

**PT****ANA HEP-2****REF FA2500A****IVD****Rx Only**

USO PRETENDIDO

ANA HEP-2 é uma análise de imunofluorescência indireta para a detecção qualitativa e determinação semiquantitativa de anticorpos antinucleares IgG no soro humano por microscopia de fluorescência manual ou com o microscópio automatizado diFine®. A presença de anticorpos antinucleares pode ser usada em conjunto com outros testes sorológicos e achados clínicos para auxiliar no diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumáticas sistêmicas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A análise de imunofluorescência indireta (IFA) tem sido amplamente utilizada para detectar a presença de anticorpos antinucleares (ANA) no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e outros distúrbios do tecido conjuntivo clinicamente semelhantes (1 - 5). Além disso, os ANA podem estar associados a várias síndromes de lúpus induzidas por medicamentos (6 - 7), que clinicamente imitam a forma espontânea do LES. A técnica de IFA foi adaptada para testes de ANA por vários pesquisadores (8 - 9), seguindo os métodos básicos originalmente descritos por Coons (10). Os ANA são compostos principalmente por anticorpos IgG; no entanto, ANA de IgA e IgM também podem ser detectados (11). Agora é reconhecido que diversas fontes de material nuclear podem ser utilizadas como substrato para testes de ANA. Embora a maior parte da pesquisa original de ANA tenha sido realizada utilizando substrato de seções de tecido de fígado ou rim de rato ou camundongo, o uso de culturas celulares de tecido embrionário humano ou animal tem fornecido uma alternativa confiável e de fácil interpretação para os testes de ANA. A linhagem celular HEP-2 é derivada de um carcinoma epidermóide da laringe humana. O uso do substrato de células HEP-2 em IFA aumentou a sensibilidade da detecção de autoanticorpos e contribuiu para o diagnóstico de doenças autoimunes sistêmicas e a descrição de novas doenças, graças à possibilidade de detectar mais de 100 antígenos em seu núcleo e citoplasma. Existem vários padrões diferentes de imunofluorescência nuclear e citoplasmática. **O diFine® foi programado para sugerir oito padrões comuns de ANA. Esses oito padrões e a base para eles podem ser avaliados pelo diFine® e pelo leitor manual da seguinte forma:**

- Homogêneo (AC-1)** - Padrões de coloração homogênea ou difusa do núcleo são consistentes com autoanticorpos contra DNA nativo (nDNA), histonas e/ou desoxirribonucleoproteínas (DNP) (12, 13). Os cromossomos das células mitóticas (células em divisão) são indicadores importantes de um padrão homogêneo, pois serão corados como massas de formato irregular com a borda externa mais intensamente corada.
- Salpicado (AC-2, AC-4 e AC-5)** - O padrão salpicado é o padrão de ANA mais comumente observado. Um padrão uniforme de "salpicado verdadeiro" pode ser observado com anticorpos contra centômeros em células que não estão em divisão. Um padrão salpicado denso pode ser observado com anticorpos contra n-RNP, Sm e SSB/La.
Padrão salpicado fino, negativo para cromossomos (AC-4): Vários pontos pequenos e uniformes de fluorescência dispersos uniformemente por todo o núcleo. Os nucléolos geralmente aparecerão não corados. As células mitóticas podem demonstrar alguns pontos no citoplasma, mas os cromossomos serão negativos.
Padrão salpicado grosseiro, negativo para cromossomos (AC-5): Pontos de fluorescência de tamanho médio serão dispersos por todo o núcleo, com margens nucleares distintas. Pontos de fluorescência de tamanho maior também podem ser observados; no entanto, são numerosos demais e variáveis em tamanho para serem identificados como um padrão nucleolar. Os cromossomos nas células mitóticas serão negativos.
Padrão nuclear salpicado fino denso (AC-2): Vários pontos finos com uma distribuição densa no núcleo, excluindo os nucléolos. Associado a anticorpos anti-DFS70, que podem ocorrer em indivíduos saudáveis e têm implicações limitadas para doenças autoimunes.
Harmon, et al. (17) demonstraram que amostras de soro contendo anticorpos anti-SSA/Ro altamente monoespecíficos apresentaram um padrão de teste IF-ANA de pontos nucleares discretos em uma ampla variedade de células humanas e núcleos de tumor. Essas amostras de soro com anticorpos monoespecíficos anti-SSA/Ro produziram muito pouca coloração citoplasmática nas células do substrato. Foi descrito um padrão salpicado distinto, grande e variável, com 3 a 10 pontos grandes no núcleo. Esses pacientes com pontos grandes e variáveis apresentam síndromes de doenças reumáticas indiferenciadas com anticorpo IgM anti-histona FH-3 (18).
- Centrômero (AC-3)** - *Salpicado discreto, positivo para cromossomos (especificidade para centrômero):* Os cromossomos serão positivos em células mitóticas; na verdade, os pontos discretos serão agrupados apenas na massa cromossômica, demonstrando claramente os diversos estágios da mitose. O padrão de centrômero foi reconhecido como associado à síndrome CREST, que é uma variante mais branda da esclerose sistêmica progressiva (PSS). O padrão de centrômero demonstrará pontos discretos e

uniformes de pontos fluorescentes dispersos por todo o núcleo. As células mitóticas serão positivas, demonstrando um agrupamento dos centrômeros nos cromossomos em diferentes arranjos de acordo com o estágio mitótico.

4. **Nucleolar homogêneo (AC-8)** – O padrão nucleolar demonstra uma coloração homogênea ou salpicada do nucléolo. Esse padrão é frequentemente associado a uma fluorescência homogênea e opaca no restante do núcleo. Os cromossomos nas células mitóticas são negativos. O padrão nucleolar sugere autoanticorpos contra PM/Sci-75, PM/Sci-100, Th/To, B23/nucleofosmina, nucleolina, No55/SC65. A fluorescência nucleolar aparecerá como homogênea, aglutinada ou salpicada, dependendo do antígeno com o qual o autoanticorpo reage. Os anticorpos anti-nucleolares ocorrem principalmente no soro de pacientes com esclerodermia, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren ou fenômeno de Raynaud (19).
5. **Múltiplos Pontos Nucleares (AC-6)** – Um pequeno número de pontos nucleares, variando de 6 a 20, está mais comumente associado à colangite biliar primária.
6. **Membrana Nuclear (AC-11)** – *Antimembrana nuclear (lamínas nucleares)*: O padrão de antimembrana nuclear aparece como uma borda ao redor do núcleo e se assemelha a um padrão de borda; no entanto, distingue-se do padrão de borda pelo fato de que o estágio dos cromossomos na metáfase é negativo. Esse autoanticorpo é importante de ser relatado porque é reconhecido como associado a doenças autoimunes do fígado.
7. **Citoplasmático (Ribossômico) (AC-19)** – O padrão ribossômico é caracterizado por vários pontos citoplasmáticos, com a maior concentração ao redor do núcleo. Ele se distingue do padrão mitocondrial devido aos pontos menores e à maior densidade. A significância do padrão é desconhecida.
8. **Citoplasmático (Mitocondrial) (AC-21)** – O padrão terá caracteristicamente vários pontos citoplasmáticos, com a maior concentração na área peri-nuclear. O padrão pode ser observado em células em interfase e mitóticas. A significância clínica de AMA é mais frequentemente uma associação com colangite biliar primária, especialmente quando o AMA é de alta titulação.

Os padrões adicionais listados abaixo não podem ser identificados utilizando o diFine® e devem ser interpretados por um operador treinado, de acordo com os padrões de nomenclatura da ICAP.

Padrões Nucleares Adicionais

1. **Padrão de antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) (AC-13)**: O padrão de antígeno nuclear de células proliferativas é observado como um salpico nuclear fino a grosso em 30–60% das células em interfase, e uma coloração negativa da região cromossômica das células mitóticas. O PCNA é específico para pacientes com LES, mas não é detectado em outras doenças do tecido conectivo.
2. **Padrão de centríolo (AC-24)**: O padrão de centríolo é caracterizado por dois pontos distintos de fluorescência no núcleo das células mitóticas ou um ponto distinto de fluorescência na célula em repouso. A significância desse padrão não é conhecida; no entanto, foi observado na PSS.
3. **Padrão de fibra do fuso (AC-25)**: *Positivo para cromossomos*: O padrão de fibra do fuso é único para células que estão passando por mitose, onde apenas o aparelho do fuso fluoresce. Esse padrão tem a aparência de uma "teia de aranha" que se estende do centríolo para os centrômeros. O padrão é sugestivo de autoanticorpos contra os microtúbulos e sua significância é incerta.
4. **Padrão de corpo intermediário (AC-27)**: O padrão de corpo intermediário é uma região densamente corada próxima à fenda de clivagem das células em telófase, isto é, na área onde as duas células filhas se separam. A significância clínica do padrão é desconhecida; no entanto, o padrão foi reconhecido em pacientes selecionados com esclerose sistêmica.

Padrões Citoplasmáticos Adicionais

1. **Padrão citoplasmático fibrilar linear semelhante à actina (AC-15)**: O padrão citoesquelético é caracterizado por uma aparência distinta de "teia de aranha" ou fibrosa por toda a célula. Foi relatado como associado a doenças autoimunes do fígado (antimúsculo liso).
2. **Padrão lisossômico (AC-18)**: O padrão lisossômico é observado como alguns pontos discretos espaçados de forma dispersa por todo o citoplasma. O padrão é observado no citoplasma de células em interfase e mitóticas. A significância clínica é desconhecida.
3. **Polar/semelhante ao Golgi (AC-22)**: O padrão do aparelho de Golgi é caracterizado por coloração citoplasmática positiva, concentrada em apenas um lado da região perinuclear. A significância clínica é incerta, mas relatos na literatura sugerem uma associação com LES e Síndrome de Sjögren.

