuppressive Behandlung erhielt und entweder eine geringe Krankheitsaktivität aufwies oder sich in Remission befand. Diese beobachtete niedrige Prävalenz von ANA wurde durch ein anderes von der FDA zugelassenes kommerzielles ANA Hep-2 IFA-Produkt weiter bestätigt. Die klinische Sensitivität in der Kohorte der CTD + ANA-assoziierten Erkrankungen reichte von einem Tief von 51,6% bis zu einem Hoch

von 60,0% bei allen drei Methoden an allen drei Standorten. Die klinische Spezifität in der Kohorte der nicht-ANA-assoziierten Erkrankungen reichte von einem Tief von 67,4% bis zu einem Hoch von 83,1% über alle drei Methoden an allen drei Standorten. Wenn man alle Interpretationsmethoden über alle drei Standorte mittelt, betrug die klinische Sensitivität in der SLE-Gruppe durchschnittlich 53,2%, die klinische Sensitivität in der Gruppe mit CTD + ANA-assoziierten Erkrankungen durchschnittlich 55,7% und die klinische Spezifität in der Gruppe mit nicht ANA-assoziierten Erkrankungen durchschnittlich 75,9%.

#### 4. Häufigkeit der nach Krankheitsgruppe festgestellten ANA:

Neben einer positiven oder negativen Bestimmung kann Methode C zu einem "Unsicheren" Aufruf führen, wenn diFine® das Ergebnis nicht als eindeutig positiv oder eindeutig negativ identifizieren konnte. Unsichere Ergebnisse wurden für diese Zusammenfassung unten als negativ angesehen (d. H. Sie waren nicht positiv). Die folgende Tabelle zeigt den Prozentsatz jeder Krankheitskategorie, der von jedem Techniker an jedem Standort nach jeder Methode als qualitativ positiv bezeichnet wurde. Diese Tabelle fasst die Häufigkeit von ANA zusammen, die in jeder Krankheitskategorie gefunden wurde, und die Konsistenz dieser ANA-Bestimmung über die Methoden hinweg.

##### Standort 1:

| Krankheit                          | Techniker A |           | Techniker B |           | Methode C |
|------------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
|                                    | Methode A   | Methode B | Methode A   | Methode B |           |
| ANA-assoziierte Erkrankungen       |             |           |             |           |           |
| SLE                                | 52.5%       | 55.0%     | 57.5%       | 52.5%     | 55.0%     |
| Sjögren                            | 50.0%       | 50.0%     | 56.7%       | 53.3%     | 53.3%     |
| Sklerodermie                       | 75.0%       | 70.0%     | 80.0%       | 80.0%     | 80.0%     |
| Autoimmune Myositis                | 50.0%       | 55.0%     | 65.0%       | 60.0%     | 60.0%     |
| MCTD                               | 40.0%       | 40.0%     | 50.0%       | 55.0%     | 50.0%     |
| CREST                              | 80.0%       | 80.0%     | 80.0%       | 80.0%     | 80.0%     |
| Autoimmunhepatitis                 | 45.0%       | 50.0%     | 60.0%       | 55.0%     | 50.0%     |
| Medikamenteninduzierter Lupus      | 35.0%       | 40.0%     | 35.0%       | 35.0%     | 35.0%     |
| Nicht- UND assoziierte Krankheiten |             |           |             |           |           |
| Autoimmunthyreoiditis              | 23.3%       | 16.7%     | 16.7%       | 16.7%     | 16.7%     |
| Krebs                              | 15.0%       | 15.0%     | 20.0%       | 20.0%     | 15.0%     |
| Zöliakie                           | 45.5%       | 45.5%     | 45.5%       | 45.5%     | 45.5%     |
| Coeliac                            | 30.0%       | 30.0%     | 30.0%       | 30.0%     | 30.0%     |
| Fibromyalgia                       | 30.0%       | 40.0%     | 50.0%       | 40.0%     | 40.0%     |
| Infektionskrankheit                | 5.0%        | 5.0%      | 5.0%        | 5.0%      | 5.0%      |
| Entzündliche Darmerkrankung        | 40.0%       | 30.0%     | 40.0%       | 20.0%     | 20.0%     |
| Rheumatoide Arthritis              | 16.7%       | 23.3%     | 23.3%       | 23.3%     | 16.7%     |
| Colitis Ulcerosa                   | 30.0%       | 30.0%     | 50.0%       | 60.0%     | 40.0%     |
| Vaskulitis                         | 17.9%       | 14.3%     | 14.3%       | 14.3%     | 14.3%     |

