

Rekomendacje EFLM, EASI oraz ICAP: Detekcja przeciwciał przeciwwjądrowych Publikacja EFLM

Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP EFLM Paper

Carolien Bonroy^{1,2}, Martine Vercammen^{3,4}, Walter Fierz⁵, Luis E.C. Andrade^{6,7}, Lieve Van Hoovels^{8,9}, Maria Infantino¹⁰, Marvin J. Fritzler¹¹, Dimitrios Bogdanos¹², Ana Kozmar¹³, Benoit Nespola¹⁴, Sylvia Broeders¹⁵, Dina Patel¹⁶, Manfred Herold¹⁷, Bing Zheng¹⁸, Eric Y.T. Chan¹⁹, Raivo Uibo²⁰, Anna-Majja Haapala²¹, Lucile Musset²², Ulrich Sack²³, Gabor Nagy²⁴, Tatjana Sundic²⁵, Katarzyna Fischer²⁶, Maria-José Rego de Sousa²⁷, Maria Luisa Vargas²⁸, Catharina Eriksson²⁹, Ingmar Heijnen³⁰, Ignacio García-De La Torre³¹, Orlando Gabriel Carballo^{32,33}, Minoru Satoh^{34,35}, Kyeong-Hee Kim³⁶, Edward K.L. Chan³⁷, Jan Damoiseaux³⁸, Marcos Lopez-Hoyos³⁹, Xavier Bossuyt^{9,40}, European Federation of Laboratory Medicine (EFLM) Working Group “Autoimmunity Testing”, the European Autoimmune Standardization Initiative (EASI) and International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns (ICAP)

¹Department of Diagnostic Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium

²Department of Laboratory Medicine, University Hospital Ghent, Ghent, Belgium

³Department of Laboratory Medicine, AZ Sint-Jan, Brugge, Belgium

⁴Research Group REIM, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

⁵Schweizerischer Verband der Diagnostikindustrie (SVDI-ASID), Bern, Switzerland

⁶Rheumatology Division, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

⁷Immunology Division, Fleury Medicine and Health Laboratories, Sao Paulo, Brazil

⁸Department of Laboratory Medicine, OLV Hospital, Aalst, Belgium

⁹Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium

¹⁰Immunology and Allergology Laboratory, S. Giovanni di Dio Hospital, Florence, Italy

¹¹Department of Medicine, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

¹²Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, University General Hospital of Larissa, Larissa, Greece

¹³Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

¹⁴Laboratory of Immunology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

¹⁵Quality of Laboratories, Sciensano, Ixelles, Belgium

¹⁶UK NEQAS Immunology, Immunochemistry & Allergy, Sheffield Teaching Hospitals, Sheffield, UK

¹⁷Department of Internal Medicine II, Rheumatology Laboratory, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

¹⁸Department of Laboratory Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, P.R. China

¹⁹Department of Pathology, Queen Mary Hospital, Hong Kong, P.R. China

²⁰Department of Immunology, Medical Faculty, University of Tartu, Tartu, Estonia

²¹Department of Immunology, Fimlab Laboratories, Tampere, Finland

²²Department of Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

²³Medical Faculty, Leipzig University, Leipzig, Germany

²⁴Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

²⁵Department of Immunology and Transfusion Medicine, Haugesund Hospital, Helse Fonna, Haugesund, Norway

²⁶Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

²⁷Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

²⁸Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

²⁹Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁰Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³¹Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³²Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³³Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁴Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁵Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁶Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁷Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁸Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

³⁹Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

⁴⁰Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

Received: 05.05.2024

Accepted: 12.05.2024

Published: 19.05.2024

DOI: 10.5604/01.3001.0054.6716

Corresponding author:

dr n. med. Katarzyna Fischer, Samodzielna Pracownia Diagnostyki Reumatologicznej, Wydział Medycyny i Stomatologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, 70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1, e-mail: katarzyna.fischer@pum.edu.pl

Cite the article as:

Bonroy C, Vercammen M, Fierz W, et al. Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP EFLM Paper. *Diagn Lab. 2024; 60(2): 38–83*



Open access

The content of the journal is available in Open Access formula which means free access to scientific data for researchers and readers.



Copyright

This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Licence

Some right reserved: Polish Society of Laboratory Diagnostics. Published by Index Copernicus Sp. z o.o.

²⁷Immunopathology and Autoimmunity Department, Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, Lisbon, Portugal

²⁸Immunology, Hospital Universitario de Badajoz, Badajoz, Spain

²⁹Department of Clinical Microbiology Section of Infection and Immunology, Umeå University, Umeå, Sweden

³⁰Immunology, Laboratory Medicine, University Hospital Basel, Basel, Switzerland

³¹Department of Immunology and Rheumatology, Hospital General de Occidente, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Mexico

³²Laboratory of Immunology, Hospital Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina

³³Department of Microbiology and Immunology, Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

³⁴Department of Human, Information and Life Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan

³⁵Department of Medicine, Kitakyushu Yahata-Higashi Hospital, Kitakyushu, Japan

³⁶Department of Laboratory Medicine, Dong-A University College of Medicine, Busan, Republic of Korea

³⁷Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, FL, USA

³⁸Central Diagnostic Laboratory, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands

³⁹Immunology Service, University Hospital Marques de Valdecilla-IDIVAL, University of Cantabria, Santander, Spain

⁴⁰Department of Laboratory Medicine, University Hospital Leuven, Leuven, Belgium

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Streszczenie

Cel: Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA; ang. *antinuclear antibodies*) odgrywają kluczową rolę w diagnostyce różnych chorób autoimmunizacyjnych. Zazwyczaj wykrywa się je za pomocą testu opartego na metodzie immunofluorescencji pośredniej (IFA; ang. *indirect immunofluorescence assay*) z użyciem komórek HEp-2 (HEp-2 IFA). Istnieje wiele zmiennych wpływających na wyniki testu HEp-2 IFA, takich jak subiektywna ocena wyników, rozcieńczenie surowicy, sposób produkcji substratu, parametry mikroskopu i zastosowany koniugat. W niektórych laboratoriach klinicznych stosowane są nowsze metody badania ANA, które obejmują nowatorskie podejście i obejmują zautomatyzowane systemy diagnostyki wspomaganą komputerowo (CAD; ang. *computer-assisted diagnosis*) oraz testy fazy stałej (SPA; ang. *solid phase assays*).

Metody: Grupa ekspertów przeanalizowała dostępne publikacje i opracowała rekomendacje dotyczące aspektów metodologicznych oznaczania ANA. Proces ten został poparty dwuetapową oceną rekomendacji, z zastosowaniem metody delfickiej. Międzynarodowa grupa ekspertów, którzy wzięli udział w tej inicjatywie, obejmowała: (I) grupę roboczą „Autoimmunity Testing” Europejskiej Federacji Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej (EFLM; ang. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*); (II) Europejskiej Inicjatywy Standaryzacyjnej na rzecz Autoimmunizacji (EASI; ang. *European Autoimmunity Standardization Initiative*); i (III) Międzynarodowy Konsensus w sprawie Typów Świeceń ANA (ICAP; ang. *International Consensus on ANA Patterns*).

Wyniki: Sformułowano łącznie 35 rekomendacji/wytycznych dotyczących: (I) badania i wydawania wyników badań w kierunku ANA przy użyciu HEp-2 IFA; (II) aspektów metodologicznych HEp-2 IFA, w tym wyboru substratu/koniugatu i zastosowania systemów CAD; (III) kontroli jakości; (IV) sposobów walidacji HEp-2 IFA i (V) SPA. Ogółem 95% wszystkich zgłoszonych wniosków w końcowej rundzie oceny z zastosowaniem metody delfickiej otrzymało powyżej 6 punktów (umiarkowana zgoda, zgoda lub całkowita zgoda), a 85% powyżej 7 punktów (zgoda i całkowita zgoda), co wskazuje na silne międzynarodowe poparcie dla zaproponowanych rekomendacji.

Wnioski: Rekomendacje te stanowią ważny krok w kierunku osiągnięcia wysokiej jakości badań służących ocenie ANA.

Słowa kluczowe: immunofluorescencja pośrednia HEp-2, przeciwciała przeciwjądrowe, rekomendacje

Abstract

Aim: Antinuclear antibodies (ANA) are important for the diagnosis of various autoimmune diseases. ANA are usually detected by indirect immunofluorescence assay (IFA) using HEp-2 cells (HEp-2 IFA). There are many variables influencing HEp-2 IFA results, such as subjective visual reading, serum screening dilution, substrate manufacturing, microscope components

and conjugate. Newer developments on ANA testing that offer novel features adopted by some clinical laboratories include automated computer-assisted diagnosis (CAD) systems and solid phase assays (SPA).

Methods: A group of experts reviewed current literature and established recommendations on methodological aspects of ANA testing. This process was supported by a two round Delphi exercise. International expert groups that participated in this initiative included (I) the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group "Autoimmunity Testing"; (II) the European Autoimmune Standardization Initiative (EASI); and (III) the International Consensus on ANA Patterns (ICAP).

Results: In total, 35 recommendations/statements related to (I) ANA testing and reporting by HEp-2 IFA; (II) HEp-2 IFA methodological aspects including substrate/conjugate selection and the application of CAD systems; (III) quality assurance; (IV) HEp-2 IFA validation/verification approaches and (V) SPA were formulated. Globally, 95% of all submitted scores in the final Delphi round were above 6 (moderately agree, agree or strongly agree) and 85% above 7 (agree and strongly agree), indicating strong international support for the proposed recommendations.

Conclusions: These recommendations are an important step to achieve high quality ANA testing.

Keywords: antinuclear antibodies, HEp-2 indirect immunofluorescence, recommendations

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----------|
| WYKAZ SKRÓTÓW | 41 |
| 1. WSTĘP | 43 |
| 2. METODY | 45 |
| 2.1. Przegląd piśmiennictwa i komitety ekspertów | 45 |
| 2.2. Opracowanie rekomendacji/wniosków | 46 |
| 3. STANY KLINICZNE ZWIĄZANE Z ANA..... | 50 |
| 3.1. Układowe choroby tkanki łącznej | 50 |
| 3.2. Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów..... | 51 |
| 3.3. Autoimmunologiczne zapalenie wątroby..... | 51 |
| 3.4. Pierwotne zapalenie dróg żółciowych..... | 52 |
| 4. ANA W POPULACJI OGÓLNEJ/ZDROWEJ | 53 |
| 5. ANA U CHORYCH ZE SCHORZENIAMI INNYMI NIŻ AUTOIMMUNIZACYJNE..... | 54 |
| 6. ANA WYKRYTE PRZY UŻYCIU HEP-2 IFA: SPOSÓB WYDAWANIA WYNIKÓW | 54 |
| 6.1. Ustalenie zakresu referencyjnego i znaczenie miana ANA..... | 55 |
| 6.1.1. Istniejące zalecenia..... | 55 |
| 6.1.2. Najnowsze spostrzeżenia..... | 55 |
| 6.1.3. Rekomendacja..... | 56 |
| 6.2. Miana przeciwciał ANA w reumatycznych chorobach układowych u dzieci | 57 |
| 6.3. Wzory świeceń HEP-2 IFA | 57 |
| 6.3.1. Najnowsze spostrzeżenia i zalecenia | 57 |
| 7. ANA W TEŚCIE HEP-2 IFA: METODYKA | 59 |
| 7.1. Substrat: HEP-2 vs. HEP-2000..... | 59 |
| 7.2. Koniugaty | 60 |
| 7.3. Automatyczna mikroskopia (CAD) | 61 |
| 7.3.1. Alternatywa dla mikroskopii manualnej: różnicowanie wyniku dodatniego/ ujemnego z oceną wzoru fluorescencji | 61 |
| 7.3.2. Miano rzeczywiste vs. miano szacowane..... | 62 |
| 7.3.3. Wartość dodana CAD w zapewnieniu jakości..... | 62 |
| 8. SPOSOBY ZAPEWNIENIA JAKOŚCI W BADANIACH HEP-2 IFA | 63 |
| 8.1. Wewnętrzna kontrola jakości..... | 63 |
| 8.1.1. Minimalna liczba próbek IQC i miano..... | 63 |
| 8.1.2. Pochodzenie próbek IQC..... | 64 |
| 8.1.3. Wzór/swoistość próbek IQC | 64 |
| 8.1.4. Metodologia monitorowania, rejestracji i oceny wyników IQC..... | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 8.2. Szkolenie i kontrola zmienności wyniku zależnej od osoby oceniającej | 65 |
| 8.3. Zewnętrzna kontrola jakości..... | 65 |
| 8.4. Metody QC oparte na wynikach pacjenta | 65 |
| 8.5. Monitorowanie serii odczynników w obrębie LOT i pomiędzy partiami LOT | 66 |
| 8.5.1. Przegląd istniejących zaleceń i wytycznych..... | 66 |
| 8.5.2. Obecna rekomendacja..... | 67 |
| 8.5.3. Kryteria akceptacji..... | 67 |
| 9. ANA W TESTACH TYPU SPA..... | 67 |
| 10. WALIDACJA/WERYFIKACJA..... | 68 |
| 10.1. Walidacja i weryfikacja analityczna..... | 69 |
| 10.1.1. Weryfikacja nowej metody HEp-2 IFA | 69 |
| 10.1.1.1. Weryfikacja prawdziwości (poprzez porównanie metod) | 70 |
| 10.1.1.2. Weryfikacja precyzji..... | 71 |
| 10.1.1.3. Weryfikacja/walidacja szacowania miana końcowego przez system CAD | 72 |
| 10.1.1.4. Weryfikacja urządzenia do pipetowania..... | 72 |
| 10.1.1.5. Weryfikacja liniowości, zakresu pomiarowego, efektu prozonowego, interferencji, miareczkowania koniugatu..... | 72 |
| 10.2. Kliniczna walidacja/weryfikacja | 73 |
| 10.2.1. Kliniczna walidacja nowej metody HEp-2 IFA | 73 |
| 11. ANA I IVDR..... | 74 |
| 12. REKOMENDACJE/STANOWISKA – PUNKTACJA DELPHI | 74 |
| 13. PODZIĘKOWANIA | 74 |
| 14. PIŚMIENNICTWO..... | 78 |
| PRZYGOTOWANIE WERSJI POLSKIEJ REKOMENDACJI..... | 83 |
| MATERIAŁ UZUPEŁNIAJĄCY | 83 |
| WKŁAD AUTORÓW..... | 83 |

Cytując niniejszy dokument, użytkownicy powinni powoływać się na jego oficjalną wersję – Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP. Clin Chem Lab Med. 2023; 61(7): 1167–1198. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0209>.

WYKAZ SKRÓTÓW

- AARD** (ang. *ANA-associated rheumatic diseases*) – choroby reumatyczne związane z ANA
- AIH** (ang. *autoimmune hepatitis*) – autoimmunologiczne zapalenie wątroby
- ALP** – fosfataza alkaliczna
- AMA** (ang. *anti-mitochondrial antibodies*) – przeciwciała przeciwmitochondrialne
- ANA** (ang. *antinuclear antibodies*) – przeciwciała przeciwjądrowe
- anti-dsDNA** (ang. *anti-double stranded DNA*) – przeciwciała przeciwko dwuniciowemu DNA
- anti-Rib-P** (ang. *anti-ribosomal P protein*) – przeciwciała przeciwko rybosomalnemu białku P
- anty-LKM-1** (ang. *anti-liver-kidney microsomes-1*) – przeciwciała przeciwko mikrosomom wątrobowo-nerkowym typu 1
- CAD** (ang. *computer-assisted diagnosis*) – diagnostyka wspomagana komputerowo
- CAP** (ang. *College of American Pathologists*) – Kolegium Amerykańskich Patologów
- CLSI** (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) – Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych
- EASI** (ang. *European Autoimmunity Standardization Initiative*) – Europejska Inicjatywa Standaryzacyjna na rzecz Autoimmunizacji
- EASL** (ang. *European Association for the Study of the Liver*) – Europejskie Stowarzyszenie Badań Wątroby
- EFLM** (ang. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) – Europejska Federacja Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej
- ELISA** (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny
- EQA** (ang. *external quality assessment*) – zewnętrzny program zapewnienia jakości
- ESPGHAN** (ang. *The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) – Europejskie Towarzystwo Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci
- FDA** (ang. *Food and Drug Administration*) – Federalny Urząd Żywności i Leków
- FI** (ang. *fluorescence intensity measure*) – ocena intensywności fluorescencji
- GGTP** – gamma-glutamylotranspeptydaza
- IAIHG** (ang. *International Autoimmune Hepatitis Group*) – Międzynarodowa Grupa Autoimmunologicznego Zapalenia Wątroby
- ICAP** (ang. *International Consensus on ANA Patterns*) – Międzynarodowy Konsensus w sprawie Typów Świeceń ANA
- IFA** (ang. *indirect immunofluorescence assay*) – test immunofluorescencji pośredniej
- IIM** (ang. *idiopathic inflammatory myopathies*) – idiopatyczne miopatie zapalne
- IQC** (ang. *internal quality control*) – wewnętrzna kontrola jakości
- IUIS** (ang. *International Union of Immunological Societies*) – Międzynarodowa Unia Towarzystw Immunologicznych
- IVDR** (ang. *In Vitro Diagnostic Regulation*) – Rozporządzenie dotyczące wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*
- LC1** (ang. *liver cytosol type 1*) – przeciwciała przeciwko cytozolowi hepatocytów typu 1
- LIU** (ang. *light intensity unit*) – jednostka intensywności światła
- LR** (ang. *likelihood ratio*) – współczynnik prawdopodobieństwa
- MCTD** (ang. *mixed connective tissue disease*) – mieszana choroba tkanki łącznej
- MIZS** – młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów
- PBC** (ang. *primary biliary cholangitis*) – pierwotne zapalenie dróg żółciowych
- QA** (ang. *quality assurance*) – zapewnienie jakości
- RF** (ang. *rheumatoid factor*) – czynnik reumatoidalny
- Scl-70** – topoizomeraza I
- SjS** (ang. *Sjögren's syndrome*) – zespół Sjögrena

SLA/LP (ang. *soluble liver antigen/liver-pancreas*) – przeciwciała przeciw rozpuszczalnym antygenom wątrobowym lub wątrobowo-trzustkowym

SLE (ang. *systemic lupus erythematosus*) – toczeń rumieniowaty układowy

SMA (ang. *smooth muscle antibodies*) – przeciwciała przeciwko mięśniom gładkim

SPA (ang. *solid phase assays*) – testy fazy stałej

WHO (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia

1. WSTĘP

Od momentu ich pierwszego opisu w 1958 roku wykrywanie przeciwciał przeciwnądrowych (ANA; ang. *antinuclear antibodies*) odgrywa kluczową rolę w diagnostyce układowych autoimmunizacyjnych chorób reumatycznych, tzw. chorób reumatycznych związanych z ANA (AARD; ang. *ANA-associated rheumatic diseases*) (przeгляд w [1]). ANA są również ważne w diagnostyce młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów [2], autoimmunologicznego zapalenia wątroby [3] oraz pierwotnego zapalenia dróg żółciowych [4]. Tradycyjnie wykrywa się je za pomocą testu immunofluorescencji pośredniej (IFA; ang. *indirect immunofluorescence assay*) z zastosowaniem, jako substratów, wątroby szczura lub komórek HEp-2 (stosowane zazwyczaj). Ze względu na subiektywność oceny i wynikające z tego różnice w odczytach wyników pomiędzy osobami oceniającymi preparaty (ocena mikroskopowa i rozpoznawanie wzoru świecenia, aspekty nomenklaturowe) oraz dużą liczbę zmieniających się technicznych wpływających na wyniki (np. rozcieńczenie surowicy, zastosowany substrat, koniugat) harmonizacja IFA jest problematyczna [5].

Obecnie analiza HEp-2 IFA jest coraz częściej wspierana przez automatyczne rozwiązania obejmujące wydajne procesory oraz oprogramowanie do analizy preparatów mikroskopowych, zautomatyzowane systemy diagnostyki wspomaganą komputerowo (CAD; ang. *automated computer-assisted diagnosis*) IFA oraz testy fazy stałej (SPA; ang. *solid phase assays*). Wszystkie te nowatorskie metody stanowią znaczący postęp w zakresie diagnostyki ANA i otwierają nowe możliwości, zwłaszcza w kontekście zapewnienia jakości.

W ramach niniejszej pracy przeanalizowano aktualne publikacje i wytyczne w dziedzinie testów w kierunku ANA, skupiając się na obszarach, takich jak preferowana metodyka (IFA vs. SPA), optymalne rozcieńczenie surowicy i określanie miana, raportowanie typu świecenia IFA HEp-2, wybór substratu i koniugatu, wykorzystanie platform CAD, zapewnienie jakości oraz walidacja/weryfikacja. Na podstawie analizy piśmiennictwa sformułowano zestaw rekomendacji dotyczących tych zagadnień, które zostały

przekazane do powtórnej oceny ekspertom przy użyciu metody Delphi w celu doprecyzowania i przygotowania międzynarodowego konsensusu.

2. METODY

2.1. Przegląd piśmiennictwa i komitetu ekspertów

Przeprowadzono przegląd piśmiennictwa, który został zrealizowany przez XB, CB i MV. Wyszukiwaniami objęto bazy PubMed oraz limo libis KU Leuven. Przeanalizowano odnośniki do prac naukowych i wykorzystano te, które uznano za istotne, a także dodatkowe źródła, takie jak publikacje Instytutu Norm Klinikalnych i Laboratoryjnych (CLSI; ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*), Kolegium Amerykańskich Patologów (CAP; ang. *College of American Pathologists*), ISO 15189, ISO 17025, Bureau International des Poids et Mesures (<https://www.bipm.org>), Światowej Organizacji Zdrowia (WHO; ang. *World Health Organization*) i Rozporządzenie dotyczące wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* (EU) 2017/746 (IVDR). Ponadto skonsultowano również krajowe wytyczne/zalecenia z Francji (COFRAC; fr. *Comité Français d'Accréditation*), Holandii (NVKC; niderl. *Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde*) i CMI, ang. *College of Medical Immunologists*) oraz Belgii.

W inicjatywie wzięły udział trzy grupy ekspertów: (i) grupa robocza „Autoimmunity Testing” Europejskiej Federacji Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej (EFLM; ang. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*), (ii) Europejskiej Inicjatywy Standaryzacyjnej na rzecz Autoimmunizacji (EASI; ang. *European Autoimmunity Standardization Initiative*) i (iii) Międzynarodowy Konsensus w sprawie Typów Świeceń ANA (ICAP; ang. *International Consensus on ANA Patterns*), w tym członkowie jego macierzystego Podkomitetu Międzynarodowej Unii Towarzystw Immunologicznych (IUIS; ang. *International Union of Immunological Societies*) w celu Standaryzacji Autoprzeciwciał w Chorobach Reumatycznych i Pokrewnych (znany jako Komitet ds. Standaryzacji Autoprzeciwciał).

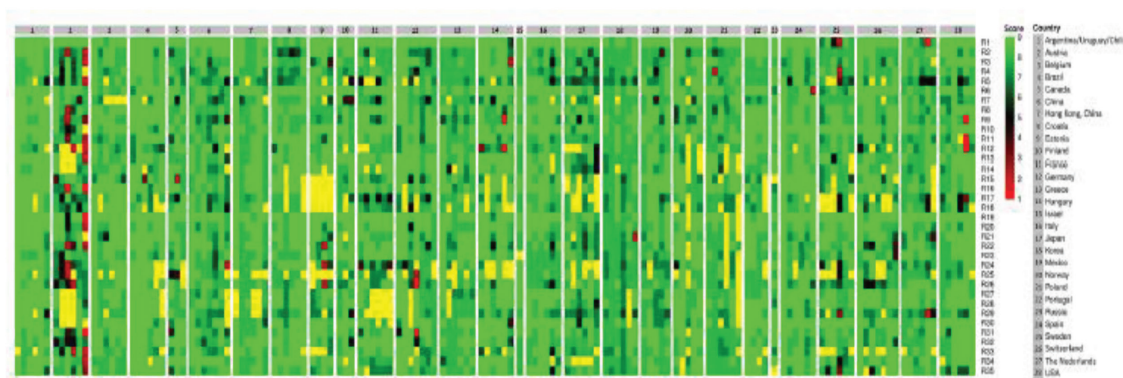
W pracy uczestniczyli eksperci z EASI z 18 krajów (Austria, Belgia, Chorwacja, Estonia, Finlandia, Francja,

Niemcy, Grecja, Węgry, Izrael, Włochy, Holandia, Norwegia, Polska, Portugalia, Hiszpania, Szwecja i Szwajcaria) oraz z Rosji. Z ramienia ICAP wzięli udział eksperci z 10 krajów (USA, Meksyk, Kanada, Brazylia, Argentyna, Chile, Urugwaj, Japonia, Korea, Chiny i Hongkong).