PRINCÍPIO DA ANÁLISE

O ANA HEP-2 é projetado para detectar a presença de ANA circulantes em soro humano. A análise utiliza substrato de cultura de células de tecido e anti-imunoglobulina humana de cabra ajustada para uso ideal e livre de coloração de fundo não específica. A reação ocorre em dois passos:

1. O primeiro passo é a incubação da amostra, onde qualquer ANA presente na amostra do paciente pode se ligar ao substrato celular, formando um complexo antígeno-anticorpo. Outros componentes do soro são subsequentemente removidos por lavagem.
2. O passo dois é a incubação com o conjugado, onde o anti-imunoglobulina humana marcado com FITC é permitido reagir com qualquer imunoglobulina humana que tenha se ligado ao substrato durante a incubação da amostra. Isso formará um complexo estável antígeno-anticorpo-conjugado no local onde o anticorpo inicial do paciente se ligou ao substrato celular. O excesso de conjugado é posteriormente removido por lavagem. Os resultados da análise podem ser visualizados utilizando um microscópio fluorescente adequadamente equipado ou o diFine®. Quaisquer reações positivas aparecerão como coloração fluorescente verde maçã dentro da célula. Se a amostra não tiver ANA específico, não haverá coloração nuclear distinta da célula.

REAGENTES

Materiais Fornecidos:

Cada kit contém os seguintes componentes em quantidades suficientes para realizar o número de testes indicado na etiqueta da embalagem. **OBSERVAÇÃO: O conjugado e os controles contêm uma combinação de Proclin (0,05% v/v) e Azida de Sódio (<0,1% p/v) como conservantes. Zorba-NS® contém Azida de Sódio (<0,1% p/v) como conservante.**

SLD	1	Lâminas de Substrato ANA HEp-2: Vinte lâminas de 12 poços com papel absorvente e sachê dessecante.
CONJ.	2	Conjugado: Anti-IgG humana de cabra marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Contém tampão fosfato com BSA e corante de contraste. Três frascos âmbar, contendo 3,5 mL. Pronto para uso.
CTRL +	3	ANA (homogênea) Controle Positivo (Soro Humano): Produzirá coloração homogênea verde maçã positiva do núcleo celular. Um frasco de 0,5 mL, com tampa vermelha Pronto para usar.
CTRL -	4	Controle Negativo (Soro Humano): Não produzirá coloração nuclear detectável. Um frasco de 0,5 mL, com tampa verde. Pronto para uso.
DIL SPE	5	Diluyente de Amostra Zorba-NS®: Quatro frascos de 25 mL, com tampa verde. Pronto para uso.
BUF PBS	6	Solução salina tamponada com fosfato (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Vazie o conteúdo de cada pacote de tampão em um litro de água destilada ou desionizada. Misture até que todos os sais estejam completamente dissolvidos. Quatro sachês, suficientes para preparar 4 litros.
MNTMED	7	Meio de montagem (glicerol tamponado): Um frasco de 3,0 ml com tampa branca e gotejador.
COVGLS	8	Vidro de cobertura Embalagem com vinte e quatro, 24 x 60 mm, espessura nº 1.

OBSERVAÇÕES:

- Os seguintes componentes não dependem do número do lote do kit e podem ser usados de forma intercambiável com os Kits Sebia IFA, desde que os números dos produtos sejam idênticos: Zorba-NS® (Número do Produto: FA025S), Meio de Montagem (Número do Produto: FA0009S), PBS (Número do Produto: 0008S) e Lamínula (Número do Produto: S8008).

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Microscópio automatizado diFine® ou um microscópio de fluorescência adequadamente equipado.
- Pipetador(es) capaz(es) de pipetar volumes entre 10 e 200 µL.
- Pontas de pipeta descartáveis.
- Pequenos tubos de ensaio, placa de diluição ou similar para preparar diluições de amostras.
- Lavadora de lâminas, ou um grande recipiente de coloração com uma placa magnética para agitar, para lavar as lâminas entre os passos de incubação.
- Água destilada ou deionizada.
- Cilindro Graduado de 1 Litro.
- Temporizador de laboratório para monitorar os passos de incubação.
- Bacia de descarte, luvas descartáveis e desinfetante (ex: água sanitária doméstica a 10% – 0,5% de hipoclorito de sódio).

CUIDADOS DE ARMAZENAMENTO

 2°C – 8°C	Kit Fechado.
	Meio de Montagem, Conjugado, Lâminas, Zorba-NS®, Lâminas*, Controles Positivo e Negativo.
	PBS reidratado (estável por 30 dias).
 2°C – 25°C	Pacotes de solução salina tamponada com fosfato (PBS).
*Uma vez abertas, as lâminas devem ser utilizadas no mesmo dia. Outros reagentes prontos para uso, exceto PBS, podem ser utilizados até a data de validade indicada.	

PRECAUÇÕES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Siga as precauções normais ao manipular reagentes laboratoriais. No caso de contato com os olhos, enxaguar imediatamente com água em abundância e consultar um médico. Use vestuário de proteção adequado, luvas e proteção para os olhos/rosto. Não inale os vapores. Descarte os resíduos observando todas as leis locais, estaduais e federais.
3. Os poços da lâmina não contêm organismos viáveis. No entanto, considere a lâmina como **material potencialmente biológico perigoso** e manuseie-a adequadamente.
4. Os controles são **materiais potencialmente biológicos perigosos**. Os materiais de origem dos quais esses produtos foram derivados foram considerados negativos para o antígeno HIV-1, HBsAg e para anticorpos contra HCV e HIV, por métodos de teste aprovados. No entanto, como nenhum método de teste pode oferecer total garantia de que agentes infecciosos estão ausentes, esses produtos devem ser manipulados no Nível de Biossegurança 2, conforme recomendado para qualquer soro humano ou amostra de sangue potencialmente infecciosa no manual dos Centros de Controle de Doenças/Institutos Nacionais de Saúde "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories": edição atual; e o Padrão da OSHA para Patógenos Transmitidos pelo Sangue (20).
5. A aderência ao tempo e temperatura especificados para as incubações é essencial para resultados precisos. **Todos os reagentes devem ser deixados atingir a temperatura ambiente (20 - 25° C) antes de iniciar o ensaio**. Devolva os reagentes não utilizados aos seus recipientes originais imediatamente e siga os requisitos de armazenamento.
6. Lavagem inadequada pode causar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Certifique-se de minimizar a quantidade de PBS residual, pressionando com papel absorvente, antes de adicionar o conjugado. Não deixe os poços secarem entre as incubações.
7. O conjugado, Zorba-NS® e os controles contêm Azida de Sódio em uma concentração de <0,1% (p/v). Foi relatado que a azida de sódio pode formar azidas de chumbo ou cobre nas tubulações laboratoriais, o que pode causar explosões ao bater. Para prevenir, enxágue bem a pia com água após descartar a solução contendo azida de sódio. Este conservante pode ser tóxico se ingerido.
8. A diluição ou adulteração desses reagentes pode gerar resultados errôneos.
9. Nunca pipete pela boca. Evite o contato de reagentes e amostras de pacientes com a pele e mucosas.
10. Evite a contaminação microbiana dos reagentes. Resultados incorretos podem ocorrer.
11. A contaminação cruzada de reagentes e/ou amostras pode causar resultados errôneos.
12. O material de vidro reutilizável deve ser lavado e enxaguado completamente, sem resíduos de detergentes.
13. Evite respingos ou geração de aerossóis.
14. Não exponha os reagentes à luz intensa durante o armazenamento ou incubação.
15. Permitir que o pacote de lâminas atinja a temperatura ambiente antes de abrir o envelope protetor ajudará a proteger os poços e o papel absorvente da condensação.
16. Colete a solução de lavagem em uma bacia de descarte. Trate a solução de resíduos com desinfetante (ex: água sanitária doméstica a 10% - 0,5% de hipoclorito de sódio). Evite a exposição dos reagentes aos vapores de água sanitária.
17. Não exponha nenhum dos reagentes reativos a soluções contendo água sanitária ou a odores fortes provenientes de soluções com água sanitária. Quantidades traço de alvejante (Hipoclorito de Sódio) podem destruir a atividade biológica de muitos dos reagentes reativos dentro deste kit.
18. Não aplique pressão sobre o envelope da lâmina. Isso pode danificar o substrato.
19. Os componentes deste kit são ajustados para otimizar a sensibilidade e a reprodutibilidade. Reagentes de outros fabricantes não devem ser trocados. Siga o folheto informativo com atenção.
20. Os componentes não abertos/abertos são estáveis até a data de validade impressa no rótulo, desde que as condições de armazenamento recomendadas sejam rigorosamente seguidas. Não use após a data de validade. Não congelar.
21. O corante de contraste Evans Blue é um potencial carcinógeno. Se ocorrer contato com a pele, lave com água. Descarte de acordo com as regulamentações locais.
22. Não deixe as lâminas secarem durante o procedimento. Dependendo das condições do laboratório, pode ser necessário colocar as lâminas em uma câmara úmida durante as incubações.