##### Standort 2:

| Krankheit                          | Techniker A |           | Techniker B |           | Methode C |
|------------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
|                                    | Methode A   | Methode B | Methode A   | Methode B |           |
| ANA-assoziierte Erkrankungen       |             |           |             |           |           |
| SLE                                | 50.0%       | 52.5%     | 55.0%       | 55.0%     | 52.5%     |
| Sjögren                            | 53.3%       | 53.3%     | 56.7%       | 56.7%     | 53.3%     |
| Sklerodermie                       | 75.0%       | 80.0%     | 75.0%       | 80.0%     | 80.0%     |
| Autoimmune Myositis                | 55.0%       | 65.0%     | 65.0%       | 70.0%     | 60.0%     |
| MCTD                               | 30.0%       | 45.0%     | 35.0%       | 45.0%     | 45.0%     |
| CREST                              | 75.0%       | 80.0%     | 80.0%       | 80.0%     | 75.0%     |
| Autoimmunhepatitis                 | 40.0%       | 45.0%     | 45.0%       | 45.0%     | 45.0%     |
| Medikamenteninduzierter Lupus      | 35.0%       | 40.0%     | 40.0%       | 40.0%     | 40.0%     |
| Nicht- UND assoziierte Krankheiten |             |           |             |           |           |
| Autoimmunthyreoiditis              | 13.3%       | 16.7%     | 16.7%       | 16.7%     | 16.7%     |
| Krebs                              | 10.0%       | 15.0%     | 15.0%       | 15.0%     | 15.0%     |

|                       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Zöliakie              | 20.0% | 30.0% | 20.0% | 30.0% | 30.0% |
| Morbus Crohn          | 30.0% | 30.0% | 30.0% | 30.0% | 30.0% |
| Fibromyalgie          | 40.0% | 40.0% | 40.0% | 40.0% | 40.0% |
| Infektionskrankheit   | 5.0%  | 5.0%  | 5.0%  | 5.0%  | 5.0%  |
| Infektionskrankheit   | 20.0% | 20.0% | 20.0% | 20.0% | 20.0% |
| Rheumatoide Arthritis | 16.7% | 16.7% | 16.7% | 16.7% | 16.7% |
| Colitis Ulcerosa      | 40.0% | 40.0% | 60.0% | 40.0% | 40.0% |
| Vaskulitis            | 0.0%  | 0.0%  | 10.0% | 10.0% | 0.0%  |