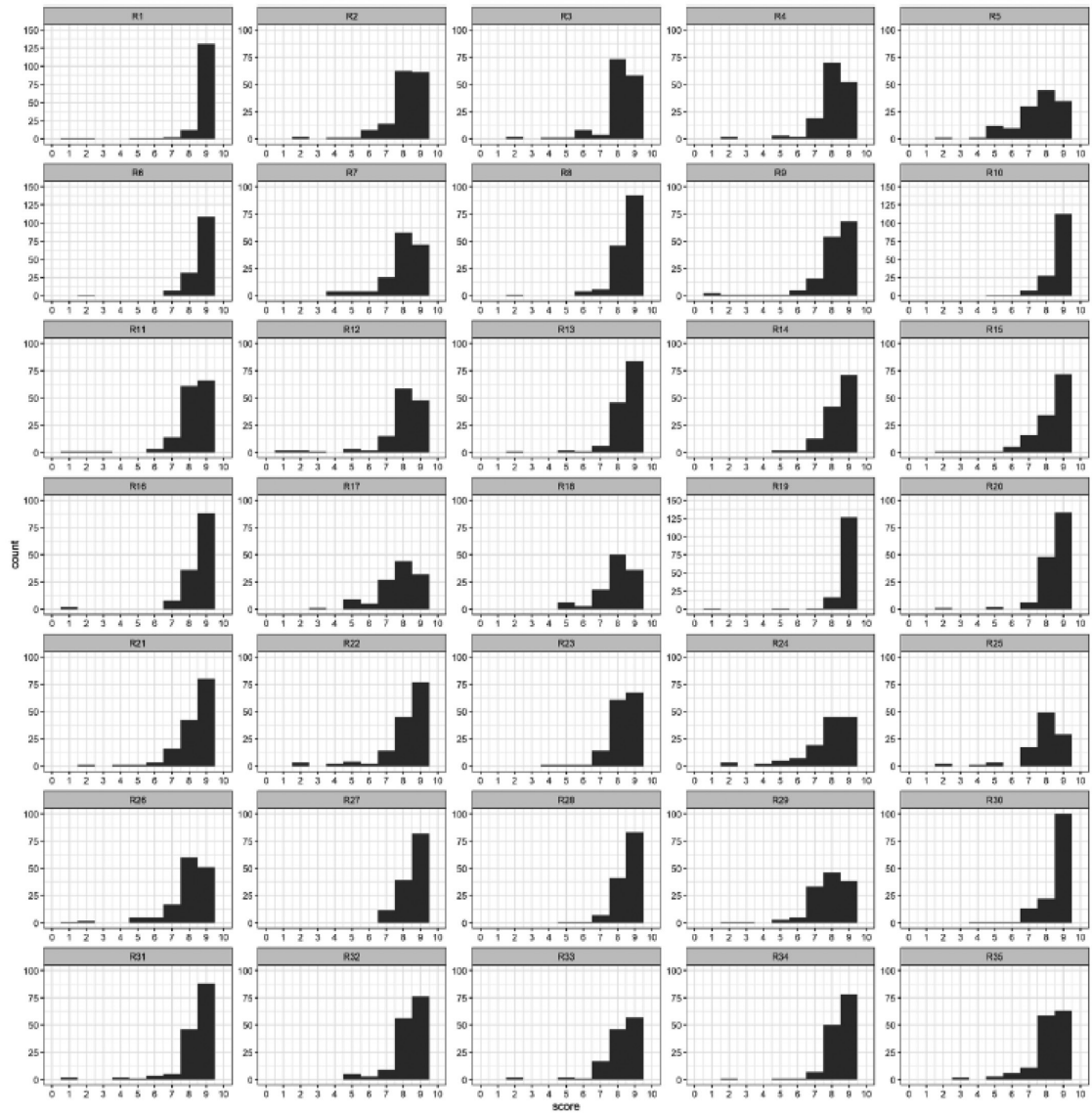
2.2. Opracowanie rekomendacji/wniosków

W 3-etapowym procesie (przegląd procesu z zastosowaniem metody Delphi na rycinie 1, *Supplementary*) opracowano zalecenia dotyczące wykrywania ANA. Pierwszy etap polegał na przygotowaniu szkicu manuskryptu na podstawie przeglądu piśmiennictwa oraz sformułowaniu 36 wstępnych rekomendacji/wniosków przez grupę roboczą „Autoimmunity Testing” EFLM, zatwierdzonych następnie przez EFLM. Wnioski zostały sklasyfikowane jako A (dostępne dane eksperymentalne/piśmiennictwo źródłowe) lub B (opinia eksperta). Następnie manuskrypt i wnioski zostały poddane otwartym komentarzom/sugestiom i klasyfikacji przez EASI (EASI Europe) i ICAP w skali

punktowej od 1 do 5 (tj. 1 – brak zgody do 5 – pełna zgoda) (przeprowadzone przez jednego przedstawiciela na kraj [EASI] / obszar geograficzny [ICAP]). Na koniec przeprowadzono analizę z zamkniętym głosowaniem z użyciem metody delfickiej. Na tym ostatnim etapie głosowano w skali punktowej od 1 do 9 (0 – absolutny brak zgody dla zalecenia, 9 – maksymalne poparcie dla zalecenia) z opcją pominięcia pytania na podstawie braku doświadczenia (= 15). Głosowanie zostało przeprowadzone w grupie 149 ekspertów składającej się z 98 uczestników zaangażowanych przez EASI (mediana sześciu członków/kraj [zakres 1-7]) i 51 uczestników zaangażowanych przez ICAP (mediana sześciu członków/obszar geograficzny [zakres 3-7]), związanych z 133 ośrodkami (przegląd geograficznego rozmieszczenia uczestników jest uwzględniony w tabeli I, *Supplementary*). Mediana i procent wskaźników wysokich przy dwóch różnych punktach odcięcia (ang. *cut-off*) (wynik ≥ 8 lub ≥ 7 w skali 9-stopniowej) wszystkich uczestników zostały wyliczone w odniesieniu do każdej rekomendacji.



Rycina 1. Mapa ciepła wyników punktacji Delphi uporządkowana według rekomendacji (R) i kraju/regionu. Punktacja Delphi w skali 1-9 [0 – całkowity brak zgody z zaleceniem; 9 – pełna zgoda z zaleceniem; 5 – bezstronność/niepewność]. Żółte obszary reprezentują brak odpowiedzi/niejasne wyniki lub wyniki wynoszące 15 (brak odpowiedzi ze względu na brak doświadczenia).



Rycina 2. Wykresy rozkładu wyników punktacji Delphi dla poszczególnych rekomendacji (R). Punktacja Delphi w skali 1-9 [0 – całkowity brak zgody z zaleceniem; 9 – pełna zgoda z zaleceniem; 5 – bezstronność/niepewność]. Zliczenia (oś Y) reprezentują liczbę odpowiedzi z określoną punktacją (słupki) dla danej rekomendacji.

Tabela 1. Przegląd zaleceń/wytycznych dotyczących aspektów metodologicznych.

| R | Aspekty metodologiczne badań w kierunku oceny ANA | Klasyfikacja | Piśmiennictwo | Punktacja Delphi | | |
|--|---|--------------|-------------------------------------|------------------|--------------------|----|
| | | | | Mediana | % wysokich wyników | |
| | ANA w HEp-2 immunofluorescencją pośrednią (IFA) | | | ≥8 | ≥7 | |
| 1 | ANA oceniane przy użyciu HEp-2 IFA powinny być raportowane wraz z oznaczeniem miana przeciwciał oraz wzoru świecenia | A | [8, 45, 46] | 9 | 96 | 97 |
| Zakres referencyjny i znaczenie miana | | | | | | |
| 2 | Dla wielu wzorów świeceń miano przeciwciał rośnie wraz z prawdopodobieństwem wystąpienia AARD | A | [14-17, 48, 55-58] | 8 | 83 | 92 |
| 3 | Dla większości wzorów nie ma jednego optymalnego punktu odcięcia w HEp-2 IFA, który jest związany zarówno z optymalną czułością, jak i swoistością dla AARD | A/B | [10, 12] | 8 | 89 | 92 |
| 4 | Uwzględnienie poziomu przeciwciał pomaga zinterpretować wyniki testu ANA | B | | 8 | 82 | 95 |
| 5 | Podawanie wskaźników wiarygodności (LR) specyficznych dla miana lub wyniku zwiększa trafność klinicznej interpretacji wyników testu HEp-2 IFA w kierunku AARD | B | | 8 | 60 | 82 |
| ANA u osób zdrowych | | | | | | |
| 6 | ANA mogą występować u znacznego odsetka zdrowych osób (w tym dzieci, dorosłych i osób starszych), a ich częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Należy ten fakt uwzględnić przy interpretacji wyników testów | A/B | [16, 32-41] | 9 | 95 | 99 |
| ANA w układowych chorobach reumatycznych u dzieci | | | | | | |
| 7 | Nie ma dowodów na to, że w przypadku dzieci należy stosować niższe początkowe rozcieńczenie w badaniu HEp-2 IFA w celu przesiewowego wykrywania AARD | A | [38, 40-42, 62, 63] | 8 | 78 | 91 |
| Wzory świeceń | | | | | | |
| 8 | Wzór HEp-2 IFA może dostarczyć przydatnych informacji dotyczących znaczenia klinicznego i wskazówek dla dalszych badań | A | [1, 45, 64, 65] | 9 | 93 | 97 |
| 9 | Kliniczna istotność wyniku testu HEp-2 IFA zależy od obserwowanego wzoru świecenia | A | [45, 64, 65, 68-74, 76] | 8 | 82 | 93 |
| 10 | Korelacja wzoru świecenia HEp-2 IFA z wynikami testów antygenowoswoistych zwiększa znaczenie obu wyników | A | [1, 64, 65, 78, 83] | 9 | 94 | 99 |
| 11 | Główne wzory ANA (o najwyższym znaczeniu klinicznym) obejmują: • jądrowy: centromerowy (AC-3), homogenny (AC-1), gęsty drobnoziarnisty (AC-2), ziarnisty (AC-4, 5), jąderkowy (AC-8, 9, 10), multiple nuclear dots (AC-6), błona jądrowa (AC-11, 12); • cytoplazmatyczny: siateczkowy/podobny do AMA (AC-21), (gęsty) drobnoziarnisty (AC-19, 20), liniowy aktywny (AC-15). | A/B | [45, 46, 64, 65, 67-76, 80, 81, 84] | 8 | 86 | 96 |
| Substrat | | | | | | |
| 12 | HEp-2, HEp-2000 i HEp-20-10 mogą być używane jako substraty do przesiewowego badania ANA w IFA | A | [48, 86-97] | 8 | 81 | 92 |
| Koniugat | | | | | | |
| 13 | Użycie koniugatu specyficznego dla IgG jest wystarczające do wykrycia większości istotnych klinicznie ANA | A/B | [48, 99-106] | 9 | 93 | 97 |
| 14 | Specyficzność izotypowa stosowanego koniugatu (poliwalentny/specyficzny dla IgG) przyczynia się do zmienności wyników badania | A/B | [48, 99-106] | 9 | 87 | 97 |

Tabela I. cd. Przegląd zaleceń/wytycznych dotyczących aspektów metodologicznych.

| Mikroskopia automatyczna | | | | | | |
|--|--|-----|---|---|----|----|
| 15 | System komputerowego wspomaganie diagnozy (CAD) może wspierać testowanie HEp-2 IFA, ale nadal zalecane jest przeprowadzanie rewizji klasyfikacji wyników dodatnich/ujemnych przez ekspertów | A/B | [107-122], meta-analiza [124] | 9 | 81 | 93 |
| 16 | CAD może wspierać HEp-2 IFA, ale wymagane jest sprawdzenie oceny rozpoznanych wzorów przez ekspertów | A | [109-111, 116, 119], meta-analiza [124] | 9 | 93 | 99 |
| 17 | Kilka spośród dostępnych systemów CAD dla HEp-2 IFA dostarcza informacji o intensywności fluorescencji (pomiar FI), który zawiera: • informacje o oszacowanym mianie; • informacje na temat prawdopodobieństwa AARD. | A | [107-109, 116, 119, 122, 127, 128] | 8 | 64 | 87 |
| 18 | Gdy używany jest system CAD dla HEp-2 IFA, który dostarcza odtwarzalne pomiary FI, śledzenie FI może przyczynić się do monitorowania jakości badania (np. jako część programu IQC) (nie dotyczy to wszystkich systemów na rynku) | A | [109, 110, 126, 130-132] | 8 | 76 | 92 |
| Sposoby zapewnienia jakości w badaniach HEp-2 IFA | | | | | | |
| 19 | Wykonanie testu HEp-2 IFA powinno być monitorowane poprzez wewnętrzne kontrole jakości (IQC przy każdorazowym nastawieniu testu ANA oraz okresową zaślepioną ocenę reprezentatywnych przypadków przez różnych „obserwatorów”), a także zewnętrzne programy kontroli jakości | A | [48, 134, 135, 139] | 9 | 98 | 99 |
| 20 | Czynniki minimalizujące zmienność odczytów wyników przez różnych „obserwatorów” testu HEp-2 IFA to programy edukacyjne, podwójna ocena, stosowanie nomenklatury ICAP oraz odczytywanie obrazów cyfrowych z monitora CAD | A/B | [134, 135, 140, 141] | 9 | 94 | 98 |
| 21 | W każdej serii badanej powinny być uwzględnione co najmniej 2 próbki IQC (jedna ujemna i jedna słabo dodatnia [z mianem docelowym odpowiadającym LR wynoszącym 2-5 dla AARD]), które są oceniane ilościowo (za pomocą m.in. ustalania miana końcowego lub automatycznego pomiaru intensywności fluorescencji) | A/B | [8, 48, 134, 135] | 9 | 85 | 96 |
| 22 | Dodatkowo, oprócz kontroli zawartych w zestawach testowych, zaleca się stosowanie w celach kontrolnych próbek IQC uzyskanych od pacjentów, które traktuje się jak rutynowe próbki (umożliwiają one monitorowanie całej procedury badawczej). Próbki te mogą pochodzić od pojedynczych osób lub być uprzednio pulowane | A/B | [130, 134, 135] | 9 | 83 | 93 |
| 23 | Preferowany wzór świecenia dla próbki kontrolnej dodatniej cechuje się wysoką odtwarzalnością (np. izolowany wzór homogeny lub ziarnisty w systemach CAD) | A/B | [109, 110, 125, 126, 130, 135] | 8 | 88 | 98 |
| 24 | Monitorowanie % wyników dodatnich (niskich, średnich, wysokich) na wykresach Leveya-Jenningsa umożliwia ocenę stabilności testu w czasie (np. do udokumentowania wpływu zmian wprowadzanych przez producenta między partiami LOT) | A | [48, 130, 131] | 8 | 71 | 87 |
| 25 | Kiedy stosowany jest system CAD dla HEp-2 IFA, który zapewnia odtwarzalny pomiar FI (nie dotyczy to wszystkich systemów komercyjnych na rynku), monitorowanie próbki IQC oraz mediany FI pacjenta na wykresach Leveya-Jenningsa jest czułą metodą do wykrywania stabilności testu w czasie (np. do udokumentowania wpływu zmian LOT) | A | [130, 132] | 8 | 77 | 91 |

Tabela 1. cd. Przegląd zaleceń/wytycznych dotyczących aspektów metodologicznych.

| Monitorowanie serii odczynników w obrębie LOT i pomiędzy partiami LOT | | | | | | |
|---|--|-----|---------------------------------|---|----|-----|
| 26 | Zmienność międzyseryjna dla koniugatów i/lub substratów powinna być oceniona przed wprowadzeniem nowej serii. Można to przeprowadzić przy użyciu próbek IQC pochodzących od pacjentów, uzupełnionych o próbki wybrane w celu minimalnego pokrycia różnych kompartmentów komórkowych (jądra i cytoplazmy) oraz różnych wartości miana | A/B | [5, 48, 66, 133, 135, 145, 146] | 8 | 79 | 91 |
| ANA w testach typu SPA | | | | | | |
| 27 | Przydatność kliniczna SPA w celu przesiewu/diagnozy AARD zależy od jednostki chorobowej i rodzaju testu | A | Przegląd w [1, 148] | 9 | 91 | 100 |
| 28 | Nie ma jednego progu SPA, który zapewniłby optymalną czułość i swoistość dla testów w kierunku AARD | A | Przegląd w [1] | 9 | 93 | 98 |
| 29 | Podawanie specyficznych wskaźników LR na wynikach testów SPA w kierunku AARD może ułatwiać kliniczną interpretację tych wyników | A/B | [13-17, 57] | 8 | 66 | 92 |
| 30 | Kombinacja HEp-2 IFA z testami SPA w celu skringu AARD zwiększa wartość kliniczną | A | Przegląd w [1, 11, 12, 17, 18] | 9 | 88 | 98 |

Klasyfikacja: A [dostępne dane eksperymentalne/piśmiennictwo źródłowe], B [opinia eksperta]. Wynik Delphi w skali 1-9 [0 – całkowity brak zgody z zaleceniem; 9 – pełna zgoda z zaleceniem; 5 – bezstronność/niepewność], z możliwością pominięcia pytania na podstawie braku doświadczenia; uczestnicy bez odpowiedzi lub z niejasną odpowiedzią, lub wskazujący, że nie mieli doświadczenia w danym zakresie, byli wykluczeni z analizy; wyniki wynoszące co najmniej osiem lub siedem na skali dziewięciopunktowej uznawane były za wysokie.

3. STANY KLINICZNE ZWIĄZANE Z ANA

3.1. Układowe choroby tkanki łącznej

ANA są ważnymi biomarkerami laboratoryjnymi, które pomagają w diagnozie i, w niektórych przypadkach, w prognozie toczenia rumieniowatego układowego (SLE; ang. *systemic lupus erythematosus*), zespołu Sjögrena (SjS; ang. *Sjögren's syndrome*), twardziny układowej (SSc; ang. *systemic sclerosis*), mieszanej choroby tkanki łącznej (MCTD; ang. *mixed connective tissue disease*) i idiopatycznych miopatii zapalnych (IIM; ang. *idiopathic inflammatory myopathies*). Choroby te są powszechnie określane jako choroby reumatyczne związane z ANA (AARD; ang. *ANA associated rheumatic diseases*). ANA mogą być wykryte metodą IFA z zastosowaniem linii komórkowej HEp-2 jako substratu lub alternatywnie linii komórkowej HEp-2000 transfekowanych białkiem SSA/Ro60. Zostało zidentyfikowanych wiele antygenów docelowych dla autoprzeciwciał w AARD, a monoswoiste testy fazy stałej do ich wykrywania są powszechnie dostępne (np. przeciwciała przeciwko dwuniciowemu DNA [dsDNA; and. *anti-double stranded DNA*], Sm, rybosomalnemu białku P [Rib-P; ang. *anti-ribosomal P protein*] w SLE; SSA/Ro60 i/lub Ro52/TRIM21 oraz SSB/La w SjS; U1-RNP w MCTD; centromerowe białko B [CENP-B], topoisomeraza-I [Scl-70], polimeraza

RNA III, fibrylaryna, PM-Scl w SSc oraz Jo1, PL7, PL12, EJ, OJ, Mi2, MDA5, TIF1γ, NXP2, SAE, SRP i HMGCR w IIM).

Niektóre swoiste autoprzeciwciała są uwzględnione w kryteriach klasyfikacyjnych dla SLE (anty-dsDNA, anty-Sm), SjS (anty-SSA/Ro), SSc (anty-topoisomeraza-I/Scl70, anty-CENP-B, anty-polimeraza RNA III), MCTD (anty-U1-RNP) i IIM (anty-Jo1) (przegląd w [1]). Dostępne są testy (SPA), które wykrywają przeciwciała przeciwko mieszaninie autoantygenów istotnych dla AARD, a także testy wieloparametrowe, które jednocześnie wykrywają i identyfikują różne ANA.

W cytowanych tutaj najnowszych pozycjach piśmiennictwa (głównie pracach przeglądowych) zawarte są szczegółowe informacje na temat wykrywania ANA w AARD za pomocą HEp-2 IFA i SPA [1, 6]. W skrócie, wykrycie ANA metodą HEp-2 IFA przy rozcieńczeniu 1:80 jest bardzo czułe, ale ma niską swoistość. Ze względu na swoją wysoką czułość HEp-2 IFA uważany jest za „złoty standard wykrywania” ANA [7, 8] i ostatnio został uwzględniony jako kryterium wejściowe w kryteriach klasyfikacyjnych SLE [9]. Charakterystyka SPA jest zróżnicowana dla różnych testów komercyjnych. SPA, które wykrywają panel przeciwciał związanych z AARD (zarówno skringing miesza-

ny przeciwciał, jak i testowanie wieloparametrowe), zwykle mają wyższą swoistość, ale niższą czułość niż HEp-2 IFA (przegląd w [1], ostatnia meta-analiza w [10]). Przydatność diagnostyczna HEp-2 IFA i SPA zależy od choroby (np. IFA wykazuje wyższą czułość niż SPA dla SSc, ale nie dla SjS) [11-13] (przegląd w [1]). Ważną cechą oceny ANA jest wzrost ogólnego ryzyka (prawdopodobieństwa) choroby wraz ze wzrostem miana przeciwciał wykrytych zarówno w HEp-2 IFA, jak i w SPA [14-17] (przegląd w [1]). Ponieważ nie ma jednego testu HEp-2 IFA ani SPA, który miałby zarówno wysoką czułość, jak i swoistość, połączenie IFA ze SPA zapewnia najwyższą wartość kliniczną: podwójny wynik pozytywny ma najwyższy współczynnik prawdopodobieństwa (LR; ang. *likelihood ratio*) dla AARD – za pomocą HEp-2 IFA można identyfikować przeciwciała, które nie są wykrywane przez SPA (np. w SSc), z drugiej strony SPA może ujawnić przeciwciała, które nie są identyfikowane przez IFA (np. w SjS) (przegląd w [1]).

3.2. Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów

W niedawno opublikowanym konsensusie Międzynarodowej Organizacji Badawczej Reumatologów Dziecięcych (ang. *Pediatric Rheumatology International Trials Organization*) przedstawiono nowe kryteria klasyfikacyjne dla młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (MIZS) (ang. *juvenile idiopathic arthritis*) [2]. Według tego konsensusu MIZS o wczesnym początku z obecnością ANA można rozpoznać, gdy objawy pojawiły się we wczesnym okresie życia (do 6. r.ż.) i utrzymują się przez co najmniej 6 tygodni oraz otrzymano dwa dodatnie wyniki testów w kierunku ANA z mianem wykrytych przeciwciał $\geq 1:160$ (oceniających w teście HEp-2 IFA) w odstępach co najmniej 3 miesiące [2]. Wyłączone są przypadki uogólnionego MIZS, zapalenia stawów z obecnością czynnika reumatoidalnego (RF; ang. *rheumatoid factor*) oraz MIZS z towarzyszącym zapaleniem przyczepów ścięgniastych/spondyloartropatią [2]. Wartość odcięcia $\geq 1:160$ została ustalona na podstawie wcześniej prowadzonych badań [19, 20].

Młody wiek w momencie wystąpienia zapalenia stawów i dodatni wynik testu ANA w IFA (nie ELISA) są znanymi czynnikami prognostycznymi zapalenia błony naczyniowej oka (powikłania okulistyczne)

w MIZS [21-24]. W niedawno przeprowadzonych populacyjnych badaniach na terenie krajów nordyckich [21, 22] punkty odcięcia dla ANA, jako markera zapalenia błony naczyniowej oka w przebiegu MIZS, różniły się między ośrodkami badawczymi, wahając się między 1:80 a 1:320. Nordal i wsp. [24] wykazali, że wartość predykcyjna ANA dla zapalenia błony naczyniowej oka wzrastała wraz ze zwiększającym się mianem przeciwciał, ale czułość zmniejszała się (np. 1:80 ma dużą czułość, podczas gdy 1:320 ma dużą swoistość). Konieczne są dalsze badania w celu doprecyzowania protokołów badania ANA w przypadku MIZS [25].

Podsumowanie obecnych rekomendacji/wniosków dotyczących MIZS:

W celu klasyfikacji MIZS o wczesnym początku z obecnością przeciwciał przeciwwądrowych powinno się wykonać ANA na HEp-2 IFA (punkt odcięcia $\geq 1:160$), zgodnie z konsensusem Międzynarodowej Organizacji Badawczej Reumatologów Dziecięcych.

W celu prognozowania zapalenia błony naczyniowej oka należy wykonać badanie w kierunku ANA metodą IFA. Nie ma ustalonego punktu odcięcia, ale im wyższe miano przeciwciał, tym większa dodatnia wartość predykcyjna, a mniejsza czułość.

3.3. Autoimmunologiczne zapalenie wątroby

Międzynarodowe grupy ekspertów opracowały kilka wytycznych (rekomendacji) dotyczących diagnozowania autoimmunologicznego zapalenia wątroby (AIH; ang. *autoimmune hepatitis*). Poniżej przedstawiono przegląd tych wytycznych.

W 1999 roku Międzynarodowa Grupa Autoimmunologicznego Zapalenia Wątroby (IAIHG, ang. *International Autoimmune Hepatitis Group*) przedstawiła kryteria rozpoznania AIH, w których stwierdzono, że seropozytywność dla ANA, przeciwciał przeciwko mięśniom gładkim (SMA; ang. *smooth muscle antibodies*) lub przeciwciał przeciwko mikrosomom wątrobowo-nerkowym typu 1 (anty-LKM-1; ang. *anti-liver-kidney microsomes-1*) w mianie $> 1:80$, umożliwia pewne rozpoznanie AIH (miana 1:40 umożliwiają

prawdopodobne rozpoznanie) [26]. U dzieci mogą być istotnie niższe miana (zwłaszcza dla przeciwciał anti-LKM-1) [26]. Autorzy stwierdzili, że przeciwciała należy oznaczać IFA na tkankach gryzoni lub, w przypadku ANA, na linii komórkowej HEp-2 [26].

W 2008 roku IAIHG opracowała uproszczone kryteria diagnostyczne AIH [26]. Zgodnie z nimi ANA lub SMA w mianie $\geq 1:40$ w ocenie punktowej odpowiadają wartości jednego punktu, a ANA lub SMA w mianie $\geq 1:80$, lub LKM w mianie $\geq 1:40$, lub wynik dodatni dla przeciwciał przeciw SLA/LP (przeciw rozpuszczalnemu antygenom wątrobowym lub wątrobowo-trzustkowym, ang. *soluble liver antigen/liver-pancreas*) (ELISA SPA, niewykrywalne w IFA) odpowiadają dwóm punktom [27]. Autorzy określili, że ocena ANA testem HEp-2 IFA może dawać większe miano niż badanie na skrawkach tkanek zwierzęcych i stwierdzili, że jeśli wyniki dotyczą testów z zastosowaniem linii komórkowej HEp-2, miana należy zredukować o połowę [27].