COLETA DE AMOSTRAS

1. Realize a coleta de amostras de acordo com o documento CLSI M29: Proteção dos Trabalhadores de Laboratório contra Doenças Infecciosas Adquiridas Ocupacionalmente. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer garantia completa de que amostras de sangue humano não transmitirão infecções. Portanto, todos os derivados de sangue devem ser considerados potencialmente infecciosos.
2. Apenas soros recém-coletados e devidamente refrigerados, obtidos por procedimentos de venopunção assépticos aprovados, devem ser utilizados com esta análise (30, 31). Não devem ser adicionados anticoagulantes ou conservantes. Evite usar soro hemolisado, lipêmico ou contaminado por bactérias.
3. Armazene a amostra à temperatura ambiente por no máximo 8 horas. Se o teste não for realizado dentro de 8 horas, o soro pode ser armazenado entre 2 - 8 C, por no máximo 48 horas. Se houver previsão de atraso no teste, armazene o soro para teste a -20 C ou mais baixo. Evite ciclos múltiplos de congelação/descongelação, pois isso pode causar perda da atividade dos anticorpos e resultar em resultados errôneos. É responsabilidade de cada laboratório utilizar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar os critérios de estabilidade para seu laboratório (38).

PROCEDIMENTO DA ANÁLISE

1. Retire as lâminas do armazenamento refrigerado e deixe-as atingir a temperatura ambiente (20 – 25 C). Abra o envelope protetor e retire as lâminas. **Não aplique pressão nas laterais planas do envelope protetor.**
2. Identifique cada poço com o soro do paciente e os controles apropriados. **OBSERVAÇÃO: Os controles devem ser utilizados sem diluição.** Prepare uma diluição 1:40 (por exemplo: 10 µL de soro + 390 µL de Zorba-NS®) de cada soro de paciente.

Opções de Diluição:

- a. Os usuários podem titular o controle positivo até o ponto final para servir como um controle semi-quantitativo (1+ Reagente Minimante). Nesses casos, o controle deve ser diluído em duas vezes em PBS, **não em Zorba-NS®**. Uma diluição de término é estabelecida e impressa no frasco do Controle Positivo ($\pm$ uma diluição). Deve-se observar que, devido a variações dentro do laboratório (equipamento, etc.), cada laboratório deve estabelecer seu próprio título de término esperado para cada lote de controle positivo.
 - b. Ao titrar amostras de pacientes, as diluições iniciais devem ser preparadas em Zorba-NS® e todas as diluições subsequentes devem ser preparadas apenas em PBS. **As titulações não devem ser preparadas em Zorba-NS®.**
3. Com um dispensador adequado (listado acima), dispense 20 – 40 µL de cada controle e de cada soro diluído de paciente nos poços apropriados.
 4. Incube as lâminas à temperatura ambiente (20 – 25 C) por 35 ± 5 minutos.
 5. Lave suavemente as lâminas com PBS. **Não direcione um jato de PBS nos poços de teste.**
 6. Lave as lâminas por dois intervalos de cinco minutos, trocando o PBS entre as lavagens. As lâminas podem ficar de molho durante cada lavagem por até cinco minutos. **OBSERVAÇÃO: Para aqueles que utilizam lavadoras automáticas, configure a lavadora para lavar cada poço três vezes, com um tempo de imersão de zero a cinco minutos.**
 7. Retire as lâminas do PBS uma de cada vez. Inverta a lâmina e alinhe os poços com os buracos nos papéis absorventes fornecidos. Seque a lâmina pressionando o lado reverso com um lenço absorvente.
CUIDADO: Posicione o papel absorvente e a lâmina em uma superfície dura e plana. A secagem em toalhas de papel pode destruir a matriz da lâmina. **Não deixe as lâminas secarem durante o procedimento do teste.**
 8. Adicione 20–40 µL de conjugado a cada poço.
 9. Repita as etapas 4 a 7.
 10. Aplique 3 a 5 gotas de meio de montagem em cada lâmina (entre os poços) e coloque a lamínula. Alternativamente, pode-se aplicar uma pequena quantidade de meio de montagem em cada poço e colocar o vidro de cobertura. O meio de montagem deve ser adicionado dentro de duas horas após a conclusão do último ciclo de lavagem.
 11. Examine as lâminas imediatamente com um microscópio de fluorescência adequado. Isso pode ser realizado manualmente utilizando um microscópio de fluorescência tradicional ou com o dIFine®. Se estiver utilizando o dIFine®, consulte o manual do instrumento para as instruções de operação. **Recomenda-se que as lâminas sejam examinadas no mesmo dia do teste.**

OBSERVAÇÕES:

- a. **Se não for possível visualizar as lâminas imediatamente, elas podem ser armazenadas por até 48 horas a 2 – 8 C.**
- b. **Se as lâminas não forem examinadas dentro de um período de 48 horas, selar a lamínula com esmalte transparente e armazenar na geladeira.**

CONTROLE DE QUALIDADE

1. Sempre que a análise for realizada, um controle positivo e um controle negativo devem ser incluídos.
2. Recomenda-se que os controles sejam lidos antes de avaliar as amostras do teste. Se os controles não aparecerem conforme descrito, os resultados podem ser inválidos.
 - a. Controle negativo – caracterizado pela ausência de fluorescência específica e uma coloração de fundo vermelha ou verde opaca de todas as células devido à contracoloração.
 - b. Controle positivo (padrão homogêneo) – caracterizado pela fluorescência verde maçã. O padrão de coloração homogênea é uma coloração difusa e uniforme de todo o núcleo.
3. Controles adicionais podem ser testados de acordo com as diretrizes ou requisitos das regulamentações locais, estaduais e/ou federais ou de organizações de acreditação.

OBSERVAÇÕES:

- a. **Ocorre retenção inespecífica de reagentes. É importante lavar as lâminas adequadamente para evitar resultados falso-positivos.**
- b. **A intensidade da fluorescência observada pode variar com o microscópio e o sistema de filtros utilizados.**
- c. **A coloração não nuclear do substrato celular pode ser observada com alguns soros humanos.**

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

1. A interpretação dos resultados depende do padrão observado, do título do autoanticorpo e da idade do paciente. Idosos, especialmente mulheres, têm tendência a desenvolver autoanticorpos de baixo título ($<1:80$) na ausência de doença autoimune clínica. A experiência sugere que uma diluição de 1:40 é uma boa opção para triagem de ANA. Resultados positivos de baixo título podem ocorrer em pessoas aparentemente saudáveis; portanto, os resultados de ANA devem sempre ser interpretados à luz da apresentação clínica total do paciente.

2. Títulos inferiores a 1:40 são considerados negativos.
3. Teste positivo: Uma reação positiva é a presença de qualquer padrão de coloração nuclear verde maçã observado em uma diluição de 1:40, com base em uma escala de intensidade de coloração de 1+ a 4+. 1+ é considerada uma reação fraca e 4+ uma reação forte. Todos os soros positivos em 1:40 devem ser titulados até a diluição de término. Isso é realizado fazendo diluições seriadas de 1:40, 1:80, 1:160, etc., de todos os positivos. O título de término é a maior diluição que produz uma reação positiva de 1+.
4. Padrões homogêneos com acentuação periférica são frequentemente encontrados em soros de pacientes com LES.

	Doença Mais Frequentemente Encontrada	Referência
Homogêneo: Título alto Título Baixo	SLE Artrite Reumatoide e outras doenças	(3, 8, 9 e 16) (1)
Centrômero	Síndrome CREST, variante da PSS (Esclerose Sistêmica Progressiva)	(27)
Salpicado	Esclerodermia, Síndrome de Raynaud, Síndrome de Sjögren Doença mista do tecido conectivo	34-36
Nucleolar	Esclerodermia	(37)
Periférica	SLE	(2, 8, 9 e 16)

LIMITAÇÕES DA ANÁLISE

1. O ANA HEp-2 é um auxílio diagnóstico de laboratório, e seus resultados não são diagnósticos por si só. ANA positivo pode ser encontrado em indivíduos aparentemente saudáveis. Portanto, é imperativo que os resultados de ANA sejam interpretados em conjunto com outros testes sorológicos e achados clínicos.
2. Pacientes com LES em tratamento com esteroides podem apresentar resultados negativos no teste (40).
3. Muitos medicamentos comumente prescritos podem induzir o ANA (6, 7).
4. Um padrão de autoanticorpo pode obscurecer parcial ou completamente as características diagnósticas do outro. Nesses casos, é necessário titular o soro.
5. Nenhuma associação definitiva entre o padrão de fluorescência nuclear e qualquer estado específico de doença é indicada por este produto.

RESULTADOS ESPERADOS

O valor esperado na população normal é negativo ou inferior a 1:40. No entanto, indivíduos aparentemente saudáveis podem conter ANA em seus soros (36). Essa porcentagem aumenta com a idade, particularmente na 7ª década de vida.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

OBSERVAÇÃO: Ao estabelecer as Características de Desempenho do ANA HEp-2, as lâminas foram interpretadas utilizando três métodos diferentes, conforme descrito abaixo:

Método de interpretação:
Método A. O Método A era um método de interpretação totalmente manual. Foi realizado utilizando um microscópio fluorescente tradicional equipado com lentes objetivas e oculares. A determinação do resultado qualitativo e do padrão foi realizada por técnicos de laboratório treinados.
Método B. O Método B foi realizado digitalizando as lâminas usando o dIFine® e, em seguida, um técnico de laboratório treinado interpretou a imagem digital resultante (qualitativa e o padrão, se positivo) exibida no monitor do computador.
Método C. O Método C é o resultado sugerido previsto pelo dIFine®; o Método C prevê o resultado qualitativo e, se positivo, o padrão, caso seja um dos oito padrões que o sistema foi programado para identificar. Se o Método C for "UNC" (incerto), o nível de fluorescência medido pelo dIFine® está na linha de fronteira entre positivo e negativo. O Método C deve ser "validado" ou aceito pelo técnico de laboratório, ou modificado ou invalidado completamente. Para os fins deste estudo e os dados apresentados abaixo, o Método C é registrado "COMO ESTÁ", sem qualquer modificação pelo(s) técnico(s) de laboratório. Portanto, é apresentado <i>apenas para fins informativos</i> .