### Standort 3:

| Diseases                           | Techniker A |           | Techniker B |           | Methode C |
|------------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
|                                    | Methode A   | Methode B | Methode A   | Methode B |           |
| ANA-assoziierte Erkrankungen       |             |           |             |           |           |
| SLE                                | 47.5%       | 45.0%     | 55.0%       | 57.5%     | 52.5%     |
| Sjögren                            | 46.7%       | 50.0%     | 60.0%       | 53.3%     | 50.0%     |
| Sklerodermie                       | 75.0%       | 75.0%     | 80.0%       | 75.0%     | 75.0%     |
| Autoimmune Myositis                | 60.0%       | 60.0%     | 60.0%       | 60.0%     | 60.0%     |
| MCTD                               | 45.0%       | 45.0%     | 45.0%       | 45.0%     | 45.0%     |
| CREST                              | 80.0%       | 80.0%     | 75.0%       | 75.0%     | 75.0%     |
| Autoimmunhepatitis                 | 45.0%       | 40.0%     | 50.0%       | 50.0%     | 45.0%     |
| Medikamenteninduzierter Lupus      | 35.0%       | 35.0%     | 35.0%       | 35.0%     | 35.0%     |
| Nicht- UND assoziierte Krankheiten |             |           |             |           |           |
| Autoimmunthyreoiditis              | 16.7%       | 13.3%     | 20.0%       | 16.7%     | 16.7%     |
| Krebs                              | 20.0%       | 20.0%     | 20.0%       | 25.0%     | 15.0%     |
| Zöliakie                           | 45.5%       | 45.5%     | 45.5%       | 45.5%     | 45.5%     |
| Morbus Crohn                       | 30.0%       | 20.0%     | 30.0%       | 30.0%     | 30.0%     |
| Fibromyalgie                       | 40.0%       | 40.0%     | 50.0%       | 50.0%     | 40.0%     |
| Infektionskrankheit                | 5.0%        | 5.0%      | 5.0%        | 5.0%      | 5.0%      |
| Infektionskrankheit                | 30.0%       | 30.0%     | 30.0%       | 30.0%     | 20.0%     |
| Rheumatoide Arthritis              | 23.3%       | 16.7%     | 26.7%       | 20.0%     | 16.7%     |
| Colitis Ulcerosa                   | 40.0%       | 40.0%     | 60.0%       | 60.0%     | 40.0%     |
| Vaskulitis                         | 10.7%       | 10.7%     | 10.7%       | 14.3%     | 14.3%     |

Die Häufigkeit von ANA, die in der Zöliakie-Kohorte festgestellt wurde, schien höher als erwartet zu sein. Es gibt Literatur, die eine erhöhte ANA bei Zöliakiepatienten unterstützt (39). Zusätzlich wurden diese Proben an einem anderen von der FDA zugelassenen, kommerziellen ANA HEP-2 getestet und die ANA wurde an diesem Produkt bestätigt.

### 5. Vergleiche der Interpretationsmethoden:

Es gab 350 klinische Proben, die an allen drei klinischen Standorten getestet wurden. Es gab 30 zusätzliche klinisch charakterisierte Zöliakie- und Vaskulitis-Proben, die an Stelle eins und Stelle drei getestet wurden. Schließlich gab es weitere 12 retrospektiv gesammelte Proben, die das Kernmembran- oder Kernpunktmuster aufwiesen, die an den Standorten eins und drei getestet wurden. Mit diesen 392 Proben gab es insgesamt 2268 Fälle, in denen man die Ergebnisse von Methode A mit Methode B, Methode A mit Methode C und Methode B mit Methode C vergleichen konnte. Eine Zusammenfassung dieser qualitativen Vergleiche finden Sie in den folgenden Tabellen:

#### a. Vergleiche der Interpretationsmethoden:

| Methode A gegen Methode B |             | Positive Mustervereinbarung (95% KI) | Negativmustervereinbarung (95% KI) | Gesamtmustervereinbarung (95% KI) |
|---------------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Standort 1                | Techniker A | 95.6% (152/159)<br>(91.2 - 97.9%)    | 95.7% (223/233)<br>(92.3 - 97.7%)  | 95.7% (375/392)<br>(93.2 - 97.3%) |
|                           | Techniker B | 94.9% (168/177)<br>(90.6 - 97.3%)    | 98.6% (212/215)<br>(95.9 - 99.5%)  | 96.9% (380/392)<br>(94.7 - 98.2%) |
| Standort 2                | Techniker A | 99.2% (124/125)<br>(95.6 - 99.9%)    | 93.8% (211/225)<br>(89.8 - 96.3%)  | 95.7% (335/350)<br>(93.1 - 97.4%) |
|                           | Techniker B | 98.6% (137/139)<br>(94.9 - 99.6%)    | 97.6% (206/211)<br>(94.6 - 98.95%) | 98.0% (343/350)<br>(95.9 - 99.0%) |

|               |             |                                   |                                    |                                   |
|---------------|-------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Standort<br>3 | Techniker A | 95.5% (148/155)<br>(90.9 - 97.8%) | 98.7% (234/237)<br>(96.4 - 99.65%) | 97.5% (382/392)<br>(95.4 - 98.6%) |
|               | Techniker B | 95.9% (162/169)<br>(91.7 - 97.9%) | 97.8% (218/223)<br>(94.9 - 99.0%)  | 96.9% (380/392)<br>(94.7 - 98.2%) |