W 2004 roku powstały rekomendacje IAIHG dotyczące diagnostyki serologicznej, w których stwierdzono, że podstawową techniką rutynowego badania autoprzeciwciał związanych z AIH jest IFA z wykorzystaniem panelu tkanek kilku organów gryzoni (w tym nerki, wątroby i żołądka) [3]. Pozwala to na wykrycie ANA, SMA, przeciwciał anti-LKM-1 i przeciwciał mitochondrialnych (AMA; ang. *anti-mitochondrial antibodies*) oraz przeciwo cytozoli hepatocytów typu 1 (LC1; ang. *liver cytosol type 1*) [3]. Proponowane początkowe rozcieńczenie wynosi 1:10, ale klinicznie istotne miano u dorosłych wynosi 1:40 [3]. U osób poniżej 18. r.ż. wyniki istotne klinicznie wynoszą: 1:20 dla ANA i SMA oraz 1:10 dla przeciwciał anti-LKM [3]. W przypadku wykrycia ANA wzór świecenia można określić za pomocą HEp-2 IFA, ponieważ komórki te mają większe i wyraźniejsze jądra [3].

Znaczenie zastosowania substratów pochodzących od gryzoni w przesiewowych badaniach w kierunku AIH zostało dodatkowo podkreślone w wytycznych EASL (ang. *European Association for the Study of the Liver*) dotyczących AIH [28] oraz w stanowisku Komitetu Hepatologicznego ESPGHAN (ang. *The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) w sprawie diagnozowania i leczenia

autoimmunizacyjnych chorób wątroby u dzieci [29]. Autorzy wytycznych ESPGHAN doszli do wniosku, że IFA z zastosowaniem tkanek gryzoni nie tylko pomaga w diagnozowaniu AIH, lecz także umożliwia różnicowanie między AIH typu 1 (charakteryzującym się ANA i SMA) i AIH typu 2 (charakteryzującym się obecnością przeciwciał anti-LKM-1 i anti-LC1) [29]. Autorzy podkreślili również, że u dorosłych za dodatnie powinno się uznać miano $\geq 1:40$, a u dzieci $\geq 1:20$ [29]. W stanowisku ESPGHAN nie zalecono stosowania linii komórkowej HEp-2 do przesiewowego badania ANA w AIH ze względu na stosunkowo wysoki odsetek wyników dodatnich w zdrowej populacji i w przypadku zakażeń, zwłaszcza u dzieci [29]. Zalecono jednak stosowanie linii komórkowej HEp-2 (ze względu na ich duże i wyraźne jądra) do określania wzoru IFA ANA, gdy wykryto obecność ANA na tkance gryzoni [29].

Podsumowanie obecnych rekomendacji/wniosków dotyczących AIH:

W przypadku podejrzenia AIH (nieprawidłowe wyniki prób wątrobowych, podwyższone IgG, martwica kęsowa [ang. *interface hepatitis*]) należy wykonać badanie w kierunku przeciwciał metodą IFA na tkankach gryzoni (wątroba, nerka, żołądek), co pozwala na wykrycie ANA, SMA oraz przeciwciał anti-LKM-1 i anti-LC1.

W przypadku wykrycia ANA wzór świecenia powinien być zdefiniowany w badaniu HEp-2 IFA.

Zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi i rekomendacjami punkt odcięcia (ang. *cut-off*) na tkankach gryzoni powinien wynosić $\geq 1:40$ dla dorosłych i $\geq 1:20$ dla dzieci.

3.4. Pierwotne zapalenie dróg żółciowych

EASL zaleca badanie w kierunku przeciwciał AMA (1:40) oraz ANA swoistych dla pierwotnego zapalenia dróg żółciowych (PBC; ang. *primary biliary cholangitis*) za pomocą IFA u pacjentów z przewlekłą cholestazą wewnątrzwątrobową (zwiększona aktywność ALP i GGTP, zwiększone stężenie bilirubiny sprzężonej, IgM) [4]. AMA są skierowane przeciwko podjednostkom E2 dehydrogenaz 2-oksokwasowych

(PDC-E2, OGDC-E2, BCOADC-E2) i występują u ponad 90% chorych na PBC. Chociaż IFA z użyciem panelu trzech substratów tkankowych (wątroba, nerka, żołądek) uważany jest za metodę referencyjną do wykrywania AMA, niedawne badanie sugerowało, że IFA z zastosowaniem tych trzech tkanek gryzoni może nie wykryć niektórych przeciwciał [30]. AMA mogą również być wykrywane poprzez HEp-2 IFA, jednak charakterystyczny dla AMA cytoplazmatyczny (siateczkowaty, ziarnisty) wzór fluorescencji (cytoplazmatyczny, podobny do AMA [AC]-21 w klasyfikacji ICAP) nie może być uważany za swoisty, dlatego konieczne jest wykonanie antygenowo swoistego testu potwierdzenia [30]. W przypadku oceny AMA Florin i wsp. [31] potwierdzili dobrą zgodność między IFA z wykorzystaniem potrójnego substratu tkankowego a testem typu *dot blot*, ale nie pomiędzy HEp-2 IFA a *dot blot*. Typowy wzór AMA (AC-21) na linii komórkowej HEp-2 obserwowano tylko w 25% próbek AMA-pozytywnych w badaniu z wykorzystaniem trzech substratów tkankowych i/lub *dot blot* [31]. Potrzebne są dodatkowe badania, aby udokumentować skuteczność HEp-2 IFA vs. IFA z wykorzystaniem potrójnego substratu tkankowego do skringingu w kierunku AMA.

PBC-swoiste ANA obejmują przeciwciała przeciwko Sp100 (ang. *multiple nuclear dots* [AC-6] w badaniu HEp-2 IFA) i gp210 (świecenie punktowe błony jądrowej [AC-12] w badaniu HEp-2 IFA). Mogą być one wykryte u podgrupy chorych na PBC (również AMA-ujemnych) [4]. Dostępne są testy antygenowo-swoiste (np. ELISA lub *dot/line blot*), które umożliwiają wykrywanie tych przeciwciał.

Podsumowanie obecnych rekomendacji/wniosek dotyczących PBC:

W przypadku klinicznego podejrzenia PBC należy wykonać badanie przeciwciał przeciwmitochondrialnych metodą IFA z wykorzystaniem potrójnego substratu tkankowego. Przeciwciała anti-PDH-E2 można potwierdzić za pomocą testów antygenowo-swoistych.

Przydatność diagnostyczna HEp-2 IFA do wykrywania AMA wymaga dalszych badań.

PBC-swoiste ANA mogą być wykrywane za pomocą HEp-2 IFA i potwierdzane za pomocą testów antygenowo-swoistych dla przeciwciał anti-Sp100 i anti-gp210.

4. ANA W POPULACJI OGÓLNEJ/ ZDROWEJ

Aby lepiej interpretować wyniki testów ANA, należy mieć świadomość, że występują one również w populacji ogólnej. Poniżej znajduje się krótki opis wybranych badań opisujących częstość występowania ANA (ocenianych za pomocą HEp-2 IFA) w populacji ogólnej w różnych regionach geograficznych.

- W badaniu przekrojowym przeprowadzonym w Chinach stwierdzono, że częstość występowania ANA (na podstawie wyników testu HEp-2 IFA) w populacji ogólnej (20 970 osób w wieku od 2 do 88 lat [średnia wieku: 32 lata]) wynosiła 13,98% przy *cut-off* 1:100 i 5,92%, gdy zastosowano *cut-off* 1:320 [32]. Wyniki dodatnie ANA były częstsze u kobiet/dziewczynek niż u mężczyzn/chłopców i u osób starszych w porównaniu do młodszych osób (z wyższą częstością występowania w wieku 20-30 lat) [32].
- W badaniu przekrojowym przeprowadzonym w USA stwierdzono, że częstość występowania ANA (na podstawie wyników HEp-2 IFA) w populacji ogólnej (4754 osoby w wieku ≥ 4 lat) wynosiła 13,8% przy *cut-off* 1:80 [33]. Częstość występowania ANA wzrastała wraz z wiekiem, a ANA były bardziej powszechne u kobiet niż u mężczyzn [33].
- W badaniu przekrojowym przeprowadzonym w Niemczech stwierdzono, że częstość występowania ANA (na podstawie wyników otrzymanych w półautomatycznym systemie HEp-2 IFA) w populacji ogólnej (1199 osób w wieku ≥ 20 lat) wynosiła 33% przy *cut-off* 1:80. Większość wyników (29%) ANA było słabo dodatnich (miano 1:80 lub 1:160). Częstość występowania ANA była wyższa u kobiet niż u mężczyzn [34]. Podobnie jak w przypadku wyników uzyskanych w Niemczech, częstość występowania ANA (na podstawie wyników otrzymanych w półautomatycznym systemie

HEp-2 IFA) u 279 belgijskich dawców krwi (średni wiek [zakres] 46 [18-68]) przy *cut-off* 1:80 wynosiła 34% [16].

- W badaniu przekrojowym przeprowadzonym w Brazylii stwierdzono, że częstość występowania ANA (na podstawie wyników HEp-2 IFA) w grupie 918 zdrowych osób wynosiła 12,9% przy *cut-off* 1:80 [35]. Większość (53,4%) miała miano \leq 1:160 w porównaniu z zaledwie 10,8% w kohorcie z AARD. Wzory świeceń otrzymanych w IFA również różniły się między osobami zdrowymi a chorymi na AARD. Gęsty drobnoziarnisty wzór jądrowy (DFS, AC-2) występował u 33,1% zdrowych osób z wynikiem pozytywnym dla ANA i u żadnego chorego na AARD. Natomiast homogenny wzór jądrowy (AC-1), wzór centromerowy (AC-3) i gruboziarnisty wzór jądrowy (AC-5) były obserwowane wyłącznie u chorych na AARD.
- W meta-analizie obejmującej badania ANA, przeprowadzone między 1997 a 2013 rokiem, odnotowano swoistość (określoną na podstawie badań w grupie kontrolnej u osób zdrowych) na poziomie 91,3% (CI 86,1-94,7%) przy rozcieńczeniu surowicy 1:80 i 79,2% (CI 72,3-84,8%) przy rozcieńczeniu 1:40 [36].

Niektóre badania skupiły się w szczególności na dzieciach. Sperotto i wsp. [37] wykazali, że 12% z 261 zdrowych włoskich dzieci (w wieku od 8 do 13 lat) miało wynik ANA dodatni (HEp-2 IFA). Hilario i wsp. [38] stwierdzili, że 12,7% brazylijskich zdrowych dzieci i nastolatków miało dodatni wynik ANA (HEp-2 IFA), natomiast Somers i wsp. [39] wykazali, że aż 15% dzieci z ogólnej populacji pediatrycznej (w wieku od 9 do 17 lat) w Meksyku (n = 114) miało dodatni wynik ANA, większą częstość wyników dodatnich odnotowano u dziewcząt. We wszystkich tych badaniach zastosowano punkt odcięcia 1:80. W grupie 207 dzieci z Tajlandii dodatni wynik ANA (HEp-2 IFA) stwierdzono u 15% z nich – punkt odcięcia: 1:40 [40]. W tych badaniach dodatnie wyniki ANA dotyczyły głównie małych mian tych przeciwciał. Sperotto i wsp. [37] stwierdzili, że częstość występowania i miana ANA wzrastały w okresie dojrzewania, zwłaszcza u dziewcząt. Starsze amerykańskie badanie wykazało, że tylko 0,4% z 241 dzieci (w wieku od 4 miesięcy do 16 lat) miało dodatni wynik ANA [41].

ANA mogą występować u znacznej liczby zdrowych osób (w tym dzieci, dorosłych i osób starszych), a częstość ich występowania zwiększa się wraz z wiekiem. Fakt ten należy uwzględnić przy interpretacji wyników testów.

5. ANA U CHORYCH ZE SCHORZENIAMI INNYMI NIŻ AUTOIMMUNIZACYJNE

Ponieważ testy w kierunku ANA są zwykle wykonywane u pacjentów, u których występują objawy chorobowe, a nie u zdrowych osób, ważne jest również zrozumienie wyników testów ANA u chorych bez choroby autoimmunizacyjnej. Wiele badań było poświęconych temu zagadnieniu. Stwierdzono, że u pacjentów z wieloma schorzeniami, takimi jak: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, dna moczanowa i dyslipidemia, częstość dodatnich wyników testów w kierunku obecności ANA (HEp-2 IFA) wynosi 12% przy rozcieńczeniu 1:80 [42]. Natomiast u pacjentów z nowotworami litymi i hematologicznymi częstość ta wynosi 20%, ale miana przeważnie nie przekraczają wartości 1:320 [43]. W ostatnim badaniu porównano wyniki HEp-2 IFA u 558 osób z chorobami innymi niż autoimmunizacyjne, 194 pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi oraz 1217 zdrowych osób. Częstość wyników pozytywnych była większa u chorych „bez choroby autoimmunizacyjnej” (18,3%) niż u zdrowych osób (12,3%). Wzory świeceń były podobne u chorych „bez choroby autoimmunizacyjnej” i osób zdrowych, z przewagą wzorów jądrowego drobnoziarnistego (AC-4) i gęstego drobnoziarnistego (AC-2) oraz brakiem homogennego wzoru jądrowego (AC-1), centromerowego (AC-3) i jądrowego gruboziarnistego (AC-5). Warto zauważyć, że bardzo niskie miana (1:80 i 1:160) ANA były częstsze u zdrowych niż u chorych „bez choroby autoimmunizacyjnej”, podczas gdy miano 1:320 było bardziej powszechne u chorych „bez choroby autoimmunizacyjnej” niż u zdrowych osób [44].

6. ANA WYKRYTE PRZY UŻYCIU HEP-2 IFA: SPOSÓB WYDAWANIA WYNIKÓW

Termin ANA jest terminem historycznym i nieprecyzyjnym, ponieważ nie odzwierciedla on tego, że wykrywane są również autoprzeciwciała skierowane przeciwko innym niż jądro kompartmentom komórkowym. Z tego powodu wielu specjalistów uważa,

że termin „przeciwciała przeciwjądrowe” nie jest już odpowiedni [8, 45]. Zaproponowano określenie „przeciwciała przeciwkomórkowe”. W związku z tym test HEp-2 IFA stał się narzędziem do wykrywania przeciwciał przeciwkomórkowych [8, 45].

Wyniki testu w kierunku ANA przeprowadzonego z zastosowaniem HEp-2 IFA powinny zawierać informacje o mianie przeciwciał oraz wzorze (typie) świecenia ANA [8, 46]. Zgodnie z niedawno opublikowanymi wytycznymi ICAP wzór świecenia powinien być preferencyjnie opisywany zgodnie z nomenklaturą ICAP (www.anapatterns.org) [45, 46].

ANA wykryte przy użyciu HEp-2 IFA powinny być raportowane wraz z oznaczeniem miana przeciwciał oraz wzoru świecenia ANA.

6.1. Ustalenie zakresu referencyjnego i znaczenie miana ANA

6.1.1. Istniejące zalecenia

Zalecenia dotyczące ustanawiania przedziałów referencyjnych zostały zaproponowane przez Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI; ang. *The Clinical and Laboratory Standards Institute*) oraz przez EASI we współpracy z Międzynarodową Unią Towarzystw Immunologicznych (IUIS; ang. *International Union of Immunology Societies*). Według CLSI „laboratorium powinno ustalić zakres wartości referencyjnych dla 95% populacji bez chorób reumatycznych z udziałem reprezentatywnej grupy pacjentów z przedziału wiekowego poniżej 40 lat oraz powyżej 40 lat” [47, 48]. Natomiast w zaleceniach EASI/IUIS [8] wskazano, że jako nieprawidłowy wynik ANA powinny być uznane wartości miano powyżej 95. percentyla populacji kontrolnej „zdrowych osób”. Zarówno CLSI, jak i EASI/IUIS zalecają, aby zakresy referencyjne były ustalane lokalnie [8, 47, 48]. Zgodnie ze stanowiskiem EASI/IUIS „rozcieńczenie początkowe 1:160 na substratach HEp-2(000) jest często odpowiednie do wykrywania ANA u dorosłych” [8]. Z niedawno przeprowadzonej przez ICAP ankiety wynika, że około 80% laboratoriów stosuje rozcieńczenie wstępne 1:80 [46]. Ankieta EASI wykazała, że rozcieńczenie wstępne 1:80 było stosowane w 60,5% laboratoriów [49].

Zgodnie z zaleceniami CLSI-EASI/IUIS 95% swoistość powinna być określona na podstawie badań przeprowadzonych zarówno w grupie osób zdrowych (EASI/IUIS), jak i chorych [47, 48]. Oczekuje się większego odsetka wyników dodatnich u chorych (którzy mogą mieć choroby nie-AARD, immunologiczne lub zapalne) niż u osób zdrowych. W rzeczywistości potwierdzono, że u pacjentów ze schorzeniami „innymi niż autoimmunizacyjne” częściej występują pozytywne wyniki ANA (HEp-2 IFA) niż w populacji osób zdrowych [44]. Ponadto CLSI podkreśliło znaczenie wieku (większa prewalencja ANA u osób starszych > 65. r.ż. [18%] w porównaniu do młodszej populacji [4%]) [50], płci (w populacji referencyjnej powinna być równowaga między mężczyznami i kobietami) i wzoru świecenia ANA [35, 47, 50]. Co więcej, CLSI uznało, że większe miano mogą wskazywać na większe prawdopodobieństwo choroby autoimmunizacyjnej lub dodatnich wyników testów w kierunku przeciwciał przeciwko dsDNA lub ekstrahowalnych antygenów jądrowych i zasugerowało zdefiniowanie różnych zakresów wyników dodatnich [48]. Jest to zgodne z koncepcją definiowania i wydawania wyników testów (przedziałów) związanych ze współczynnikiem prawdopodobieństwa LR [1].

Wener i wsp. [36] sugerowali, że w celu zharmonizowania badań ANA laboratoria powinny dostosować swoje badania tak, aby około 10% populacji osób zdrowych miało pozytywne wyniki w kierunku ANA przy badaniach surowicy w rozcieńczeniu 1:80.

Uwzględnienie poziomu przeciwciał pomaga zinterpretować wyniki testu ANA.

6.1.2. Najnowsze spostrzeżenia

AARD są rzadkie. Szacuje się, że zapadalność na SLE wynosi 47/100 000 [51], na IIM 14/100 000 [52], na SSc 30,7/100 000 [53], a na JIA 19,4/100 000 (dla dziewcząt) / 11/100 000 (dla chłopców) [54]. W związku z tym, przy niskim prawdopodobieństwie wstępnym („pre-test”), należy spodziewać się wielu fałszywie dodatnich wyników ANA, jeśli zastosowany zostanie próg 95% swoistości (więcej fałszywie niż prawdziwie dodatnich wyników).

Jak potwierdzają dwie ostatnie meta-analizy [10, 12], nie ma jednego punktu odcięcia (*cut-off*) dla HEp-2

IFA lub SPA, który byłby związany zarówno z dużą czułością, jak i dużą swoistością. Niski punkt odcięcia (np. 1:80) wiąże się z dużą czułością, ale małą swoistością [10, 12], podczas gdy wysoki punkt odcięcia (np. 1:320) wiąże się z większą swoistością, ale mniejszą czułością w odniesieniu do chorób autoimmunizacyjnych. Różne badania wykazały, że prawdopodobieństwo choroby autoimmunizacyjnej rośnie wraz ze zwiększeniem miana przeciwciał (przegląd w [1]). Odkryto to zarówno dla HEp-2 IFA wykonywanych manualnie [14, 15, 55, 56], jak i automatycznie [16, 17, 57]. Na przykład Op de Beek i wsp. [15] zauważyli, że LR dla SLE zależy od miana wynosząc odpowiednio 0,05; 0,6; 0,5; 6; 7; 19; 13,3; 19 dla wyników < 1:40, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, \geq 1:1,280 i punktu odcięcia dla wyników dodatnich (> 1:40) na komórkach transfekowanych SSA/Ro60 (HEp-2000) [15]. Te dane pokazują nie tylko, że LR zależy od miana przeciwciał, ale też wynik testu < 1:40 ma mniejszy LR niż wynik testu 1:40 lub 1:80. Wynik testu < 1:40 ma więc mały LR i dużą ujemną wartość predykcyjną. Takie wyniki są przydatne do wykluczenia choroby.

Oczywistym jest, że im większe miano przeciwciał, tym większa dodatnia wartość predykcyjna i LR dla AARD [58]. Co więcej, jest to częściowo zależne od wzoru świecenia [58]. Warto zauważyć, że wzór świecenia charakterystyczny dla DFS może być widoczny przy dużym mianie przeciwciał [35], ale monoswoiste przeciwciała przeciwko DFS70 nie są uważane za związane z AARD (ostatnie prace przeglądowe i meta-analizy w [59]).

Dlatego też oznaczenie wyniku testu ANA jako dodatniego lub ujemnego, z pominięciem informacji o mianie przeciwciał, jest zbyt uproszczone. Można temu zapobiec, raportując wartości LR swoiste dla danego miana (lub przedziału wyników), co pozwala na bardziej precyzyjne przekazywanie klinicznie ważnych informacji na podstawie wyniku testu [56, 60, 61]. LR to iloraz liczby osób z tym samym wynikiem (może to być dowolny wynik lub przedział wyników testu) i liczby osób zdrowych (tj. bez danej choroby), którzy uzyskali taki sam wynik. Szczegółowe informacje na temat zrozumienia i interpretowania wartości LR swoistych dla wyników testu ANA można znaleźć w niedawnej pracy przeglądowej [1].

Wielu diagnostów laboratoryjnych i lekarzy nie jest jeszcze zaznajomionych z pojęciem LR jako miary dokładności testu diagnostycznego w artykułach naukowych, systematycznych przeglądach i instrukcjach testów. Tradycyjnie charakterystyka testu opiera się na parametrach, takich jak: czułość, swoistość i wartość predykcyjna. W rzeczywistości wnioskowanie bayesowskie do obliczania prawdopodobieństw „post-test” jest uważane za niepraktyczne i trudne. Badanie Vermeersch i Bossuyt [60], oparte na kwestionariuszu składającym się z trzech pytań, przeprowadzone wśród 172 klinicystów, wykazało, że graficzna prezentacja prawdopodobieństwa „post-test” jako funkcji prawdopodobieństwa wstępnego („pre-test”) mogłaby pomóc w rozwiązaniu tej trudności. Pokazali oni, że większość klinicystów (81%) zdecydowanie przeszacowywała prawdopodobieństwo wystąpienia choroby, gdy informacje o dokładności diagnostycznej były podawane jako czułość i swoistość. Jeśli informacje te były podawane w przystępnej formie jako LR, liczba poprawnych odpowiedzi znacznie wzrosła – z 8 do 34%. W przypadku prezentacji wyników w formie graficznej uzyskano 73% poprawnych odpowiedzi [60].

6.1.3. Rekomendacja

Z uwagi na (bardzo) małą częstość występowania AARD, swoistość na poziomie 95% wydaje się problematyczna. Optymalniej byłoby osiągnąć próg 97,5% i 99% swoistości, szczególnie w kontekście małego prawdopodobieństwa wstępnego („pre-test”).

Aby informacje związane z mianem przeciwciał lepiej przekładały się na aspekt kliniczny, zalecane jest określanie miana ANA oraz podanie LR swoistego dla miana lub wyniku (zakresu) testu (wyrażonego w jednostkach intensywności światła).

Aby określić LR, należy użyć grup kontrolnych złożonych zarówno z chorych, jak i osób zdrowych (z takim samym rozkładem wieku i płci w obu grupach). W miarę możliwości powinno to być przeprowadzane w badaniach wielośrodkowych przez specjalistów w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej we współpracy z klinicystami i producentami urządzeń *in vitro* (IVD). Laboratorium może wtedy lokalnie zweryfikować swoiste LR obliczone na podstawie miana. Istotne jest uwzględnienie grupy kontrolnej złożonej z osób chorych.

W ostatnich latach na rynek wprowadzono zestawy testowe HEp-2 IFA i związane z nimi zautomatyzowane systemy zamknięte, które zostały zatwierdzone przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) i/lub posiadają znak CE. Takie zestawy i systemy mogą zmniejszyć różnice między wynikami wydawanymi przez laboratoria, które używają urządzeń/odczytników od tego samego producenta (przykład przypisania LR swoistego dla miana dla zautomatyzowanego systemu HEp-2 IFA w [57]).

Dla wielu wzorów świeceń miano przeciwciał rośnie wraz z prawdopodobieństwem wystąpienia AARD.

Dla większości wzorów nie ma jednego optymalnego punktu odcięcia w HEp-2 IFA, który jest związany zarówno z optymalną czułością, jak i swoistością dla AARD.

Podawanie współczynników prawdopodobieństwa (LR) swoistych dla miana lub wyniku zwiększa trafność kliniczną interpretacji wyników HEp-2 IFA w kierunku AARD.

6.2. Miana przeciwciał ANA w reumatycznych chorobach układowych u dzieci

Badania Malleson i wsp. [62] wykazały, że ANA przy początkowym rozcieńczeniu 1:40 miały wysoką czułość, ale bardzo niską dodatnią wartość predykcyjną (0,10) dla młodzieńczych postaci SLE, MCTD lub zespołów nakładania. W związku z tym negatywny wynik testu przy punkcie odcięcia 1:40 ma wysoką ujemną wartość predykcyjną, ale niskie miana występowały często u dzieci bez układowych chorób reumatycznych. Dodatnia wartość predykcyjna rosła wraz ze wzrostem poziomu przeciwciał, a autorzy sugerowali, że próg początkowy 1:160 lub 1:320 zwiększyłby użyteczność kliniczną testu. Na podstawie danych dotyczących dziewcząt w tym badaniu wyliczono, że wskaźnik LR swoisty dla miana wynosił 0,2; 0,93 i 2,7 odpowiednio dla miana: 1:80, 1:160 i 1:320.

Zgodnie z wynikami uzyskanymi przez Malleson i wsp. [62] oraz McGhee i wsp. [63] dzieci chore na SLE mają duże miana ANA, a małe miana ANA są powszechne u dzieci bez przewlekłych chorób zapalnych.