1. Estudos de Desempenho Analítico:

a. Linearidade:

Amostras fortes positivas foram identificadas para cada um dos seguintes oito padrões de ANA: Homogêneo, Salpicado, Centrômero, Nucleolar, Pontos Nucleares, Membrana Nuclear, Citoplasmático (Ribossômico) e Citoplasmático (Mitocondrial). Cada uma das amostras foi analisada em 1:40 e titulada até 1:20480, sendo interpretada por todos os três métodos mencionados acima. Este estudo foi conduzido internamente na ZEUS Scientific. Os pontos finais para cada amostra e cada método são apresentados abaixo:

Amostra	Método A	Método B	Método C
Homogêneo	1:1280	1:1280	1:1280
Salpicado	1:5120	1:5120	1, 2560
Centrômero	1:5120	1:5120	1:5120
Nucleolar	1, 2560	1:5120	1, 2560
Pontos Nucleares	1:640	1:640	1:640
Membrana Nuclear	1, 2560	1, 2560	1, 2560
Citoplasmático (Ribossômico)	1:320	1:320	1:320
Citoplasmático (mitocondrial)	1:10240	1:10240	1:10240

Resumo: Em 100% dos casos, o padrão identificado foi o esperado e em concordância, independentemente do método de interpretação. Da mesma forma, a determinação do término foi conforme o esperado $\pm$ uma diluição para 100% das determinações, independentemente do método de interpretação.

b. Reprodutibilidade de Lote para Lote:

Uma amostra moderadamente positiva e uma amostra fortemente positiva foram identificadas para cada um dos seguintes oito padrões de ANA: Homogêneo, Salpicado, Centromérico, Nucleolar, Pontos Nucleares, Membrana Nuclear, Citoplasmático (Ribossômico) e Citoplasmático (Mitocondrial). Além disso, nove amostras negativas foram incluídas, totalizando 25 espécimes no grupo. Este grupo de 25 amostras foi analisado em três lotes diferentes de ANA HEP-2 e interpretado por todos os três métodos mencionados acima. Além disso, todos os dezesseis membros positivos foram titulados até o término e interpretados por todos os três métodos.

Resultados:

- Concordância Qualitativa:** Houve 100% de concordância nos resultados qualitativos na diluição de triagem de todas as 25 amostras em todos os três lotes do kit, e houve 100% de concordância entre todos os três métodos de interpretação, independentemente do lote do kit de reagentes.
- Concordância do Título de Término:** Todas as 16 amostras positivas resultaram nos mesmos títulos de término $\pm$ uma diluição, independentemente do lote do kit de reagentes ou do método de interpretação.
- Concordância de Padrão:** Para diluições que geraram um resultado positivo em todos os três métodos de interpretação, houve 100% de concordância de padrão para o lote um e o lote dois em todos os três métodos de interpretação. Para o lote três, houve 100% de concordância de padrão entre o Método A e o Método B, com uma amostra homogênea de intensidade média positiva como o único valor atípico ao comparar o Método C com os Métodos A e B.

c. Estudo de Intervalo de Referência:

Cento e oitenta amostras de soro aleatórias foram adquiridas de doadores saudáveis no Nordeste dos Estados Unidos. As amostras foram analisadas na diluição de triagem de 1:40 e interpretadas por todos os três métodos. Todas as amostras que produziram um resultado positivo na diluição 1:40 foram tituladas e interpretadas por todos os três métodos. Os resultados do teste de triagem estão resumidos abaixo:

Método de Interpretação	Número de Positivos	% Positivos	Número de negativos	% Negativos	Número de incertos	% Incertos
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. Estudo de Repetibilidade de Vinte Dias:

Uma amostra de baixa positividade ($\sim$ 1:40 de término), uma amostra de positividade média ($\sim$ 1:160 a 1:320 de término) e uma amostra de alta positividade ($\geq$ 1:640 de término) foram identificadas para cada um dos seguintes oito padrões de ANA: Homogêneo, Especulado, Centromérico, Nucleolar, Pontos Nucleares, Membrana Nuclear, Citoplasmático (Ribossômico) e Citoplasmático (Mitocondrial). Uma amostra negativa para ANA também foi incluída, totalizando 25 amostras no grupo. Essas 25 amostras foram analisadas (diluição de triagem 1:40) na ZEUS Scientific em triplicata, em dez dias diferentes, resultando em 30 resultados por amostra. As lâminas foram interpretadas pelos três métodos.

Para a avaliação dentro do método, os resultados da concordância qualitativa e da concordância do padrão são apresentados abaixo: houve 100% de concordância qualitativa em todas as amostras quando lidas usando os Métodos A e B. Para o Método C, 22 de 25 amostras mostraram 100% de concordância qualitativa; as amostras homogêneas de baixa positividade, nucleolares de baixa positividade e de membrana nuclear de baixa positividade não apresentaram completa concordância qualitativa. Além disso, houve 100% de concordância do padrão entre os Métodos A e B. Para o Método C, houve 100% de concordância do padrão em 21 das 25 amostras, com desvios observados em amostras homogêneas de baixa positividade, nucleolares de baixa positividade e de membrana nuclear de baixa e alta positividade.

Concordância nos Resultados Qualitativos Dentro do Método

Amostra	Concordância do Método A (IC de 95%)	Concordância do Método B (IC de 95%)	Concordância do Método C (IC de 95%)
Homogêneo Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	76,7% (59,1 - 88,2%)
Homogêneo Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Homogêneo Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Nucleolar Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	96,7% (83,3 - 99,4%)
Nucleolar Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Nucleolar Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocôndria Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocondrial Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocondrial Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Membrana Nuclear Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Membrana Nuclear Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Membrana Nuclear Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Negativo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)

Concordância nos Resultados de Padrão Dentro do Método (Técnico 2)

Amostra	Concordância do Método A (IC de 95%)	Concordância do Método B (IC de 95%)	Concordância do Método C (IC de 95%)
Homogêneo Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	73,3% (55,6 - 85,8%)
Homogêneo Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Homogêneo Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Nucleolar Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	96,7% (83,3 - 99,4%)
Nucleolar Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Nucleolar Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocôndria Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocondrial Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocondrial Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Membrana Nuclear Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	86,67% (70,3 - 94,7%)
Membrana Nuclear Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Membrana Nuclear Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	96,7% (83,3 - 99,4%)
Pontos Nucleares Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)

Para a concordância entre os métodos, houve 100% de concordância qualitativa e de padrão entre o Método A e o Método B. No entanto, apenas 22 de 25 amostras mostraram 100% de concordância qualitativa nas comparações entre o Método B e o Método C, e entre o Método A e o Método C; as amostras discrepantes foram as de padrão homogêneo positivo baixo, nucleolar

positivo baixo e membrana nuclear positivo baixo. Além disso, apenas 21 de 25 amostras mostraram 100% de concordância de padrão nas comparações entre o Método B e o Método C, e entre o Método A e o Método C; as amostras discrepantes foram as de padrão homogêneo positivo baixo, nucleolar positivo baixo, membrana nuclear positivo baixo e membrana nuclear positivo alto.

Concordância de Resultado Qualitativo Entre Métodos

Amostra	Concordância entre o Método A e o Método B (CI de 95%)	Concordância entre o Método A e o Método C (CI de 95%)	Concordância entre o Método B e o Método C (CI de 95%)
Homogêneo Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	76,67% (59,1 - 88,2%)	76,67% (59,1 - 88,2%)
Homogêneo Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Homogêneo Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Salpicado Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Centrômero Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Nucleolar Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	96,67% (83,3 - 99,4%)	96,67% (83,3-99,4%)
Nucleolar Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Nucleolar Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocôndria Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocondrial Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Mitocondrial Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Membrana Nuclear Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	90% (74,4 - 96,5%)
Membrana Nuclear Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Membrana Nuclear Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Pontos Nucleares Alto Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Baixo Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)
Ribossômico Médio Positivo	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)	100% (88,7 - 100%)

Amostra	Concordância entre o Método A e o Método B (CI de 95%)	Concordância entre o Método A e o Método C (CI de 95%)	Concordância entre o Método B e o Método C (CI de 95%)
Ribossômico Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Negativo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

Concordância entre os Métodos quanto ao Resultado de Padrão

Amostra	Concordância entre o Método A e o Método B (CI de 95%)	Concordância entre o Método A e o Método C (CI de 95%)	Concordância entre o Método B e o Método C (CI de 95%)
Homogêneo Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	73,3% (55,6 – 85,9%)	73,3% (55,6 – 85,9%)
Homogêneo Médio Positivo	100% (88,65 – 100%)	100% (88,65 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Homogêneo Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Salpicado Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Salpicado Médio Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Salpicado Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centrômero Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centrômero Médio Positivo	100% (88,65 – 100%)	100% (88,65 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Centrômero Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleolar Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	96,7% (83,3 – 99,4%)	96,7% (83,3 – 99,4%)
Nucleolar Médio Positivo	100% (88,65 – 100%)	100% (88,65 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Nucleolar Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocôndria Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondrial Médio Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Mitocondrial Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana Nuclear Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	86,7% (70,3 – 94,7%)	86,7% (70,3 – 94,7%)
Membrana Nuclear Médio Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Membrana Nuclear Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	96,7% (83,3 – 99,4%)
Pontos Nucleares Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Pontos Nucleares Médio Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Pontos Nucleares Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribossômico Baixo Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribossômico Médio Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)
Ribossômico Alto Positivo	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)	100% (88,7 – 100%)

e. Estudo de Reprodutibilidade de Cinco Dias em Múltiplos Locais:

Uma amostra de baixa positividade (~1:40 de diluição final), uma amostra de positividade média (~1:160 – 1:320 de diluição final) e uma amostra de forte positividade ($\geq$ 1:640 de diluição final) foram identificadas para cada um dos seguintes padrões de ANA: Homogêneo, Manchado, Centromérico, Nucleolar, Pontos Nucleares, Membrana Nuclear, Citoplasmático (Ribossomal) e Citoplasmático (Mitocondrial). Uma amostra negativa para ANA também foi incluída, totalizando 25 amostras no grupo. Essas 25 amostras foram analisadas (diluição de triagem 1:40) em triplicata, duas vezes por dia, em cinco dias diferentes e três laboratórios diferentes, produzindo 30 resultados por amostra, por local. As lâminas foram interpretadas pelos três métodos. Em cada local, o Método A e o Método B também foram interpretados por dois técnicos de laboratório separados. Os resultados da concordância qualitativa e da concordância de padrão são mostrados abaixo:

i. Concordância Geral dos Resultados Qualitativos

- a. Dentro do Método:** A concordância qualitativa dentro do método para o Método A e o Método B foi de 100% para todos os três locais e todos os técnicos. Para o Método C, houve 100% de concordância para 24 das 25 amostras em todos os locais e com todos os técnicos: uma amostra de membrana nuclear com baixa positividade foi a única amostra discrepante no local 2.
- b. Entre os Métodos:** Houve 100% de concordância qualitativa para todas as 25 amostras entre o Método A versus o Método B e o Método A versus o Método C. Notavelmente, houve 100% de concordância qualitativa entre o Método B versus o Método C para 24 das 25 amostras, sendo que a amostra de membrana nuclear com baixa positividade foi um valor discrepante no local 2.

ii. Concordância do Resultado do Padrão:

- a. Dentro do Método:** A concordância do padrão dentro do método para o Método A e Método B foi de 100% em todos os três locais e para todos os técnicos. Para o Método C, houve concordância de 100% em 24 de 25 amostras, sendo a amostra de centromero de intensidade média a única fora do padrão.
- b. Entre os Métodos:** Houve concordância de 100% nos padrões para todas as 25 amostras entre o Método A e o Método B, em todos os locais e com todos os técnicos. Para o Método A vs Método C, houve duas amostras discrepantes: uma amostra de centromero de intensidade média no Local 1 e uma amostra de membrana nuclear de intensidade baixa no Local 2. Da mesma forma, para o Método B vs Método C, houve duas amostras discrepantes: uma amostra de centromero média no Local 1 e uma amostra de membrana nuclear baixa no Local 2.

f. Estudo de Interferência:

Uma amostra de baixa positividade (~1:160 a 1:320 de término) e uma amostra de forte positividade ($\geq$ 1:640 de término) foram identificadas para cada um dos seguintes oito padrões de ANA: Homogêneo, Pontilhado, Centromérico, Nucleolar, Pontos Nucleares, Membrana Nuclear, Citoplasmático (Ribossomal) e Citoplasmático (Mitocondrial). Uma amostra negativa de ANA também foi incluída, totalizando 17 amostras no grupo. Essas 17 amostras foram adicionadas com duas concentrações diferentes (baixa e alta) de doze possíveis interferentes, conforme detalhado na tabela abaixo. Todas as amostras foram avaliadas no ANA HEP-2 e interpretadas pelos três métodos mencionados acima.

Interferente	Concentrações de Teste de Interferente	
	Baixa	Alta
Intralipídios	3 mg/mL	7,50 mg/ml
Colesterol	1,5 mg/mL	2,5 mg/mL
Albumina	35 mg/1mL	50 mg/1mL
Ibuprofeno	0,5 mg/mL	2 mg/mL
Prednisona	0,2 mg/mL	0,8 mg/mL
Hidroxicloroquina	0,006 mg/mL	0,2 mg/mL
Sinvastatina	4 ug/mL	20 ug/mL
Ciclofosfamida	1 mg/mL	4 mg/ml
Fator Reumatóide	200 U/ml	400 U/mL
Hemoglobina	100 mg/ml	200 mg/mL
Triglicerídeos	1,5 mg/mL	5 mg/ml
Bilirrubina	0,01 mg/mL	0,15 mg/mL

Resultados: Para os métodos A e B, nem a concordância qualitativa nem o padrão resultante foram afetados pela adição dos possíveis interferentes. O método C gerou um resultado incerto em uma amostra de membrana nuclear de baixo positivo quando foi adicionada Albumina. Portanto, pode-se concluir que os resultados do ANA HEP-2 não estão em risco significativo de resultados errôneos devido à presença dos interferentes testados.

Um segundo estudo de interferência foi conduzido, focando no ponto de corte do ensaio e incluindo alguns interferentes potenciais adicionais. Amostras foram selecionadas para cada um dos oito padrões de ANA (Homogêneo, Salpicado, Centromérico, Nucleolar, Pontos Nucleares, Membrana Nuclear, Citoplasmático (Ribossômico) e Citoplasmático (Mitocondrial)) que apresentaram um título de ponto final de 1:40-1:80 (próximo ao ponto de corte do ensaio), além de uma

amostra negativa para ANA. Essas nove amostras foram adicionadas a duas concentrações diferentes dos interferentes, conforme listado abaixo.

Interferente	Concentrações de Teste de Interferente	
	Baixa	Alta
Bilirrubina (não conjugada)	0,02 mg/mL	0,15 mg/mL
Colesterol (total)	1,5 mg / mL	2,2 mg/mL
Triglicerídeos	1 mg/mL	2,5 mg/mL
Albumina	35 mg/mL	52 mg/mL
Hemoglobina	100 mg/ml	200 mg/mL
Intralipídios	2,0 mg/ml	20 mg/mL
Fator Reumatóide	200 U/ml	400 mg/mL
Ciclofosfamida	0,183 mg/mL	0,549 mg/mL
Ibuprofeno	0,073 mg/ml	0,219 mg/ml
Hidroxicloroquina	0,006 mg/mL	0,024 mg/mL
Sinvastatina	0,0000277 mg/mL	0,000083 mg/ml
Prednisona	0,000033 mg/mL	0,000099 mg/mL
Azatioprina	0,00086 mg/mL	0,00258 mg/mL
Diltiazem	0,0003 mg/mL	0,0009 mg/mL
Micofenolato de mofetila	0,012 mg/mL	0,048 mg/mL
Rituximabe	0,5 mg/mL	2 mg/mL
Belimumabe	2 mg/mL	8 mg/mL

Resultados: Novamente, nem a concordância qualitativa nem o padrão resultante foram afetados pela adição dos possíveis interferentes, independentemente do método de interpretação. Portanto, pode-se concluir que os resultados do ANA HEP-2 não estão em risco significativo de resultados errôneos devido à presença dos interferentes testados.

2. Design do Estudo de Desempenho Clínico:

Um total de 380* amostras clinicamente caracterizadas foram adquiridas conforme descrito na tabela abaixo. Essas 380 amostras foram fracionadas e enviadas para três laboratórios diferentes para avaliação pelo ANA HEP-2. Todos os três laboratórios avaliaram as lâminas pelos três métodos mencionados acima. Além disso, a interpretação das lâminas pelos Métodos A e B foi repetida duas vezes em cada local clínico por dois técnicos de laboratório diferentes. Em cada local clínico, as 380 amostras foram inicialmente triadas em diluição de 1:40 para uma avaliação do status qualitativo das 380 amostras. Qualquer amostra que gerasse um resultado positivo na diluição de triagem de 1:40 (para qualquer um dos três métodos de interpretação) foi então titulada e interpretada por todos os três métodos novamente para determinar o término, bem como o padrão. * **OBSERVAÇÃO: O local dois testou um número menor de amostras de Celíaca e Vasculite, resultando em um total de 350 amostras no local dois.**

Os resultados foram utilizados para avaliar a especificidade clínica (potencial reatividade cruzada), sensibilidade clínica, concordância qualitativa entre métodos dentro dos locais, interpretação do Método C entre locais (ou seja, comparação entre o microscópio automatizado dIFine® e dIFine®), concordância do título de término e concordância de padrões.