**b. Kombinierte qualitative Vereinbarung für Methode A vs Methode B Alle Standorte/alle Techniker**

|           |         |                  |         |
|-----------|---------|------------------|---------|
|           |         | <b>Methode A</b> |         |
|           |         | Positiv          | Negativ |
| Methode B | Positiv | 891              | 40      |
|           | Negativ | 33               | 1304    |

Positive prozentuale Übereinstimmung = 96.43% (891 / 924)      95% -Konfidenzintervall = 95,03 - 97,45%  
 Negative prozentuale Übereinstimmung = 97.02% (1304 / 1344)      95% -Konfidenzintervall = 95,97 - 97,81%  
 Prozentuale Gesamtübereinstimmung = 96.78% (2195 / 2268)      95% -Konfidenzintervall = 95,97 - 97,43%

**c. Qualitativer Vergleich von Methode A und Methode C**

Da Methode C für viele Proben unsichere Ergebnisse lieferte, wurde die positive und negative prozentuale Übereinstimmung unter Verwendung der beiden anwendbaren Szenarien berechnet:

**Unsicher Auf Positives gezählt**

| Methode A gegen Methode C |             | Positive Mustervereinbarung (95% KI) | Negativmustervereinbarung (95% KI) | Gesamtmustervereinbarung (95% KI) |
|---------------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Standort 1                | Techniker A | 97.5% (155/159)<br>(93.7 - 99.0%)    | 80.3% (187/233)<br>(74.7 - 84.9%)  | 87.2% (342/392)<br>(83.6 - 90.2%) |
|                           | Techniker B | 98.3% (174/177)<br>(95.1 - 99.4%)    | 87.4% (188/215)<br>(82.4 - 91.2%)  | 92.4% (362/392)<br>(89.3 - 94.6%) |
| Standort 2                | Techniker A | 100% (125/125)<br>(97.0 - 100.0%)    | 85.3% (192/225)<br>(80.1 - 89.4%)  | 90.6% (317/350)<br>(87.1 - 93.2%) |
|                           | Techniker B | 100% (139/139)<br>(97.3 - 100.0%)    | 91.0% (192/211)<br>(86.4 - 94.2%)  | 94.6% (331/350)<br>(91.7 - 96.5%) |
| Standort 3                | Techniker A | 100% (155/155)<br>(97.6 - 100.0%)    | 87% (206/237)<br>(82.0 - 90.7%)    | 92.1% (361/392)<br>(88.9 - 94.4%) |
|                           | Techniker B | 98.8% (167/169)<br>(95.8 - 99.7%)    | 91.9% (205/223)<br>(87.6 - 94.8%)  | 94.9% (372/392)<br>(92.3 - 96.7%) |

**d. Ergebnisse für Methode A vs Methode C für alle Standorte und alle Techniker zusammen unten dargestellt:**

|           |         |                  |         |
|-----------|---------|------------------|---------|
|           |         | <b>Methode A</b> |         |
|           |         | Positiv          | Negativ |
| Methode C | Positiv | 915              | 174     |
|           | Negativ | 9                | 1170    |

Positive prozentuale Übereinstimmung: 99.03 % (915/924)      95% CI: 98.39 - 99.55%  
 Negative prozentuale Übereinstimmung: 87.05 % (1170/1344)      95% CI: 85.15 - 88.74%  
 Prozentuale Gesamtübereinstimmung: 91.93 % (2085/2268)      95% CI: 90.74 - 92.98%