Hilario i wsp. [38] donoszą, że 12,7% zdrowych dzieci i nastolatków z Brazylii miało pozytywne wyniki testu ANA (rozcieńczenie początkowe 1:80). U zdrowych dzieci wykrywano ANA w mniejszym mianie niż u dzieci z rozpoznaniem AARD (28 SLE, 9 JDM i 8 SSc). Na podstawie tych danych obliczono wskaźnik LR swoisty dla mian w układowych chorobach reumatycznych na poziomie 0,94; 2,7; 3,9; 9,4 i 52 odpowiednio dla mian: 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 i $\geq 1:1280$ (grupa kontrolna – dzieci zdrowe). Dane te wskazują, że u dzieci LR dla AARD zwiększa się wraz ze wzrostem miana przeciwciał. Ponadto wskaźniki LR, swoiste dla mian dla AARD wynoszące 1:80 i 1:160, były porównywalne do tych obserwowanych u dorosłych (odpowiednio 0,5 dla 1:80 i 6 dla 1:160) [15]. Watanukul i wsp. [40] oraz Arroyava i wsp. [41] donoszą również, że miana ANA wykryte w przebiegu SLE u dzieci były wyższe niż u zdrowych dzieci.

Nie ma dowodów na to, że w przypadku dzieci należy stosować niższe początkowe rozcieńczenie w badaniu HEp-2 IFA w celu badań przesiewowych w kierunku AARD.

6.3. Wzory świeceń HEp-2 IFA

6.3.1. Najnowsze spostrzeżenia i zalecenia

Najnowsze i najbardziej kompleksowe badania nad wzorami świeceń HEp-2 IFA zostały przeprowadzone przez ICAP [45, 64, 65]. Ten konsensus jest dobrą podstawą do opisu wzorów i zawiera nazwy wzorów z odpowiadającym im kodem alfanumerycznym AC (ang. *anti-cell*), szczegółowy opis głównych cech do identyfikacji wzoru, możliwą swoistość dla auto-przeciwciał oraz znaczenie kliniczne każdego wzoru świecenia na komórkach HEp-2. ICAP zróżnicował wzory świeceń na poziomie podstawowym (ang. *competent level*) i zaawansowanym (ang. *expert level*) [45, 64, 65]. Krajowe wytyczne mogą dostosować konsensus ICAP do swojej sytuacji lokalnej, tak jak zrobiono to np. w Brazylii i Holandii [66, 67].

W celu zapoznania się z ogólnym przeglądem wzorów świeceń HEp-2 IFA oraz powiązanych z nimi przeciwciał i antygenów odsyłamy do publikacji ICAP [45, 64, 65] oraz strony internetowej www.anapatterns.org [1]. Z wyjątkiem wzoru centromerowego (AC-3), wzór świecenia na komórkach HEp-2 nie może być

stosowany w celu wiarygodnego określenia antygenu swoistego dla przeciwciała, ponieważ ten sam wzór może być spowodowany przez różne przeciwciała skierowane przeciwko różnym antygenom. Z drugiej strony, wzór świecenia może sugerować konieczność dalszej oceny swoistych przeciwciał [1, 65]. Ponadto pomocne jest sprawdzenie, czy obserwowane na HEp-2 IFA wzory świeceń odpowiadają określoneму przeciwciału (przeciwciałom), zidentyfikowanemu w swoistym dla antygenu badaniu SPA. Niektóre cytoplazmatyczne wzory świeceń często są klinicznie istotne i powinny być raportowane [1, 46, 47, 65, 67].

W ostatnim dużym międzynarodowym badaniu dotyczącym wydawania wyników i interpretowania wzorów świeceń HEp-2 IFA wzór centromerowy (AC-3) i homogeny (AC-1) uzyskały najwyższą ocenę (następnie wzory ziarnisty i jąderkowy) pod względem klinicznej istotności wzorów jądrowych podstawowych (ang. *competent level*), a wzór DFS (AC-2) uzyskał ocenę najniższą. Spośród wzorów cytoplazmatycznych wzór siateczkowy/podobny do AMA (AC-21) uzyskał najwyższy wynik pod względem klinicznej istotności, a wzór biegunowy/typu aparat Golgiego (AC-22) i typu *rods and rings* (AC-23) najniższy [68, 69]. Niski wynik dla przeciwciał przeciwko aparatowi Golgiego wynika z ograniczonego związku klinicznego tych przeciwciał z AARD [70, 71]. Przeciwciała typu *rods and rings* mogą nie być wykrywalne na komórkach HEp-2 niektórych producentów IVD i są zwykle stwierdzane w przypadku zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C leczonego α -interferonem i/lub rybawiryną [65]. W dużym retrospektywnym badaniu wykazano, że spośród rzadkich ANA przeciwciała typu *multiple nuclear dots* (w wyższych mianach) (AC-6) i anty-błona jądrowa (AC-11, 12) mają najwyższy kliniczny związek z autoimmunizacyjnymi chorobami wątroby [71]. Warto zauważyć, że ostatnia aktualizacja ICAP ponownie rozpatruje fluorescencję błony jądrowej (AC-11, 12) i wzór pleomorficzny (AC-13, 14) jako te, które powinny być rozpoznawane na poziomie podstawowym (ang. *competent level*) [45]. W przypadku błony jądrowej (AC-11, 12) zmiana ta jest zgodna z ostatnimi badaniami [68, 71]. W przypadku wzoru pleomorficznego nie była ona jednak poparta wynikami ostatnich badań [68, 72]. Badanie przeprowadzone w USA wykazało wysoką zgodność/dokładność

w identyfikacji wzorów świeceń o typie jądrowym, ale mniejszą w przypadku wzorów cytoplazmatycznych i mitotycznych [69]. Ostatnie wielośrodkowe badanie obserwacyjne przeprowadzone w Hiszpanii wykazało, że wykrycie rzadkich wzorów świeceń ANA bez równoczesnej obecności swoistych przeciwciał może prowadzić do podejrzenia choroby autoimmunizacyjnej [73]. Przeciwciała przeciw PCNA początkowo opisywane były jako wysoce swoiste dla SLE, ale ostatecznie stwierdzono, że występują w jego przebiegu rzadko i mogą być obecne także w innych chorobach [74]. Wzór świecenia może nie być widoczny na wszystkich substratach HEp-2 [75].

W wielu próbkach surowicy wykrywa się więcej niż jeden wzór świecenia w HEp-2 IFA, a niektóre kombinacje kilku wzorów świeceń mają znaczenie kliniczne. Współwystępowanie dwóch lub więcej spośród następujących wzorów: centromerowy (AC-3), punktowe świecenie błony jądrowej (AC-12), ang. *multiple nuclear dots* (AC-6) i wzór cytoplazmatyczny siateczkowy/podobny do AMA (AC-21), powinno nasunąć podejrzenie PBC [76].

Ważne wzory świeceń HEp-2 IFA o najwyższym potencjalnym znaczeniu klinicznym dla AARD, AIH i PBC to:

- AARD
 - Jądrowy: centromerowy (AC-3), homogeny (AC-1), (drobno-/grubo-) ziarnisty (AC-4, 5), jąderkowy (AC-8, 9, 10), ang. *multiple nuclear dots* (AC-6).
 - Cytoplazmatyczny: (gęsty) drobnoziarnisty (AC-19, 20).
- PBC
 - Jądrowy: ang. *multiple nuclear dots* (AC-6), błona jądrowa (AC-11, 12).
 - Cytoplazmatyczny siateczkowy/podobny do AMA (AC-21).
- AIH
 - Jądrowy: homogeny (AC-1), (drobno-/grubo-) ziarnisty (AC-4, 5).
 - Cytoplazmatyczny: liniowy aktynowy (AC-15).

Rozpoznanie wzoru DFS (AC-2) na komórkach HEp-2 wymaga specjalistycznego szkolenia [77]. Międzynarodowa ankieta internetowa potwierdziła, że rozpoznawanie wzoru DFS stanowi wyzwanie [78], a z wniosku końcowego wynika, że obecność przeciwciał reagujących z DFS70 powinna być potwierdzana swoistym testem immunologicznym, zanim wyniki zostaną przekazane klinicystom [78], co dotyczy również wszystkich innych wzorów świeceń HEp-2 IFA, z wyjątkiem wzoru centromerowego (AC-3) [65]. Jednak w przypadku wysoko wykwalifikowanych diagnostów próbki z rzeczywistym jądrowym wzorem DFS (AC-2) są silnie związane z monoswoistymi przeciwciałami anti-DFS70 [79]. Należy zauważyć, że istnieją różnice w skuteczności testów komercyjnych w wykrywaniu przeciwciał przeciw DFS70 [80]. Prevalencja monoswoistych przeciwciał anti-DFS70 u zdrowych osób waha się od 1 do 8% (głównie u kobiet), ale jest niska w przypadku AARD [81, 82]. Należy jednak zauważyć, że izolowane przeciwciała anti-DFS70 były wykrywane u chorych na SLE [80, 83].

Ostatnim zdefiniowanym przez ICAP wzorem świecenia jest wzór związany z przeciwciałami przeciwko topoizomerazie I DNA (ang. *topo-I-like pattern*) [83]. Opis wzoru jest dla wielu laboratoriów nowy. Z tego powodu niezbędne są dalsze badania, aby udowodnić znaczenie tego wzoru przy wyborze testu identyfikującego przeciwciała przeciwko topoizomerazie I.

Podsumowując, wzory świeceń ANA powinny być interpretowane łącznie z mianem przeciwciał i wynikami swoistych antygenowo testów potwierdzających (SPA). Niektóre wzory świeceń mają większe znaczenie kliniczne niż inne.

Wzór świecenia HEp-2 IFA może dostarczyć przydatnych informacji dotyczących znaczenia klinicznego i wskazówek w odniesieniu do dalszych badań.

Kliniczna istotność wyniku testu HEp-2 IFA zależy od obserwowanego wzoru świecenia.

Korelacja wzoru świecenia HEp-2 IFA z wynikami testów antygenowo swoistych zwiększa znaczenie obu wyników.

Główne wzory ANA (o najwyższym znaczeniu klinicznym) obejmują:

– Jądrowy: centromerowy (AC-3), homogenny (AC-1), gęsty drobnoziarnisty (AC-2), ziarnisty (AC-4, 5), jąderkowy (AC-8, 9, 10), ang. *multiple nuclear dots* (AC-6), błona jądrowa (AC-11, 12).

– Cytoplazmatyczny: siateczkowaty/podobny do AMA (AC-21), (gęsty) drobnoziarnisty (AC-19, 20), liniowy aktynowy (AC-15).

7. ANA W TEŚCIE HEp-2 IFA: METODYKA

7.1. Substrat: HEp-2 vs. HEp-2000

Ważne jest maksymalne zwiększenie szans na wykrycie przeciwciał anti-SSA/Ro60, ponieważ auto-przeciwciała te są związane z zespołem Sjögrena, postacią skórną toczenia rumieniowatego układowego, wrodzonym blokiem serca, toczeniem noworodkowym, toczeniem rumieniowatym układowym i innymi AARD [85-87]. Jednakże wykorzystanie HEp-2 IFA do wykrywania przeciwciał przeciwko SSA/Ro60 było ograniczone ze względu na brak czułości, spowodowany małą zawartością antygenu SSA/Ro60 oraz obserwowaną dyfuzją antygenu z jądra komórkowego podczas utrwalania i kolejnych etapów przygotowywania substratu [88]. W związku z tym opracowano substrat HEp-2000, czyli zmodyfikowany substrat HEp-2 transfekowany cDNA SSA/Ro60, aby zwiększyć szanse na wykrycie przeciwciał przeciwko SSA/Ro60 [49]. Nadekspresja antygenu SSA/Ro60 prowadzi do wyraźnego świecenia drobnoziarnistego z wybarwieniem stref jąderkowych w 10-20% komórek interfazowych (czasami określanego mianem świecenia „atypowego ziarnistego” lub „wzorem SSA/Ro60”) [86, 89]. Wykazano, że charakterystyczny wzór świecenia na komórkach HEp-2000 jest wysoce swoisty i dlatego umożliwia bezpośrednią identyfikację przeciwciał przeciwko SSA/Ro60 [88, 90-92]. Zaproponowano związek pomiędzy „wzorem SSA/Ro60” na komórkach HEp-2000 przy obecności lub braku innych wzorów świecenia a niektórymi stanami klinicznymi [93]. W dwóch badaniach zaobserwowano wysoką czułość (88%) substratu HEp-2000 w wykrywaniu autoprzeciwciał anti-SSA/Ro60 zdefiniowaną przez konwencjonalne techniki referencyjne (takie jak podwójna

immunodyfuzja i elektroforeza przeciwwądowa) [90, 91]. Należy jednak wspomnieć, że komórki HEp-2000 nie są uważane za idealne do wykrywania przeciwciał przeciwko SSA/Ro60, ponieważ mogą nie być skuteczne w wykrywaniu tych przeciwciał w niektórych surowicach [90, 91, 94, 95]. Oprócz HEp-2000 dostępne są inne zmodyfikowane substraty komórkowe. W podłożu HEp-20-10 zmodyfikowany jest cykl komórkowy w celu zwiększenia proporcji komórek mitotycznych.

Wyniki bezpośredniego porównania różnych substratów są sprzeczne, a prawdopodobnie również zniekształcone przez różnice w swoistości koniugatów (swoisty dla IgG lub nie) między zestawami testowymi. W jednym badaniu na komórkach HEp-2000 wykryto przeciwciała anty-SSA w przypadku 4% próbek negatywnych w teście z wykorzystaniem komórek HEp-2 [96]. W badaniu porównującym komórki HEp-2000 z czterema dostępnymi na rynku testami opartymi na komórkach HEp-2, komórki HEp-2000 były znacznie bardziej czułe niż wszystkie cztery testy wykorzystujące komórki HEp-2 w wykrywaniu próbek z izolowanymi przeciwciałami przeciwko SSA (potwierdzone testem blot) czułość komórek HEp-2000 wynosiła od 24 do 91%) [93]. Porównywalną czułość między komórkami HEp-2000 i HEp-2 w wykrywaniu przeciwciał anty-SSA (72% [CI 68-76%] dla HEp-2 w porównaniu do 75% [CI 70-78%] dla HEp-2000) zaobserwował Hoffman i wsp. w badaniu opartym na 68 próbkach dodatnich dla przeciwciał anty-SSA/Ro60 w teście *line blot* [94].

Z drugiej strony, w kontekście dyskusji na temat przydatności testów serologicznych w kierunku ANA jako kryterium wejściowego do badań klinicznych, ostatnie badanie przeprowadzone na pacjentach, u których zdiagnozowano (i potencjalnie leczono) SLE, wykazało znacznie niższą czułość (72,4%) dla komórek HEp-2000 w porównaniu z trzema testami opartymi na komórkach HEp-2 (czułość wynosiła od 86,2 do 96,7%) i jednym na komórkach HEp-20-10 (substrat wzbogacony komórkami mitotycznymi) (czułość 99,4%) [97]. Warto zauważyć, że to badanie nie skupiało się na wykrywaniu przeciwciał anty-SSA/Ro60 i nie porównywało swoistości zastosowanych testów HEp-2 [95]. Niemniej jednak substrat HEp-2000 (oraz jeden substrat HEp-2) lepiej korelował

z aktywnością choroby [97]. Pomimo dużej czułości komórek HEp-2000 dla przeciwciał anty-SSA/Ro60, w ciągu ostatnich lat w niektórych częściach Europy zastąpiono komórki HEp-2000 substratem bazującym na komórkach HEp-2 (spadek liczby użytkowników HEp-2000 o 47% przez 6 lat [2013-2019] [źródło: Sciensano, Belgia] oraz o 40% przez 5 lat [2014-2019] [źródło: UKNEQAS, UK]). Nie wiadomo, czy ta zmiana dotyczy również innych części Europy lub innych kontynentów. Czynniki, które przyczyniły się do tej zmiany, są prawdopodobnie zróżnicowane (np. ograniczona liczba systemów CAD wykorzystujących HEp-2000, dostępność alternatywnych zautomatyzowanych testów SPA dla przeciwciał SSA/Ro60 i inne).

Swoisty dla HEp-2000 wzór świecenia przeciwciał anty-SSA/Ro początkowo nie został uwzględniony w nomenklaturze ICAP, ponieważ skupiono się wówczas na substratach komórkowych niemodyfikowanych [65, 86]. Ta decyzja została ostatnio podana w wątpliwość przez Lee i wsp., zwłaszcza w kontekście wysokiej czułości substratu HEp-2000 dla wykrywania przeciwciał anty-SSA/Ro60 i oceny ryzyka wystąpienia tocznia u noworodków [85, 87]. W odpowiedzi na komentarz Lee i wsp. [87], ICAP uznał, że decyzja o nieuwzględnianiu wzorów świeceń na modyfikowanych substratach komórkowych może być dyskusyjna [86]. Na swojej stronie internetowej ICAP dodał informacje na temat komórek HEp-2000, stwierdzając, że barwienie przeciwciał anty-SSA/Ro60 na szkiełkach z komórkami HEp-2000 jest inne niż na szkiełkach z linia komórkową HEp-2 (zob. www.anapatterns.org, wzór AC-4). Niedawno zaproponowano warianty wzoru świecenia określanego jako jądrowy drobnoziarnisty (AC-4), aby zwiększyć korelację z obecnością przeciwciał anty-SSA/Ro60 [98].

HEp-2, HEp-2000 i HEp-20-10 mogą być używane jako substraty do przesiewowej oceny obecności ANA w IFA.

7.2. Koniugaty

Opublikowane porównawcze dane dotyczące stosowania różnych koniugatów do wykrywania obecności ANA w HEp-2 IFA są bardzo ograniczone. Jedno badanie dotyczące oceny ANA z użyciem HEp-2 IFA

u zdrowych dawców wykazało obecność przeciwciał i izotypie IgG w 23/62 (37,1%) surowicach, które były ANA-dodatnie w testach z zastosowaniem poliwalentnego koniugatu anty-Ig (głównie o miano niższe lub równe 1:80) [99]. Drugie badanie dotyczące identyfikacji ANA u 100 osób z chorobą układową tkanki łącznej wykazało, że we wszystkich surowicach występowały ANA klasy IgG i były albo izolowane, albo współwystępowały z ANA klasy IgM i/lub IgA [100]. Autorzy badania zasugerowali stosowanie poliwalentnego koniugatu do czasu wyjaśnienia roli ANA klasy IgA w diagnozowaniu chorób, ich monitorowaniu i ocenie rokowania [100]. Według niektórych autorów i wytycznych CLSI dotyczących HEp-2 IFA, stosowanie poliwalentnego koniugatu może wpływać na pojawianie się tła we fluorescencji i wykrywanie klinicznie nieistotnych przeciwciał [48, 101, 102]. Z tego powodu zalecane jest stosowanie swoistego koniugatu przeciwko ludzkim IgG (Fc), aby zwiększyć wartość predykcyjną testu ANA [102, 103]. ANA klasy IgM są również związane z reumatoidalnym zapaleniem stawów, leczeniem, starszym wiekiem badanych i zwykle nie mają znaczenia diagnostycznego w odniesieniu do AARD [48, 104]. Ponadto należy wspomnieć, że leczenie biologicznymi lekami, takimi jak infliksymab, indukuje ANA, zwłaszcza IgM i IgA przeciwko dsDNA [105, 106]. W rzadkich przypadkach te przeciwciała są związane z rozwojem tocznia polekowego [105, 106].

Użycie koniugatu swoistego dla IgG jest wystarczające do identyfikacji większości istotnych klinicznie ANA.

Swoistość izotypowa stosowanego koniugatu (poliwalentny/swoisty dla IgG) przyczynia się do zmienności wyników badania.

7.3. Automatyczna mikroskopia (CAD)

7.3.1. Alternatywa dla mikroskopii manualnej: różnicowanie wyniku dodatniego/ujemnego z oceną wzoru fluorescencji

W trakcie ostatniej dekady intensywnie oceniano cyfrowe systemy dla HEp-2 IFA, umożliwiające automatyczną interpretację dodatnią/ujemną i rozpoznawanie wzoru fluorescencji. Kilka badań porównywało

systemy CAD z manualnie wykonywanymi badaniami HEp-2 IFA i wykazało dobrą ogólną zgodność (wynik dodatni/ujemny) między automatyczną a klasyczną wizualną interpretacją (średnia całkowita zgodność: 93,7%; zakres 71-99%) [107-122]. W porównaniu do klasycznych manualnych testów HEp-2 IFA, systemy CAD miały dużą czułość dla wykrywania ANA w klinicznie istotnych mianach (średnia czułość: 95,7%; zakres 87-99%) [107, 110, 116]. Szczegółowa analiza próbek niezgodnych wykazała, że poprawne różnicowanie wyników dodatnich/ujemnych przez systemy CAD jest najczęściej utrudnione przez małe miano ANA, cytoplazmatyczny wzór świecenia (np. spowodowany przez przeciwciała przeciwko rybosomom, mitochondriom, Jo-1, lizosomom, wimentynie) oraz szczególne wzory świeceń: jądrowe (np. typu ang. *nuclear dots*) i mitotyczne (np. typu centrosomy, ang. *midbody*) [109, 110, 116]. Dokładność diagnostyczna zautomatyzowanej metody HEp-2 IFA w kohortach chorych na AARD została również udokumentowana w kilku badaniach [109, 112, 119, 120, 122, 123]. Ostateczna czułość diagnostyczna CAD, w porównaniu z klasyczną wizualną oceną HEp-2 IFA, została ostatnio obliczona na podstawie połączonych danych z czterech badań i wynosiła odpowiednio 84% (95% CI = 81,4-87,7) vs. 78,2% (95% CI = 74,5-81,7) łącznie dla AARD; 95,5% (95% CI = 90,4-98,3) vs. 93,9% (95% CI = 88,4-97,3) dla SLE i 86,5% (95% CI = 78,4-92,4) vs. 83,7% (95% CI = 75,1-90,2) dla SSc (przeгляд systematyczny i meta-analiza w [124]). Podsumowując, wyniki te wspierają wdrażanie tych platform w pierwszym kroku przesiewu ANA (różnicowanie wyniku dodatniego/ujemnego).

Oprócz klasyfikacji wyników ANA jako dodatnich lub ujemnych, większość (ale nie wszystkie) systemów CAD zapewnia również automatyczną interpretację wzoru świecenia dla wcześniej zdefiniowanego zestawu wzorów, głównie obejmującego wzory jądrowe (homogenne – AC-1; ziarnisty – AC-4, 5; jądrowy – AC-8, 9, 10; centromerowy – AC-3) oraz wzory cytoplazmatyczne. Niektóre systemy CAD są również w stanie zidentyfikować wzór *nuclear dots* (AC-6, 7) oraz wzory świeceń: gęsty drobnoziarnisty (AC-2) i błony jądrowej (AC-11, 12). Niemniej jednak, mimo że dane muszą być interpretowane w świetle ograniczeń deklarowanych przez producenta (pod względem rozpoznawanych wzorów świeceń), opublikowane

dane dotyczące wydajności rozpoznawania wzorów budzą wątpliwości. Meta-analiza oparta na 11 badaniach wykazała łączną zgodność dodatnią dla wszystkich wzorów (w tym homogenego, ziarnistego, jąderkowego i centromerowego) wynoszącą 68,5% (95% CI = 67,2-69,7) (przeгляд systematyczny i meta-analiza w [124]). Dokładność rozpoznawania wzoru zależała od rodzaju wzoru i substratu. Systemy CAD miały wyraźne trudności w poprawnym identyfikowaniu rzadkich wzorów jądrowych, cytoplazmatycznych i wzorów nakładających się [109-111, 116, 119], a najniższą łączną zgodność dodatnią (11,7%) stwierdzono dla wzoru typu *nuclear dots* (95% CI = 6,8-18,3) [124]. Rozpoznawanie wzorów świeceń przez systemy CAD wymaga udoskonalenia, dlatego w dalszym ciągu konieczna jest ocena eksperta przed zatwierdzeniem wyniku HEp-2 IFA.

7.3.2. Miano rzeczywiste vs. miano szacowane

Interesującą cechą platform CAD HEp-2 IFA jest częste zapewnianie systemowej (arbitralnej) ilościowej oceny intensywności fluorescencji (ang. *fluorescence intensity [FI] measure*). Dla kilku dostępnych systemów CAD pomiar FI wykazywał wysoką odtwarzalność analityczną [109, 110, 125, 126] oraz znaczącą korelację z końcowymi mianami uzyskanymi przez ocenę wzrokovą [107-110, 116, 119, 122, 127]. Ponadto wykazano, że wartość wskaźnika LR dla AARD rośnie wraz ze wzrostem wartości pomiaru FI [109, 119, 122, 128]. Te obserwacje ilustrują, że szacowanie FI przez system CAD dla HEp-2 IFA ma zastosowanie kliniczne.

Powyższe dane sugerują również, że pomiar FI może stanowić przydatną alternatywę dla określania końcowego miana. Ponadto niektóre z dostępnych obecnie platform CAD HEp-2 IFA zapewniają funkcję szacowania miana na podstawie pojedynczego rozcieńczenia próbki, co jest określane jako *single well titer* [125]. Niemniej jednak istnieją pewne ograniczenia w bezpośrednim zastosowaniu tej korelacji między pomiarem FI a określaniem końcowego miana w celu zrezygnowania z szeregu rozcieńczeń. Po pierwsze, związek między pomiarem FI a końcowym mianem jest swoisty dla systemu i wydaje się zależeć od substratu [119] oraz wzoru ANA [126, 127]. Ponadto w przypadku wzorów ANA, które barwią tylko wybrane elementy komórek (np.

nuclear dots czy cytoplazmatyczny drobnoziarnisty związany z Jo-1), możliwe jest niedoszacowanie miana końcowego i wskaźnika LR dla AARD [128]. Po drugie, nakładające się wzory świeceń przeciwciał mogą zostać zamaskowane i pominięte, jeśli próbki są analizowane tylko w jednym rozcieńczeniu.