Doenças Associadas ao ANA	n, Todos os Locais
<i>Doenças do Tecido Conjuntivo:</i>	
Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	40
Síndrome de Sjögren (SS)	30
Esclerodermia	20
Miosite autoimune (AM)	20
Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC)	20
CREST (Calcificação, Raynaud, Esôfago, Esclerodactila e Telangiectasia)	20
<i>Outras Doenças Autoimunes Associadas ao ANA</i>	
Hepatite Autoimune (HAI)	20
Lúpus Induzido por Medicamentos (LIM)	20
Total	190

Doenças Não Associadas ao ANA	n, Local 1 e Local 3	n, Local 2
<i>Outras Doenças Autoimunes:</i>		
Doença Celíaca	22	10
Vasculite associada a ANCA	28	10
Doença de Crohn	10	10
Artrite Reumatoide	30	30
Tireoidite Autoimune	30	30
Doença Inflamatória Intestinal (DII)	10	10
Colite Ulcerativa	10	10
<i>Outras Doenças:</i>		
Neoplasia/Câncer	20	20
Fibromialgia	10	10
Doenças Infecciosas	10	10
Total	190	160

3. Sensibilidade Clínica e Especificidade Clínica:

A sensibilidade clínica foi calculada em cada local para o lúpus eritematoso sistêmico (SLE) separadamente, e para a combinação das doenças do tecido conjuntivo (CTD: SLE + SS + esclerodermia + CREST + MCTD + AM) mais outras doenças associadas ao ANA (hepatite autoimune + lúpus induzido por medicamentos). A especificidade foi calculada utilizando a população total de controle das doenças não associadas ao ANA.

a. Desempenho Clínico no Local 1

Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica			% Sensibilidade (CI de 95%)	% Sensibilidade 95% de CI	% Especificidade (CI de 95%)
			SLE (n = 40)	Doenças do Tecido Conjuntivo (CTD) + Doenças Associadas ao ANA (n = 190)	Doenças Não Associadas ao ANA (n = 190)
Local 1	Método A	Técnico A	52,5% (37,5 - 67,1%)	53,2% (46,1 - 60,1%)	75,8% (69,2 - 81,3%)
	Método A	Técnico B	57,5% (42,2 - 71,5%)	60,0% (52,9 - 66,7%)	73,2% (66,4 - 79,0%)
	Método B	Técnico A	55,0% (39,8 - 69,3%)	54,7% (47,6 - 61,6%)	75,8% (69,2 - 81,3%)
	Método B	Técnico B	52,5% (37,5 - 67,1%)	57,9% (50,8 - 64,7%)	74,2% (67,6 - 79,9%)
	Método C	dIFine	55,0% (39,8 - 69,3%)	57,4% (50,3 - 64,2%)	67,4% (60,4 - 73,6%)

b. Desempenho Clínico no Local 2

Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica			% Sensibilidade (CI de 95%)	% Sensibilidade (CI de 95%)	% Especificidade (CI de 95%)
			SLE (n = 40)	Doenças do Tecido Conjuntivo (CTD) + Doenças Associadas ao ANA (n = 190)	Doenças Não Associadas ao ANA (n = 160)
Local 2	Método A	Técnico A	50,0% (35,2 - 64,8%)	51,6% (44,5 - 58,6%)	83,1% (76,6 - 88,1%)
	Método A	Técnico B	55,0% (39,8 - 69,3%)	56,3% (49,2 - 63,2%)	80,0% (73,1 - 85,5%)
	Método B	Técnico A	52,5% (37,5 - 67,1%)	56,8% (49,7 - 63,7%)	81,3% (74,5 - 86,5%)
	Método B	Técnico B	55,0% (39,8 - 69,3%)	58,4% (51,3 - 65,2%)	80,6% (73,8 - 86,0%)
	Método C	dIFine	52,5% (37,5 - 67,1%)	55,8% (48,7 - 62,7%)	74,4% (67,1 - 80,5%)

c. Desempenho Clínico no Local 3

Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica			% Sensibilidade (CI de 95%)	% Sensibilidade (CI de 95%)	% Especificidade (CI de 95%)
			SLE (n = 40)	Doenças do Tecido Conjuntivo (CTD) + Doenças Associadas ao ANA (n = 190)	Doenças Não Associadas ao ANA (n = 190)
Local 3	Método A	Técnico A	47,5% (32,9 - 62,5%)	53,2% (46,1 - 60,1%)	76,8% (70,4 - 82,3%)
	Método A	Técnico B	55,0% (39,8 - 69,3%)	57,4% (50,3 - 64,2%)	74,2% (67,6 - 79,9%)

	Método B	Técnico A	45,0% (30,7 - 60,2%)	52,6% (45,6 - 59,6%)	78,9% (72,6 - 84,1%)
	Método B	Técnico B	57,5% (42,2 - 71,5%)	56,3% (49,2 - 63,2%)	74,7% (68,1% - 80,4%)
	Método C	dIFine	55,0% (39,8 - 69,3%)	54,2% (47,1 - 61,1%)	67,5% (63,1 - 76,1%)

A sensibilidade na coorte de LES variou de 45,0% a 57,5% em todos os três métodos, em todos os três locais. A prevalência de ANA observada nesta coorte de LES pareceu ser mais baixa do que o normalmente observado. De acordo com os reumatologistas que ajudaram na coleta dessas amostras, isso pode ser devido ao fato de que a maioria desses pacientes estava em tratamentos imunossupressores fortes e apresentava baixa atividade da doença ou estava em remissão. Essa baixa prevalência de ANA observada foi ainda confirmada usando outro produto comercial de IFA ANA HEP-2 aprovado pela FDA. A sensibilidade clínica entre o coorte de Doenças do Tecido Conjuntivo (CTD) + Doenças Associadas a ANA variou de 51,6% a 60,0% entre todos os três métodos, em todos os três locais. A especificidade clínica entre o coorte de Doenças Não Associadas a ANA variou de 67,4% a 83,1% entre todos os três métodos, em todos os três locais. Se for feita uma média de todos os métodos de interpretação em todos os três locais, a sensibilidade clínica no grupo de LES foi de 53,2%, a sensibilidade clínica no grupo de CTD + Doenças Associadas a ANA foi de 55,7% e a especificidade clínica no grupo de Doenças Não Associadas a ANA foi de 75,9%.

4. Frequência de ANA Detectada por Grupo de Doença:

Além da determinação positiva ou negativa, o Método C pode resultar em uma chamada de "Incerto" se o dIFine® não conseguir identificar o resultado como claramente positivo ou claramente negativo. Resultados incertos foram considerados negativos para este resumo abaixo (ou seja, **não** foram considerados positivos). A tabela abaixo mostra a porcentagem de cada categoria de doença que foi chamada qualitativamente positiva por cada técnico em cada local por cada método. Esta tabela resume a frequência de ANA encontrada em cada categoria de doença e a consistência dessa determinação de ANA entre os métodos.

Local 1

Doenças	Técnico A		Técnico B		Método C
	Método A	Método B	Método A	Método B	
Doenças Associadas ao ANA					
SLE	52,5%	55,0%	57,5%	52,5%	55,0%
Sjögren	50,0%	50,0%	56,7%	53,3%	53,3%
Esclerodermia	75,0%	70,0%	80,0%	80,0%	80,0%
Miosite autoimune	50,0%	55,0%	65,0%	60,0%	60,0%
MCTD	40,0%	40,0%	50,0%	55,0%	50,0%
CREST (Calcificação, Raynaud, Esôfago, Esclerodáctila e Telangiectasia)	80,0%	80,0%	80,0%	80,0%	80,0%
Hepatite Autoimune	45,0%	50,0%	60,0%	55,0%	50,0%
Lúpus Induzido por Medicamentos	35,0%	40,0%	35,0%	35,0%	35,0%
Doenças Não Associadas ao ANA					
Tireoidite Autoimune	23,3%	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%
Câncer	15,0%	15,0%	20,0%	20,0%	15,0%
Doença Celíaca	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%
Doença de Crohn	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%
Fibromialgia	30,0%	40,0%	50,0%	40,0%	40,0%
Doença Infecciosa	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Doença Inflamatória Intestinal	40,0%	30,0%	40,0%	20,0%	20,0%
Artrite Reumatoide	16,7%	23,3%	23,3%	23,3%	16,7%
Colite Ulcerativa	30,0%	30,0%	50,0%	60,0%	40,0%
Vasculite	17,9%	14,3%	14,3%	14,3%	14,3%

Local 2:

Doenças	Técnico A		Técnico B		Método C
	Método A	Método B	Método A	Método B	
Doenças Associadas ao ANA					
SLE	50,0%	52,5%	55,0%	55,0%	52,5%
Sjögren	53,3%	53,3%	56,7%	56,7%	53,3%
Esclerodermia	75,0%	80,0%	75,0%	80,0%	80,0%
Miosite autoimune	55,0%	65,0%	65,0%	70,0%	60,0%
MCTD	30,0%	45,0%	35,0%	45,0%	45,0%
CREST (Calcificação, Raynaud, Esôfago, Esclerodactila e Telangiectasia)	75,0%	80,0%	80,0%	80,0%	75,0%
Hepatite Autoimune	40,0%	45,0%	45,0%	45,0%	45,0%
Lúpus Induzido por Medicamentos	35,0%	40,0%	40,0%	40,0%	40,0%
Doenças Não Associadas ao ANA					
Tireoidite Autoimune	13,3%	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%
Câncer	10,0%	15,0%	15,0%	15,0%	15,0%
Doença Celíaca	20,0%	30,0%	20,0%	30,0%	30,0%
Doença de Crohn	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%
Fibromialgia	40,0%	40,0%	40,0%	40,0%	40,0%
Doença Infecciosa	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Doença Inflamatória Intestinal	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%
Artrite Reumatoide	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%
Colite Ulcerativa	40,0%	40,0%	60,0%	40,0%	40,0%
Vasculite	0,0%	0,0%	10,0%	10,0%	0,0%

Local 3

Doenças	Técnico A		Técnico B		Método C
	Método A	Método B	Método A	Método B	
Doenças Associadas ao ANA					
SLE	47,5%	45,0%	55,0%	57,5%	52,5%
Sjögren	46,7%	50,0%	60,0%	53,3%	50,0%
Esclerodermia	75,0%	75,0%	80,0%	75,0%	75,0%
Miosite autoimune	60,0%	60,0%	60,0%	60,0%	60,0%
MCTD	45,0%	45,0%	45,0%	45,0%	45,0%
CREST (Calcificação, Raynaud, Esôfago, Esclerodactila e Telangiectasia)	80,0%	80,0%	75,0%	75,0%	75,0%
Hepatite Autoimune	45,0%	40,0%	50,0%	50,0%	45,0%
Lúpus Induzido por Medicamentos	35,0%	35,0%	35,0%	35,0%	35,0%
Doenças Não Associadas ao ANA					
Tireoidite Autoimune	16,7%	13,3%	20,0%	16,7%	16,7%
Câncer	20,0%	20,0%	20,0%	25,0%	15,0%
Doença Celíaca	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%	45,5%
Doença de Crohn	30,0%	20,0%	30,0%	30,0%	30,0%
Fibromialgia	40,0%	40,0%	50,0%	50,0%	40,0%
Doença Infecciosa	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Doença Inflamatória Intestinal	30,0%	30,0%	30,0%	30,0%	20,0%
Artrite Reumatoide	23,3%	16,7%	26,7%	20,0%	16,7%
Colite Ulcerativa	40,0%	40,0%	60,0%	60,0%	40,0%
Vasculite	10,7%	10,7%	10,7%	14,3%	14,3%

A frequência de ANA detectada no grupo de Doença Celíaca pareceu mais alta do que o esperado. Há literatura que apoia o aumento de ANA em pacientes com doença celíaca (39). Além disso, essas amostras foram testadas em outro produto comercial de ANA HEP-2 aprovado pelo FDA e o ANA foi confirmado nesse produto.