**Unsicher auf Negative gezählt**

| Methode A gegen Methode C |             | Positive Mustervereinbarung (95% KI) | Negativmustervereinbarung (95% KI) | Gesamtmustervereinbarung (95% KI) |
|---------------------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Standort 1                | Techniker A | 93.1% (148/159)<br>(88.0 - 96.1%)    | 94.0% (219/233)<br>(90.2 - 96.4%)  | 93.6% (367/392)<br>(90.8 - 96.5%) |
|                           | Techniker B | 90.4% (160/177)<br>(85.2 - 93.9%)    | 99.1% (213/215)<br>(96.7 - 99.7%)  | 95.2% (373/392)<br>(92.6 - 96.9%) |
| Standort 2                | Techniker A | 99.2% (124/125)<br>(95.1 - 99.9%)    | 94.7% (213/225)<br>(90.9 - 96.9%)  | 96.3% (337/350)<br>(93.8 - 97.8%) |
|                           | Techniker B | 95.0% (132/139)<br>(89.9 - 97.5%)    | 98.1% (207/211)<br>(95.2 - 99.3%)  | 96.9% (339/350)<br>(94.5 - 98.2%) |
| Standort 3                | Techniker A | 96.1% (149/155)<br>(91.8 - 98.2%)    | 97.1% (230/237)<br>(94.4 - 98.1%)  | 96.7% (379/392)<br>(94.4 - 98.1%) |
|                           | Techniker B | 90.5% (153/169)<br>(85.2 - 94.1%)    | 98.7% (220/223)<br>(96.1 - 99.5%)  | 95.2% (373/392)<br>(92.6 - 96.9%) |

e. Ergebnisse für Methode A vs Methode C für alle Standorte und alle Techniker zusammen unten dargestellt:

|           |         | Methode A |         |
|-----------|---------|-----------|---------|
|           |         | Positiv   | Negativ |
| Methode C | Positiv | 866       | 42      |
|           | Negativ | 58        | 1302    |

Positive prozentuale Übereinstimmung: 93.72 % (866/924)      95% CI: 91.97 - 95.11%  
 Negative prozentuale Übereinstimmung: 96.88% (1302/1344)      95% CI: 95.80 - 97.68%  
 Prozentuale Gesamtübereinstimmung: 95.59 % (2168/2268)      95% CI: 94.67 - 96.36%

f. Qualitativer Vergleich von Methode B und Methode C

Da Methode C zusätzlich zu einem positiven oder negativen qualitativen Ergebnis ein unsicheres (UNC) Ergebnis liefern kann, wurde die Übereinstimmung zwischen den Methoden unter Verwendung der als positiv und dann als negativ eingestuftenen UNC-Proben berechnet:

UNC wird für jeden Standort und jeden Techniker als positiv angesehen.

| Methode B gegen Methode C |             | Positive Mustervereinbarung (95% KI) | Positive Pattern agreement (95% CI) | Positive Mustervereinbarung (95% KI) |
|---------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Standort 1                | Techniker A | 100.0% (162/162)<br>(97.7 - 100.0%)  | 83.0% (191/230)<br>(77.7 - 87.3%)   | 90.1% (353/392)<br>(86.7 - 92.7%)    |
|                           | Techniker B | 99.4% (170/171)<br>(96.8 - 99.9%)    | 86.4% (191/221)<br>(81.3 - 90.3%)   | 91.8% (360/392)<br>(88.7 - 94.2%)    |
| Standort 2                | Techniker A | 100.0% (138/138)<br>(97.3 - 100.0%)  | 90.6% (192/212)<br>(85.9 - 93.8%)   | 94.3% (330/350)<br>(91.3 - 96.3%)    |
|                           | Techniker B | 100.0% (142/142)<br>(97.4 - 100.0%)  | 92.3% (192/208)<br>(87.9 - 95.2%)   | 95.4% (334/350)<br>(92.7 - 97.2%)    |
| Standort 3                | Techniker A | 99.3% (150/151)<br>(96.3 - 99.9%)    | 85.5% (206/241)<br>(80.5 - 89.4%)   | 89.9% (356/392)<br>(86.5 - 92.5%)    |
|                           | Techniker B | 99.4% (166/167)<br>(96.7 - 99.9%)    | 91.6% (206/225)<br>(87.2 - 94.5%)   | 94.9% (372/392)<br>(92.3 - 96.7%)    |