Podsumowując, wartość dodana pomiaru FI generowanego przez systemy CAD polega na ilościowej ocenie FI, która może być użyta do oszacowania miana końcowego i uzyskania informacji na temat prawdopodobieństwa wystąpienia choroby. Jednakże nie oznacza to automatycznie, że konwencjonalne szeregi rozcieńczeń powinny zostać wyeliminowane. W ostatnich wytycznych ICAP stwierdził, że wynik testu powinien określać, czy miano końcowe jest szacowane czy uzyskane poprzez szereg rozcieńczeń [46].

7.3.3. Wartość dodana CAD w zapewnieniu jakości

W ciągu ostatnich kilku lat pomiary FI systemów CAD HEp-2 IFA wykazały również potencjał w ocenie i kontroli kilku zmiennych wpływających na jakość całego procesu testowania HEp-2 IFA. Podstawą tego potencjału jest wysoka odtwarzalność analityczna pomiarów FI, co zostało udokumentowane dla niektórych systemów CAD [109, 110, 126, 129]. Badania eksperymentalne i retrospektywne wykazały, że monitorowanie pomiarów FI na materiałach kontrolnych, jak również na rutynowych próbkach, stanowi wystarczający wskaźnik jakości, o ile istnieją jasno określone kryteria akceptacji [129-132]. Powinny być one oparte na identyfikacji klinicznie ważnych zmian w pomiarach FI. Faktycznie, monitorowanie odtwarzalności FI na wybranych próbkach (w obrębie jednego laboratorium lub między różnymi laboratoriami) oraz monitorowanie mediany FI w każdym teście pozwoliło na wykrycie problemów technicznych związanych z wyposażeniem zarówno w fazie przedanalizacyjnej (np. problemy z pipetowaniem na procesorze do szkiełek), jak i analitycznej (np. problemy z kalibracją CAD). Monitorowanie FI pozwoliło również na wykrycie zmian FI związanych ze zmiennością koniugatów między partiami w obrębie różnych numerów seryjnych [131, 132]. Na uwagę zasługuje fakt, że metoda ta okazała się bardziej czuła niż tradycyjne, bardziej subiektywne wskaźniki kontroli jakości, takie jak ilościowa kontrola

jakości na próbkach IQC i miesięczne monitorowanie odsetka wyników dodatnich w próbkach pacjentów [129-132].

Biorąc pod uwagę te obserwacje, można stwierdzić, że systemy CAD z udokumentowanymi odtwarzalnymi ilościowymi pomiarami FI umożliwiają wprowadzenie obiektywnych i bardziej czułych procedur kontroli jakości do monitorowania całego procesu testowania HEp-2 IFA, począwszy od rozcieńczenia do interpretacji wyniku w jednym laboratorium (procedury wewnętrznej kontroli jakości), jak również między laboratoriami (programy zewnętrznej kontroli jakości) [131]. Należy zauważyć, że nie wszystkie systemy CAD zapewniają pomiary FI (odtwarzalne), a monitorowanie szacowania końcowego miana (na podstawie odczytu pojedynczego rozcieńczenia), jakie oferuje CAD, może być alternatywną opcją, jeśli jest dostępna.

System komputerowego wspomaganie diagnozy (CAD) może wspierać wykonanie HEp-2 IFA, ale nadal zalecane jest przeprowadzanie rewizji klasyfikacji wyników dodatnich/ujemnych przez ekspertów.

CAD może wspierać HEp-2 IFA, ale wymagane jest sprawdzenie oceny rozpoznanych wzorów przez ekspertów.

Kilka spośród dostępnych systemów CAD dla HEp-2 IFA dostarcza informacji o intensywności fluorescencji (pomiar FI), który zawiera:

- informacje o szacowanym mianie,
- informacje na temat prawdopodobieństwa AARD.

Gdy używany jest system CAD dla HEp-2 IFA, który dostarcza odtwarzalne pomiary FI, śledzenie FI może przyczynić się do monitorowania jakości badania (np. jako część programu IQC) (nie dotyczy to wszystkich systemów na rynku).

8. SPOSOBY ZAPEWNIENIA JAKOŚCI W BADANIACH HEP-2 IFA

Zarządzanie jakością jest ważnym zadaniem laboratoriów medycznych zajmujących się opieką nad

pacjentami i badaniami translacyjnymi. Zgodnie z (między)narodowymi wytycznymi oraz wymaganiami akredytacyjnymi EN/ISO 15189:2012 [133] laboratorium ma obowiązek monitorowania i kontroli jakości całego procesu badawczego poprzez opracowanie i wdrożenie kompleksowego programu zapewnienia jakości (QA; ang. *quality assurance*). Niemniej, w kontekście testów w kierunku zaburzeń autoimmunizacyjnych, a konkretnie badań w kierunku ANA, przetłumaczenie i interpretacja tych wytycznych/wymagań i zaproponowanie swoistych dla testu zaleceń dotyczących sposobu tworzenia programu QA jest niezwykle trudne (przegląd w [134]).

8.1. Wewnętrzna kontrola jakości

Jednym z kluczowych filarów w programie QA laboratoriów klinicznych jest wewnętrzna kontrola jakości (IQC), która polega na monitorowaniu wyników uzyskanych w próbkach kontroli jakości (QC) o znanym wzorze/swoistości i intensywności fluorescencji w każdym badaniu. Warianty IQC dla HEp-2 IFA obejmują: minimalną liczbę wymaganych próbek, miano, pochodzenie, wzory fluorescencji wybranych próbek oraz metodykę monitorowania, rejestracji i oceny wyników QC.

8.1.1. Minimalna liczba próbek IQC i miano

W przypadku zestawów do badania HEp-2 IFA kontrola jakości obejmuje zwykle jedną próbkę IQC dodatnią i jedną ujemną. Zgodnie z zaleceniami Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI) [48] oraz innymi bardziej aktualnymi rekomendacjami, w tym brazylijskimi wytycznymi [66, 135], zaleca się stosowanie (co najmniej) dwóch próbek IQC w każdej serii badanej, jednej ujemnej i jednej dodatniej. Ważne jest również badanie co najmniej jednej próbki o małej wartości dodatniej, bliskiej punktowi odcięcia [48, 134, 135]. Nie ma jednak jednoznacznych zaleceń dotyczących wartości tego dodatniego wyniku. Tylko jedno z zaleceń [135] sugeruje dokładne docelowe miano dla próbki kontroli o małej wartości dodatniej (1/80-1/160). W starszej wersji wytycznych CLSI (wcześniej NCCLS), dotyczących analizy HEp-2 IFA, zalecono, aby kontrola dodatnia miała miano większe o jedno rozcieńczenie w porównaniu do ustalonego punktu odcięcia [47]. W bardziej aktualnych zaleceniach CLSI z 2006 roku (CLSI LA02-A2) – obejmujących wytyczne zarówno dla

IFA, jak i ELISA – stwierdzono, że wybrana kontrola dodatnia powinna być na poziomie istotnym dla podejmowania decyzji klinicznych [48]. W kontekście stosowania/raportowania wskaźnika LR dla AARD zalecamy dopasowanie docelowego miana próbki kontroli o małej wartości dodatniej do wskaźnika LR wynoszącego 2-5 dla AARD (ponieważ taki wskaźnik LR sugeruje niewielkie, ale potencjalnie istotne klinicznie różnice). Odpowiada to mianu 1:160 dla substratu HEp-2000 [15] lub jednostce intensywności światła (LIU; ang. *light intensity unit*) wynoszącej 522–910 (LR 5,2) na komórkach HEp-2 Werfen w systemie NOVA View CAD [16]. Należy przeprowadzić odpowiednie badania, aby ustalić analogiczne progi dla innych produktów komercyjnych.

8.1.2. Pochodzenie próbek IQC

Zaleca się wybór próbek IQC o znanym wzorze/swoistości i intensywności fluorescencji (FI) [134]. W praktyce większość zestawów kontrolnych zapewnia próbkę IQC dodatnią i ujemną, które spełniają te kryteria. Jednak te zestawy mogą nie być idealne z kilku powodów. Po pierwsze, są one często silnie dodatnie i całkowicie ujemne, charakteryzują skrajne wartości, które nie są reprezentatywne dla większości rutynowych próbek i nie identyfikują (niewielkich) problemów analitycznych [135]. Po drugie, często są one „gotowe do użycia” i nie wymagają wcześniejszego rozcieńczenia, przez co nie obejmują całego procesu analitycznego [130]. Po trzecie, kontrole dostarczone w zestawie mogą nie być trwałe, ponieważ nie można wykluczyć, że producenci zmieniają swoje kontrole (np. w różnych partiach reagentów) [134]. Dlatego preferowane są nierozcieńczone próbki IQC pochodzące od pacjentów (pulowane albo pojedyncze próbki pacjentów wybrane spośród rutynowych próbek laboratoryjnych, które zostały uprzednio podzielone – aby ograniczyć liczbę cykli zamrażania i rozmrażania – i zamrożone do czasu analizy, co pozwala na dłuższy okres ich przechowywania). Ponadto, w niedawnym badaniu monitorującym FI swoistą dla CAD jako wskaźnika QA, wykazano, że takie próbki były bardziej czułe w porównaniu z kontrolami pochodzącymi z zestawu. Porównanie obu typów materiałów wykazało, że kontrole pochodzące z zestawu okazały się mniej znaczące, ponieważ nie umożliwiały identyfikacji (sztucznie wprowadzonych) błędów w przeciwień-

stwie do kontroli IQC pochodzących od pacjentów [130]. CLSI zaleca długotrwałe przechowywanie próbek w temperaturze -70°C z konserwantem [47, 48]. Mimo to powszechnie stosowaną praktyką jest przechowywanie próbek surowicy/osocza zawierających immunoglobuliny w zamrażarce w temperaturze -20°C , jako że w wielu laboratoriach stanowi to jedyną dostępną opcję. Jednak niedawne badanie sugeruje, że nie wszystkie autoprzeciwciała (w tym panel anty-ENA) wykrywane przez SPA są stabilne w temperaturze -30°C przez 12 miesięcy [136].

8.1.3. Wzór/swoistość próbek IQC

Według naszej wiedzy tylko w jednych wytycznych wspomina się o dodatkowych szczegółach dotyczących „znanej” swoistości i/lub wzorów świeceń, które powinny być wybrane dla dodatnich próbek IQC. Wytyczne niemieckie EASI z 2009 roku zalecały stosowanie trzech dodatnich próbek surowicy o różnych wzorach fluorescencji wynikających z określonej reaktywności przeciwciał (np. przeciw: centromerom, dsDNA, SSA/Ro60) na zmianę między seriami [137]. Ta strategia jest również zgodna z najnowszymi wytycznymi EASI, które sugerują, że próbki IQC powinny zawierać tak dużo autoprzeciwciał, jak to możliwe [134]. Inny sposób może polegać na wyborze wysoce rozpowszechnionej potencjalnie niestabilnej swoistości, takiej jak SSA/Ro60. Alternatywną opcją, zwłaszcza w świetle niedawnych postępów i możliwości w dziedzinie CAD, byłby wybór wzoru, który wykazałby się pomiędzy testami wysoką odtwarzalnością pomiarów FI, takich jak izolowane wzory ziarniste lub homogenne [125, 130]. Warto zauważyć, że zmiana swoistości/wzoru IQC w kolejnych seriach utrudnia optymalne wykorzystanie ilościowych pomiarów FI w celu zapewnienia kontroli jakości przez systemy CAD.

8.1.4. Metodologia monitorowania, rejestracji i oceny wyników IQC

Tradycyjnie próbki IQC na HEp-2 IFA są oceniane pod kątem oczekiwanego wzoru fluorescencji i miana w odniesieniu do predefiniowanych wartości docelowych i kryteriów. Niektórzy autorzy sugerują, aby nie dopuszczać do odchylenia wzoru lub zmiany miana >1 miano [129, 134]. CLSI stwierdza, że wykrywalne różnice metody HEp-2 IFA wynoszą zwykle ± 2 seryjne, dwukrotne rozcieńczenia [48]. Wymagania regula-

cyjne w niektórych krajach akceptują zmiany miana maksymalnie o ± 2 rozcieńczenia [102]. Wadą tego podejścia jest to, że pozwala tylko na jakościowe monitorowanie/ocenę. Ostatnie postępy w zakresie systemów CAD umożliwiły monitorowanie ilościowe z wykorzystaniem wykresów Leveya-Jenningsa, które są uzupełnione przez reguły Westgarda [138], jak pokazano w kilku badaniach wykorzystujących odtwarzalne systemowe pomiary FI [129, 130, 132], a co zostało już opisane w akapicie dotyczącym wartości dodanej systemów CAD w QA. Warto zauważyć, że te badania sugerują również kryteria akceptacji [129, 130, 132]. Ponadto podejście to pozwala na analizę próbek IQC w pojedynczym rozcieńczeniu, zamiast ustalania miana końcowego.

8.2. Szkolenie i kontrola zmienności wyniku zależnej od osoby oceniającej

W celu zapewnienia spójności odczytów testów opartych na HEp-2 IFA, konieczne są regularne szkolenia i testy sprawdzające dla osób, które interpretują wzory świeceń. Oczywiście laboratorium powinno utrzymywać odpowiedni poziom liczby wykonywanych testów, aby zapewnić wystarczającą wiedzę i doświadczenie personelu. Ponadto szkolenie powinno być organizowane zarówno wewnątrz, jak i zewnątrz. Co więcej, w niektórych krajach dokumentacja dotycząca zmienności wyników zależnej od osoby oceniającej wzór świecenia powinna być również zawarta w raporcie weryfikacyjnym [139]. Jednym z proponowanych podejść jest wewnętrzna organizacja (i) regularnych sesji, podczas których omawiane są przypadki, oraz (ii) odczytywanie i interpretowanie (przez każdego „obserwatora” odczytującego wyniki) reprezentatywnych rutynowych próbek z różnymi wzorami świeceń i mianami w ramach okresowego sprawdzania wiedzy [135]. Systemy CAD generujące wysokiej jakości obrazy cyfrowe umożliwiają organizowanie takich spotkań na szerszą skalę (np. krajowe spotkania EQC w Belgii). Częstotliwość takich szkoleń/testów „obserwatorów”, a także wymagania dotyczące sesji szkoleniowych powinny być zdefiniowane i mogą zależeć od krajowych przepisów (np. w Niemczech cztery wewnętrzne szkolenia na rok). Ponadto szkolenia te nie powinny ograniczać się wyłącznie do kompetencji analitycznych, ale powinny obejmować również szkolenia dotyczące interpretacji wyników w kontekście klinicznym [134].

Spójność wyników w HEp-2 IFA można dodatkowo poprawić poprzez zastosowanie podwójnego (zaślepionego) odczytu preparatów przez niezależnych „obserwatorów” (na wszystkich próbkach rutynowych) [140]. W jednym z badań spójność w ocenie intensywności fluorescencji między obserwatorami poprawiła się, gdy odczyty były wykonywane na monitorze CAD (obrazy cyfrowe), a nie pod klasycznym mikroskopem [141]. W przypadku klasyfikacji wzorów poprawa była mniejsza, prawdopodobnie w związku z brakiem możliwości ustawienia właściwej ostrości za pomocą monitora CAD [141]. W tym zakresie należy również wspomnieć, że modyfikacja ustawień monitora CAD może stanowić dodatkowy czynnik zmienności. Należy mieć wdrożone procedury umożliwiające utrzymanie ustawień monitora zgodnych z tymi, które zostały zwalidowane. Wreszcie, pomimo braku oficjalnych badań, spójność wyników HEp-2 IFA może zostać dodatkowo poprawiona przez zastosowanie jednolitej nomenklatury ICAP (np. wprowadzenie wzoru AC-29 związanego z przeciwciałami przeciwko topoizomerazie I DNA [84]).

8.3. Zewnętrzna kontrola jakości

Zewnętrzne programy zapewnienia jakości (EQA; ang. *external quality assessment*) – często w połączeniu z analizą przeciwciał przeciw ENA – powinny być stosowane do monitorowania międzylaboratoryjnej zmienności [48, 66]. EQA wykazały pozytywny wpływ na wyniki HEp-2 IFA poprzez udzielanie porad uczestniczącym laboratorium [142]. Częstotliwość i charakter uczestnictwa w EQA (np. dobrowolne vs. obowiązkowe) powinny być określone przez przepisy krajowe.

8.4. Metody QC oparte na wynikach pacjenta

Według CLSI monitorowanie częstotliwości wyników testu, które mieszczą się w różnych granicach wartości referencyjnych (np. ujemny, graniczny, dodatni), może wykryć zmiany związane z wprowadzeniem nowych partii reagentów testowych [48]. Więcej szczegółów na temat tego, jak to wprowadzić w praktyce, można znaleźć w piśmiennictwie [132]. Oczywiście podejście to jest wykonalne tylko wtedy, gdy laboratorium przeprowadza określoną liczbę badań w kierunku ANA w akceptowalnym czasie. Systemy CAD pozwalają również monitorować mediany pomiarów FI dla próbek pacjentów

generowanych w każdej serii. Takie postępowanie okazało się przydatne dla systemów, które generują odtwarzalne wskaźniki FI [130, 132]. Ponadto podejście to wspiera koncepcję, że interpretacja wyników testów ANA wyłącznie jako dodatni lub ujemny jest nadmiernym uproszczeniem.

Wykonanie testu HEp-2 IFA powinno być monitorowane poprzez wewnętrzne kontrole jakości (IQC) podczas każdej serii badanej oraz regularną ocenę przypadków reprezentatywnych przez różnych „obserwatorów”), a także zewnętrzne programy kontroli jakości.

Czynniki minimalizujące zmienność odczytów wyników przez różnych „obserwatorów” testu HEp-2 IFA to programy edukacyjne, podwójna ocena, stosowanie nomenklatury ICAP oraz odczytywanie obrazów cyfrowych z monitora CAD.

W każdej serii badanej powinny być uwzględnione co najmniej 2 próbki IQC (jedna ujemna i jedna słabo dodatnia (z mianem docelowym odpowiadającym LR wynoszącym 2–5 dla AARD), które są oceniane półilościowo (m.in. za pomocą ustalania miana końcowego lub automatycznego pomiaru intensywności fluorescencji).

Dodatkowo, oprócz kontroli zawartych w zestawach testowych, zaleca się stosowanie w celach kontrolnych próbek IQC uzyskanych od pacjentów, które traktuje się jak rutynowe próbki (umożliwiają one monitorowanie całej procedury badawczej). Mogą one pochodzić od pojedynczych osób lub być uprzednio pulowane.

Preferowany wzór świecenia dla próbki kontrolnej dodatniej cechuje się wysoką odtwarzalnością (np. izolowany wzór homogeny lub ziarnisty w systemach CAD).

Monitorowanie % wyników dodatnich (małych, średnich, dużych) na wykresach Leveya-Jenningsa umożliwia ocenę stabilności testu w czasie (np. do udokumentowania wpływu zmian wprowadzanych przez producenta między partiami LOT).

Kiedy stosowany jest system CAD dla HEp-2 IFA, który zapewnia odtwarzalny pomiar FI (nie dotyczy to wszystkich systemów komercyjnych na rynku), monitorowanie próbki IQC oraz mediany FI pacjenta na wykresach Leveya-Jenningsa jest czułą metodą do wykrywania stabilności testu w czasie (np. do udokumentowania wpływu zmian LOT).

8.5. Monitorowanie serii odczynników w obrębie LOT i pomiędzy partiami LOT

8.5.1. Przegląd istniejących zaleceń i wytycznych

Wyniki testów HEp-2 IFA różnią się w zależności od producenta zestawu [75, 143, 144], ale zasugerowano także, że wyniki te mogą zmieniać się również wraz ze zmianą numeru LOT w ramach zestawów od jednego producenta [66, 75, 125, 132], prawdopodobnie w związku z procesem produkcyjnym [5, 66].

Zgodnie z (między)narodowymi wytycznymi i wymaganiami akredytacyjnymi EN/ISO 15189:2012 każdy nowy numer LOT odczynników i sposób dostawy powinny być zwalidowane przed użyciem [133]. CLSI zaleca testowanie próbek pacjentów z odczynnikami z obecnego zestawu i kolejnego o nowym numerze LOT [145]. Preferuje się korzystanie z materiałów pochodzących od pacjentów ponieważ komercyjne materiały kontrolne, mogą nie odzwierciedlać wydajności próbek pacjentów (przegląd w [146]), ale można je stosować równolegle z próbkami pacjentów i/lub używać do weryfikacji nowej dostawy odczynników o tym samym numerze LOT, który został wcześniej zatwierdzony [145, 146]. Metoda porównywania serii LOT do serii LOT, jaką opisano w CLSI EP26-A, jest uważana za mało praktyczną, dlatego zaproponowano kilka alternatywnych sposobów (przegląd w [146]), jednak są zazwyczaj przeznaczone dla typowo ilościowych metod i dlatego nie są łatwe do wdrożenia w przypadku badań na linii komórkowej HEp-2.

Dla testów HEp-2 IFA istnieje kilka bardziej szczegółowych zaleceń dotyczących akceptacji serii reagentów. Zgodnie z zaleceniami CLSI LA02-A2 każdy numer LOT dla komórek HEp-2 powinien być testowany z wykorzystaniem dodatniej próbki o małym mianie i przeciwciałami anty-SSA oraz zestawem in-

nych znanych surowic dodatnich i ujemnych, które są zbierane/przechowywane w celu porównań między seriami [48]. Brazylijskie wytyczne sugerują przetestowanie panelu próbek reprezentujących szeroki zakres wzorów, z naciskiem na te antygeny, które są podatne na uszkodzenia (tj. Jo1, SSA, PCNA, polimeraza RNA) oraz które są immunologicznie i morfologicznie dobrze scharakteryzowane [5, 48, 66, 135].

W przypadku zmiany serii koniugatu zarówno wytyczne CLSI LA02-A2, jak i brazylijskie zalecają ustalenie miana metodą szachownicy (ang. *chessboard titration*) oraz/lub porównanie ze standardowymi koniugatami w celu ustalenia optymalnego rozcieńczenia koniugatu [5, 48, 66, 135]. Jednak w kontekście obowiązujących przepisów IVDR nie jest powszechnie zalecane. W rzeczywistości szeroko stosuje się zestawy ze zwalidowaną kombinacją odczynników, a każde odstępstwo od instrukcji producenta wymaga rozległej walidacji.

8.5.2. Obecna rekomendacja

Rekomendujemy weryfikację zmian związanych ze zmianą serii LOT za pomocą próbek IQC pochodzących od pacjentów, uzupełnionych o próbki wybrane w celach porównawczych, które minimalnie pokrywają różne kompartmenty komórkowe (jądro i cytoplazmę) oraz różne poziomy miana, włączając w to próbki negatywne. Zmiany LOT powinny być ograniczane tak bardzo, jak to możliwe.

8.5.3. Kryteria akceptacji

Zgodnie z zaleceniami CLSI EP26-A, podczas porównywania różnych serii LOT, szacowana różnica między dwiema seriami nie powinna przekraczać krytycznej różnicy [145]. Ta krytyczna różnica (dopuszczalny błąd medyczny) powinna być oparta m.in. na badaniach wyników klinicznych, zmienności biologicznej, wynikach analitycznych, wytycznych dotyczących praktyki zawodowej oraz opublikowanych zaleceniach [145-147]. W przypadku HEp-2 IFA bardzo trudno jest zdefiniować tę krytyczną różnicę.

Jeśli testy HEp-2 IFA są uznawane za jakościowe/półilościowe, zalecenia ANA IFA CLSI sugerują, że w badaniach porównawczych pomiędzy seriami co najmniej 85% próbek powinno dawać porównywalne wyniki [48]. Standardowo akceptowana maksymalna

zmienność kliniczna to brak odchylenia od wzoru świecenia i różnica jednego lub dwóch mian [48, 102, 129, 132, 134]. Może to budzić wątpliwości, czy ta ogólnie akceptowana zmienność rzeczywiście odzwierciedla całkowity dopuszczalny błąd, który można tolerować bez unieważnienia medycznej przydatności wyniku analitycznego w odniesieniu do % wyników dodatnich dla ANA i % wyników dodatnich dla przeciwciał anti-ENA wykrywanych po przesiewowym badaniu HEp-2 IFA [132]. Należy zauważyć, że to kryterium można również przetłumaczyć na swoiste dla systemu kryteria CAD, które mogą być stosowane poprzez wykorzystanie pomiarów FI dla wyników HEp-2 IFA w badaniach porównawczych pomiędzy seriami [129]. Wykorzystanie wykresów Leveya-Jenningsa (i reguł Westgarda) może pomóc w ocenie/monitorowaniu wpływu zmian serii (patrz wyżej) [129, 130, 132, 137].

Zmienność międzyseryjna dla koniugatów i/lub substratów powinna być oceniona przed wprowadzeniem nowej serii. Można to przeprowadzić przy użyciu próbek IQC pochodzących od pacjentów, uzupełnionych o próbki wybrane w celu minimalnego pokrycia różnych kompartmentów komórkowych (jądra i cytoplazmy) oraz różnych wartości miana.

9. ANA W TESTACH TYPU SPA

Wykorzystanie SPA (ang. *solid phase assay*) do badania swoistości ANA i (multiplexowej) identyfikacji tych swoistych przeciwciał jest coraz częstsze w laboratoriach klinicznych (przegląd w [1, 148]). Chociaż niektóre formaty testów stosują ekstrakty komórkowe jako analit na fazie stałej, najnowsze zautomatyzowane testy wykrywają obecność przeciwciał skierowanych przeciwko wybranemu zestawowi istotnych antygenów związanych z AARD. Podsumowanie charakterystyki różnych platform i metod testowych nie jest jednak tematem niniejszej pracy. W celu zapoznania się z ostatnim kompleksowym przeglądem odsyłamy do Bossuyt i wsp. [1]. W skrócie: przydatność tych badań jest zależna od testu i jednostki chorobowej. Należy zdawać sobie sprawę z mocnych i słabych stron SPA jako narzędzia przesiewowego, gdy stosowane jest w warunkach klinicznych. Największa przydatność kliniczna dla AARD jest uzyskiwana, gdy łączy się SPA i HEp-2

IFA (jak wcześniej opisano). Definiowanie swoistych wskaźników LR dla wyników testów SPA zwiększa wartość kliniczną wyników testów SPA i umożliwia harmonizację interpretacji [57].