5. Comparações dos Métodos de Interpretação

Foram testadas 350 amostras clínicas em todos os três locais clínicos. Houve 30 amostras adicionais de doença celíaca e vasculite caracterizadas clinicamente que foram testadas no local um e no local três. Finalmente, houve 12 amostras adicionais coletadas retrospectivamente que exibiram o padrão de membrana nuclear ou pontos nucleares e que foram testadas nos locais um e três. Com essas 392 amostras, houve um total de 2268 instâncias em que foi possível comparar os resultados do Método A com o Método B, do Método A com o Método C e do Método B com o Método C. Um resumo dessas comparações qualitativas aparece nas tabelas abaixo:

a. Comparações dos Métodos de Interpretação

Método A vs Método B		Concordância de Amostras Positivas (CI de 95%)	Concordância de Amostras Negativas (CI de 95%)	Concordância Total de Amostras (CI de 95%)
Local 1	Técnico A	95,6% (152/159) (91,2 - 97,9%)	95,7% (223/233) (92,3 - 97,7%)	95,7% (375/392) (93,2 - 97,3%)
	Técnico B	94,9% (168/177) (90,6 - 97,3%)	98,6% (212/215) (95,9 - 99,5%)	96,9% (380/392) (94,7 - 98,2%)
Local 2	Técnico A	99,2% (124/125) (95,6 - 99,9%)	93,8% (211/225) (89,8 - 96,3%)	95,7% (335/350) (93,1 - 97,4%)
	Técnico B	98,6% (137/139) (94,9 - 99,6%)	97,6% (206/211) (94,6 - 98,95%)	98,0% (343/350) (95,9 - 99,0%)
Local 3	Técnico A	95,5% (148/155) (90,9 - 97,8%)	98,7% (234/237) (96,4 - 99,65%)	97,5% (382/392) (95,4 - 98,6%)
	Técnico B	95,9% (162/169) (91,7 - 97,9%)	97,8% (218/223) (94,9 - 99,0%)	96,9% (380/392) (94,7 - 98,2%)

b. Concordância Qualitativa Combinada para Método A vs Método B Todos os Locais/Todos os Técnicos

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

Concordância Percentual Positiva = 96,43% (891 / 924)

Concordância Percentual Negativa = 97,02% (1304 / 1344)

Concordância Percentual Total = 96,78% (2195 / 2268)

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

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

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

c. Comparação Qualitativa Método A vs Método C

Como o Método C produziu resultados incertos para muitas amostras, a concordância percentual positiva e negativa foi calculada considerando ambos os cenários aplicáveis:

Resultados Incertos Contabilizados como Positivos

Método A vs Método C		Concordância de Amostras Positivas (CI de 95%)	Concordância de Amostras Negativas (CI de 95%)	Concordância Total de Amostras (CI de 95%)
Local 1	Técnico A	97,5% (155/159) (93,7 - 99,0%)	80,3% (187/233) (74,7 - 84,9%)	87,2% (342/392) (83,6 - 90,2%)
	Técnico B	98,3% (174/177) (95,1 - 99,4%)	87,4% (188/215) (82,4 - 91,2%)	92,4% (362/392) (89,3 - 94,6%)
Local 2	Técnico A	100% (125/125) (97,0 - 100,0%)	85,3% (192/225) (80,1 - 89,4%)	90,6% (317/350) (87,1 - 93,2%)
	Técnico B	100% (139/139) (97,3 - 100,0%)	91,0% (192/211) (86,4 - 94,2%)	94,6% (331/350) (91,7 - 96,5%)
Local 3	Técnico A	100% (155/155) (97,6 - 100,0%)	87% (206/237) (82,0 - 90,7%)	92,1% (361/392) (88,9 - 94,4%)
	Técnico B	98,8% (167/169) (95,8 - 99,7%)	91,9% (205/223) (87,6 - 94,8%)	94,9% (372/392) (92,3 - 96,7%)

d. Resultados para o Método A vs Método C em todos os locais e todos os técnicos combinados apresentados abaixo:

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

Percentual de Concordância Positiva: 99,03 % (915/924)

IC de 95%: 98,39 - 99,55%

Percentual de Concordância Negativa: 87,05 % (1170/1344)

IC de 95%: 85,15 - 88,74%

Percentual Total de Concordância: 91,93 % (2085/2268)

IC de 95%: 90,74 - 92,98%

Incerto Contado como Negativo

Método A vs Método C		Concordância de Amostras Positivas (CI de 95%)	Concordância de Amostras Negativas (CI de 95%)	Concordância Total de Amostras (CI de 95%)
Local 1	Técnico A	93,1% (148/159) (88,0 - 96,1%)	94,0% (219/233) (90,2 - 96,4%)	93,6% (367/392) (90,8 - 96,5%)
	Técnico B	90,4% (160/177) (85,2 - 93,9%)	99,1% (213/215) (96,7 - 99,7%)	95,2% (373/392) (92,6 - 96,9%)
Local 2	Técnico A	99,2% (124/125) (95,1 - 99,9%)	94,7% (213/225) (90,9 - 96,9%)	96,3% (337/350) (93,8 - 97,8%)
	Técnico B	95,0% (132/139) (89,9 - 97,5%)	98,1% (207/211) (95,2 - 99,3%)	96,9% (339/350) (94,5 - 98,2%)
Local 3	Técnico A	96,1% (149/155) (91,8 - 98,2%)	97,1% (230/237) (94,4 - 98,1%)	96,7% (379/392) (94,4 - 98,1%)
	Técnico B	90,5% (153/169) (85,2 - 94,1%)	98,7% (220/223) (96,1 - 99,5%)	95,2% (373/392) (92,6 - 96,9%)

e. Resultados para o Método A vs Método C em todos os locais e todos os técnicos combinados apresentados abaixo:

		Método A	
		Positivo	Negativo
Método C	Positivo	866	42
	Negativo	58	1.302

Concordância Percentual Positiva: 93,72% (866/924) 95% IC: 91,97 - 95,11%

Concordância Percentual Negativa: 96,88% (1302/1344) 95% IC: 95,80 - 97,68%

Concordância Percentual Total: 95,59% (2168/2268) 95% IC: 94,67 - 96,36%

f. Comparação Qualitativa Método B vs Método C

Como o Método C pode gerar um resultado incerto (UNC) além de um resultado qualitativo positivo ou negativo, a concordância entre os métodos foi calculada considerando as amostras UNC como positivas e depois como negativas:

UNC considerado como positivo para cada local e cada técnico.

Método B vs Método C		Concordância de Amostras Positivas (CI de 95%)	Concordância de Amostras Negativas (CI de 95%)	Concordância Total de Amostras (CI de 95%)
Local 1	Técnico A	100,0% (162/162) (97,7 - 100,0%)	83,0% (191/230) (77,7 - 87,3%)	90,1% (353/392) (86,7 - 92,7%)
	Técnico B	99,4% (170/171) (96,8 - 99,9%)	86,4% (191/221) (81,3 - 90,3%)	91,8% (360/392) (88,7 - 94,2%)
Local 2	Técnico A	100,0% (138/138) (97,3 - 100,0%)	90,6% (192/212) (85,9 - 93,8%)	94,3% (330/350) (91,3 - 96,3%)
	Técnico B	100,0% (142/142) (97,4 - 100,0%)	92,3% (192/208) (87,9 - 95,2%)	95,4% (334/350) (92,7 - 97,2%)
Local 3	Técnico A	99,3% (150/151) (96,3 - 99,9%)	85,5% (206/241) (80,5 - 89,4%)	89,9% (356/392) (86,5 - 92,5%)
	Técnico B	99,4% (166/167) (96,7 - 99,9%)	91,6% (206/225) (87,2 - 94,5%)	94,9% (372/392) (92,3 - 96,7%)

Concordância Qualitativa Combinada Entre o Método B e o Método C para Todos os Locais/Todos os Técnicos (UNC como Positivos):

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

Concordância Percentual Positiva: 99,7 % (928/931)

IC de 95%: 99,1 – 99,9%

Concordância Percentual Negativa: 88,0 % (1177/1337)

IC de 95%: 86,2 – 89,7%

Concordância Percentual Total: 92,8% (2105/2268)