Kombinierte qualitative Übereinstimmung zwischen Methodenband Methode C für alle Standorte/ alle Techniker (UNC als positiv):

|           |         | Methode B |         | Insgesamt |
|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
|           |         | Positiv   | Negativ |           |
| Methode C | Positiv | 928       | 160     | 1088      |
|           | Negativ | 3         | 1177    | 1180      |
| Insgesamt |         | 931       | 1337    | 2268      |

Positive prozentuale Übereinstimmung: 99.7 % (928/931)      95% CI: 99.1 - 99.9%  
 Negative prozentuale Übereinstimmung: 88.0 % (1177/1337)      95% CI: 86.2 - 89.7%  
 Prozentuale Gesamtübereinstimmung: 92.8% (2105/2268)      95% CI: 91.7 - 93.8%

UNC wird für jeden Standort und jeden Techniker als negativ eingestuft

| Methode B gegen Methode C |             | Method B vs Method C               | Negativmustervereinbarung (95% KI)   | Gesamtmustervereinbarung (95% KI)  |
|---------------------------|-------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| Standort 1                | Techniker A | 95.7% (155/162)<br>(91.4 - 97.9%)  | 97.0% (223/230)<br>(93.9 - 98.5%)    | 96.4% (378/392)<br>(94.1 - 97.9%)  |
|                           | Techniker B | 94.2% (161/171)<br>(89.6 - 96.8%)  | 99.6% (220/221)<br>(97.5 - 99.9%)    | 97.2% (381/392)<br>(95.1 - 98.4%)  |
| Standort 2                | Techniker A | 98.6% (136/138)<br>(94.9 - 99.60%) | 100.0% (212/212)<br>(98.2 - 100.0%)  | 99.4% (348/350)<br>(97.9 - 99.8%)  |
|                           | Techniker B | 95.8% (136/142)<br>(91.1 - 98.1%)  | 100.00% (208/208)<br>(98.2 - 100.0%) | 98.3% (344/350)<br>(96.3 - 99.2%)  |
| Standort 3                | Techniker A | 98.0% (148/151)<br>(94.3 - 99.3%)  | 96.7% (233/241)<br>(93.6 - 98.3%)    | 97.2% (381/392)<br>(95.1 - 98.4%)  |
|                           | Techniker B | 92.8% (155/167)<br>(87.9 - 95.8%)  | 99.56% (224/225)<br>(97.5 - 99.9%)   | 96.68% (379/392)<br>(94.4 - 98.1%) |

**Kombinierte qualitative Übereinstimmung zwischen Methodenband Methode C für alle Standorte / alle Techniker (UNC als Negative):**

|           |         | Methode B |         | Insgesamt |
|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
|           |         | Positiv   | Negativ |           |
| Methode C | Positiv | 891       | 17      | 908       |
|           | Negativ | 40        | 1320    | 1360      |
| Insgesamt |         | 931       | 1337    | 2268      |

Positive prozentuale Übereinstimmung: 95.7% (891/931)      95% CI: 94.2 - 96.8%  
 Negative prozentuale Übereinstimmung: 98.7% (1320/1337)      95% CI: 98.0 - 99.2%  
 Prozentuale Gesamtübereinstimmung: 97.5% (2211/2268)      95% CI: 96.8 - 98.1%

In allen Fällen ist die qualitative Übereinstimmung zwischen den Interpretationsmethoden recht hoch, was darauf hinweist, dass alle drei Methoden (manuelles Mikroskop, digitales Lesen des diFine®-Scanners und automatisierter Aufruf des diFine®-Scanners) gut miteinander korrelieren und nur wenige Abweichungen aufweisen.

Zusätzlich wurden Musterbestimmungen über verschiedene Interpretationsmethoden hinweg korreliert; Proben, die kein Muster aufwiesen (d. h. 'negativ') oder Proben, die unsichere Ergebnisse ergaben (d. H. 'UNC'), wurden in die Musterübereinstimmungsanalysen zwischen den verschiedenen Interpretationsmethoden einbezogen, die in der folgenden Tabelle dargestellt sind:

|            |             | Methode A gegen Methode B   | Methode A gegen Methode C   | Methode B gegen Methode C   |
|------------|-------------|---|---|---|
|            |             | Prozentuale Übereinstimmung (%)<br>(# Zustimmen / Gesamt #)<br>[95% KI] | Prozentuale Übereinstimmung (%)<br>(# Zustimmen / Gesamt #)<br>[95% KI] | Prozentuale Übereinstimmung (%)<br>(# Zustimmen / Gesamt #)<br>[95% KI] |
| Standort 1 | Techniker A | 98.5<br>(386/392)<br>[96.7 - 99.3%]                                     | 84.2<br>(330/392)<br>[80.2 - 87.5%]                                     | 83.9<br>(329/392)<br>[80.0 - 87.2%]                                     |
|            | Techniker B | 97.7<br>(383/392)<br>[95.7 - 98.8%]                                     | 85.0<br>(333/392)<br>[81.1 - 88.2%]                                     | 85.2<br>(334/392)<br>[81.4 - 88.4%]                                     |
| Standort 2 | Techniker A | 96.9<br>(339/350)<br>[94.5 - 98.2%]                                     | 86.0<br>(301/350)<br>[82.0 - 89.3%]                                     | 86.9<br>(304/350)<br>[82.9 - 90.0%]                                     |
|            | Techniker B | 97.7<br>(342/350)<br>[95.6 - 98.8%]                                     | 86.6<br>(303/350)<br>[82.6 - 89.8%]                                     | 87.1<br>(305/350)<br>[83.2 - 90.3%]                                     |
| Standort 3 | Techniker A | 98.47<br>(386/392)<br>[96.7 - 99.3%]                                    | 88.3<br>(346/392)<br>[84.7 - 91.1%]                                     | 88.5<br>(347-392)<br>[85.0 - 91.3%]                                     |
|            | Techniker B | 98.2<br>(385/392)<br>[96.4 - 99.1%]                                     | 88.0<br>(345/392)<br>[84.4 - 90.9%]                                     | 87.5<br>(343/392)<br>[83.9 - 90.4%]                                     |

Die Kombination aller drei Standorte ergab die folgende Mustervereinbarung:

|                           | Mustervertragsnummer / Gesamtproben | Prozentuale Übereinstimmung (%) | 95% KI     |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------|
| Methode A gegen Methode B | 2221/2268                           | 98.0                            | 97.3-98.4% |
| Methode A gegen Methode C | 1958/2268                           | 86.3                            | 84.9-87.7% |
| Methode B gegen Methode C | 1962/2268                           | 86.5                            | 85.0-87.9% |

Proben, die an jeder Stelle mit einer beliebigen Methode positiv waren, wurden bis zum Endpunkt titriert und mit allen drei Methoden interpretiert. Proben, die mit allen drei Methoden an einem Standort qualitativ positiv waren, konnten auf Endpunktübereinstimmung verglichen werden. An Standort eins wurden 156 Proben bis zum Endpunkt titriert. An Standort zwei wurden 133 Proben bis zum Endpunkt titriert und an Standort drei wurden 154 Proben bis zum Endpunkt titriert. Wenn man bedenkt, dass an jedem Standort zwei Techniker sowohl mit Methode A als auch mit Methode B zu lesen waren, führte dies zu

886-fachen Vergleichen der Endpunktbestimmungen zwischen Methode A und Methode B, Methode A und Methode C und Methode B und Methode C. Die Häufigkeit, mit der diese Endpunktbestimmungen plus oder minus einer, zweifachen Verdünnung übereinstimmen, ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

| <b>Kombinierte Endpunkttitervereinbarung (alle Standorte/alle Techniker)</b> |                                  |                                    |                |
|--|----------------------------------|------------------------------------|----------------|
| Interpretation   | [± 1<br>Verdünnung]/Gesamtproben | Prozentuale<br>Übereinstimmung (%) | 95% KI         |
| Methode A vs. Methode B  | 880/886                          | 99.32                              | 98.53 - 99.69% |
| Methode A vs. Methode B  | 879/886                          | 99.21                              | 98.38 - 99.62% |
| Methode B vs. Methode C  | 880/886                          | 99.32                              | 98.53 - 99.69% |

Dieser Vergleich zeigt, dass die Endpunktbestimmung zwischen den Methoden hoch ist und es nur sehr wenige Fälle gab, in denen die mit einer Methode bestimmte Endpunktverdünnung zu einer Endpunktverdünnung führte, die größer als ± eine Verdünnung mit einer anderen Methode war.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass das von diFine® identifizierte Autoaufrufmuster (Methode C) für die meisten Proben mit Methode A und/oder Methode B (nicht automatisierte Mustererkennungsverfahren) übereinstimmt. Es liegt jedoch immer noch in der Verantwortung des geschulten Bedieners, die endgültige Entscheidung zu treffen.

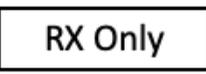
## VERWEISE

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

34. Burnham TK, Neblett TR, Fine G:Am. J. Clin. Path. 50:683, 1968.
35. Textbook of Immunopathology, Vol II, P Miescher and HJ Muller-Eberhard (Eds), Glune & Stratton, NY, 1969.
36. Wittingham S. Irvin J, Mackay IR, et al:Aust. Ann. Med. 18:130, 1969.
37. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
38. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4<sup>th</sup> Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.
39. Barton, S., Murray, J., Gastroenterol Clin North Am. 2008 June ; 37(2): 411-vii. doi:10.1016/j.gtc.2008.02.001
40. Weisbart RH, Colburn K. Effect of corticosteroids on serum antinuclear antibodies in man. Immunopharmacology. 1984 Oct;8(2):97-101. doi: 10.1016/0162-3109(84)90048-1. PMID: 6334672.

## GLOSSAR DER SYMBOLE

Bei der Kennzeichnung dieses Produkts wurden möglicherweise die folgenden Symbole verwendet.

| Symbol  | Beschreibung                                  | Symbol   | Beschreibung                                   |
|---|---|--|--|
|    | Hersteller                                    |     | Von Sonnenlicht fernhalten                     |
|    | In-vitro-Diagnostika                          |     | Übereinstimmung mit der Richtlinie 98/79       |
|    | Katalognummer                                 |    | Abdeckglas                                     |
|    | Ausreichend für n Tests                       |    | Substratschlitten                              |
|   | Chargencode                                   |   | PBS-Puffer                                     |
|  | Verwendung durch                              |  | Eindeckmedien                                  |
|  | Einschränkungen der Lagertemperatur           |  | Konjugieren                                    |
|  | Nur für verschreibungspflichtige Zwecke       |  | ANA (Homogen) Positiv-Kontroll (humanes Serum) |
|  | Elektronische Gebrauchsanweisung konsultieren |  | Negativkontrolle                               |
|  | In aufrechter Position aufbewahren            |  | Hergestellt in den USA                         |



### ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New 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](http://www.zeusscientific.com)

Für den Kundendienst in den USA wenden Sie sich an Ihren Händler vor Ort.

Für technischen Support in den USA wenden Sie sich an ZEUS Scientific, rufen Sie gebührenfrei an oder senden Sie eine E-Mail [support@zeusscientific.com](mailto:support@zeusscientific.com)

Für Anfragen zu Kundendienst und technischem Support außerhalb der USA wenden Sie sich bitte an Ihren örtlichen Händler. ©2019 ZEUS Scientific. Alle Rechte vorbehalten.



EMERGO EUROPE  
 Westervoortsedijk 60  
 6827 AT Arnhem  
 The Netherlands