Przydatność kliniczna SPA w celu przesiewu/diagnozy AARD zależy od jednostki chorobowej i rodzaju testu.

Nie ma jednej wartości odcięcia SPA, która zapewniłaby optymalną czułość i swoistość dla skriningu w kierunku AARD.

Podawanie swoistych wskaźników LR na wynikach testów SPA w kierunku AARD może ułatwić kliniczną interpretację tych wyników.

Kombinacja HEp-2 IFA z testami SPA w celu skriningu w kierunku AARD zwiększa ich wartość kliniczną.

10. WALIDACJA/WERYFIKACJA

Walidacja jest definiowana przez Światową Organizację Zdrowia jako „działanie lub proces udowodnienia, że procedura, proces, system, sprzęt lub metoda działa zgodnie z oczekiwaniami i osiąga zamierzony wynik” [149]. Walidacja metody służy uzyskaniu obiektywnych dowodów (poprzez dokumentowanie parametrów testu), że metoda/aplikacja jest adekwatna dla zamierzonego zastosowania [133]. Testy certyfikowane CE-IVD (ang. *Conformité Européenne In vitro Diagnostics*) / US FDA są walidowane przez producenta [150, 151]. Jeśli laboratorium korzysta z metod niestandardowych, modyfikacji standardowych metod, metod standardowych poza zamierzonym zakresem lub laboratoryjnie zaprojektowanych/opracowanych metod, walidacja jest odpowiedzialnością laboratorium [133]. Według Rozporządzenia UE w sprawie wyrobów medycznych IVD z 2017 roku walidacja jest odpowiedzialnością producenta lub laboratorium w przypadku braku dostępności testów komercyjnych [152]. Rozporządzenie CE IVD z 2017 roku będzie wymagać od laboratoriów, które przeprowadzają testy opracowane w laboratorium, aby spełniały określone standardy i były zgodne z „ogólnymi wymogami dotyczącymi bezpieczeństwa i wydajności” oraz ramami systemu zarządzania jakością IVDR [152].

Laboratoria medyczne często korzystają z testów oznaczonych znakiem CE IVD/FDA (metody zweryfikowane/zwalidowane przez producenta) w sposób niemodyfikowany (zgodnie z instrukcjami producenta testu). W tym przypadku stosuje się weryfikację metody zamiast walidacji. Weryfikacja to skrócony proces, który potwierdza poprzez obiektywne dowody, że już zwalidowana procedura badawcza jest odpowiednia dla określonego zamierzonego zastosowania w danym laboratorium [151, 153-157]. Warunkiem wstępnym dla weryfikacji jest dostępność informacji podanych przez producenta [133]. Wskazówki dotyczące tego, jak zweryfikować/zwalidować test w sposób zgodny ze stanem wiedzy, można znaleźć w ogólnych wytycznych wydanych przez organizacje, takie jak np. Clinical Laboratory Standards Institute [158, 159], książki lub publikacje [160, 161].

Standardy ISO zostały przetłumaczone i zinterpretowane przez władze krajowe, niektóre z nich określają jak spełnić wymagania ISO, co może skutkować niewielkimi różnicami między krajami zarówno w definicji walidacji/weryfikacji, jak i minimalnych wymaganiach.

Przegląd definicji walidacji/weryfikacji zgodnie z CAP, ISO 15189 i wytycznymi krajowymi zebrano w tabeli II [133, 139, 150, 156, 157, 161]. Uogólniając, weryfikacja dotyczy testów oznaczonych znakami CE/FDA lub opublikowanych metod. Wyjątkowo, dla holenderskich NVKC i CMI, weryfikacja może opierać się na kombinacji danych otrzymanych lokalnie (dla parametrów testu, na które wpływ może mieć lokalne środowisko, np. precyzja pipetowania) oraz odwołań do dokumentacji (dla parametrów testu [np. czułości klinicznej i swoistości analitycznej], które zostały obiektywnie zwalidowane z dostępną dokumentacją, np. w innym akredytowanym laboratorium lub w walidacji wielośrodkowej) (podsumowane w tabeli II [156, 162]). Niektóre cechy mogą być uważane za nieistotne lub niemożliwe do oceny (np. ze względu na małą prevalencję choroby, niedostępność metody referencyjnej) [156, 162]. W takim przypadku wymagana jest dokumentacja/argumentacja. W raporcie weryfikacyjnym należy dla każdego parametru zaznaczyć, czy uzyskano wyniki eksperymentalne spełniające lokalne kryteria akceptacji [156, 162].

Tabela II. Przegląd zaleceń/wytycznych dotyczących walidacji/weryfikacji.

| R | Sposoby walidacji/weryfikacji HEp-2 IFA | Klasyfikacja | Piśmiennictwo | Punktacja Delphi | |
|----|--|--------------|-------------------------------|------------------|--------------------|
| | | | | Mediana | % wysokich wyników |
| | | | | ≥8 | ≥7 |
| | Walidacja/weryfikacja analityczna | | | | |
| 31 | Każde laboratorium powinno wykazać, że stosowana przez nie metoda HEp-2 IFA wykrywa główne klinicznie istotne wzory świeceń oraz główne klinicznie istotne reaktywności antygenów, zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie | A/B | [5, 48, 66, 75, 133, 136] | 9 | 91 94 |
| 32 | Każde laboratorium powinno zweryfikować precyzję stosowanej metody. Sposób weryfikacji zależy od sposobu przetwarzania danych: dwumianowe (dodatnie/ujemne), porządkowe (miana) lub ciągłe (wyniki FI) | A/B | [134, 139, 157-162, 168] | 9 | 89 95 |
| 33 | Zastosowanie oszacowanego przez CAD miana na podstawie pojedynczego rozcieńczenia próbki ma swoje ograniczenia, a parametry podawane przez producenta powinny zostać zweryfikowane poprzez porównanie z mianem końcowym dla najczęściej wzorów świeceń | B | | 8 | 82 96 |
| | Walidacja/weryfikacja kliniczna | | | | |
| 34 | Zgodnie z normą ISO 15189, dyrektywami CAP oraz nowymi przepisami dotyczącymi IVD z 2017 roku producent jest odpowiedzialny za walidację kliniczną testu oznaczonego znakiem CE/FDA. Krajowe przepisy mogą formułować dodatkowe wymagania | A | [134, 139, 151, 152, 154-156] | 9 | 93 98 |
| 35 | Walidacja metody HEp-2 IFA powinna być wykonywana w dużych badaniach wieloosrodkowych, obejmujących wystarczającą liczbę próbek pobranych od pacjentów z dokładnym opisem ich stanu klinicznego oraz próbek kontrolnych. Takie badania powinny umożliwić oszacowanie wskaźnika LR specyficznego dla wyniku | B | | 8 | 85 92 |

Klasyfikacja: A [dostępne dane eksperymentalne/zródło literaturowe], B [opinia eksperta]. Wynik Delphi w skali 1-9 [0 – całkowity brak zgody z zaleceniem; 9 – pełna zgoda z zaleceniem; 5 – bezstronność/niepewność], z możliwością pominięcia pytania na podstawie braku doświadczenia; uczestnicy bez odpowiedzi lub z niejasną odpowiedzią, lub wskazujący, że nie mieli doświadczenia w danym zakresie, byli wykluczeni z analizy; wyniki wynoszące co najmniej 8 lub 7 na skali 9-punktowej uznawane były za wysokie.

10.1. Walidacja i weryfikacja analityczna

EN-ISO 15189 nie określa, jakie cechy wydajności analitycznej należy zweryfikować [133]. W tabeli IIIA, wymienione są minimalne wymagania dotyczące walidacji/weryfikacji, zawarte w wytycznych akredytacyjnych CAP, normie ISO 15189 oraz krajowych tłumaczeniach/interpretacjach normy ISO 15189. Walidacja/weryfikacja precyzji (powtarzalność/precyzja pośrednia), dokładności/prawdziwości, zakresu pomiarowego, obecności interferantów, stabilności, wartości referencyjnych i granic decyzji medycznych to powszechne wymagania. Według COFRAC i NVKC porównanie metody z już stosowaną metodą jest wymagane do weryfikacji [139, 156], podczas gdy w innych wytycznych porównanie metody nie jest obowiązkowe do celów walidacji/weryfikacji, ale jest wymagane w celu zapewnienia porównywalności wyników przy użyciu różnych metod, aparatów lub procedur. W niektórych wytycznych porównanie

metody jest również sugerowane w celu weryfikacji prawdziwości/dokładności [156, 162] lub ustalenia/weryfikacji wartości referencyjnych [151]. Niezależnie od ISO wytyczne CAP wskazują, że oprócz najczęściej spotykanych wymagań należy również przeprowadzić ograniczoną weryfikację liniowości (weryfikację zakresu raportowalnego dla trzech punktów [mały/pośredni/duży]) [151]. W kolejnych akapitach omówimy wyzwania związane z weryfikacją testów opartych na linii komórkowej HEp-2 i przedstawimy przegląd możliwych podejść do zweryfikowania najczęściej spotykanych minimalnych wymagań.

10.1.1. Weryfikacja nowej metody HEp-2 IFA

Wykrywanie ANA za pomocą HEp-2 IFA jest złożone i podatne na zmienność analityczną [135, 143]. Istnieje wiele czynników, które przyczyniają się do tej zmienności. Warunki hodowli, metoda utrwalania (np. metanol, aceton vs paraformaldehyd) oraz metoda permeabilizacji (np. Triton X-100) mogą wpłynąć

na ekspresję, zabezpieczenie (lub niszczenie) i dostępność antygenów komórkowych [75, 135, 163]. Optymalne warunki hodowli i utrwalania mogą być zależne od antygeny [75, 135, 163]. Ponadto na wyniki mogą wpływać: drugorzędowe przeciwciała przyłączone do fluorochromu (izotyp, gatunek, cechy immunogenu, metoda oczyszczania, stosunek molowy fluoresceiny/białka, środek zapobiegający blaknięciu i stężenie), medium inkubacyjne, roztwór blokujący, bufor płuczający i medium zatapiające (ang. *mounting medium*) [135, 162]. Sprzęt, w tym stosowany typ źródła światła (stabilne diody LED vs starsze lampy rtęciowo-argonowe), i systemy CAD oraz zastosowane procedury inkubacji mogą dodatkowo przyczynić się do zmienności analitycznej [129].

Delavance i wsp. [75] badali zmienność wzorów świeceń zależną od producenta użytych szkiełek z komórkami HEp-2 i stwierdzili, że opisywany wzór świecenia może być odmienny dla tej samej surowicy na szkiełkach pochodzących od różnych producentów lub różnice te mogą dotyczyć klasyfikacji jako dodatni/ujemny. Znaczne różnice zaobserwowano w przypadku cytoplazmatycznego wzoru drobnoziarnistego związanego z przeciwciałami anti-Jo-1, wzoru typu PCNA i CENP-F [75]. Zmienność zależna od zestawów testowych została również ostatnio udokumentowana w badaniu opisującym wyniki EQC przeprowadzonym przez CAP w latach 2008–2018. Zmienność ta była silnie powiązana ze stosowanymi zestawami, a różnice między zestawami były dość spójne w czasie trwających 11 lat badań [164].

Tylko ograniczona liczba opublikowanych wytycznych w kontekście analizy autoprzeciwciał i/lub ANA omawia proces walidacji/weryfikacji (przegląd w tabeli IIIB), niektóre z nich dotyczą tylko ograniczonych aspektów [5, 47, 66, 134, 135, 137, 162]. Ponadto kilka wytycznych CLSI może być przydatnych jako wskazówki do tworzenia procesów walidacji/weryfikacji (np. CLSI EP12-A2 [159], CLSI EP15-A3 [158]). Należy jednak zaznaczyć, że wytyczna CLSI EP15-A3 została opracowana dla testów ilościowych i dlatego nie jest łatwo wdrożyć ją do analizy jakościowej/półilościowej HEp-2 IFA [158].

Weryfikacja nowej metody ANA opartej na komórce HEp-2(000) rozpoczyna się od kontroli gęstości komórek, ich dystrybucji, morfologii oraz liczby

komórek mitotycznych (3-5/pole przy powiększeniu $\times 200$) [137]. Zalecenia EASI dotyczące minimalnych wymagań weryfikacji testów w kierunku autoprzeciwciał sugerują sprawdzenie prawdziwości (poprzez porównanie metod), odtwarzalności i precyzji pośredniej, a także weryfikację zakresów referencyjnych [134], zgodnie z wymaganiami określonymi w normie ISO i krajowych tłumaczeniach/interpretacjach (tabela IIIA).

10.1.1.1. Weryfikacja prawdziwości (poprzez porównanie metod)

Każde laboratorium powinno wykazać w porównaniu metod, że jego metoda ANA wykrywa główne, klinicznie istotne wzory oraz reaktywności antygenowe, zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, biorąc pod uwagę zróżnicowanie w rozpoznawaniu wzorów immunofluorescencji między różnymi producentami testów HEp-2 [5, 66, 75, 137, 146, 163]. W porównaniu metod zestawia się powyżej opisaną zdolność metody porównawczej HEp-2 IFA z metodą nowo wprowadzoną /rozważaną HEp-2 IFA, przy czym metodą porównawczą jest albo stara/uprzednio stosowana metoda HEp-2 IFA, albo, idealnie, kombinacja metod pozwalająca na wykrycie wzorów/swoistych reaktywności antygenowych (w tym również SPA). Zgodnie z dokumentem *Brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies* zaleca się, aby każdą nowo wprowadzaną markę przetestować na panelu surowic reprezentujących różne wzory świeceń, preferencyjnie pokrywające różne kompartmenty komórkowe [66]. Te wytyczne nie określają wzorów, które powinny być uwzględnione w panelu, ale wymieniają niektóre wzory/reaktywności, dla których substrat komórkowy HEp-2 może stanowić problem (np. przeciwciała anti-SSA/Ro60, anti-RNP/Sm, anti-PCNA, anti-CENP-F, anti-Jo-1, anti-NuMA-1-podobne, anti-NuMA-2, *rods and rings*). Niemieckie wytyczne EASI z 2009 roku zalecają analizę co najmniej trzech pozytywnych próbek o różnej reaktywności przeciwciał (np. centromer, dsDNA, SSA/Ro60) [134]. CLSI LA02-A2 zaleca ocenę wykrywalności klinicznie istotnych przeciwciał (dsDNA, U1RNP, Sm, SSA/Ro60, SSB, Scl-70, CENP, Jo-1) [48]. Próbkę referencyjną (z określonym wzorem i/lub określoną reaktywnością) udostępniane są przez Komitet Standaryzacji Autoprzeciwciał i można je zamówić poprzez stronę internetową (www.AutoAb.org).

Minimalna liczba próbek, która powinna być uwzględniona w procesie porównywania metod, jest przedmiotem dyskusji. Według protokołu użytkownika CLSI EP12-A2, dotyczącego oceny wydajności testów jakościowych, powinno się przetestować co najmniej 50 próbek dodatnich zarówno nową, jak i porównawczą metodą (czułość analityczna) oraz co najmniej 50 próbek ujemnych dla porównawczej metody (swoistość analityczna) [159]. W ostatnim artykule EASI dotyczącym jakości i dobrych praktyk w laboratoriach zajmujących się chorobami autoimmunizacyjnymi [134] zaproponowano weryfikację czułości i swoistości analitycznej z porównaniem metod składającym się optymalnie z 50 znanych próbek dodatnich (czułość analityczna) i 100 znanych próbek ujemnych (swoistość analityczna), z minimalnym wykonaniem 30 porównań, w tym z udziałem co najmniej 10 próbek dodatnich i 10 próbek ujemnych. Ten minimalny próg został ustalony na podstawie wymagań do przeprowadzenia analizy statystycznej Kappa [165].

Rekomendujemy zweryfikowanie (przynajmniej) następujących klinicznie istotnych wzorów i reaktywności (tj. tych, które są uwzględnione w kryteriach klasyfikacyjnych/diagnostycznych): jądrowego homogenego (AC-1), jądrowego ziarnistego (AC-4, 5), jąderkowego (AC-8, 9, 10), centromerowego (AC-3), ang. *multiple nuclear dots* (AC-6) i błony jądrowej (AC-11, 12), a także cytoplazmatycznego ziarnistego (AC-19, 20) i wzoru cytoplazmatycznego, podobnego do AMA (AC-21); oraz reaktywności dsDNA, SSA/Ro60, Sm/RNP, CENPB, Scl70, RNA-polimeraza III, Jo-1, sp100, gp210 i AMA-M2. Proponujemy, aby wykrycie każdego z wyżej wymienionych klinicznie ważnych wzorów/reaktywności było potwierdzone (preferencyjnie) w pięciu próbkach na wzór/reaktywność, jeśli to możliwe. Dodatkowo w porównaniu należy uwzględnić co najmniej 10 próbek ujemnych. Dla rzadko występujących przeciwciał laboratoria mogą odwołać się do publikacji lub uczestniczyć w międzylaboratoryjnych współpracach, takich jak inicjatywa holenderska w zakresie krajowej walidacji/weryfikacji testów w kierunku autoprzeciwciał [162]. Optymalnie próbki uwzględnione w porównaniu metod powinny być dobrze scharakteryzowane (np. udokumentowane wynikami SPAs, kontekstem klinicznym – jeśli jest dostępny –, docelowymi wynikami, np. w przypadku stosowania próbek EQC lub próbek referencyjnych).

Ponieważ „złoty standard” dla HEp-2 IFA nie istnieje i należy spodziewać się różnic w badaniu porównawczym pomiędzy nową metodą HEp-2 IFA a metodą porównawczą, korelacja z określonymi reaktywnościami w SPA i/lub danymi klinicznymi i/lub wartością docelową (jeśli dotyczy) może przyczynić się do określenia ograniczeń nowej metody HEp-2 IFA i/lub poprzedniej metody. Wiedza na temat ograniczeń nowego testu powinna być następnie wykorzystana do decyzji o potrzebie dostosowania kolejnych testów (ang. *follow-up*).

Każde laboratorium powinno wykazać, że stosowana przez nie metoda HEp-2 IFA wykrywa główne klinicznie istotne wzory świeceń oraz główne klinicznie istotne reaktywności antygenowe, zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie.

10.1.1.2. Weryfikacja precyzji

Weryfikacja precyzji jest zasadniczym elementem procesu weryfikacji metody [139, 157, 162]. Ostatnie zalecenia EASI dotyczące testów przeznaczonych do oceny autoprzeciwciał proponują przetestowanie 10 powtórzeń próbki ujemnej i 10 powtórzeń próbki dodatniej (preferowane są próbki o małym, średnim i dużym mianie), w tej samej i między różnymi seriami [134]. Liczba powtórzeń proponowana przez EASI jest zauważalnie niższa niż liczba powtórzeń sugerowana w uznanych (międzynarodowych) wytycznych dotyczących obliczania zmienności wewnątrz- i międzyseryjnej (np. 30 powtórzeń przez 15 dni, zgodnie z francuskimi wytycznymi akredytacji [139], 5 powtórzeń przez 5 dni, zgodnie z CLSI EP15-A3 [158]). Wytyczne EASI opierają się na wnioskach Senanta i wsp., że >10 pomiarów dla współczynników zmienności (CVs; ang. *coefficients of variation*) wewnątrz- lub międzyseryjnej nie poprawia szacowania precyzji metody, niezależnie od rodzaju stosowanego immunotestu [134, 166].

Ocena precyzji dla testu HEp-2 IFA jest trudna i preferowana strategia będzie zależać od tego, jak są oceniane dane: dwumianowo (ang. *binomial*) (dodatni/ujemny), porządkowo (ang. *ordinal*) (miana) lub w sposób ciągły (ang. *continuous*) (wyniki FI).

Jeśli wyniki HEp-2 IFA są traktowane jako surowe dane dwumianowe/porządkowe, to celem jest ustalenie, *jak często* wyniki różnią się od tych oczekiwanych, a nie, *o ile* wyniki się od nich różnią.

W przypadku testów jakościowych najnowsze wytyczne EASI proponują analizę „10 powtórzeń próbek dodatnich i 10 powtórzeń próbek ujemnych w ciągu kilku kolejnych dni” w celu ustalenia spójności wyników [134]. Warto zauważyć, że zgodnie z zaleceniem EASI maksymalna akceptowalna zmienność dla testu HEp-2 IFA wynosi różnicę jednego miana [134].

W przypadku korzystania z systemu CAD wyniki HEp-2 IFA mogą być uważane za wyniki jakościowe i półilościowe pochodzące z ilościowego pomiaru wskaźnika FI, który jest swoisty dla danego systemu. Precyzję można wówczas zweryfikować, stosując podejścia stosowane w testach ilościowych [161]. Jednakże specyfikacje odtwarzalności dla większości pomiarów FI swoistych dla poszczególnych systemów są niepełne (producenci nie określają parametrów dotyczących „nieprecyzji”), teoretycznie wymagana jest walidacja. Zgodnie z CLSI EP05A3 precyzję można ustalić (walidacja) na podstawie podwójnych pomiarów uzyskanych w 2 seriach/dzień przez 20 dni [167]. Alternatywnie opublikowane dane dotyczące odtwarzalności pomiarów FI zostały wygenerowane na podstawie 6-20 powtórzeń [109, 110, 119, 125, 130] i mogą być uznane za referencje o najwyższej wartości w procesie weryfikacji. Zgodnie z CLSI EP15-A3 precyzję można zweryfikować przez 5 pomiarów w trakcie 5 dni [158]. Podobne podejście zaproponowali Antonelli i wsp. [168]. Ocena akceptowalności jest oparta na teście F [158, 168].

Każde laboratorium powinno zweryfikować precyzję stosowanej metody. Sposób weryfikacji zależy od sposobu przetwarzania danych: dwumianowe (dodatnie/ujemne), porządkowe (miana) lub ciągłe (wyniki FI).

10.1.1.3. Weryfikacja/walidacja szacowania miana końcowego przez system CAD

Jeśli laboratorium zamierza raportować miano końcowe, bazując na pomiarach FI przez system CAD (na pojedynczym rozcieńczeniu lub na serii rozcieńczeń), to korelacja pomiędzy tzw. *single well titer*, czyli mianem obliczonym na podstawie pojedynczego rozcieńczenia próbki (szacowanym mianem) a mianem końcowym (określonym na podstawie szeregu rozcieńczeń) powinna zostać udokumentowana.

Korelacja pomiędzy pomiarami FI a mianami została udokumentowana dla kilku systemów CAD HEp-2 IFA [107-110, 116, 119, 122, 127]. Wykazano występowanie różnic między mianem końcowym a oszacowanym mianem na podstawie FI zmierzonej dla pojedynczego rozcieńczenia (ang. *single well titer*) przez systemy CAD. Na przykład belgijskie badanie wielośrodkowe, przeprowadzone w systemie CAD NOVAVIEW®, wykazało akceptowalne przeszacowanie o jedno miano w 36% próbek, ale różnicę wynoszącą ≥ 2 miana w 16,5% próbek o wzorze świecenia centromerowym lub jąderkowym [125].

Zastosowanie oszacowanego przez CAD miana na podstawie pojedynczego rozcieńczenia próbki ma swoje ograniczenia, a parametry podawane przez producenta powinny zostać zweryfikowane poprzez porównanie z mianem końcowym dla najczęstszych wzorów świeceń.

10.1.1.4. Weryfikacja urządzenia do pipetowania

Chociaż wydajność urządzenia do pipetowania może być uważana za odpowiedzialność producenta, może też być rozpatrywana jako zmienna lokalna, która powinna być zweryfikowana [162]. Awaria automatycznego urządzenia do pipetowania może przyczynić się do zmienności analitycznych, takich jak fluktuacje intensywności fluorescencji [131, 132] lub zanieczyszczenie na skutek przeniesienia materiału powodujące zmianę wzorów świeceń ANA w różnych rozcieńczeniach tej samej surowicy (doświadczenie osobiste M. Vercammen). Weryfikację urządzenia do pipetowania można przeprowadzić poprzez testy powtarzalności/odtwarzalności oraz protokoły zapobiegania przenoszeniu materiału (ang. *carry-over protocols*).

10.1.1.5. Weryfikacja liniowości, zakresu pomiarowego, efektu prozonoowego, interferencji, miareczkowania koniugatu

Według EASI ocena liniowości i zakresu pomiarowego, efektu Hooka lub efektu prozonoowego, interferencji oraz ogólnych problemów, takich jak stabilność lub przeniesienie materiału, są mniej istotne przy stosowaniu zestawów CE-IVD do badań autoprzeciwciał, takich jak HEp-2 IFA [134]. Niemniej kwestie te powinny zostać uwzględnione w raporcie weryfikacyjnym. Należy zauważyć, że efekt prozonoowy może wystąpić w testach HEp-2 IFA [169, 170].

Normy CLSI I/A02-A2 oraz wytyczne brazylijskie proponują miareczkowanie koniugatu, także w przypadku, gdy stanowi on część zestawu odczynników [5, 48, 66, 134]. W takiej sytuacji zestaw będzie używany poza instrukcją producenta i konieczna będzie walidacja metody, a nie tylko jej weryfikacja. W przypadku dobrych systemów mikroskopowych sugerujemy ocenę zestawu zgodnie z instrukcjami producenta.

10.2. Kliniczna walidacja/weryfikacja

Według normy ISO 15189, dyrektyw CE IVDR, CAP oraz nowych przepisów z 2017 roku dotyczących wyrobów medycznych, producent ma obowiązek przeprowadzenia walidacji klinicznej testu oznaczonego znakiem CE/FDA, który jest używany przez laboratorium bez dokonywania modyfikacji [133, 150-152, 155]. Zgodnie z propozycją EASI [134] należy podkreślić, że informacje dotyczące walidacji klinicznej powinny być udostępniane klientom.

Jednakże krajowe przepisy mogą formułować dodatkowe wymagania. Na przykład w Belgii, Holandii i we Francji specjalista medycyny laboratoryjnej odpowiada za walidację/weryfikację kliniczną, nawet gdy używane są testy oznaczone CE-IVD [139, 157, 162]. Decyduje, które aspekty należy zbadać i w jaki sposób. Przykładowo holenderskie CMI sugeruje, że weryfikację klinicznej czułości można osiągnąć poprzez udokumentowane uzasadnienie (np. odwołując się do danych walidacji wieloośrodkowej) [162]. Według CAP laboratoria nie są zobowiązane do podawania interpretacji klinicznych [151, 155]. Ale jeśli to robią, mogą odwołać się do danych producentów. „Nowe” interpretacje kliniczne powinny być zweryfikowane, ale w przypadku rzadkich stanów lub dobrze znanych zastosowań testu odwołanie się do recenzowanych czasopism naukowych jest dopuszczalne [151].

10.2.1. Kliniczna walidacja nowej metody HEp-2 IFA

Wytyczne CLSI I/LA02-A2 dotyczące jakości oznaczeń ANA zalecają weryfikację czułości i swoistości klinicznej, jak również wartości referencyjnych [48]. Kliniczna walidacja polega na analizie wyników pacjentów dobrze zdefiniowanych klinicznie (np. spełniających kryteria klasyfikacyjne) oraz kontroli.

Klasyfikacja wiąże się to z określeniem diagnostycznej czułości i swoistości dla punktu odcięcia (progno *cut-off*) zaproponowanego przez producenta. Jednak, jak wyżej argumentowano, proponujemy ustanowienie dla wyników testu (miano, FI) swoistych wskaźników LR, ponieważ zwiększają one wartość kliniczną. Można tego dokonać w badaniach (wieloośrodkowych) z udziałem immunologów, lekarzy i producentów testów laboratoryjnych. Aby ustalić wskaźnik LR swoisty dla wyniku testu, niezbędne jest przebadanie dużej liczby pacjentów dobrze scharakteryzowanych klinicznie (od których próbki są pobierane w momencie diagnozy) i osób z grupy kontrolnej (najlepiej osób chorych). Przykładowo niedawne badanie, które posłużyło ustaleniu wskaźników LR swoistych dla wyników testu HEp-2 IFA i SPA, obejmowało >400 próbek pacjentów i >700 próbek kontrolnych [57]. Przy założeniu, że techniczna jakość testu jest dobrze zwalidowana i skontrolowana, prawdopodobne jest, że te cechy wydajności diagnostycznej są mniej podatne na zmienne lokalne. Dlatego twierdzimy, że takie badania nie powinny/nie mogą być przeprowadzane przez każde pojedyncze laboratorium. Inicjatywy krajowe dotyczące walidacji/weryfikacji, takie jak grupa robocza holenderskiego CMI, mogą zmniejszać indywidualne wymagania, które muszą zostać spełnione podczas wprowadzania nowych testów do laboratoriów [162]. Preferowane są wieloośrodkowe badania walidacyjne z próbkami diagnostycznymi zamiast porównywania metod przez poszczególne laboratoria przy użyciu próbek nienadających się do diagnostyki [162].

Zgodnie z normą ISO 15189, dyrektywami CAP oraz nowymi przepisami dotyczącymi IVD z 2017 roku producent jest odpowiedzialny za walidację kliniczną testu oznaczonego znakiem CE/FDA. Krajowe przepisy mogą formułować dodatkowe wymagania.

Walidacja metody HEp-2 IFA powinna być wykonywana w dużych badaniach wieloośrodkowych, obejmujących wystarczającą liczbę próbek pobranych od pacjentów z dokładnym opisem ich sytuacji klinicznej oraz próbek kontrolnych. Takie badania powinny umożliwić oszacowanie wskaźnika LR swoistego dla wyniku.

11. ANA I IVDR

W maju 2017 roku opublikowano rozporządzenie dotyczące wyrobów medycznych do badań *in vitro* (EU) 2017/746 (IVDR; *In-Vitro Diagnostic Medical Devices Regulation*), które miało wejść w życie w 2022 roku [152]. Urządzenia do wykonywania testu ANA metodą HEp-2 IFA są objęte tymi regulacjami i muszą spełniać ich wymogi. Zgodnie z klasyfikacją określoną w IVDR wszystkie urządzenia są podzielone na klasy A, B, C i D: od niekrytycznych (A) do wysoce krytycznych (D), uwzględniając przeznaczenie urządzeń i ich nieodłączne ryzyko. Urządzenia służące do badań ANA wchodzą w skład grupy B, która jest domyślną klasą dla wszystkich parametrów, a które nie mieszczą się w zakresie żadnych określonych zasad. Jest to głównie spowodowane tym, że urządzenia HEp-2 IFA nie służą do testowania w kierunku obecności czynników zakaźnych.

Ponadto konieczne jest udokumentowanie wydajności klinicznej testu w ramach jego zamierzonego zastosowania oraz aktualizowanie tych informacji w czasie użytkowania danego urządzenia. Aktualizacja ta obejmuje planowane monitorowanie przez producenta nowości naukowych i zmian w praktyce medycznej. Odpowiednie nowe informacje powinny skłonić do ponownego przebadania klinicznej skuteczności urządzenia. Wytyczne dotyczące spełnienia tych wymagań można znaleźć na stronie MedTech Europe (<https://www.medtecheurope.org/resource/library/clinical-evidence-requirements-for-ce-certification-under-the-in-vitro-diagnostic-regulation-in-the-european-union/>).

Ważnym punktem jest stosowanie zharmonizowanych standardów. Urządzenia, zgodne z odpowiednimi zharmonizowanymi standardami, które zostały wymienione w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej, uważa się za zgodne z wymaganiami. Przykładem takiego standardu jest EN 13612:2002 Ocena działania wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* (<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/26676c14-f7c5-4f6c-b054-ffbd4199af54/en-13612-2002>).

Krytyczną kwestią w odniesieniu do wykazywania klinicznej skuteczności testów HEp-2 IFA jest fakt, że ANA mogą występować wiele lat przed kliniczną

manifestacją choroby [171]. Konieczne byłoby więc wykazanie wartości predykcyjnej testu w przypadku subklinicznej postaci choroby.

12. REKOMENDACJE/STANOWISKA – PUNKTACJA DELPHI

Ostatecznie w tym badaniu zostało sformułowanych 35 rekomendacji/stanowisk i zostały one podsumowane w tabelach I i II oraz podzielone na dwie podgrupy. Pierwsza podgrupa dotyczy różnych aspektów metodologicznych analizy ANA, głównie skoncentrowanych na HEp-2 IFA (tab. I). Druga podgrupa dotyczy aspektów walidacji/weryfikacji IFA i obejmuje zarówno walidację analityczną, jak i kliniczną (tab. II). Dla każdej rekomendacji podano medianę wyników Delphi i % wysokich wyników (tab. I i II). Więcej szczegółów na temat wyników można znaleźć w tab. IV.

Podsumowując, ogólna odpowiedź wyniosła 93% z minimalną liczbą niejasnych (lub braku) odpowiedzi (0,3%). Średnie zgłaszane niedoświadczenie w różnych dziedzinach wyniosło 9% (zakres 1-32%), przy czym najistotniejszy brak niedoświadczenia zgłoszono w odniesieniu do zaleceń związanych z CAD (rekomendacje 15-18 [11-24% niedoświadczonych], rekomendacja 25 [32% niedoświadczonych] i rekomendacja 33 [16% niedoświadczonych]).

Ogólnie 85% (4114 z 4832) wszystkich zgłoszonych wyników było powyżej 7 (zgoda się lub zgoda całkowita), 95% wyników było powyżej 6 (umiarkowana zgoda, zgoda i całkowita zgoda), co wskazuje na silne międzynarodowe poparcie dla zaproponowanych rekomendacji. Występują również wizualizacje wyników w postaci mapy cieplnej dla każdego regionu/kraju (ryc. 1) oraz wykresy rozkładu dla każdej rekomendacji (ryc. 2).

13. PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy krajowym zespołom EFLM (Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine, the Georgian Laboratory Medicine Association, the Estonian Society of Laboratory Medicine, the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, the Lithuanian Society

of Laboratory Medicine, the Portuguese Society of Clinical Chemistry, Genetics and Laboratory Medicine, the Slovenian Association for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, the Spanish Society of Laboratory Medicine and the Turkish Biochemical Society) za ich cenne uwagi i sugestie. Dziękujemy wszystkim ekspertom uczestniczącym w kwestionariuszu Delphi (runda 2) (zrealizowana na podstawie poszczególnych regionów geograficznych/krajów): Manfred Herold (Rheumatology Laboratory, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria); Andrea Griesmacher (Central Institute of Clinical and Chemical Laboratory Diagnostics, University Hospital of Innsbruck, Austria), Georg Endler (labors.at, Vienna, Austria); Jörg Hofmann (Institut für Labormedizin, Sozialmedizinisches Zentrum Ost, KAV Wien, Austria); Nikolaus Wick (Speziallabor Wick, Innsbruck, Austria); Ulrike Demel (Clinical Department for Rheumatology and Immunology, University Hospital of Graz, Austria); Lieve Van Hoovels (Department of Laboratory Medicine, OLV Hospital, Aalst, Belgium); Khadija Guerti (Department of Clinical Chemistry, Antwerp University Hospital, Edegem, Belgium); Laurence Lutteri (Department of Clinical Chemistry, University Hospital Liège, Liège, Belgium); Sylvie Goletti (Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium); Sofie Schouwens (Department of Laboratory Medicine, GZA Hospitals, Antwerp, Belgium); Sara Vijgen (Department of Laboratory Medicine, Jessa Hospital, Hasselt, Belgium); Ana Kozmar (Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia); Katarina Gugo (Department of Medical Laboratory Diagnostics, University Hospital Center Split, Split, Croatia); Jasna Pavela (Institute of Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia); Lovorka Đerek (Clinical Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Dubrava, Zagreb, Croatia); Vedrana Drvar (Clinical Department of Laboratory Diagnostics, Clinical Hospital Center Rijeka, Rijeka, Croatia); Andrea Tešija Kuna (Department of Clinical Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia); Raivo Uibo (Department of Immunology, Medical Faculty, University of Tartu, Estonia); Kaja Metsküla (United Laboratories, Tartu University Hospital, Tartu, Estonia); Liisa Kuhl (Central Laboratory, Diagnostic Clinic, East Tallinn Central Hospital, Tallinn, Estonia); Meeli Glükmann (Clinical Chemistry

Department, Synlab Eesti OÜ, Tallinn, Estonia); Anna-Maija Haapala (Department of Immunology, Fimlab laboratories, Tampere, Finland); Jari Karhukorpi (ISLAB, Finland); Arno Hänninen (Turku University Hospital, Finland); Lucile Musset (Department of Immunology, CHU Pitié Salpêtrière-Ch Foix, APHP, Paris, France); Marie Senant (Cerballiance, Lisses, France); Marie-Agnès Dragon-Durey (Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Paris Cité, APHP, Paris, France); Pascale Ghillani (Department of Immunology, CHU Pitie-Salpêtrière-Ch Foix, APHP, Paris, France); Dumestre-Pérard Chantal (Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France); Nicole Fabien (Service d'Immunologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France); Ulrich Sack (Institute of Clinical Immunology, University Hospital Leipzig, Germany); Bernard Schlüter (Center for Laboratory Medicine, University Hospital Muenster, Muenster, Germany); Martin Blüthner (Autoimmunity, MVZ Laboratory PD Dr. Volkmann & colleagues, Karlsruhe, Germany); Oliver Frey (Institute of Laboratory Medicine, Brandenburg Medical School Theodor Fontane, Brandenburg, Germany); Rudolf Gruber (R&D, bene pharmaChem GmbH & Co. KG, Geretsried, Germany); Thorsten Krieger (Autoimmunity Laboratory, MVZ Rheuma GmbH, Hamburg, Germany); Dirk Reinhold (Institute of Clinical Immunology, University Hospital Magdeburg, Magdeburg, Germany); Dimitrios P. Bogdanos (Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, University General Hospital of Larissa, Larissa, Greece); Kalliroi Tsalimalma (Department of Immunology, General Hospital Athens "Laiko", Athens, Greece); Christina Tsigalou (Laboratory of Microbiology, University General Hospital of Alexandroupolis, Thrace, School of Medicine, Democritus University Of Thrace, Alexandroupolis, Greece); Christos Liaskos (Department of Rheumatology and clinical Immunology, University Hospital of Thessaly, Larissa, Greece); Alexandra Tsirogianni (Department of Immunology-Histocompatibility, "Evaggelismos" General Hospital of Athens, Athens, Greece); Eleni Patrikiou (Laboratory of Rheumatology and Clinical Immunology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Greece); Gabor Nagy (Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen,

Debrecen, Hungary); Eszter Nagy (National Institute of Locomotor Diseases and Disabilities; Department of Laboratory Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary); Katalin Huszar (Central Department of Laboratory Diagnostics, Military Hospital, Hungarian Defense Forces Medical Center, Budapest, Hungary); Péter Antal-Szalmás (Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary); Péter Gergely (Department of Laboratory Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary); Zsuzsanna Beleznyay (Department of Laboratory Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary); Boris Gilburd (Research Unit of Autoimmune Diseases and the Department of Medicine 'B', Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Israel); Maria Infantino (Immunology and Allergology, Laboratory, S. Giovanni di Dio Hospital, Florence, Italy); Luigi Cinquanta (IRCCS SYNLAB SDN Naples, Italy); Mariangela Manfredi (Immunology and Allergology, Laboratory, S. Giovanni di Dio Hospital, Florence, Italy); Pesce Giampaola (IRCCS ospedale policlinico San Martino Genova/Dimi Università Genova, Italy); Boaz Palterer (Careggi University Hospital, University of Florence, Department of Clinical and Experimental Medicine, Italy); Nicola Bizzaro (Laboratory of Clinical Pathology, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Udine, Italy); Jan Damoiseaux (Central Diagnostic Laboratory, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands); Caroline Roozendaal (Department of Laboratory Medicine, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands); Marco Schreurs (Laboratory Medical Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, The Netherlands); Renate van der Molen (Laboratory of Medical Immunology, Radboud UMC, Nijmegen, The Netherlands); Henny Otten (Center of Translational Immunology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands); Hetty Bontkes (Laboratory Medical Immunology, Dept Clinical Chemistry, Amsterdam UMC, location VUmc, Amsterdam, The Netherlands); Tatjana Sundic (Department of Immunology and Transfusion Medicine, Haugesund Hospital, Haugesund, Norway); Hristina Andreeva (Laboratory Medicine Department, Diagnostic Clinic, University Hospital of North Norway, Tromsø, Norway); Yi Hu (Lillehammer

hospital for Rheumatic diseases, Lillehammer, Norway); Irina P Midtgard (Rheumatological department, Northen Bodo Hospital, Norway); Livia Bajelan (Oslo University Hospital, Oslo, Norway); Katarzyna Fischer (Individual Laboratory for Rheumatologic Diagnostics, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland); Marek Brzosko (Department of Rheumatology, Internal Diseases, Geriatrics and Clinical Immunology, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland); Eugeniusz J. Kucharz (Medical University of Silesia, Katowice, Poland); Bogdan Batko (Department of Rheumatology and Immunology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Andrzej Frycz Modrzewski University, Krakow, Poland); Zbigniew Żuber (Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Andrzej Frycz Modrzewski Kraków University, Kraków, Poland); Piotr Dąbrowski (Department of Rheumatology, Clinical Hospital No. 2 in Rzeszów. University of Rzeszow, Poland); Maria-Jose Rego de Sousa (Immunopathology and Autoimmunity Department, Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, Lisbon, Portugal); Catarina Castaldo/Margarida Albuquerque (Immunopathology and Autoimmunity Department, Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, Lisbon, Portugal); Esmeralda Neves (Immunology Department, Centro Hospitalar Porto, Porto, Portugal); Ana Paula Cruz (Immunology Department, Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia e Espinho, Gaia, Portugal); Vladimir Malkov (Tafi Diagnostica, Vladivostok, Russia); M Luisa Vargas-Pérez (Immunology, Hospital Universitario de Badajoz, Spain); Aurora Jurado Roger (Immunology, Hospital Universitario Reina Sofia, Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Córdoba, Spain.); Garbiñe Roy (Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain); Laura Martínez Martínez (Immunology, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain); Marco A Montes Cano (Immunology. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain); Yvelise Barrios Del Pino (Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain); Catharina Eriksson (Department of Clinical Microbiology section of Infection and Immunology, Umeå University, Umeå, Sweden); Rille Pullerits (Department of Clinical Immunology, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Sweden); Johan

Rönnelid (Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden); Rui Da Silva Rodrigues (Department of Clinical Immunology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden); Charlotte Dahle (Department of Clinical Immunology, University Hospital, Linköping, Sweden); Maria Lundgren (Clinical immunology, University Hospital, Lund, KITM, Lund, Sweden); Ingmar Heijnen (Immunology, Laboratory Medicine, University Hospital Basel, Basel, Switzerland); Eric Dayer (Synlab Immunologie, Lausanne, Switzerland); Elisabeth Probst-Müller (Immunology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland); Arlettaz Lionel (Institut Central des Hôpitaux (Hôpital du Valais), Valais, Switzerland); Dehlia Chevalley (Service of Immunology and Allergology, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland); Michael P. Horn (Department of Clinical Chemistry, Inselspital Bern, University of Bern, Bern, Switzerland); Luca Bernasconi (Institute of Laboratory Medicine, Kantonsspital Aarau, Aarau, Switzerland). Edward Chan (Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, FL, United States); Mark Wener (University of Washington, United states); Lisa K. Peterson (ARUP Laboratories, United States); Anne E. Tebo (Mayo Clinic, Rochester, USA); Donald Bloch (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, United States); Carlos A. von Mühlen (Private Consultant in Rheumatology and Clinical Pathology, United states); Ignacio García-De La Torre (Department of Immunology and Rheumatology, Hospital General de Occidente, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Mexico); Julio Sierra G de Quevedo (Unidad de Patología Clínica, Guadalajara, Mexico); Q.B.P. Andrés Mendiola Jiménez (Servicio de Reumatología H.U. de la U.A.N.L., Monterrey, Mexico); Daniel Perez Covarrubias (Laboratorio de Inmunología Clínica, S.A. de C.V. Guadalajara, México); Carlos A. Núñez-Alvarez (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico); Marvin Fritzler (Department of Medicine, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada); May Choi (University of Calgary, Canada); Ronald Booth (Department of Pathology and Lab Medicine, University of Ottawa, Canada); Luis Andrade (Immunology Division, Fleury Medicine and Health Laboratories, Sao Paulo, Brazil); Fabiano de Almeida Brito (Department of Clinical Pathology, School of

Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil); Hermes Pardini Group, Vespasiano, Brazil); Wilson Melo Cruvinel (Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Brazil); Cristóvão Luis Pitangueira Mangueira (Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil); Henrique de Athayde Mariz (Rheumatology Division, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil); Sandra Gofinet Pasoto (Rheumatology Division and Central Laboratory Division, Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil); Orlando Gabriel Carballo (Laboratory of Immunology, Hospital Carlos G. Durand; Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina); Celia Buzzi (Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela, Universidad dela República, Montevideo, Uruguay); Marta Costa (Hospital Aléman, Buenos Aires, Argentina); Alejandra Ginaca (Immunology Unit. Gutierrez Children Hospital, Buenos Aires, Argentina); María Pino (Hospital de Clínicas “José de San Martín” UBA División Reumatología Laboratorio, Buenos Aires, Argentina); Carolina Valenzuela (Instituto de Salud Pública de Chile-Laboratorio Nacional y de Referencia de Inmunología, Chili); Minoru Satoh (Department of Clinical Nursing, University of Occupational and Environmental Health and Kitakyushu Yahata-Higashi Hospital, Kitakyushu, Japan); Takao Fujii (Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan) Michito Hirakata (Medical Education Center, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan) Tsuneyo Mimori (Ijinkai Takeda General Hospital, and Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Kyoto University, Kyoto, Japan) Yoshinao Muro (Department of Dermatology, Nagoya University, Nagoya, Japan); Shinji Sato (Department of Internal Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan); Kyeong-Hee Kim (Department of Laboratory Medicine, Dong-A University, Republic of Korea) Jimyung Kim (Department of Laboratory Medicine, Chungnam National University Hospital, Republic of Korea) Eun-Jee Oh (Department of Laboratory Medicine, Catholic University of Korea, Republic of Korea) Hee-Won Moon (Department of Laboratory Medicine, Konkuk University Medical Center, South Korea) Sun Min Lee (Department of Laboratory

Medicine, Pusan National University Yangsan Hospital, Republic of Korea); Hyun-Woo Choi (Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Hospital, Republic of Korea). Bing Zheng (Department of Laboratory Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, China); Rulin Julia (Peking University Peoples Hospital, China); Shiji Wu (Department of Laboratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, China); Renfang Zhou (Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Wenling, Affiliated Wenzhou Medical University, Taizhou, Zhejiang Province, China); Taichang Tan (Department of Laboratory Medicine, Sichuan Provincial People's Hospital, University of

Electronic Science and Technology of China); Weidong Jin (Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang, China); Zhang Hang-feng (Sichuan Provincial People's Hospital, China); Eric Yuk-tat Chan (Department of Pathology, Queen Mary Hospital, Hong Kong, China); Elaine Au (Department of Pathology, Queen Mary Hospital, Hong Kong, China); Ip Wai Ki Ricky (Department of Pathology, Queen Mary Hospital, Hong Kong, China); Lam Ki (Department of Pathology, Queen Mary Hospital, Hong Kong, China); Sally Wong (Department of Pathology, Queen Mary Hospital, Hong Kong, China); Valerie Chiang (Department of Pathology, Queen Mary Hospital Hong Kong, China). Chcielibyśmy także podziękować Janie Neirinck za zaprojektowanie rysunków (mapa cieplna i wykresy dystrybucji).

14. PIŚMIENICTWO

1. Bossuyt X, De Langhe E, Borghi MO, Meroni PL. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16: 715–726.
2. Martini A, Ravelli A, Avcin T, et al. Toward new classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: first steps, pediatric Rheumatology international trials organization international consensus. *J Rheumatol* 2019; 46: 190–197.
3. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004; 41: 677–683.
4. EASL, Beuers U, Corpechot C, et al. EASL clinical practice guidelines: the diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* 2017; 67: 145–172.
5. Francescantonio PL, Cruvinel Wde M, Dellavance A, et al. IV Brazilian guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells. *Rev Bras Reumatol* 2014; 54: 44–50.
6. Ling M, Murali M. Antinuclear antibody tests. *Clin Lab Med* 2019; 39: 513–524.
7. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1420–1422.
8. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 17–23.
9. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al. European league against rheumatism/American college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2019; 71: 1400–1412.
10. Orme ME, Andalucia C, Sjolander S, Bossuyt X. A hierarchical bivariate meta-analysis of diagnostic test accuracy to provide direct comparisons of immunoassays vs. indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59: 547–561.
11. Bossuyt X, Fieuws S. Detection of antinuclear antibodies: added value of solid phase assay? *Ann Rheum Dis* 2014; 73: e10.
12. Orme ME, Andalucia C, Sjolander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay vs. indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018; 32: 521–534.
13. Bizzaro N. Can solid-phase assays replace immunofluorescence for ANA screening? *Ann Rheum Dis* 2020; 79: e32.
14. Willems P, De Langhe E, Claessens J, et al. Screening for connective tissue disease-associated antibodies by automated immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 909–918.
15. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 801–808.
16. Claessens J, Belmondo T, De Langhe E, et al. Solid phase assays vs. automated indirect immunofluorescence for detection of antinuclear antibodies. *Autoimmun Rev* 2018; 17: 533–540.
17. Bossuyt X, Claessens J, De Langhe E, et al. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and solid phase assays. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: e65.
18. Bizzaro N, Brusca I, Previtali G, Alessio MG, Daves M, Platzgummer S, et al. The association of solid-phase assays to immunofluorescence increases the diagnostic accuracy for ANA screening in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2018; 17: 541–547.
19. Ravelli A, Felici E, Magni-Manzoni S, et al. Patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 826–832.
20. Ravelli A, Vamier GC, Oliveira S, et al. Antinuclear antibody-positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 267–275.
21. Rypdal V, Glerup M, Songstad NT, et al. Uveitis in juvenile idiopathic arthritis: 18-year outcome in the population-based Nordic cohort study. *Ophthalmology* 2021; 128: 598–608.
22. Nordal E, Rypdal V, Christoffersen T, et al. Incidence and predictors of Uveitis in juvenile idiopathic arthritis in a Nordic long-term cohort study. *Pediatr Rheumatol Online J* 2017; 15: 66.
23. Saurenmann RK, Levin AV, Feldman BM, Laxer RM, Schneider R, Silverman ED. Risk factors for development of uveitis differ between girls and boys with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1824–1828.



24. Nordal EB, Songstad NT, Berntson L, Moen T, Straume B, Rygg M. Biomarkers of chronic uveitis in juvenile idiopathic arthritis: predictive value of antihistone antibodies and antinuclear antibodies. *J Rheumatol* 2009; 36: 1737–1743.
25. Storwick JA, Brett A, Buhler K, et al. Prevalence and titres of antinuclear antibodies in juvenile idiopathic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2022; 21: 103086.
26. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929–938.
27. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008; 48: 169–176.
28. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2015; 63: 971–1004.
29. Mieli-Vergani G, Vergani D, Baumann U, et al. Diagnosis and management of pediatric autoimmune liver disease: ESPGHAN hepatology committee position statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018; 66: 345–360.
30. Porcelli B, Terzuoli L, Bacarelli MR, Cinci F, Bizzaro N. How reliable is the detection of anti-mitochondrial antibodies on murine triple-tissue? *Clin Chem Lab Med* 2020; 58: e142–143.
31. Florin L, Rubben K, Vanhaecke A, et al. Evaluation of the primary biliary cholangitis-related serologic profile in a large cohort of Belgian systemic sclerosis patients. *Clin Chem Lab Med* 2020; 58: 416–423.
32. Guo YP, Wang CG, Liu X, et al. The prevalence of antinuclear antibodies in the general population of China: a cross-sectional study. *Curr Ther Res Clin Exp* 2014; 76: 116–119.
33. Satoh M, Chan EK, Ho LA, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2319–2327.
34. Akmatov MK, Rober N, Ahrens W, et al. Anti-nuclear autoantibodies in the general German population: prevalence and lack of association with selected cardiovascular and metabolic disorders-findings of a multicenter population-based study. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 127.
35. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 191–200.
36. Wener MH, Fink SL, Morishima C, Chaudhary A, Hutchinson K. Anti-nuclear antibody quantitation: calibration and harmonization adjustment via population interrogation. *J Appl Lab Med* 2022; 7: 46–56.
37. Sperotto F, Cuffaro G, Brachi S, Seguso M, Zulian F. Prevalence of antinuclear antibodies in schoolchildren during puberty and possible relationship with musculoskeletal pain: a longitudinal study. *J Rheumatol* 2014; 41: 1405–1408.
38. Hilario MO, Len CA, Roja SC, Terreri MT, Almeida G, Andrade LE. Frequency of antinuclear antibodies in healthy children and adolescents. *Clin Pediatr* 2004; 43: 637–642.
39. Somers EC, Monrad SU, Warren JS, et al. Antinuclear antibody prevalence in a general pediatric cohort from Mexico City: discordance between immunofluorescence and multiplex assays. *Clin Epidemiol* 2017; 9: 1–8.
40. Wananukul S, Voramethkul W, Kaewopas Y, Hanvivatvong O. Prevalence of positive antinuclear antibodies in healthy children. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2005; 23: 153–157.
41. Arroyave CM, Giambone MJ, Rich KC, Walaszek M. The frequency of antinuclear antibody (ANA) in children by use of mouse kidney (MK) and human epithelial cells (HEp-2) as substrates. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 741–744.
42. Wichainun R, Kasitanon N, Wangkaew S, Hongsongkiat S, Sukitawut W, Louthrenoo W. Sensitivity and specificity of ANA and anti-dsDNA in the diagnosis of systemic lupus erythematosus: a comparison using control sera obtained from healthy individuals and patients with multiple medical problems. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2013; 31: 292–298.
43. Mohammed ME, Abdelhafiz K. Autoantibodies in the sera of breast cancer patients: antinuclear and anti-double stranded DNA antibodies as example. *J Cancer Res Therapeut* 2015; 11: 341–344.
44. Agustinelli RA, Rodrigues SH, Mariz HA, Prado MS, Andrade LEC. Distinctive features of positive anti-cell antibody tests (indirect immunofluorescence on HEp-2 cells) in patients with non-autoimmune diseases. *Lupus* 2019; 28: 629–634.
45. Chan EKL, von Mühlen CA, Fritzler MJ, et al. ICAP Committee. The International Consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021-the 6th workshop and current perspectives. *J Appl Lab Med* 2022; 7: 322–330.
46. von Muhlen CA, Garcia-De La Torre I, Infantino M, et al. How to report the antinuclear antibodies (anti-cell antibodies) test on HEp-2 cells: guidelines from the ICAP initiative. *Immunol Res* 2021; 69: 594–608.
47. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI I/LA2-A. Quality assurance for the indirect immunofluorescence test for autoantibodies to nuclear antigen (IF-ANA). Approved guideline. USA: CLSI; 1996.
48. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI I/LA02-A2. Quality assurance of laboratory tests for autoantibodies to nuclear antigens: (1) indirect fluorescence assay for microscopy and (2) microtiter enzyme immunoassay methods. Wayne, PA, USA: CLSI; 2006.
49. Damoiseaux J, Agmon-Levin N, Van Blerk M, et al. From ANA-screening to antigen-specificity: an EASI-survey on the daily practice in European countries. *Clin Exp Rheumatol* 2014; 32: 539–546.
50. Goodwin JS, Searles RP, Tung KS. Immunological responses of healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 1982; 48: 403–410.
51. Arnaud L, Fagot JP, Mathian A, Paita M, Fagot-Campagna A, Amoura Z. Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: a 2010 nation-wide population-based study. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 1082–1089.
52. Svensson J, Arkema EV, Lundberg IE, Holmqvist M. Incidence and prevalence of idiopathic inflammatory myopathies in Sweden: a nationwide population-based study. *Rheumatology* 2017; 56: 802–810.
53. Royle JG, Lanyon PC, Grainge MJ, Abhishek A, Pearce FA. The incidence, prevalence, and survival of systemic sclerosis in the UK clinical practice research datalink. *Clin Rheumatol* 2018; 37: 2103–2111.
54. Thierry S, Fautrel B, Lemelle I, Guillemain F. Prevalence and incidence of juvenile idiopathic arthritis: a systematic review. *Joint Bone Spine* 2014; 81: 112–117.
55. Willems P, De Langhe E, Westhovens R, Vanderschueren S, Blockmans D, Bossuyt X. Antinuclear antibody as entry criterion for classification of systemic lupus erythematosus: pitfalls and opportunities. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: e76.
56. Bossuyt X, Fierz W, Meroni PL. (2021). Correspondence on “European League Against Rheumatism (EULAR)/American College of Rheumatology (ACR) SLE classification criteria item performance” by Aringer et al. *Annals of the rheumatic diseases*, *annrheumdis-2021-221288*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221288>.
57. Bossuyt X, Claessens J, Belmonto T, et al. Harmonization of clinical interpretation of antinuclear antibody test results

- by solid phase assay and by indirect immunofluorescence through likelihood ratios. *Autoimmun Rev* 2019; 18: 102386.
58. Vulsteke JB, Van Hoovels L, Willems P, et al. Titre-specific positive predictive value of antinuclear antibody patterns. *Ann Rheum Dis* 2019; 80: e128.
 59. Cheng CF, Lan TY, Shih MC, Li KJ. Monospecific anti-DFS70 antibodies are moderately helpful in excluding ANA-associated rheumatic disease in patients presenting with a dense fine speckled pattern – a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Autoimmun Rev* 2020; 19: 102637.
 60. Vermeersch P, Bossuyt X. Comparative analysis of different approaches to report diagnostic accuracy. *Arch Intern Med* 2010; 170: 734–735.
 61. Bossuyt X. Clinical performance characteristics of a laboratory test. A practical approach in the autoimmune laboratory. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 543–548.
 62. Malleson PN, Sailer M, Mackinnon MJ. Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic diseases. *Arch Dis Child* 1997; 77: 299–304.
 63. McGhee JL, Kickingbird LM, Jarvis JN. Clinical utility of antinuclear antibody tests in children. *BMC Pediatr* 2004; 4: 13.
 64. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Front Immunol* 2015; 6: 412.
 65. Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 879–889.
 66. Cruvinel WM, Andrade LEC, von Muhlen CA, et al. V Brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies on HEp-2 cells. *Adv Rheumatol* 2019; 59: 28.
 67. van Beek AA, Schreurs MWJ, Otten HG, Bergkamp FJM, Damoiseaux JGMC. The updated Dutch guideline for laboratory diagnostics of ANA-associated auto-immune diseases. *Paper Nederland Van Beek et al. Nederlands Tijdschr Allerg Klin Immunol* 2021; 2: 58–64.
 68. Van Hoovels L, Broeders S, Chan EKL, et al. Current laboratory and clinical practices in reporting and interpreting anti-nuclear antibody indirect immunofluorescence (ANA IIF) patterns: results of an international survey. *Auto Immun Highlights* 2020; 11: 17.
 69. Tebo AE, Schmidt RL, Kadkhoda K, et al. The antinuclear antibody HEp-2 indirect immunofluorescence assay: a survey of laboratory performance, pattern recognition and interpretation. *Auto Immun Highlights* 2021; 12: 4.
 70. Vermeersch P, Van den Bergh K, Blockmans D, Westhovens R, Bossuyt X. Anti-Golgi autoantibodies are not clinically associated with systemic autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 234–235.
 71. Vermeersch P, Bossuyt X. Prevalence and clinical significance of rare antinuclear antibody patterns. *Autoimmun Rev* 2013; 12: 998–1003.
 72. Peterson LK, Tebo AE, Wener MH, Copple SS, Fritzler MJ. Assessment of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence assay: report from a survey by the American Association of Medical Laboratory Immunologists. *Clin Chem Lab Med* 2020; 58: 1489–1497.
 73. Irure-Ventura J, Rodriguez C, Vergara-Prieto E, et al. Rare immunofluorescence patterns of autoantibodies on HEp-2 cells defined by ICAP identify different autoimmune diseases in the absence of associated specificities: a Spanish multicentre study. *Rheumatology* 2021; 60: 3904–3912.
 74. Vermeersch P, De Beeck KO, Lauwerys BR, et al. Antinuclear antibodies directed against proliferating cell nuclear antigen are not specifically associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1791–1793.
 75. Dellavance A, Cruvinel W, Francescantonio P, et al. Variability in the recognition of distinctive immunofluorescence patterns in different brands of HEp-2 cell slides. *J Bras Patol Med Lab* 2013; 49: 182–190.
 76. Dellavance A, Cançado EL, Abrantes-Lemos CP, Harriz M, Marvulle V, Andrade LE. Humoral autoimmune response heterogeneity in the spectrum of primary biliary cirrhosis. *Hepato Int* 2012; 7: 775–784.
 77. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D. Recognizing the dense fine speckled/lens epithelium-derived growth factor/p75 pattern on HEp-2 cells: not an easy task! Comment on the article by Mariz et al. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 4036–4037.
 78. Bentow C, Fritzler MJ, Mummert E, Mahler M. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey. *Auto Immun Highlights* 2016; 7: 8.
 79. Dellavance A, Baldo DC, Zheng B, et al. Establishment of an international autoantibody reference standard for human anti-DFS70 antibodies: proof-of-concept study for a novel Megapool strategy by pooling individual specific sera. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57: 1754–1763.
 80. Bonroy C, Schouwers S, Berth M, et al. The importance of detecting anti-DFS70 in routine clinical practice: comparison of different care settings. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 1090–1099.
 81. Mahler M, Parker T, Peebles CL, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2012; 39: 2104–2110.
 82. Albesa R, Sachs U, Infantino M, et al. Increased prevalence of anti-DFS70 antibodies in young females: experience from a large international multi-center study on blood donors. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57: 999–1005.
 83. Choi MY, Clarke E, St Pierre Y, et al. The prevalence and determinants of anti-DFS70 autoantibodies in an international inception cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2017; 26: 1051–1059.
 84. Andrade LEC, Klotz W, Herold M, et al. International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 1783–1788.
 85. Lee LA. Cutaneous lupus in infancy and childhood. *Lupus* 2010; 19: 1112–1117.
 86. Damoiseaux J, Chan EK. Response to: 'the utility of the HEp-2000 antinuclear antibody substrate' by Lee et al. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: e68.
 87. Lee AYS, Beroukas D, Roberts-Thomson PJ. Utility of the HEp-2000 antinuclear antibody substrate. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: e67.
 88. Fritzler MJ, Hanson C, Miller J, Eystathioy T. Specificity of autoantibodies to SS-A/Ro on a ransfected and overexpressed human 60 kDa Ro autoantigen substrate. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 103–108.
 89. Keech CL, McCluskey J, Gordon TP. Transfection and overexpression of the human 60-kDa Ro/SS-A autoantigen in HEp-2 cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73: 146–151.
 90. Peene I, Van Ael W, Vandenbossche M, Vervaet T, Veys E, De Keyser F. Sensitivity of the HEp-2000 substrate for the detection of anti-SSA/Ro60 antibodies. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 291–295.
 91. Bossuyt X, Meurs L, Mewis A, Marien G, Blanckaert N. Screening for autoantibodies to SS-A/RO by indirect immunofluorescence using HEp-2000 cells. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 216–219.

92. Pollock W, Toh BH. Routine immunofluorescence detection of Ro/SS-A autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SS-A. *J Clin Pathol* 1999; 52: 684–687.
93. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westhovens R, Marien G. Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. *Clin Chem* 2004; 50: 2361–2369.
94. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clin Chem* 2002; 48: 2171–2176.
95. Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples. *Clin Chem* 2005; 51: 2426–2427.
96. Kidd K, Cusi K, Mueller R, Goodner M, Boyes B, Hoy E. Detection and identification of significant ANAs in previously determined ANA negative samples. *Clin Lab* 2005; 51: 517–521.
97. Pisetsky DS, Thompson DK, Wajdula J, Diehl A, Sridharan S. Variability in antinuclear antibody testing to assess patient eligibility for clinical trials of novel treatments for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2019; 71: 1534–1538.
98. Röber N, Dellavance A, Ingénito F, et al. Strong association of the myriad discrete speckled nuclear pattern with anti-SS-A/Ro60 antibodies: consensus experience of four international expert centers. *Front Immunol* 2021; 12: 730102.
99. de Vlam K, De Keyser F, Verbruggen G, et al. Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11: 393–397.
100. Arcavi M, Dadone J. Antinuclear antibodies, patterns and characteristics obtained by immunofluorescence. The importance of the IgA, IgM and IgG isotypes. *Medicina* 2009; 69: 502–506.
101. Humbel R. Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In: Van Venrooij W, Maini R, (eds.). *Manual of biological markers of disease*. Kliever Academic Publishers, Norwell, MA. 1993; 10.1007/978-94-011-5444-4_2.
102. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71–81.
103. Infantino M, Meacci F, Grossi V, et al. The burden of the variability introduced by the HEp-2 assay kit and the CAD system in ANA indirect immunofluorescence test. *Immunol Res* 2017; 65: 345–354.
104. Harmon CE. Antinuclear antibodies in autoimmune disease. Significance and pathogenicity. *Med Clin North Am* 1985; 69: 547–563.
105. De Rycke L, Kruithof E, Van Damme N, et al. Antinuclear antibodies following infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1015–1023.
106. Vermeire S, Noman M, Van Assche G, et al. Autoimmunity associated with anti-tumor necrosis factor alpha treatment in Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gastroenterology* 2003; 125: 32–39.
107. Bertin D, Jourde-Chiche N, Bongrand P, Bardin N. Original approach for automated quantification of antinuclear autoantibodies by indirect immunofluorescence. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 182172.
108. Bertin D, Mouhadjir Y, Bongrand P, Bardin N. ICARE improves antinuclear antibody detection by overcoming the barriers preventing accreditation. *Clin Chim Acta* 2016; 454: 57–61.
109. Bonroy C, Verfaillie C, Smith V, et al. Automated indirect immunofluorescence antinuclear antibody analysis is a standardized alternative for visual microscope interpretation. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 1771–1779.
110. Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 292–298.
111. Egerer K, Roggenbuck D, Hiemann R, et al. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R40.
112. Bentow C, Lakos G, Rosenblum R, Bryant C, Seaman A, Mahler M. Clinical performance evaluation of a novel, automated chemiluminescent immunoassay, QUANTA flash CTD screen plus. *Immunol Res* 2015; 61: 110–116.
113. Yoo IY, Oh JW, Cha HS, Koh EM, Kang ES. Performance of an automated fluorescence antinuclear antibody image analyzer. *Ann Lab Med* 2017; 37: 240–247.
114. Melegari A, Bonaguri C, Russo A, Luisita B, Trenti T, Lippi G. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun Rev* 2012; 11: 713–716.
115. Voigt J, Krause C, Rohwader E, et al. Automated indirect immunofluorescence evaluation of antinuclear autoantibodies on HEp-2 cells. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 651058.
116. Look CD, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Automated evaluation of ANA under real-life conditions. *RMD Open* 2017; 3: e000409.
117. Lutteri L, Dierge L, Pesser M, Watrin P, Cavalier E. A paperless autoimmunity laboratory: myth or reality? *Ann Biol Clin* 2016; 74: 477–489.
118. Hayashi N, Saegusa J, Uto K, et al. Evaluation of a computer-aided microscope system and its anti-nuclear antibody test kit for indirect immunofluorescence assay (English abstract). *Rinsho Byori Japanese J Clin Pathol* 2016; 64: 142–151.
119. Bossuyt X, Cooreman S, De Baere H, et al. Detection of antinuclear antibodies by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chim Acta* 2013; 415: 101–106.
120. Coppole SS, Jaskowski TD, Giles R, Hill HR. Interpretation of ANA indirect immunofluorescence test outside the darkroom using NOVA view compared to manual microscopy. *J Immunol Res* 2014; 2014: 149316.
121. Zheng B, Li E, Zhu H, et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody analysis is a reliable approach in routine clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: 1922–1930.
122. Schouwens S, Bonnet M, Verschuere P, et al. Value-added reporting of antinuclear antibody testing by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 547–551.
123. Kivity S, Gilburd B, Agmon-Levin N, et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clin Rheumatol* 2012; 31: 503–509.
124. Kim J, Lee W, Kim GT, et al. Diagnostic utility of automated indirect immunofluorescence compared to manual indirect immunofluorescence for anti-nuclear antibodies in patients with systemic rheumatic diseases: a systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2019; 48: 728–735.
125. Van Hoovels L, Schouwens S, Van den Breemt S, et al. Analytical performance of the single well titer function of NOVA View®: good enough to omit ANA IIF titer analysis? *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 258–261.
126. Van Hoovels L, Schouwens S, Van den Breemt S, Bossuyt X. Variation in antinuclear antibody detection by automated indirect immunofluorescence analysis. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: e48.
127. Roggenbuck D, Hiemann R, Schierack P, Reinhold D, Conrad K. Digital immunofluorescence enables automated detection of antinuclear antibody endpoint titers avoiding serial dilution. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: e9–11.
128. Oyaert M, Bossuyt X, Ravelingien I, Van Hoovels L. Added value of indirect immunofluorescence intensity of automated antinuclear antibody testing in a secondary hospital setting. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: e63–e66.

129. Van Hoovels L, Bossuyt X, Manfredi M, et al. Integrating quality assurance in autoimmunity: the changing face of the automated ANA IIF test. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59: 1247–1255.
130. Bogaert L, Van den Bremt S, Schouwers S, Bossuyt X, Van Hoovels L. Harmonizing by reducing inter-run variability: performance evaluation of a quality assurance program for anti-nuclear antibody detection by indirect immunofluorescence. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57: 990–998.
131. Van den Bremt S, Schouwers S, Van Blerk M, Van Hoovels L. ANA IIF automation: moving towards harmonization? Results of a multicenter study. *J Immunol Res* 2017; 2017: 6038137.
132. Maenhout TM, Bonroy C, Verfaillie C, Stove V, Devreese K. Automated indirect immunofluorescence microscopy enables the implementation of a quantitative internal quality control system for anti-nuclear antibody (ANA) analysis. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 989–998.
133. International Organization for Standardization. EN-ISO 15189: 2012. Medical laboratories – requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: EN-ISO 15189; 2012.
134. Sack U, Bossuyt X, Andreeva H, et al. Quality and best practice in medical laboratories: specific requests for autoimmunity testing. *Auto Immun Highlights* 2020; 11: 12.
135. Dellavance A, Andrade L. Detection of autoantibodies by indirect immunofluorescence cytochemistry on HEp-2 cells. In: Houen G, (ed.). *Autoantibodies. Methods in Molecular biology*, vol 1901. Humana Press, Springer Nature, New York, NY. 2019: 19–46.
136. Higgins V, Augustin R, Kulasingam V, Taher J. Sample stability of autoantibodies: a tool for laboratory quality initiatives. *Clin Biochem* 2021; 96: 43–48.
137. Sack U, Conrad K, Csernok E, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 166–173.
138. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem* 1981; 27: 493–501.
139. Comité Français d'Accréditation. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Document SH GTA 04-Révison 01. Paris, France: COFRAC; 2015.
140. Van Blerk M, Van Campenhout C, Bossuyt X, et al. Current practices in antinuclear antibody testing: results from the Belgian External Quality Assessment Scheme. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 102–108.
141. Rigon A, Soda P, Zennaro D, Iannello G, Afeltra A. Indirect immunofluorescence in autoimmune diseases: assessment of digital images for diagnostic purpose. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: 472–477.
142. Pham BN, Albaredo S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus* 2005; 14: 113–119.
143. Cople SS, Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, Hill HR. Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization. *Am J Clin Pathol* 2012; 137: 825–830.
144. Silva MJ, Dellavance A, Baldo DC, et al. Interkit reproducibility of the indirect immunofluorescence assay on HEp-2 cells depends on the immunofluorescence reactivity intensity and pattern. *Front Immunol* 2022; 12: 798322.
145. CLSI EP26-A. User evaluation of between-reagent lot variation. Approved guideline. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
146. Thompson S, Cheshier D. Lot-to-lot variation. *Clin Biochem Rev* 2018; 39: 51–60.
147. Sandberg S, Fraser CG, Horvath ER, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st strategic conference of the European federation of clinical chemistry and laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53: 833–835.
148. Damoiseaux J, Vulsteke JB, Tseng CW, et al. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies: clinical associations and laboratory evaluation by mono- and multispecific immunoassays. *Autoimmun Rev* 2019; 18: 293–305.
149. World Health Organization. WHO BS/95.1793. Glossary of terms for biological substances used for texts of the requirements. Geneva Switzerland: World Health Organization Expert Committee on Standardization WHO; 1995.
150. European parliament, Council of the European Union. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *Off J Eur Communities* 1998; 331: 1–37.
151. Sarewitz SJ. CAP accreditation requirements for validation of laboratory tests. 2013. Available from: <http://webapps.cap.org/apps/docs/education/lapaudio/pdf/011613.presentation.pdf>.
152. Regulation (EU) 2017/746 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU. The European Parliament and the council of the European Union; 2017, 117: 176–332.
153. Joint Committee for Guides in Metrology. JCGM 200:2012: international vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). Sèvres cedex: JCGM; 2012.
154. International Organization for Standardization. ISO 9000:2005 quality management systems – fundamentals and vocabulary. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
155. CAP – all common checklist. Northfield: College of American Pathologists; 2017.
156. Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde. NVKC richtlijn Validatie en Verificatie van onderzoeksprocedures. The Netherlands: NVKC; 2021.
157. Commissie voor Klinische Biologie. Praktijkrichtlijn voor het opzetten van een kwaliteitshandboek in de erkende laboratoria voor klinische biologie werkzaam binnen het kader van het Erkenningsbesluit. Versie 3. Belgium. Commissie voor Klinische Biologie; 2017.
158. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP15-A3: user verification of precision and estimation of Bias. Approved guideline, 3rd ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2014.
159. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP12-A2: user protocol for evaluation of qualitative test performance. Approved guideline, 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2008.
160. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem* 2019; 90: 215–281.
161. Pum JKW. Evaluation of analytical performance of qualitative and semi-quantitative assays in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 2019; 497: 197–203.
162. Mulder L, van der Molen R, Koelman C, van Leeuwen E, Roos A, Damoiseaux J. Validation conform ISO-15189 of assays in the field of autoimmunity: joint efforts in The Netherlands. *Autoimmun Rev* 2018; 17: 513–517.
163. Munujos J. Autoimmune diagnostics by immune-fluorescence: variability and harmonization. *Clin Lab Int* 2016; 38–41.
164. Wener MH, Fink S, Bashleben C, Sindelar S, Linden MA. Long-term variability in immunofluorescence titer of antibodies to nuclear antigens observed in clinical laboratory proficiency testing surveys. *Arch Pathol Lab Med* 2021; 145: 937–942.

165. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med* 2012; 22: 276–282.
166. Senant M, Musset L, Chyderiotis G, et al. Precision of autoantibody assays in clinical diagnostic laboratories: what is the reality? *Clin Biochem* 2020; 83: 57–64.
167. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP05-A3: evaluation of precision of quantitative measurement procedures. Approved guideline, 3rd ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2014.
168. Antonelli G, Padoan A, Aita A, Sciacovelli L, Plebani M. Verification of examination procedures in clinical laboratory for imprecision, trueness and diagnostic accuracy according to ISO 15189:2012: a pragmatic approach. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: 1501–1508.
169. Jacobs JF, van der Molen RG, Bossuyt X, Damoiseaux J. Antigen excess in modern immunoassays: to anticipate on the unexpected. *Autoimmun Rev* 2015; 14: 160–167.
170. Bossuyt X, Marien G, Vanderschueren S. A 67-year-old woman with a systemic inflammatory syndrome and sicca. *Clin Chem* 2010; 56: 1508–1509.
171. Ma WT, Chang C, Gershwin ME, Lian ZX. Development of autoantibodies precedes clinical manifestations of autoimmune diseases: a comprehensive review. *J Autoimmun* 2017; 83: 95–112.

PRZYGOTOWANIE WERSJI POLSKIEJ REKOMENDACJI

- dr n. med. Katarzyna Fischer – nadzór merytoryczny i konsultacja naukowa;
- firma EUROIMMUN POLSKA Sp. z o. o. – przygotowanie tłumaczenia.

EFLM nie zatwierdziło treści tego tłumaczenia. Oficjalna wersja dokumentu znajduje się na stronie www.EFLM.eu.

MATERIAŁ UZUPEŁNIAJĄCY

Ten artykuł zawiera materiał uzupełniający, który jest dostępny w linku do strony artykułu (<https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0209>).

WKŁAD AUTORÓW

- Carolien Bonroy i Martine Vercaemmen – autorzy równorzędni.
- Edward K.L. Chan i Jan Damoiseaux – jednakowy wkład w tworzeniu publikacji.