IC de 95%: 91,7 – 93,8%

UNC Considerado como Negativo para Cada Local e Cada Técnico

Método B vs Método C		Concordância de Amostras Positivas (CI de 95%)	Concordância de Amostras Negativas (CI de 95%)	Concordância Total de Amostras (CI de 95%)
Local 1	Técnico A	95,7% (155/162) (91,4 – 97,9%)	97,0% (223/230)(93,9 – 98,5%)	96,4% (378/392) (94,1 – 97,9%)
	Técnico B	94,2% (161/171) (89,6 – 96,8%)	99,6% (220/221) (97,5 – 99,9%)	97,2% (381/392) (95,1 – 98,4%)
Local 2	Técnico A	98,6% (136/138) (94,9 – 99,60%)	100,0% (212/212) (98,2 – 100,0%)	99,4% (348/350) (97,9 – 99,8%)
	Técnico B	95,8% (136/142) (91,1 – 98,1%)	100,00% (208/208) (98,2 – 100,0%)	98,3% (344/350) (96,3 – 99,2%)
Local 3	Técnico A	98,0% (148/151) (94,3 – 99,3%)	96,7% (233/241) (93,6 – 98,3%)	97,2% (381/392) (95,1 – 98,4%)
	Técnico B	92,8% (155/167) (87,9 – 95,8%)	99,56% (224/225) (97,5 – 99,9%)	96,68% (379/392) (94,4 – 98,1%)

Concordância Qualitativa Combinada Entre o Método B e o Método C para Todos os Locais/Todos os Técnicos (UNC como Negativos):

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

Concordância Percentual Positiva: 95,7% (891/931)

IC de 95%: 94,2 – 96,8%

Concordância Percentual Negativa: 98,7% (1320/1337)

IC de 95%: 98,0 – 99,2%

Concordância Percentual Total: 97,5% (2211/2268)

IC de 95%: 96,8 – 98,1%

Em todos os casos, a concordância qualitativa entre os métodos de interpretação é bastante alta, indicando que todos os três métodos (microscópio manual, leitura digital do scanner dIFine® e chamada automatizada do scanner dIFine®) correlacionam-se bem entre si e apresentaram poucas discrepâncias.

Além disso, as determinações de padrão foram correlacionadas entre os diferentes métodos de interpretação; amostras que não apresentaram padrão (ou seja, 'negativo') ou amostras que geraram resultados incertos (ou seja, 'UNC') foram incluídas nas análises de concordância de padrão entre os diferentes métodos de interpretação, conforme apresentado na tabela abaixo:

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

Combinando os três locais resultou na seguinte concordância de padrão:

	Número de Concordância de Padrão/Total de Amostras	Concordância Percentual (%)	IC de 95%
Método A vs Método B	2221/2268	98,0	97,3-98,4%
Método A vs Método C	1958/2268	86,3	84,9-87,7%
Método B vs Método C	1962/2268	86,5	85,0-87,9%

As amostras que foram positivas por qualquer método em cada local foram tituladas até o ponto de término e interpretadas por todos os três métodos. As amostras que foram qualitativamente positivas por todos os três métodos em qualquer local poderiam ser comparadas para a concordância do ponto de término. No local um, foram 156 amostras tituladas até o ponto de término. No local dois, foram 133 amostras tituladas até o ponto de término, e no local três, foram 154 amostras tituladas até o ponto de término. Considerando que havia dois técnicos em cada local para ler pelos métodos A e B, isso resultou em 886 comparações nas determinações do ponto de término entre os Métodos A versus Método B, Método A versus Método C e Método B versus Método C. O número de vezes em que essas determinações de ponto de término coincidiram, com uma variação de mais ou menos um ou dois diluições, está ilustrado na tabela abaixo:

Concordância de Título de Endpoint Combinado (Todos os Locais/Todos os Técnicos)			
Interpretação	[± 1 diluição]/Total de Amostras	Concordância Percentual (%)	IC de 95%
Método A vs Método B	880/886	99,32	98,53 - 99,69%
Método A vs Método C	879/886	99,21	98,38 - 99,62%
Método B vs Método C	880/886	99,32	98,53 - 99,69%

Esta comparação mostra que a determinação do título de endpoint entre os métodos é alta e houve muito poucas instâncias em que o título de endpoint determinado por um método resultou em um título de endpoint que fosse maior que ± uma diluição pelo outro método.

Tomando-se os dados em conjunto, esses resultados demonstram que o padrão de chamada automática identificado pelo diFine® (Método C) concorda com o Método A e/ou o Método B (métodos de identificação de padrão não automatizados) para a maioria das amostras. No entanto, ainda é responsabilidade do operador treinado tomar a decisão final.

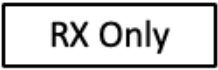
REFERÊNCIAS

1. Barnett EV: Mayo. Clin. Proc. 44:645, 1969.
2. Burnham TK, Fine G, Neblett TR: Ann. Int. Med. 63:9, 1966.
3. Casals SP, Friou GJ, Meyers LL: Arthritis Rheum. 7:379, 1964.
4. Condemni JJ, Barnett EV, Atwater EC, et al: Arthritis Rheum. 8:1080, 1965.
5. Dorsch CA, Gibbs CV, Stevens MB, Shelman LE: Ann. Rheum. Dis. 28:313, 1969.

6. Dubois EL: J. Rheum. 2:204, 1975.
7. Alarcon-Segovia D, Fishbein E: J. Rheum. 2:167, 1975.
8. Friou GJ: J. Clin. Invest. 36:890, 1957.
9. Friou GJ, Finch SC, Detre KD: J. Immunol. 80:324, 1958.
10. Coons AH, Creech H, Jones RN, *et al*: J. Immunol. 80:324, 1958.
11. Barnett EV, North AF, Condemni JJ, Jacox RF, Vaughn JH: Ann. Intern. Med. 63:100, 1965.
12. Lachman PJ, Kunkel HG: Lancet 2:436, 1961.
13. Friou GJ: Arthritis Rheum. 7:161, 1964.
14. Beck JS: Scot. Med. J. 8:373, 1963.
15. Anderson JR, Gray KG, Beck JS, *et al*: Ann. Rheum. Dis. 21:360, 1962.
16. Luciano A, Rothfield NF: Ann. Rheum. Dis. 32:337, 1973.
17. Harmon C, Deng JS, Peebles CL, *et al*: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. Arthritis Rheum. 27:166-173, 1984.
18. Peebles CL, Molden DP, Klipple GL, Nakamura RM: An antibody to histone H3 which produces a variable large speckled (VLS) immunofluorescent pattern on mouse kidney. Arthritis Rheum. 27:S44, 1984.
19. Ritchie RF: Antinuclear antibodies: Their frequency and diagnostic association. N. Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
20. Deng JS, Sontheimer RD, Gilliam JN: Relationships between antinuclear and anti-Ro/SS-A antibodies in subacute cutaneous lupus erythematosus. J. Am. Acad. Dermatol. 11:494-499, 1984.
21. Meyer O, Hauptmann G, Tappeiner G, Ochs HD, Mascart-Lemone F: Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro(SSA) antibodies. Clin. Exp. Immunol. 62:678-684, 1985.
22. Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti-Ro(SS-A) antibodies. Arthritis Rheum. 26:1279-1282, 1983.
23. Speirs C, Fielder AHL, Chapel H, *et al*: Complement system protein C4 and susceptibility to hydralazine-induced systemic lupus erythematosus. Lancet 1:922-924, 1989.
24. Watson RM, Scheel JN, Petri M, *et al*: Neonatal lupus erythematosus syndrome: Analysis of C4 allotypes and C4 genes in 18 families. Medicine 71:84-95, 1992.
25. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C: Arthritis Rheum. Vol. 23 No. 6:617, 1980.
26. Hall AP, Bardawil WA, Bayles TB, *et al*: N. Engl. J. Med. 263:769, 1960.
27. Pollack VE: N. Engl. J. Med. 271:165, 1964.
28. Raskin J: Arch. Derm. 89:569, 1964.
29. Beck JS, Anderson JR, Gray KG, Rowell NR: Lancet 2:1188, 1963.
30. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second edition; Approved Standard (1984). Publicado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards.
31. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
32. Beck JS: Lancet, 1:1203, 1961.
33. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, *et al*: Am. J. Med. 52:48, 1972.
34. Burnham TK, Neblett TR, Fine G: Am. J. Clin. Path. 50:683, 1968.
35. Textbook of Immunopathology, Vol II, P Miescher e 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 - 4th Edition (2010). Documento CLSI 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. Junho de 2008; 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 Out;8(2):97-101. doi: 10.1016/0162-3109(84)90048-1. PMID: 6334672.

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos **podem** ter sido usados na rotulagem deste produto.

Símbolo	Descrição	Símbolo	Descrição
	Fabricante		Manter longe da luz solar
	Dispositivo médico diagnóstico para uso <i>in vitro</i>		Conformidade com a Diretiva 98/79
	Número do catálogo		Vidro de cobertura
	Suficiente para <i>n</i> testes		Lâmina de Substrato
	Código do lote		Tampão PBS
	Utilizado por		Meios de Montagem
	Limitações de Temperatura de Armazenamento		Conjugado
	Somente para Uso com Receita Médica		ANA (homogênea) Controle Positivo
	Consulte as instruções eletrônicas de uso		Controle Negativo
	Armazenar na posição vertical		Fabricado nos EUA



ZEUS Scientific

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

Ligação gratuita (EUA): 1-800-286-2111, Opção 2

Internacional: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Site: www.zeusscientific.com

Para atendimento ao cliente nos EUA, entre em contato com seu distribuidor local.

Para suporte técnico dos EUA, entre em contato com a ZEUS Scientific, ligue gratuitamente ou

escreva um e-mail para: support@zeusscientific.com.

Para consultas de Atendimento ao Cliente e Suporte Técnico fora dos EUA, entre em contato com seu distribuidor local.

© 2019 ZEUS Scientific. Todos os direitos reservados.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands