

01-2021/v.2.

Određivanje antinuklearnih antitijela (ANA): Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

**Andrea Tešija Kuna, Lovorka Đerek,
Vedrana Drvar, Ana Kozmar, Katarina Gugo**

Zagreb, siječanj 2022.

Naslov:

Određivanje antinuklearnih antitijela (ANA): Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

Autori:

Andrea Tešija Kuna, Lovorka Đerek, Vedrana Drvar, Ana Kozmar, Katarina Gugo

Izdavač:

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM)

Prijevod:

Andrea Tešija Kuna, Lovorka Đerek, Vedrana Drvar, Ana Kozmar, Katarina Gugo

Ovaj dokument je prijevod članka objavljenog u časopisu Biochemia Medica: Assessment of antinuclear antibodies (ANA): National recommendations on behalf of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine (Zagreb) 2021;31(2):020502.

Korektura:

Andrea Tešija Kuna, Lovorka Đerek, Vedrana Drvar, Ana Kozmar, Katarina Gugo

Grafičko oblikovanje:

Maja Mravec, Braće Radića 107, Mraclin

ISBN: 978-953-96611-4-2

Određivanje antinuklearnih antitijela (ANA): Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

Andrea Tešija Kuna

Klinički zavod za kemiju,
Klinički bolnički centar Sestre
milosrdnice, Zagreb

Lovorka Đerek

Klinički zavod za laboratorijsku
dijagnostiku, Klinička bolnica
Dubrava, Zagreb

Vedrana Drvar

Klinički zavod za laboratorijsku
dijagnostiku, Klinički bolnički
centar Rijeka, Rijeka

Ana Kozmar

Klinički zavod za laboratorijsku
dijagnostiku, Klinički bolnički
centar Zagreb, Zagreb

Katarina Gugo

Zavod za medicinsko laboratorijsku
dijagnostiku, Klinički bolnički
centar Split, Split

SADRŽAJ

UVOD	4
1. PRIJEANALITIČKA FAZA	6
Indikacije za ANA testiranje.....	6
Vrsta uzorka i stabilnost	7
Provođenje kontrole kvalitete	7
Racionalni algoritam	9
2. ANALITIČKA FAZA	11
ANA metode probira	11
ANA specifični testovi (uključujući ENA).....	14
Antitijela na dsDNA	14
Interferencije	15
3. POSLIJEANALITIČKA FAZA	16
Nazivlje.....	16
Specifikacija antigena	16
Mjerne jedinice	17
Granična vrijednost	17
Primjenjene metode	18
Komentari na nalazu	18
Ponavljanje ANA testiranja	18
ZAKLJUČAK	20
LITERATURA	21
PRILOG 1	25
Tablica A. Nazivlje na nalazu.....	25
Tablica B. ICAP nazivlje za opis obrasca fluorescencije i pripadajući klinički značaj.....	25
PRILOG 2	27
Komentari pristigli tijekom javne rasprave i recenzije Povjerenstva za stručna pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara	27

SAŽETAK

Antinuklearna antitijela (ANA) predstavljaju obitelj autoantitijela usmjerenih na različite stanične strukture i karakteristična su značajka podskupine sistemskih upalnih autoimunih reumatskih bolesti pod nazivom bolesti vezivnog tkiva (BVT; engl. *Connective Tissue Diseases* (CTD)). Zlatni standard za određivanje ANA je indirektna imunofluorescencija (IIF) na supstratu stanične linije humanog epidermoidnog karcinoma larinksa tip 2 (HEp-2 stanice), no s povećanim zahtjevima za ANA testiranjem, pojavile su se nove automatizirane metode što omogućava testiranje laboratorijskim djelatnicima koji su manje iskusni u ovom specifičnom području laboratorijske dijagnostike. Radna grupa za laboratorijsku dijagnostiku autoimunih bolesti, kao dio Povjerenstva za znanstveno-stručni razvoj Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) objavila je rezultate ankete koja je obuhvaćala pitanja o općem pristupu laboratorijskoj dijagnostici autoimunih bolesti u Hrvatskoj. Rezultati su pokazali veliku raznolikost u izvedbi određivanja autoantitijela kao i izvještavanju rezultata što je

ukazalo na potrebu za izradom preporuka za određivanje ANA koje bi pomogle u harmonizaciji dijagnostike sistemskih autoimunih reumatskih bolesti u Hrvatskoj.

Ovaj dokument obuhvaća dvadeset i sedam preporuka za ANA testiranje s osvrtom na indikacije za ANA testiranje, probleme prijeanalitičke, analitičke i poslijeanalitičke faze, uključujući i racionalni algoritam kao i osiguranje kvalitete.

Ove preporuke se temelje na relevantnim međunarodnim preporukama i smjernicama za ANA testiranje, kao i ostaloj relevantnoj literaturi i trebale bi doprinijeti harmonizaciji pristupa ANA testiranju kao i pojašnjenju različitosti u interpretaciji rezultata dobivenih korištenjem različitih metoda određivanja.

Ključne riječi: antinuklearna antitijela; autoimunost; preporuke; harmonizacija

UVOD

Autoantitijela su najvažnija značajka autoimunosti među kojima antinuklearna antitijela (ANA) povijesno imaju središnju ulogu (1,2). Antinuklearna antitijela obuhvaćaju heterogenu skupinu autoantitijela usmjerenih prema unutarstaničnim antigenima u raznim staničnim odjeljcima, uključujući sastavnice jezgre (kromatin, nukleole i nukleoplazma), jezgrine ovojnice, mitotskog aparata i citosola (1). Rastući broj novo opisanih ciljnih autoantigena kao i njihove uloge u određenim autoimunim bolestima rezultiralo je neprestanim širenjem panela testova s pratećim razvojem metoda i analitičkih sustava u ovom specifičnom području laboratorijske dijagnostike. Nažalost, nedostatak ovog trenda je izrazita heterogenost u korištenom nazivlju, algoritmima za ANA testiranje, analitičkoj metodologiji, izvještavanju rezultata i njihovoj interpretaciji. Rezultati ankete Radne grupe (RG) za laboratorijsku dijagnostiku autoimunih bolesti Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) potvrdili su heterogenost među medicinsko-biokemijskim laboratorijima u Hrvatskoj i potaknuli su izradu prvih nacionalnih preporuka za određivanje ANA (3).

Nacionalne preporuke temelje se na međunarodnim preporukama za određivanje antinuklearnih antitijela koje je izdala Europska inicijativa za standardizaciju u autoimunosti (engl. *European Autoimmunity Standardisation Initiative* - EASI) i odnose se na probleme prijeanalitičke (uključujući racionalni algoritam) i analitičke faze te posebno na izvještavanje i interpretaciju rezultata (1).

Antinuklearna antitijela ključno su obilježje podskupine sistemskih upalnih autoimunih reumatskih bolesti (engl. *Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases* - SARD) pod nazivom bolesti vezivnog tkiva (BVT; engl. *Connective Tissue Diseases* - CTD) koje uključuju: sistemski eri-

temski lupus (engl. *Systemic Lupus Erythematosus* - SLE), primarni Sjögrenov sindrom (engl. *Sjögren Syndrome* - SjS), sistemsku sklerozu (skleroderma, engl. *Systemic Sclerosis* - SSc), idiopatske upalne miopatije (engl. *Idiopathic Inflammatory Myopathies* - IIM), miješanu bolest vezivnog tkiva (MBVT, engl. *Mixed Connective tissue Disease* - MCTD) i sindrome preklapanja (4-6). Antinuklearna antitijela predstavljaju klasiifikacijske kriterije većine BVT, a jedan su od temeljnih seroloških biljega za dijagnozu autoimunog hepatitisa tipa I (AIH tip I) kao organspecifične autoimune bolesti i potvrđeni faktor rizika za razvoj uveitisa u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) (7,8).

Nazivlje ANA specifičnih antitijela potječe od biokemijskih svojstava ciljnog antigena (npr. anti-dsDNA), naziva povezane bolesti (npr. anti-SS-A, kao antigena A povezanog sa Sjögrenovim sindromom (SjS)) ili imena prvog bolesnika (npr. anti-Sm od Smith). Unutar ANA obitelji, skupina u fiziološkoj otopini topljivih makromolekula koje se mogu ekstrahirati iz jezgre, obuhvaćena je pojmom ekstraktibilni nuklearni antigeni (ENA). Šest antigena koji su obuhvaćeni nazivom ENA su: SS-A (Ro60), SS-B (La), Sm, RNP, Scl-70 i Jo-1. Osim jezgrinih, ovaj pojam se odnosi i na citoplazmatske proteine, stoga nomenklatura nije u potpunosti točna. Također, u svjetlu stalnog širenja spektra klinički relevantnih autoantitijela, ovaj pojam je zastario, ali je još uvijek u širokoj uporabi od strane kliničara (1).

U prisutnosti pozitivnih ANA, preporučuje se testiranje na specifična autoantitijela unutar ANA obitelji za koja se zna da su povezana s određenim BVT u smislu kliničke dijagnoze, kategorizacije podsindroma, prognoze ili indikacije razvoja preklapajućih sindroma. Zbog njihove prisutnosti godinama prije pojave evidentne bolesti, ova antitijela mogu pružiti korisne prognostičke informacije o kliničkom tijeku ili komplikacijama (9-19). Najrelevantnije

ANA specifičnosti s ovakvim karakteristikama prikazane su u Tablici 1. Nedavno je u idiopatskim upalnim mioopatijama identificiran veći broj autoantitijela specifičnih za miozitis (engl. *Myositis specific antibodies* - MSA) i autoantitijela povezanih s miozitisom (engl. *Myositis associated antibodies* - MAA), koja su korisna za podklasifikaciju fenotipova, predviđanje prognoze i donošenje odluke o načinu liječenja. Slijedom toga, brojne linijske imunoblot metode (engl. *Line immunoassay* - LIA) postale su

komercijalno dostupne a sastoje se od različitih panela MSA i MAA kako bi se postigla veća osjetljivost jer je većina autoantitijela tih panela vrlo specifična, ali prisutna u samo do 20% bolesnika (20-22).

Autoantitijela koja se nalaze u serumu bolesnika s autoimunom bolešću su visoko avidna patogena autoantitijela IgG izotipa (10). Iako IgA i IgM izotipovi također mogu biti prisutni, njihova povezanost s BVT je manje specifična u usporedbi s IgG izotipom (9).

TABLICA 1. Klinički najrelevantnija autoantitijela u bolestima vezivnog tkiva

Autoantitijelo	Učestalost u različitim bolestima vezivnog tkiva	Klinički značaj
anti-dsDNA	>95% u aktivnom SLE sa zahvaćenosti bubrega 50 – 70% u aktivnom SLE bez zahvaćenosti bubrega <40% u neaktivnom SLE	ACR i SLICC klasifikacijski kriterij za SLE Prognostički biljeg za SLE (biljeg zahvaćenosti bubrega, aktivnosti bolesti, primjena u praćenju terapije)
anti-SS-A (Ro60)	60 - 96% u primarnom SjS 40 – 60% u sekundarnom SjS 25 – 60% SLE 60 - 100% SCLE 90% NLE	ACR/EULAR klasifikacijski kriterij za primarni SjS, povezana s izvanžljezdanim manifestacijama, nalaze se u majki djece s NLE
anti-Ro52/TRIM21	17 - 63% SjS 23% SLE 20% SSc 30% bolesnika s antisintetaza sindromom (u do 72% bolesnika s pozitivnim anti-Jo-1) Kod ne-BVT bolesti (28% PBC, 17% AIH)	Nalazi se u raznim autoimunim bolestima
anti-SS-B (La)	40 - 70% u primarnom SjS 5 – 50% u sekundarnom SjS 19 - 30% u SLE 25 - 80% u SCLE 70% NLE	Obično su prisutna uz SS-A antitijela, usporedna pojavnost sa SS-A antitijelima obično korelira s rjeđim bubrežnim manifestacijama
anti-Sm	5 – 10% SLE	ACR i SLICC klasifikacijski kriterij za SLE Visoka specifičnost za SLE
anti-RNP	100% MBVT 13 - 32% SLE	Serološki biljeg MBVT (kad su prisutna u visokom titru)
anti-Topo I/Scl70	65% u difuznoj SSc	ACR/EULAR klasifikacijski kriterij za SSc Povezana s brže progredirajućim sistemskim oblikom SSc
anti-CENP B	57 - 82% bolesnika s CREST sindromom 3 -12% bolesnika s difuznim kožnim oblikom SSc	ACR/EULAR klasifikacijski kriterij za SSc Povezana sa sporo razvijajućim ograničenim kožnim oblikom SSc (CREST sindrom)
anti-RNA-pol III	3 – 19% SSc	ACR/EULAR klasifikacijski kriterij za SSc Povezana s difuznim kožnim manifestacijama i bubrežnom krizom
anti-Jo-1	24 – 30% IIM	ACR/EULAR klasifikacijski kriterij za odrasle i juvenilne IIM Povezana s intersticijskom plućnom fibrozom

Autoantitijelo	Učestalost u različitim bolestima vezivnog tkiva	Klinički značaj
anti-PM/Scl	24 – 55% poliomiozitis/skleroderma preklapajući sindrom 8 - 12% IIM 1 - 16% SSc	Dijagnostički biljeg za polimiozitis/skleroderma preklapajući sindrom
anti-PCNA	3% SLE	Donedavno su se smatrala vrlo specifičnim za SLE
anti-ribosom P	10 – 35% SLE	Visoka specifičnost za SLE
anti-histoni	92 – 95% lupusa uzrokovanog lijekovima 50 – 80% SLE	Visoka specifičnost za lupus uzrokovan lijekovima
anti-nukleosomi	56 - 90% SLE	Visoka specifičnost za SLE

dsDNA – dvostruka uzvojnica DNK. BVT – Bolesti vezivnog tkiva. SLE – Sistemski eritemski lupus. ACR – American College of Rheumatology (Američki kolegij reumatologa). SLICC – Systemic Lupus International Collaborating Clinics (Međunarodno udruženje posvećeno kliničkim istraživanjima sistemskog lupusa). SS-A (Ro60) – antigen A povezan sa Sjögrenovim sindromom (60 kDa ribonukleoprotein). SjS – Sjögrenov sindrom. EULAR – European League Against Rheumatism (Europska liga protiv reumatizma). SCLE – Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus (Subakutni kožni eritemski lupus). NLE – Neonatal Lupus Erythematosus (Neonatalni eritemski lupus). Ro52/TRIM21 – 52 kDa ribonukleoprotein/ Protein 21 koji sadrži trodijelni motiv. SSc – Systemic Sclerosis (Sistemska skleroza). PBC – Primary Biliary Cholangitis (Primarni bilijarni kolangitis). AIH – Autoimuni hepatitis. CHB – Congenital Heart Block (Kongenitalni srčani blok). SS-B (La) – antigen B povezan sa Sjögrenovim sindromom. Sm – Smith antigen. RNP – kompleks ribonukleoproteina. MBVT – Miješana bolest vezivnog tkiva. Scl-70/Topo I – 70kDa antigen povezan sa sklerodermom/Topoizomeraza I. CENP B – centromerni protein B. CREST – Calcinosis, Raynaud's syndrome, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly and Telangiectasia (kalcinoza, Raynaud-ov sindrom, dismotilitet jednjaka, sklerodaktilija i telangiektazija). RNA-pol III – RNA polimeraza III. Jo-1 – histidil-tRNA sintetaza. IIM – Idiopathic Inflammatory Myopathies (Idiopatske upalne mioopatije). PM/Scl – antigen povezan s polimiozitisom / sklerodermom. PCNA – Proliferating cell nuclear antigen (jezgrin antigen proliferirajuće stanice). Ribosom P – ribosomski P protein.

1. PRIJEANALITIČKA FAZA

Indikacije za ANA testiranje

Testiranje na ANA treba provoditi samo u bolesnika sa simptomima autoimune reumatske bolesti jer slaba ANA reaktivnost može biti prisutna u mnogim nereumatskim stanjima (virusne infekcije, paraneoplastični neurološki sindromi (PNS), bolesti jetre, sindrom kroničnog umora, razni karcinomi) kao i u zdravih osoba (osobito trudnica, žena starijih od 40 godina i starijih osoba) (10).

Zlatni standard za otkrivanje ANA je indirektna imunofluorescencija (IIF) na HEp-2 staničnom supstratu (stanična linija humanog epidermo-

idnog karcinoma larinksa tip 2) i smatra se jedinstvenim ANA probirnim testom. Definicija IIF kao zlatnog standarda prvenstveno se temelji na visokoj osjetljivosti za SLE, unatoč ograničenoj specifičnosti te uloji u klasifikacijskim kriterijima za različite BVT (1, 23).

Pokazalo se da se ANA bez ikakvog kliničkog značaja mogu naći u 30% zdravih ispitanika u titru 1:40 i u 5% u titru 1:160 (9). Probirni test na antinuklearna antitijela pokazuje visoku dijagnostičku osjetljivost za određene BVT (SLE (90 – 95%), primarni Sjögrenov sindrom (75%), skleroderma (85-90%), i MBVT (100%)), ali ima relativno nisku specifičnost (9). Prema tome, predodabir bolesnika vrlo je važan za smanjenje broja lažno pozitivnih rezultata i otkrivanje autoantitijela iz logičnog kliničkog konteksta.

Preporuke za indikacije određivanja ANA:

1. Testiranje na ANA preporučuje se samo u bolesnika sa simptomima vezanim uz BVT, u sumnji na AIH, i u praćenju bolesnika s JIA.
2. ANA probirni test treba koristiti samo u dijagnostičke svrhe, a ne za praćenje aktivnosti bolesti ili odgovora na terapiju.

Vrsta uzorka i stabilnost

Uzorak izbora za određivanje ANA je serum. Uzorak je stabilan dva do tri dana pri temperaturi od 4°C dok se za dugotrajniju pohranu preporučuje – 70°C (24). Pohrana uzoraka na –20°C općenito je prihvatljiva do 6 mjeseci. Višekratno zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka potrebno je izbjegavati jer može uzrokovati denaturaciju imunoglobulina. Mnogi proizvođači komercijalnih testova za određivanje ANA, ENA i anti-dsDNA preporučuju serum i plazmu kao jednako prihvatljive uzorke. Ne postoje specifični zahtjevi za transport uzorka ukoliko se poštuju prethodno navedeni uvjeti stabilnosti.

Prije uzorkovanja krvi potrebno je pridržavati se standardnih uputa za pripremu pacijenta za rutinske laboratorijske pretrage. Prema dostupnim podacima, terapija ne utječe na vrijeme uzorkovanja.

Većina proizvođača preporuča izbjegavanje analize izrazito hemolitičnih, lipemičnih i ikteričnih uzoraka ne navodeći pritom koncentracije pri kojima se interferencija pojavljuje. Ukoliko proizvođač preporuča izbjegavanje hemolitičnih, ikteričnih ili lipemičnih uzoraka, koncentracije interferirajućih tvari trebale bi biti dostupne u uputstvima za korištenje reagensa ili na zahtjev korisnika. U protivnom, preporuka je da svaki laboratorij ispita interferencije za korištenu metodu.

Preporuka za vrstu uzorka:

1. Preporučena vrsta uzorka za određivanje ANA je serum.

Provođenje kontrole kvalitete

Posebnu pažnju potrebno je posvetiti kontroli kvalitete. Minimalni zahtjevi za vrstu kontrolnog materijala trebali bi pratiti preporuke proizvođača reagensa koje obično upućuju na provođenje kontrole kvalitete analizom negativnih i pozitivnih kontrolnih uzoraka proizvođača. U slučaju linijskih imunoblot ili western blot metoda, kontrola kvalitete cijelog postupka obično je osigurana kontrolnom linijom na svakoj trakici te dodatno upotpunjena lot-specifičnim kontrolnim uzorkom obično dostatnim za jednu analizu po reagens paketu. Poželjna je također i primjena kontrolnih uzoraka neovisnih o proizvođaču. Za kvantitativne testove, poželjan uzorak za kontrolu kvalitete trebao bi imati vrijednost blizu granične vrijednosti testa što često nije slučaj s kontrolnim uzorcima proizvođača. Nativni uzorak pacijenta s prethodno utvrđenim negativnim ili pozitivnim rezultatom za određeno autoantitijelo može biti dobra alternativa. Željena vrijednost blizu granične vrijednosti ili razine kliničke odluke može se postići razrjeđivanjem pozitivnog uzorka pacijenta s negativnim uzorkom. Upotreba prethodno određenih negativnih i pozitivnih uzoraka pacijenata kao uzoraka za provođenje unutarnje kontrole kvalitete, osjetljiviji je alat za otkrivanje varijacija između lotova koje mogu imati izravan utjecaj na kliničku odluku, osobito u slučaju koncentracije anti-dsDNA koja se koristi za praćenje aktivnosti bolesti (25). Potencijalni nedostaci upotrebe nativnih uzoraka pacijenata za kontrolu kvalitete su ograničena stabilnost i količina uzorka.

Za razliku od komercijalnih kontrolnih uzoraka, nativni uzorci pacijenata nisu stabilizirani, stoga je prije upotrebe potrebno ispitati stabilnost uzoraka tijekom vremena pri preporučenim uvjetima pohrane. U svrhu stabilizacije uzoraka može se upotrebljavati natrijev azid (100 - 300 µg/ml). Prije uvođenja uzorka za unutarnju kontrolu kvalitete potrebno je postaviti kriterije prihvatljivosti rezultata. Kriterij prihvatljivosti može biti definiran kao kvalitativno podudaranje s prethodnim rezultatom ili kao prihvatljiva kvantitativna devijacija.

Kod IIF, primjena nativnog uzorka pacijenta kao kontrolnog uzorka omogućuje istovremenu kontrolu ponovljivosti obrasca fluorescencije i titra ANA. Upotreba kontrolnog uzorka s unaprijed definiranim titrom je također preporučena kod određivanja ANA metodom IIF. Treba napomenuti da je detektabilna razlika kod ANA IIF metode +/- dva serijska dvostruka razrjeđenja (24) i preporuča se kao kriterij prihvatljivosti razlike između dva mjerenja kontrolnog uzorka. Kod metoda na čvrstoj podlozi prihvatljiva razlika između uzastopnih mjerenja kontrolnog uzorka definirana je koeficijentom varijacije između serija. Primjerice, za ELISA metodu (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*) to je +/- 2 standardne devijacije (SD) što iznosi otprilike +/- 30% do 40% na temelju CV unutar serije od 15% do 20% (24).

Upotreba granično pozitivnih kontrolnih uzoraka, bilo komercijalnih ili nativnih uzoraka pacijenata, osigurava provjeru osjetljivosti mikroskopa i osoblja koje očitava rezultate (25).

Dodatno pitanje je učestalost provođenja kontrole kvalitete. Unutarnju kontrolu kvalitete potrebno je provoditi sa svakim novim lotom reagensa, neovisno o vrsti metode i učestalosti izvođenja analize. Prilikom upotrebe istog lota reagensa, bilo bi optimalno analizirati kontrolne uzorke (s pozitivnim, negativnim i graničnim titrom) u svakoj seriji ručno pripremljenih stakalaca za određivanje ANA IIF metodom.

Isto vrijedi i za metode na čvrstoj podlozi gdje se analiza izvodi u serijama. U slučaju automatiziranih metoda kod kojih se analize izvode svakodnevno postupak unutarnje kontrole kvalitete trebao bi se provoditi jednom dnevno, po mogućnosti na početku radnog procesa. Međutim, za manje i srednje velike laboratorije ovaj pristup je teško ekonomski ostvariv. U skladu s tim, laboratoriji mogu optimizirati učestalost provođenja unutarnje kontrole kvalitete retrospektivnom analizom podataka unutarnje kontrole kvalitete (u prihvatljivom vremenskom razdoblju od barem 6 mjeseci) te izračunom sigma vrijednosti (sustav kvalitete šest sigma, engl. *Six-sigma*) kako bi se dokazala stabilnost analitičkog procesa. Sigma vrijednost pruža informaciju o učestalosti pojave različitih pogrešaka (u ovom slučaju o broju rezultata unutarnje kontrole kvalitete izvan definiranog prihvatljivog raspona/ukupan broj rezultata unutarnje kontrole kvalitete za pojedine parametre) (26). Jednom kad je definirana učestalost provođenja unutarnje kontrole kvalitete, učestalost pogrešaka potrebno je redovito revidirati (barem jednom godišnje) kako bi se potvrdila stabilnost procesa te u slučaju smanjenja sigma razine kvalitete povećala učestalost provođenja unutarnje kontrole kvalitete. Drugi oblik unutarnje kontrole kvalitete analitičkog procesa je praćenje udjela negativnih rezultata u ukupnom broju rezultata za određenu analizu (jednako za ANA probir kao i za pojedinačna specifična antitijela) (27). Za postizanje pravilnog uvida u izvođenje ANA analize u laboratoriju, nužno je sudjelovanje u ciklusima vanjske kontrole kvalitete.

Preporuke za osiguranje kontrole kvalitete:

1. Minimalni zahtjev za vrstu kontrolnog uzorka trebao bi slijediti upute proizvođača.

2. Preporuča se upotreba uzoraka pacijenta s prethodno potvrđenim pozitivnim ili negativnim rezultatom za određeno antitijelo kao uzorka za unutarnju kontrolu kvalitete.
3. Postupak unutarnje kontrole kvalitete nužno je provoditi prilikom svake upotrebe novog lota reagensa.
4. Minimalni zahtjevi za učestalost provođenja unutarnje kontrole kvalitete za isti lot reagensa:
 - Jednom u seriji ukoliko se analiza ne izvodi svakodnevno
 - Jednom dnevno, na početku radnog procesa, za automatizirane testove koji se izvode svakodnevno

Iznimno, odstupanje od minimalnih zahtjeva za provođenje unutarnje kontrole kvalitete moguće je učiniti u slučaju prihvatljive sigma vrijednosti izračunate na temelju analize rezultata prikupljenih tijekom razdoblja od barem 6 mjeseci.
5. Sudjelovanje u programu vanjske kontrole kvalitete je obavezno.

Racionalni algoritam

Uvođenje refleksnog testiranja prilikom određivanja ANA pokazalo se u kliničkoj praksi kao dobar način unaprijeđenja efikasnosti laboratorijske dijagnostike bolesti vezivnog tkiva skraćivanjem vremena do postavljanja dijagnoze uz istovremenu uštedu sredstava (28). Racionalni algoritmi predloženi u literaturi uglavnom navode metodu "zlatnog standarda", IIF na HEp-2 stanicama, kao optimalan probirni test. Prema tome, izbor optimalnog ANA refleksnog testa trebao bi biti vođen

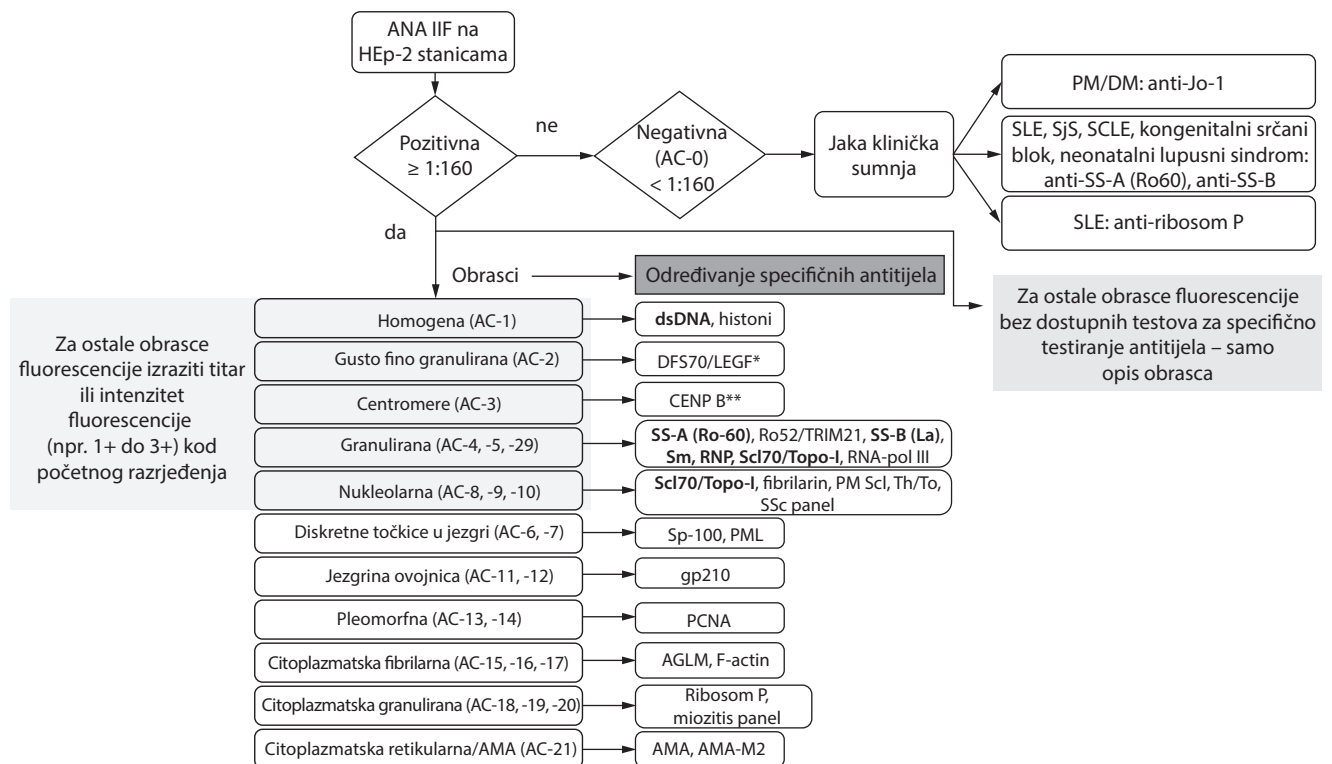
obrascem IIF i titrom kao i kliničkom indikacijom. Ukoliko se koristi alternativni test za probir, kao što su metode na čvrstoj podlozi temeljene na ograničenom broju specifičnih antigena, tada se rezultat navodi s napomenom o ograničenjima takvog testa.

Pozitivan IIF test trebao bi biti praćen analizom antigen specifičnih antitijela, ovisno o obrascu fluorescencije (Slika 1.). Preporuka je usredotočiti se na ona antitijela s poznatim kliničkim značenjem (10,29). Određivanje specifičnih antitijela bi trebalo uključivati barem testove na čvrstoj podlozi koji uključuju klasične ENA antigene (SS-A (Ro60), SS-B (La), Sm, RNP, Scl-70 i Jo-1) i dsDNA (6, 29-32). Multipleks testovi na mikročesticama poput imunometode s laserski adresabilnim mikročesticama (engl. *Addressable laser bead immunoassay* – ALBIA), odnosno Luminex metode, omogućuju određivanje različitih ANA specifičnih antitijela istovremeno (obično dsDNA, ENA, CENP B).

Kako bi se dodatno unaprijedila racionalizacija, testovi s definiranom mješavinom nuklearnih autoantigena vezanih za čvrstu podlogu (testovi probira na čvrstoj podlozi) mogu prethoditi određivanju pojedinačnih antitijela koja mogu biti zanemarena u slučaju negativnog nalaza probirnog testa. Ovi testovi su dostupni u obliku ENA probirnih testova, obuhvaćajući samo klasične ENA antigene, ili kao BVT probirni testovi (CTD probirni testovi) koji obuhvaćaju širi spektar klinički važnih autoantitijela.

Kod negativnog rezultata ANA IIF testa, testiranje na određena pojedinačna specifična autoantitijela treba biti provedeno u slučaju postojanja jake kliničke sumnje na pojedine dijagnoze (anti-Jo-1 u slučaju PM/DM; anti-SS-A (Ro60) u slučaju SjS, kongenitalnog srčanog bloka ili neonatalnog lupusa; antitijela na ribosom P protein u slučaju SLE) (33-35).

U slučaju kliničke sumnje na reumatske bolesti povezane s različitim ANA antitijelima kao što



SLIKA 1. Algoritam ispitivanja specifičnih antitijela za pozitivne ANA IIF uzorke ovisno o obrascu fluorescencije. Svaki obrazac označen je s odgovarajućom AC oznakom (objašnjenje se nalazi u sljedećem odjeljku). Testovi na specifična antitijela koji bi minimalno trebali biti dostupni su označeni podebljanim slovima. *DFS70 / LEGF refleksno testiranje samo u slučaju ako nije potvrđena ENA; **Ispitivanje antitijela na CENP B nije obvezno zbog specifičnog obrasca fluorescencije. ANA - antinuklearna antitijela. IIF - indirektna imunofluorescencija. HEp-2 - stanična linija humanog epidermoidnog karcinoma larinksa tip 2. PM/DM - Polimiozitis / dermatomiozitis. Jo-1 - histidil-tRNA sintetaza. SLE - Sistemski eritemski lupus. SjS - Sjögrenov sindrom. SCLE - Subakutni kožni eritemski lupus. SS-A (Ro60) - antigen A povezan sa Sjögrenovim sindromom (60 kDa ribonukleoprotein). dsDNA - dvostruka uzvojnica DNK. DFS70/LEGF - antigen od 70 kDa povezan s gusto fino granuliranim fluorescentnim obrascem na HEp-2 stanicama/čimbenik rasta endotela leće. CENP B - centromerni protein B. Ro52/TRIM21 - 52 kDa ribonukleoprotein / Protein 21 koji sadrži trodijelni motiv. SS-B (La) - antigen B povezan sa Sjögrenovim sindromom. Sm - Smith antigen. RNP - kompleks ribonukleoproteina. Scl-70/Topo I - antigen od 70 kDa povezan sa sklerodermom/Topoizomeraza I. RNA-pol III - RNA polimeraza III. PM /Scl - antigen povezan s polimiozitisom/sklerodermom. Th/To - nukleolarni 7-2/8-2 RNA proteinski kompleks. SSc - Sistemska skleroza. Sp100 - topljivi jezgrin protein. PML proteini - proteini promijelocitne leukemije. gp-210 - nukleoporin 210. PCNA - jezgrin antigen proliferirajuće stanice. AGLM - antitijela na glatku muskulaturu. Ribosom P - ribosomski P protein. AMA - antimitoondrijska antitijela. M2 - E2 podjedinica piruvat dehidrogenaznog kompleksa. ENA - ekstraktibilni nuklearni antigeni.

su idiopatske inflamatorne miopatije (IIM) i sistemska skleroza (SSc), preporuča se upotreba komercijalno dostupnih testova za profil autoantitijela specifičnih za navedene bolesti (36).

Određivanje antitijela usmjerenih na 70 kDa antigen povezan s gusto fino granuliranim obrascem fluorescencije HEp-2 stanica (anti-DFS70) preporuča se radi dodane vrijednosti prilikom isključivanja dijagnoze autoimune bo-

lesti (međutim, samo u odsustvu pozitivnih ENA), zahvaljujući negativnoj povezanosti sa sistemskim autoimunim reumatskim bolestima (37).

Kako u laboratorijskoj praksi zahtjevi obično nisu praćeni kliničkim informacijama, nedavno je predloženo kombiniranje IIF s probirnim testovima na čvrstoj podlozi u cilju postizanja maksimalne osjetljivosti i specifičnosti u po-

stavljanju dijagnoze bolesti vezivnog tkiva (33, 38). Učinkovitost ove strategije pokazala se ovisnom o bolesti s najvećom opaženom učinkovitošću za SLE i SjS dok za SSc nije postignuta dodatna vrijednost u usporedbi s algoritmom u kojem se koristi samo IIF kao test prve linije nakon čega slijede testovi na čvrstoj podlozi samo na IIF pozitivnim uzorcima (39).

Preporuke za racionalni algoritam:

1. Preporučeni test prve linije u određivanju ANA je IIF probirni test na HEp-2 stanicama.
2. Određivanje specifičnih ANA trebalo bi provesti samo u slučaju pozitivnog ANA IIF probirnog testa pri titru $\geq 1:160$, vodeći se obrascem fluorescencije. Iznimke su vezane za prethodno spomenute kliničke indikacije (tj. anti-SS-A ili Jo-1 zbog niske osjetljivosti IIF metode za ova antitijela).
3. Ukoliko potpuna evaluacija ANA (probir i potvrda specifičnosti) nije uključena u zahtjev, preporuča se provesti potpunu evaluaciju ili bi, kao minimalni zahtjev, u napomeni na nalazu trebalo navesti preporuku za određivanje specifičnih antitijela.

2. ANALITIČKA FAZA

ANA metode probira

Dobro je poznato da probirni testovi zahtijevaju visoku osjetljivost, dok je za potvrdne testove primarna visoka specifičnost. Određivanje antinuklearnih antitijela metodom IIF na HEp-2 ili HEp2000 stanicama (stanice HEp-2 transfecirane sa SS-A cDNA) kao preporučenom supstratu, posjeduje sva svojstva probirnog testa

prve linije u dijagnostici BVT-a te se stoga smatra „zlatnim“ standardom i referentnom metodom za ANA probir. Fluorokromom (fluorescein izotiocijanat, FITC) - označeni anti-human Ig konjugat koji se koristi u ANA IIF testu treba biti specifičan za IgG (mogu se koristiti i polivalentni konjugati, ali time se detektira i veći broj antitijela koja nisu klinički značajna) (1,2,23,33, 40).

Upotrebom metode IIF na HEp-2 stanicama za ANA probir, može se otkriti više od 100 različitih autoantitijela, mnogo više od bilo kojeg drugog komercijalno dostupnog testa na čvrstoj podlozi (2,41).

Međunarodnim konsenzusom o obrascima fluorescencije antinuklearnih antitijela (*The International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns* - ICAP) 2015. godine definirane su i opisane tri glavne skupine obrazaca fluorescencije na HEp-2 stanicama: fluorescencija jezgre, citoplazme i mitotskog aparata. Svaki obrazac fluorescencije označen je odgovarajućom AC oznakom (engl. *Anti-Cell pattern code*). Obrasci unutar svake skupine detaljno su opisani na službenoj mrežnoj stranici <https://www.anapatterns.org/>.

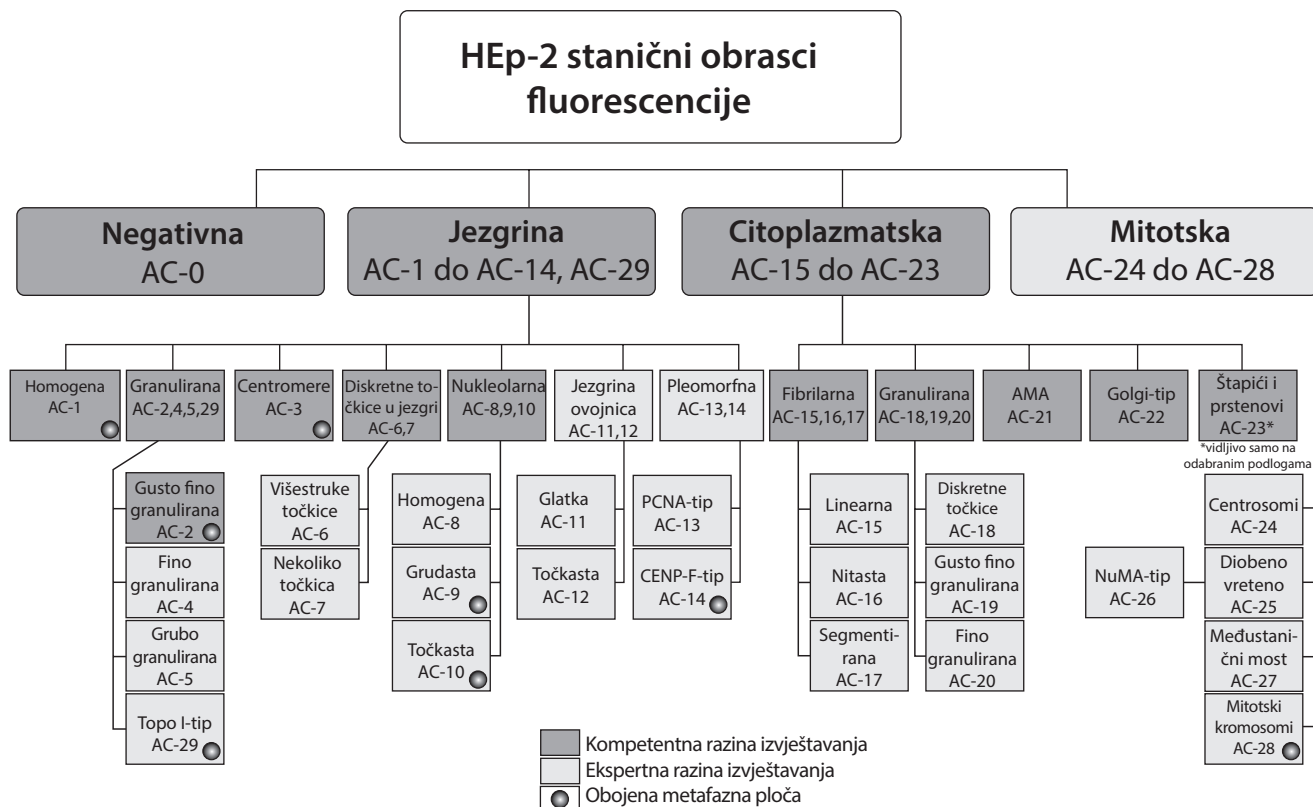
Prema ICAP preporuci, ANA probir metodom IIF treba izvještavati kao pozitivan u slučajevima pozitivne fluorescencije jezgre, ali i kod jasnih citoplazmatskih i mitotskih obrazaca imunofluorescencije (2,42). ICAP nazivlje i klasifikacija ANA IIF obrazaca na stanicama HEp-2 prikazani su na Slici 2.

ICAP-ova namjera/preporuka je izvještavanje obrazaca imunofluorescencije na dvije razine:

Kompetentna razina: obrasci koji su lako prepoznatljivi i čije se izvještavanje izrazito preporučuje. Također su uključeni i obrasci čija klinička važnost još uvijek nije jasna /definirana.

Ekspertna razina: obrasci koje je zahtjevnije prepoznati i koje mogu prepoznati /izvijestiti samo stručnjaci s iskustvom na razini eksperata.

Nazivlje i klasifikacijsko stablo



SLIKA 2. ICAP stablo nazivlja i klasifikacije ANA IIF obrazaca na HEp-2 staničnom supstratu (<https://www.anapatterns.org/>). ICAP - Međunarodni konsenzus o obrascima antinuklearnih antitijela (The International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns). HEp-2 - stanična linija humanog epidermoidnog karcinoma larinksa tip 2. ANA - antinuklearna antitijela. IIF - indirektna imunofluorescencija. PCNA - jezgrin antigen proliferirajuće stanice. CENP-F - centromerni protein F. AMA - antimitohondrijska antitijela.

Kao i u drugim probirnim testovima, prilikom definiranja graničnog titra (engl. *cut-off*) važno je osigurati odgovarajuću osjetljivost i specifičnost testa za definirana razrjeđenja. Pozitivna ANA se može naći ne samo u bolesnika s autoimunim bolestima nego i kod zdravih osoba. S nižim graničnim titrom osjetljivost testa se povećava, međutim, specifičnost testa kao alata za dijagnozu BVT-a je niža uz viši udio pozitivnih rezultata u zdravih osoba. Nekoliko studija je potvrdilo da je optimalna upotreba graničnog titra u omjeru 1:160 za razlikovanje zdravih osoba od onih s BVT-om (43-45). Međunarodne preporuke za određivanje ANA koje također preporučuju granični titar 1:160 za ANA IIF

na HEp-2 stanicama za odraslu populaciju, naglašavaju da negativan rezultat kod titra 1:160 ne znači potpuno isključenje bolesti (1). Nema preporuka/konsenzusa za granični titar kod ANA probira u dječjoj populaciji (<16 godina) (46,47).

Prema Međunarodnim preporukama za određivanje ANA, utvrđeno je da uzorak pozitivan na probiru ANA IIF metodom treba dodatno razrijediti u dvostrukim razrjeđenjima do najvišeg razrjeđenja (titra) kod kojeg je još vidljiva fluorescencija kao rezultat reaktivnosti autoantitijela (1). Naša preporuka je da je potrebno tiritirati do klinički značajnog titra od 1:640 ili maksimalno do 1:5120 s obzirom da viši titar

nema dodatnu kliničku vrijednost (33). Izvještanje titra važno je zbog razlučivanja zdravih osoba od pacijenata s BVT-om s obzirom na ustanovljenu prevladavajuću reaktivnost u niskom titru kod ANA pozitivnih zdravih osoba u odnosu na pacijente s BVT-om (43). Zajedno s titrom, izvještaj o pozitivnom rezultatu ANA treba biti popraćen opisom obrasca fluorescencije prema ICAP AC-nomenklaturi (Tablica B u Prilogu) budući da su svojstveni profili obrazaca povezani s BVT, odnosno s pozitivnim ANA u zdravih osoba. Neki obrasci, poput homogene (AC-1) i grubo granulirane (AC-5) fluorescencije jezgre te centromera (AC-3) izrazito su povezani s autoantitijelima koja se nalaze gotovo isključivo u uzorcima bolesnika s BVT-om ili u osoba s visokim rizikom za razvoj BVT-a. Nasuprot tome, gusto fino granulirani obrazac fluorescencije jezgre (AC-2), bez prisustva dodatnog obrasca fluorescencije i obično u visokom titru, gotovo se isključivo opaža u zdravih osoba i pacijenata s različitim ne-BVT upalnim stanjima (38). Treba imati na umu da unatoč visokoj korelaciji sa specifičnim autoantitijelima, uočeni obrasci IIF koriste se samo kao smjernica za specifična testiranja (izuzetak su centromere) bilo kao daljnji korak u algoritmu (Slika 1.) ili samo kao preporuka na nalazu.

Iako se smatra zlatnim standardom za otkrivanje ANA, IIF test ima i neke nedostatke: subjektivnost, kompleksnost izvođenja, potrebno iskustvo i vremenski je zahtjevno. Važno je napomenuti nisku osjetljivost ANA IIF za neka specifična autoantitijela: anti-SS-A, anti-Ro52, anti-ribosom P protein, anti-Jo-1 i druga miozitis-specifična autoantitijela (38). Također, komponente fluorescentnog mikroskopa poput svjetlosne snage ili povećanja leće kao i metode korištene za pripremu HEp-2 stanica značajno doprinose varijabilnosti testa. Neki od ovih nedostataka reducirani su uvođenjem automatiziranih mikroskopskih sustava temeljenih na digitalnoj akviziciji i analizi imunofluores-

centnih slika kroz algoritam prepoznavanja obrazaca, međutim ovim sustavima nije moguće prepoznati sve ANA obrasce fluorescencije (48,49).

Izraz "ANA probir" potrebno je isključivo koristiti za metodu IIF jer je to jedina metoda koja obuhvaća sve nuklearne antigene, iako je razina izražaja za neke od njih niska (1). Testovi na čvrstoj podlozi, koji se često koriste kao alternativa IIF, predstavljaju mješavinu definiranih autoantigena (nativni ili rekombinantni) vezanih na različite čvrste nosače, poznati su pod nazivom „CTD screen assays“ (BVT probirni testovi). Ovi se testovi ne mogu smatrati ANA probirom zbog ograničenog broja autoantigena. Ako test sadrži samo one antigene koji su obuhvaćeni pojmom ENA, takav se test naziva ENA probirni test (engl. *ENA screen assay*). Novije tehnologije omogućile su identifikaciju brojnih novih autoantigena u BVT-u. Širenjem spektra autoantigena poboljšana je osjetljivost nove generacije testova na čvrstoj podlozi što ih čini gotovo konkurentnim alatom IIF metodi za otkrivanje ANA. Važno je napomenuti da ovi testovi ne mogu biti alternativa IIF kada se traži ANA testiranje kod dijagnostike autoimunog hepatitisa. Najčešće, imunitestovi na čvrstoj podlozi koji se koriste kao probirne metode uključuju standardnu ELISA metodu koju sve više zamjenjuju nove tehnologije poput fluorescentnog enzimoimunotesta (engl. *Fluorescence enzyme immunoassay* - FEIA) i u zadnje vrijeme, kemiluminescentnog imunitesta (engl. *Chemiluminescent immunoassay* - CLIA). Prednosti metoda na čvrstoj podlozi su temeljene na više čimbenika: visoka analitička specifičnost i osjetljivost, bolja reproducibilnost, kraće vrijeme izrade i nepotrebno iskustvo kao za IIF, što sve osigurava pouzdanost i dosljednost (37,48). Testovi probira na čvrstoj podlozi su u osnovi kvalitativni i potrebno ih je tumačiti kao takve bez obzira na kvantitativno mjerenje (omjer) u osnovi.

Glavni nedostaci ovih metoda su upotreba ograničenog broja pročišćenih ili rekombinantnih autoantigena, nedostatak standardizacije i učestalost "lažno negativnih" ANA rezultata iako neki od njih upitnog kliničkog značaja. Nedavna meta-analiza uspoređivala je IIF s imunološkim testovima na čvrstoj podlozi koji se koriste kao početna probirna metoda (50). Nisu nađene značajne razlike između ELISA i IIF (uz graničnu vrijednost 1:80) jednako u pogledu osjetljivosti i specifičnosti. Osjetljivost CLIA metode je također bila usporediva s IIF dok je za FEIA metodu bila značajno niža. S druge strane, specifičnosti za CLIA i FEIA su bile više nego za IIF. Prema tim podacima, kombinacija IIF (najosjetljivija) i CLIA ili FEIA (najspeficijnije) metoda trebala bi postići najvišu dijagnostičku točnost. Međutim, unatoč prednostima korištenja novih automatiziranih tehnologija u dijagnostici autoimunih reumatskih bolesti povezanih s ANA (engl. *ANA-associated autoimmune rheumatic diseases* - AARD), zajedničko gledište vodećih svjetskih organizacija (ACR, EASI, Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization – WHO), Međunarodnog saveza imunoloških društava (International Union of Immunological Societies - IUIS)) je da je IIF referentna metoda za ANA probir (48,49,51).

ANA specifični testovi (uključujući ENA)

Danas su dostupne brojne tehnologije koje omogućuju određivanje ANA (uključujući ENA) specifičnosti, a metode se osim po vrsti korištene tehnologije razlikuju i po mogućnosti kvantifikacije rezultata. Najčešće korištene metode su (abecednim slijedom): imunometoda s laserski adresabilnim mikročesticama (engl. *addressable laser bead immunoassay* - ALBIA), CLIA, ELISA, FEIA i LIA. Ovisno o korištenoj tehnologiji, određivanje ANA specifičnih antitijela

može se provesti primjenom pojedinačnih testova ili u obliku testova koji omogućuju određivanje nekoliko specifičnosti u isto vrijeme (ELISA, LIA i ALBIA). Istovremeno određivanje definiranih, obično klinički najrelevantnijih ANA specifičnosti, skraćuje vrijeme potrebno za postavljanje dijagnoze. ANA (ENA) specifični testovi mogu biti kvalitativni (LIA s mogućnošću polukvantitativne interpretacije skeniranjem linija), polukvantitativni ili kvantitativni, iako je kvantifikacija opravdana samo za određivanje anti-RNP antitijela zbog poznate povezanosti s određenim kliničkim stanjem (MBVT).

Antitijela na dsDNA

Antitijela na dvostruku uzvojniju DNA su visoko specifična za dijagnozu SLE (52). Osim dijagnostičke, imaju i značajnu prognostičku vrijednost jer je dinamika njihovog titra izravno proporcionalna aktivnosti bolesti. Porast titra često prethodi pogoršanju SLE-a unutar nekoliko tjedana. Visoki titar povezuje se s lupusnim nefritisom (11,53). Usprkos međunarodno dostupnom standardu, primjena različitih metoda rezultira različitim izmjerenim koncentracijama za iste uzorke. Ove razlike mogu se pripisati molekularnim svojstvima korištenih antigena dsDNA i eksperimentalnim uvjetima provođenja analize. Također, kompleksnost antigena izaziva vrlo raznoliki imunološki odgovor. S obzirom na navedeno, od iznimne je važnosti pratiti koncentraciju antitijela uvijek u istom laboratoriju koristeći istu metodu (54,55). Glavna razlika između subpopulacija anti-dsDNA antitijela, s obzirom na njihov klinički značaj, je avidnost antitijela. Za razliku od antitijela s niskom avidnošću, antitijela s visokom avidnošću pokazala su se visoko specifičnim za SLE i povezana su s razvojem oštećenja bubrega i aktivnošću bolesti (56,57). Određivanje anti-dsDNA metodama kao što je ELISA, koje obuhvaćaju antitijela niske i visoke avidnosti, rezultira

nižom specifičnosti za SLE u odnosu na primjerice metodu IIF kojom se određuju antitijela na nativnu DNA (nDNA), koristeći kinetoplast *Crithidia luciliae* kao supstrat (engl. *Crithidia luciliae immunofluorescence test* - CLIFT) ili CLIA metodu (58). Zbog visoke specifičnosti i pozitivne prediktivne vrijednosti za SLE, CLIFT se koristi za potvrdu pozitivnog rezultata dobivenog manje specifičnom metodom. Niska dijagnostička osjetljivost CLIFT metode (20 - 35%), ograničava njezinu primjenu u dijagnostici SLE (57). Prije odabira metode za određivanje anti-dsDNA treba uzeti u obzir s koje razine zdravstvene zaštite (primarna ili sekundarna/tercijarna zdravstvena zaštita) se upućuje većina zahtjeva za analizom. U slučajevima kada je zahtjev za analizom upućen iz sekundarne/tercijarne zdravstvene zaštite, gdje prvenstveno klinički imunolog ili reumatolog ordinira određivanje anti-dsDNA, uz visoku predtestnu vjerojatnost pozitivnog rezultata, preporuka je primjena metode s visokom osjetljivošću (53).

Interferencije

Poznato je da se interferencije u imunometodama javljaju kao rezultat složenosti interakcije antigena i antitijela kao i zbog niske koncentracije analita. Potencijalne interferencije uključuju nespecifične predanalitičke čimbenike (lipemija, hemoliza) i brojne interferencije ovisne o analitu koje su značajnije i izazovnije u samom procesu analize (59). U humoralnoj imunodijagnostici autoimunih bolesti, autoantitijelo je analit od interesa ("antigen" u kontekstu reakcije antigena i antitijela), dok se u metodi može koristiti jedno antitijelo (detekcijsko) ili dva antitijela (vezujuće i detekcijsko). Ove metode podložne su interferencijama zbog prisutnosti endogenih antitijela kao što su heterofilna antitijela (HA), autoantitijela i humana antianimalna antitijela (HAAA). Od autoantitijela, reumatoidni faktor (RF) je od posebnog

interesa jer je prisutan u većini bolesnika s BVT (npr. prisutan je u do 80% bolesnika sa SjS-om) tako da su informacije proizvođača reagensa vezane uz interferencije RF-a od iznimne važnosti. Porastom upotrebe monoklonskih antitijela u terapiji širokog spektra bolesti, važno je naglasiti utjecaj interferencije HAAA u imunometodama za određivanje autoantitijela. Sljedeća interferencija na koju treba misliti je mogućnost prozonskog učinka (engl. *hook effect*) koji se javlja kao rezultat visokog titra autoantitijela. Osim u imunometodama na čvrstoj podlozi, prozonski učinak može se javiti i kod često korištenih imunofluorescentnih testova kao što je ANA IIF probirni test (60). Na interferenciju treba posumnjati u slučajevima odstupanja rezultata analize od kliničkog stanja bolesnika ili kod pojave nepodudarnosti rezultata analize primjenom dvaju različitih testova kojima se mjeri isti analit. Primjer za posljednje je istovremena primjena ANA IIF i ENA/CTD probirnih testova u prvoj liniji testiranja pri čemu se dobije negativan rezultat ANA IIF probira i pozitivan rezultat ENA/CTD probirnog testa, dodatno potvrđen pozitivnom individualnom reaktivnošću na specifični antigen u testu druge linije testiranja (ukoliko se ne radi o antigenima za koje je poznata slabija osjetljivost IIF). U tom slučaju, prozonski učinak koji se javlja primjenom metode IIF treba isključiti s daljnjim serijskim razrjeđivanjem uzorka. Zbog šireg mjernog raspona u usporedbi s drugim metodama, pojava ove vrste interferencije manje je vjerojatna za CLIA metode određivanja ANA. Neophodno je da laboratorijski stručnjaci budu svjesni ograničenja metode koja se koristi, kao i mogućnosti utjecaja potencijalnih interferencija prilikom izvođenja analize.

Preporuke za analitičku fazu

1. Referentna metoda za određivanje ANA je IIF na HEp-2 (ili Hep2000) stanicama.

2. Počeno razrjeđenje u probiru na ANA može se preuzeti iz preporuke proizvođača (obično 1:80 ili 1:100) ili odrediti u laboratoriju uz uvjet da odgovara 95-oj percentili zdravih kontrola.
3. Titriranje pozitivnih uzoraka ANA IIF metodom preporučuje se barem do klinički značajnog titra od 1:640.
4. Anti-dsDNA se mora odrediti kvantitativnim testom, dok primjena CLIFT testa nije obavezna, već se može koristiti isključivo kao potvrda avidnosti pozitivnih anti-dsDNA antitijela određenih kvantitativnim testom.
5. U kontekstu uporabe testova na čvrstoj podlozi, potvrdno određivanje pojedinačnih specifičnih antigena koji su uključeni u probirni test potrebno je samo u slučaju pozitivnog probirnog testa, bez iznimki.
6. Kvantifikacija pojedinih ENA specifičnih antitijela obavezna je samo za anti-RNP antitijela jer je njihova prisutnost u visokoj koncentraciji serološki biljeg MBVT.
7. Na utjecaj interferencije, bilo da se radi o IIF metodi ili metodi na čvrstoj podlozi, treba posumnjati u slučaju nepodudarnosti rezultata analize s kliničkim stanjem bolesnika ili u slučajevima nepodudarnosti rezultata primjenom dva različita testa kojima je mjeren isti analit. Ispitivanje mogućnosti prisutstva interferencija trebalo bi uključivati serijsko razrjeđivanje uzorka ili ponavljanje analize drugom metodom.

3. POSLIJEANALITIČKA FAZA

Način izvještavanja o rezultatu jednako je važan kao i sam rezultat pri čemu je ključno nekoliko točaka: a) nazivlje; b) specifikacija uključenih antigena u slučaju probirnih testova na čvrstim nosačima; c) mjerne jedinice; d) granična vrijednost; e) korištena metoda; f) komentar uz nalaz.

Nazivlje

Jedan od prvih koraka u harmonizaciji laboratorijskih nalaza je upotreba jedinstvenog nazivlja kako bi se izbjegla mogućnost zabune ili krive interpretacije od strane kliničara. U Tablicama A i B u Prilogu navedeno je preporučeno nazivlje koje bi se trebalo koristiti pri izvještavanju rezultata određivanja ANA.

Specifikacija antigena

U slučaju primjene probirnih testova na čvrstim nosačima koji koriste ograničeni broj ciljnih antigena, uključeni antigeni moraju biti navedeni na nalazu. Primjer takvog testa je ENA-probirni test koji *in sensu strictu* obuhvaća 6 antigena: SS-A, SS-B, Sm, RNP, Scl-70 (Topo I) i Jo-1. Danas je dobro poznato da je razlučivanje Ro60 i Ro52 (TRIM21) antigena kao zasebnih podjedinica SS-A antigena klinički značajno s obzirom da je specifična reaktivnost povezana s različitim kliničkim scenarijima (1). U skladu s tim, laboratorijski nalaz mora sadržavati informaciju da li test razlučuje ove dvije specifične reaktivnosti. Drugi primjer važnosti specifikacije antigena korištenih u testu je Sm antigen. Antitijela na Sm antigen mogu biti usmjerena na devet različitih polipeptida, ali najčešće su usmjerena na BB' i D polipeptide. Nedavna saznanja potvrdila su SmD (posebno SmD3) kao ciljni antigen s najvećom specifičnošću za SLE dok testovi koji uključuju BB' antigene ne razlučuju SLE pacijente od onih s drugim auto-

imunim reumatskim bolestima. Kao i u navedenom slučaju SS-A antitijela, specifikacija ciljnog Sm polipeptida na nalazu daje dodatnu informaciju o specifičnosti testa i objašnjava porijeklo neslaganja rezultata za anti-Sm antitijela između dviju različitih metoda (61, 62).

Ovaj problem je od posebne važnosti pri upotrebi testova baziranim na različitim mješavinama definiranih antigena iz jezgre i citoplazme koji se često koriste kao zamjena za ANA probirni test IIF metodom. Kao što je već spomenuto, takvi testovi se ne mogu smatrati jednako vrijednom zamjenom za ANA IIF test. S obzirom da kliničari moraju biti upoznati s činjenicom da negativan rezultat takvog testa ne znači nužno i negativan nalaz ANA, već negativan nalaz antitijela usmjerenih isključivo na antigene koji su obuhvaćeni testom, ovi antigeni moraju biti jasno navedeni na nalazu.

Mjerne jedinice

Preporučuje se rezultat ANA IIF probirnog testa izražavati u titru antitijela, a ne samo kao pozitivan/negativan rezultat (1, 29). Ipak, važno je imati na umu da variranje titra ANA tijekom vremena nema utemeljenog kliničkog značaja i ne smije se koristiti za modificiranje terapije (63). Općenito, antitijela kao i većina proteina, pripadaju skupini analita koji nisu jednoznačno definirani kemijski entiteti sljedivi do primarnog standarda čija je koncentracija izražena u jedinicama Internacionalnog sustava (SI), već su heterogena skupina proteina u humanim uzorcima. Stoga, referentni materijal u ovom slučaju predstavlja surogat analita koji se mjeri u uzorku pacijenta i rezultat ne može biti izražen u SI jedinicama već arbitrarnim jedinicama, kao što su internacionalne jedinice prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO), IU/mL (64, 65). Unutar ANA obitelji, referentni standard je dostupan samo za anti-dsDNA an-

titijela pa je to stoga jedino ANA-specifično antitijelo čiji se rezultat izražava u IU/mL. Rezultati kvantitativnih i polukvantitativnih testova za ostala ANA specifična antitijela trebaju se izražavati u arbitrarnim jedinicama (AU/mL), relativnim jedinicama (RU/mL) ili pak jedinicama kemiluminiscencije (CU) u slučaju primjene kemiluminiscentne metode. Unatoč primjeni kvantitativnih metoda, nema čvrstih dokaza da kvantificiranje specifičnih ANA antitijela, osim anti-dsDNA, anti-RNP i nukleosoma (rijetko se određuju u rutinskom radu) ima dodanu vrijednost u dijagnostici ili praćenju bolesti.

Granična vrijednost

Početno razrjeđenje uzorka u probirnom ANA IIF testu na Hep-2 stanicama varira između proizvođača, a najčešće je u upotrebi 1:80 ili 1:100. Uobičajeno se početno razrjeđenje interpretira i kao granični titar (engl. *cut-off*) ili se kao granični titar koristi 1:160, najčešće preporučeno u literaturi u svrhu povećanja specifičnosti za dijagnozu autoimunih bolesti (66, 67). Optimalni granični titar ovisan je o populaciji za koju je probirni test namijenjen i razlikuje se između populacije u primarnoj odnosno sekundarnoj zdravstvenoj zaštiti. Primjerice, za liječnika opće prakse od najvećeg je značaja negativna prediktivna vrijednost (NPV) ANA probirnog testa kojom se dijagnoza sistemske reumatske bolesti može odbaciti s velikom vjerojatnošću (68, 69). Kvaliteta veznih antigena koji se koriste u probirnim i potvrđnim testovima na čvrstim nosačima značajno se razlikuju između proizvođača pa se shodno tome primjenjuju i različite granične vrijednosti. Čak i granične vrijednosti za anti-dsDNA testove koji su kalibrirani prema istom standardu, značajno variraju (od 15 IU/mL do > 100 IU/mL). Razlog tome je prvenstveno interindividualna heterogenost anti-dsDNA antitijela, ali i prethodno navedena varijabilnost veznog antigena izme-

đu testova (70). Uobičajena je primjena granične vrijednosti koju preporučuje proizvođač testa, no poželjna je verifikacija ove vrijednosti na lokalnoj populaciji. Prilikom planiranja verifikacije granične vrijednosti treba uzeti u obzir namjenu testa u praksi. Visoka osjetljivost testa je imperativ za probirni test kako bi se broj lažno negativnih nalaza sveo na minimum dok je za potvrdne testove primarna visoka specifičnost (41). Preporučljivo je provesti verifikaciju granične vrijednosti prema CLSI smjernicama za polu/kvantitativne ili kvalitativne testove, ovisno o karakteristikama testa, uzevši u obzir spol i dob (71,72).

Primjenjene metode

Kod izvještavanja rezultata ANA testiranja, na nalazu je potrebno specificirati primjenjenu metodu. Kliničari moraju biti upoznati s potencijalnim nepodudarnostima rezultata za istog pacijenta primjenom različitih metoda.

Komentari na nalazu

Nalaz ANA testiranja trebao bi biti popraćen odgovarajućim komentarom ukoliko isti može doprinjeti postavljanju dijagnoze. To se prvenstveno odnosi na sugestije kliničaru za daljnje testove, s obzirom na rezultat ANA IIF probirnog testa. Na primjer, u slučaju pozitivne homogene fluorescencije nukleoplazme uz fluorescenciju kromatinske ploče stanica u metafazi, u komentaru nalaza bi trebalo sugerirati testiranje na anti-dsDNA antitijela, ali samo u slučaju sumnje na SLE. U slučaju pozitivne granularne fluorescencije, trebalo bi sugerirati testiranje na ENA antitijela. Sljedeći primjer je nalaz citoplazmatske retikularne fluorescencije gdje je poželjno sugerirati testiranje na prisutnost AMA. Sljedeći aspekt unaprjeđenja laboratorijskog nalaza dodatkom komentara je interpretacija rezultata koja može pomoći kliničaru u

slaganju mozaika dijagnoze. Na primjer, pozitivna gusta fino granulirana fluorescencija kao rezultat ANA IIF testa uz potvrđenu monoreaktivnost na DFS70 antigen, upućuje na nisku vjerojatnost dijagnoze sistemske autoimune reumatske bolesti (41,73,74). Također, razlikovanje reaktivnosti na Ro60 i Ro52 podjedinice SS-A antigena moguće je tek odnedavno tako da mnogi kliničari još nisu upoznati s kliničkim značajem pozitivnog nalaza Ro52 reaktivnosti uz negativna anti-Ro60 antitijela pa interpretacija takvog nalaza može biti od pomoći.

Ponavljanje ANA testiranja

Određivanje ANA je primarno dijagnostički test i serijsko praćenje titra nije opravdano s obzirom da promjena titra ne korelira s aktivnošću bolesti i ne može se koristiti u procjeni uspješnosti terapije (1,63). U slučaju negativnog ili slabo pozitivnog nalaza, ponavljanje ANA testiranja korisno je samo u pacijenata s perzistirajućim ili pogoršanim kliničkim simptomima BVT (9,75). Nekritički ponavljajući zahtjevi za ANA testiranjem predstavljaju značajan, nepotreban trošak (76,77). Ponavljanje testiranja inicijalno pozitivnog nalaza ANA u pacijenata s klinički definiranom BVT je nepotrebno osim u slučaju izrazite sumnje u promjenu fenotipa bolesti ili pojave dodatne autoimune reumatske bolesti (9). Serokonverzija ENA, bez obzira da li je inicijalno bila pozitivna ili negativna, događa se rijetko. Nedavna studija pokazala je da je učestalost ENA serokonverzije među SLE pacijentima < 5% (78). Visoki trošak i izostanak dokaza da je inicijalni rezultat podložan promjeni ukazuje na to da je ponavljanje ENA testova nepotrebno. Također, korelacija razine ENA antitijela s aktivnošću bolesti nije potvrđena (79). Odstupanje od ovog pravila odnosi se, kao i u slučaju ANA, na prethodno ENA negativne pacijente s perzistentnim ili pogoršavajućim kliničkim simptomima

koji upućuju na progresiju BVT ili na prethodno ENA pozitivne pacijente čiji klinički simptomi upućuju na pojavu dodatne autoimune reumatske bolesti. Nadalje, ponavljanje ENA testiranja je indicirano kao dio prekonceptijske obrade SLE pacijentica jer pozitivan nalaz SS-A (Ro60) i/ili SS-B i Ro52 antitijela upućuje na potrebu za fetalnom ehokardiografijom u svrhu otkrivanja kongenitalnog srčanog bloka (80). Poznato je da koncentracija anti-dsDNA antitijela korelira s aktivnošću bolesti i prediktor je aktivacije SLE iako ovaj odnos može biti individualan i značajno je ovisan o metodi određivanja anti-dsDNA (odnosi se na visoko avidna antitijela!) (53). Praćenje aktivnosti bolesti u SLE pacijenata obično se provodi upotrebom indeksa aktivnosti bolesti (engl. *SLE Disease Activity Index*, SLEDAI) koji uključuje anti-dsDNA i komponente komplementa (65). U skladu s tim, ponavljanje mjerenja anti-dsDNA je klinički opravdano, a učestalost retestiranja određuje se prema aktivnosti bolesti (1,53,63).

Preporuke za poslijeanalitičku fazu:

1. Obrazac fluorescencije na Hep-2 stanicama treba biti naveden na nalazu zajedno s titrom, u skladu s preporučenom terminologijom navedenom u Tablici B u Prilogu, uz pripadajuću AC oznaku. U komentaru nalaza treba navesti poveznicu na ICAP mrežnu stranicu. Minimalan zahtjev za izvještavanje nalaza ANA IIF testa je kompetentna razina prepoznavanja obraza fluorescencije.
2. Probirni testovi na čvrstim nosačima koji koriste mješavinu ograničenog broja definiranih antigena ne smiju se nazivati ANA-probirnim testovima. Preporučuje se naziv naveden u Tablici A u Prilogu, uz specifikaciju uključenih antigena.

3. Rezultati probirnih testova na čvrstim nosačima koji koriste mješavinu ograničenog broja definiranih antigena trebaju se izvještavati isključivo kao kvalitativni.
4. Na nalazu treba specificirati metodu upotrebljenu za ANA probir, odnosno metodu probira na čvrstom nosaču koja koristi mješavinu ograničenog broja definiranih antigena.
5. Na nalazu treba specificirati metodu upotrebljenu za ANA specifična antitijela (uključujući ENA i dsDNA).
6. Rezultati kvantitativnih testova za ANA specifična antitijela treba izvještavati na sljedeći način:
 - anti-dsDNA u IU/mL
 - sva ostala ANA specifična antitijela u AU/mL ili RU/mL, odnosno CU za CLIA metode.
7. Ponavljanje određivanja ANA je opravdano:
 - u inicijalno negativnih ili slabo pozitivnih (niski titar) pacijenata samo u slučaju perzistirajućih ili pogoršavajućih kliničkih simptoma
 - u pacijenata s klinički definiranom BVT, samo u slučaju promjene kliničkih simptoma koji pobuđuju sumnju u promjenu fenotipa bolesti ili pojavu povezane reumatske bolesti (sindrom preklapanja).
8. Ponovljeno mjerenje pozitivnih anti-dsDNA antitijela treba raditi uvijek s istom kvantitativnom metodom i u preporučenim intervalima:
 - 6 – 12 mjeseci za inaktivnu bolest
 - 2 – 4 mjeseca za SLE pacijente sa zahvaćenim bubrezima, u skladu s procijenjenom aktivnošću bolesti (63).
9. Ponavljanje određivanja ENA:
 - kao dio prekonceptijske obrade SLE pacijentica u svrhu reevaluacije pret-

hodno negativnog nalaza anti-SS-A (Ro60), anti-Ro52 i anti-SS-B (La) antitijela jer su ova antitijela povezana s NLE, uključujući kongenitalni srčani blok kao najtežu komplikaciju.

- u slučaju promjene kliničke slike koja se povezuje s promjenom fenotipa bolesti ili s pojavom povezane reumatske bolesti (sindrom preklapanja).

ZAKLJUČAK

Rezultati ankete provedene 2016. među hrvatskim laboratorijima koji rade dijagnostiku autoimunih bolesti ukazali su na veliku heterogenost u svim fazama laboratorijskog određivanja ANA. Razlog djelomično leži u primjeni različitih tehnologija, ali i u nedostatku dokumentiranih preporuka za prijeanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku fazu testiranja na prisutnost ANA. Ove preporuke imaju za cilj harmonizaciju ANA testiranja na nacionalnoj razini, uzimajući u obzir različite tehnologije koje su u upotrebi. Jedan od najvažnijih očekivanih rezultata primjene ovih preporuka je izostanak konfuzije koju su kod kliničara izazivali različiti algoritmi i različiti načini izvještavanja za isti test.

LITERATURA

1. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, 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.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, 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.
3. Tešija Kuna A, Đerek L, Kozmar A, Drvar V. Current practice in laboratory diagnostics of autoimmune diseases in Croatia. Survey of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine Working group for laboratory diagnostics of autoimmune diseases. *Biochem Med.* 2016;26: 376-94.
4. Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Carvalho FPL, et al. International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto Immun Highlights.* 2016;7(1):1.
5. Conrad K, Schössler W, Hiepe F, Fritzler MJ. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases - A Diagnostic Reference. Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity, Volume 2, 3rd ed. Conrad K, Sack U, editors. Pabst Science Publishers, 49525 Lengerich, Germany; 2015.
6. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13:495-502.
7. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev.* 2014;13:435–40.
8. Mahmud SA, Binstadt BA. Autoantibodies in the Pathogenesis, Diagnosis, and Prognosis of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front Immunol.* 2019;9:3168.
9. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:316-24.
10. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40: 1725-34.
11. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2677–86.
12. Maher J. Role of the clinical immunology laboratory in disease monitoring. *World J Immunol.* 2013;3:18-30.
13. Mohan C, Assassi S. Biomarkers in rheumatic diseases: how can they facilitate diagnosis and assessment of disease activity? *BMJ.* 2015;351:h5079.
14. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjogren's Syndrome. A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthritis Rheum.* 2017;69:35–45.
15. Lane SK, Gravel JW Jr. Clinical utility of common serum rheumatologic tests. *Am Fam Physician.* 2002;65:1073-80.
16. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol.* 2010;37:42-53.
17. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. Available at: https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/2013%20ACR%20EULAR%20SSc%20Classification%20Criteria_Complete%20article.pdf. Accessed September 5th 2019.
18. Tani C, Carli I, Vagnani S, Talarico R, Baldini C, Mosca M, et al. The diagnosis and classification of mixed connective tissue disease. *J Autoimm.* 2014;48-49:46-9.
19. Bizzaro N, Wiik A. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol.* 2004;22:349-55.
20. McHugh NJ, Tansley SL. Autoantibodies in myositis. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14:290–302.
21. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, de Visser M, et al. EULAR/ACR Classification Criteria for Adult and Juvenile Idiopathic Inflammatory Myopathies and their Major Subgroups. *Ann Rheum Dis.* 2017;76:1955–64.
22. Nakashima R. Clinical significance of myositis-specific autoantibodies. *Immunological Medicine.* 2018;41:103–12.
23. American College of Rheumatology. American College of Rheumatology Position Statement: Methodology of testing for antinuclear antibodies. Available at: <https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/Methodology%20of%20Testing%20Antinuclear%20Antibodies%20Position%20Statement.pdf>. Accessed December 5th 2020.
24. Lightfoote MM, Chirmule N, Homburger HA, Kavanaugh A, Nakamura RM, Papisch W, Tetin SY. Quality

- Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline – Second Edition. Available at: https://clsi.org/media/1413/ila02a2_sample.pdf. Accessed September 19th 2019.
25. Jacobs JFM, Bossuyt X. Standardization and harmonization of autoimmune diagnostics. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:1563–7.
 26. Sciacovelli L, Lippi G, Sumarac Z, West J, Garcia Del Pino Castro I, Furtado Vieira K, et al. Quality Indicators in Laboratory Medicine: the status of the progress of IFCC Working Group "Laboratory Errors and Patient Safety" project. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:348–57.
 27. Bogaert L, Van den Breemt S, Schouwers S, Bossuyt X, Van Hoovels L. Harmonizing by reducing inter-run variability: performance evaluation of a quality assurance program for antinuclear antibody detection by indirect immunofluorescence. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57:990–8.
 28. Tonutti E, Bizzaro N, Morozzi G, Radice A, Cinquanta L, Danilo Villalta D, et al. The ANA-reflex test as a model for improving clinical appropriateness in autoimmune diagnostics. *Auto Immun Highlights*. 2016;7:9.
 29. Van Blerk M, Bossuyt X, Humbel R, Mewis A, Servais G, Tomasi JP, et al. Belgian recommendations on ANA, anti-dsDNA and anti-ENA antibody testing. *Acta Clin Belg*. 2014;69:83–6.
 30. Gunnarsson R, Hetlevik SO, Lilleby V, Molberg Ø. Mixed connective tissue disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2016;30:95–111.
 31. Gunawardena H. The clinical features of myositis-associated autoantibodies: a review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52:45–57.
 32. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of lupus erythematosus: correlation between immunopathological features and clinical aspects. *Auto-immune Dis*. 2014;2014:321359.
 33. Meroni PL, Borghi MO. Diagnostic laboratory tests for systemic autoimmune rheumatic diseases: unmet needs towards harmonization. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:1743–8.
 34. Hoffman IEA, 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;48:2171–6.
 35. Pasoto SG, Viana VS, Bonfa E. The clinical utility of anti-ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10:1493–503.
 36. Damoiseaux J. The Perspective on Standardisation and Harmonisation: The Viewpoint of the EASI President. *Auto Immun Highlights*. 2020;11:4.
 37. Ochs RL, Mahler M, Basu A, Rios-Colon L, Sanchez TW, Andrade LE, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med*. 2016;16:273–93.
 38. 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: 541–7.
 39. Bossuyt X, Fieuws S. Detection of antinuclear antibodies: added value of solid phase assay?. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:e10.
 40. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1420–2.
 41. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current Concepts and Future Directions for the Assessment of Autoantibodies to Cellular Antigens Referred to as Anti-Nuclear Antibodies. *J Immunol Res*. 2014;2014:315179.
 42. International consensus on ANA patterns (ICAP). Available at: <https://www.anapatterns.org/trees.php>. Accessed June 10th 2019.
 43. 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 Jan;63(1):191–200.
 44. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in „healthy“ individuals. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1601–11.
 45. Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am J Med*. 2013;126(4):342–8.
 46. Aksu G, Gulez N, Azarsiz E, Karaca N, Kutukçuler N. Determination of cut-off titers and agreement between immunofluorescence and immunoblotting methods for detecting antinuclear antibodies in children. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(4):230–6.
 47. Kang I, Siperstein R, Quan T, Breitenstein ML. Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and -dsDNA antibodies. *Clin Rheumatol*. 2004;23(6):509–15.
 48. Willitzki A, Hiemann R, Peters V, Sack U, Schierack P, Rödiger S, et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012:284740.
 49. Pérez D, Gilburd B, Cabrera-Marante Ó, Martínez-Flores JA, Serrano M, Naranjo L, et al. Predicti-

- ve autoimmunity using autoantibodies: screening for anti-nuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56:1771–7.
50. Orme ME, Andalucia C, Sjölander 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.* 2020 Apr 30 [cited 2020 Oct 15]. [Epub ahead of print].
 51. Pérez D, Gilburd B, Azoulay D, Shovman O, Bizzaro N, Shoenfeld Y. Antinuclear antibodies: Is the indirect immunofluorescence still the gold standard or should be replaced by solid phase assays? *Autoimmun Rev.* 2018;17(6):548–52.
 52. Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies — quintessential biomarkers of SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12:102–10.
 53. Mummert E, Fritzler MJ, Sjöwall C, Bentow C, Mahler M. The clinical utility of anti-double-stranded DNA antibodies and the challenges of their determination. *J Immunol Methods.* 2018 Aug;459:11–19.
 54. Neogi T, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz M. Anti-dsDNA antibody testing by Farr and ELISA techniques is not equivalent. *J Rheumatol.* 2006;33:1785–8.
 55. Bonroy C, Verfaillie C, De Witte E, De Keyser F. Relevance of different results of different anti-double-stranded DNA assays in reporting clinical studies: comment on the article by Petri et al. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:479–80.
 56. Andrejevic S, Jeremic I, Sefik-Bukilica M, Nikolic M, Stojimirovic B, Bonaci-Nikolic B. Immunoserological parameters in SLE: high-avidity anti-dsDNA detected by ELISA are the most closely associated with the disease activity. *Clin Rheumatol.* 2013;32(11):1619–26.
 57. Infantino M, Meacci F, Bentow C, Martis P, Benucci M, Afeltra A, et al. Clinical comparison of QUANTA Flash anti-dsDNA chemiluminescent immunoassay with four current assays for the detection of antidsDNA autoantibodies. *J Immunol Res.* 2015;2015:902821.
 58. Villalta D, Romelli PB, Savina C, Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, et al. Anti-dsDNA antibody avidity determination by a simple reliable ELISA method for SLE diagnosis and monitoring. *Lupus.* 2003;12(1):31–6.
 59. Ward G, Simpson A, Boscatto L, Hickman PE. The investigation of interferences in immunoassay. *Clin Biochem.* 2017;50:1306–11.
 60. Jacobs JFM, van der Molen RG, Bossuyt X, Damoiseaux J. Antigen excess in modern immunoassays: to anticipate on the unexpected. *Autoimmun Rev.* 2015;14:160–7.
 61. Mahler M, Fritzler MJ, Blüthner M. Identification of a SmD3 epitope with a single symmetrical dimethylati-
 - on of an arginine residue as a specific target of a sub-population of anti-Sm antibodies. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R19–R29.
 62. Mahler M. Sm peptides in differentiation of autoimmune diseases. *Adv Clin Chem.* 2011;54:109–28.
 63. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Hamburger HA. Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:71–81.
 64. Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem.* 2009;42:236–40.
 65. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, Arden LA. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. *Ann Rheum Dis.* 1988;47:740–6.
 66. Bonaguri C, Melegari A, Ballabio A, Parmeggiani M, Russo A, Battistelli L, et al. Italian multicentre study for application of a diagnostic algorithm in autoantibody testing for autoimmune rheumatic disease: conclusive results. *Autoimmun Rev.* 2011;11:1–5.
 67. Damoiseaux J, Agmon-Levin N, Van Blerk M, Chopyak V, Eriksson C, Heijnen I, et al. From ANA-screening to antigen-specificity: an EASI-survey on the daily practice in European countries. *Clin Exp Rheumatol.* 2014;32:0539–0546.
 68. Avery TY, van de Cruys M, Austen J, Stals F, Damoiseaux JGMC. Anti-Nuclear Antibodies in Daily Clinical Practice: Prevalence in Primary, Secondary, and Tertiary Care. *J Immunol Res* 2014, Article ID 401739. Accessed June 1st 2019. from <https://downloads.hindawi.com/journals/jir/2014/401739.pdf>.
 69. Soto ME, Hernández-Becerril N, Perez-Chiney AC, Hernández-Rizo A, Telich-Tarriba JE, Juárez-Orozco LE, et al. Predictive value of antinuclear antibodies in autoimmune diseases classified by clinical criteria: Analytical study in a specialized health institute, one year follow-up. *Results Immunol.* 2015;5:13–22.
 70. Meroni PL, Biggioggero M, Pierangeli SS, Sheldon J, Zegers I, Borghi MO. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:35–43.
 71. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). User verification of precision and estimation of bias: approved guideline, 2nd ed. CLSI document EP15-A2. Wayne:CLSI; 2005.
 72. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). User protocol for evaluation of qualitative test performance: approved guideline, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne: CLSI; 2008.
 73. Shovman O, Gilburd B, Chayat C, Amital H, Langevitz P, Watad A, et al. Prevalence of anti-DFS70 antibodies in patients with and without systemic auto-

- immune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36:121-6.
74. Lee H, Kim Y, Han K, Oh EJ. Application of anti-DFS70 antibody and specific autoantibody test algorithms to patients with the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells. *Scand J Rheumatol*. 2016;45:122-8.
75. BCGuidelines.ca: Antinuclear Antibody (ANA) Testing for Connective Tissue Disease (2013). Available at [https://www2.gov.bc.ca/gov/content/health/practitioner-professional-resources/bc-guidelines/ana-testing?keyword=Antinuclear&keyword=Antibody&keyword=\(ANA\)&keyword=Testing&keyword=for&keyword=Connective&keyword=Tissue&keyword=Disease](https://www2.gov.bc.ca/gov/content/health/practitioner-professional-resources/bc-guidelines/ana-testing?keyword=Antinuclear&keyword=Antibody&keyword=(ANA)&keyword=Testing&keyword=for&keyword=Connective&keyword=Tissue&keyword=Disease). Accessed August 1st 2019.
76. Man A, Shojania K, Phoon C, Pal J, Hudoba de Badyn M, Pi D, et al. An evaluation of autoimmune antibody testing patterns in a Canadian health region and an evaluation of a laboratory algorithm aimed at reducing unnecessary testing. *Clin Rheumatol* 2013;32:601-8.
77. Amorese-O'Connell L, Vaidya P, Mahboob D, Gn C, Schwartz S. Repetitive Requisition of Antinuclear Antibody Testing (ANA) in Outpatient Multispecialty Clinics in Patients with a Known Positive ANA [abstract]. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68 (Suppl 10). Available at <https://acrabstracts.org/abstract/repetitive-requisition-of-antinuclear-antibody-testing-ana-in-outpatient-multispecialty-clinics-in-patients-with-a-known-positive-ana/>. Accessed July 2nd 2019.
78. Raissi TC, Hewson C, Pope JE. Repeat Testing of Antibodies and Complements in Systemic Lupus Erythematosus: When Is It Enough? *J Rheumatol*. 2018;45: 827-34.
79. Agarwal S, Harper J, Kiely PD. Concentration of antibodies to extractable nuclear antigens and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18:407-12.
80. Andreoli L, Bertias GK, Agmon-Levin N, Brown S, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, et al. EULAR recommendations for women's health and the management of family planning, assisted reproduction, pregnancy and menopause in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome *Ann Rheum Dis* 2017;76:476-85.

PRILOG 1.

TABLICA A. Nazivlje na nalazu.

Probirni testovi ^a
1. Antinuklearna antitijela (ANA) – probirni test ^b
2. Probirni test na ograničeni broj specifičnih antinuklearnih antitijela (ANA) (navesti antigene koji su obuhvaćeni testom) ^c
3. ENA probirni test (navesti antigene koji su obuhvaćeni testom) ^d
Testovi na specifična antitijela ^a
4. Antitijela na dvostruku uzvojniju DNA (anti-dsDNA)
5. Antitijela na SS-A (Ro) antigen (anti-SS-A (Ro)) ^e
6. Antitijela na SS-A (Ro60) antigen (anti-SS-A (Ro60))
7. Antitijela na Ro52 antigen (anti-Ro52)
8. Antitijela na SS-B (La) antigen (anti-SS-B (La))
9. Antitijela na Smith antigen (anti-Sm) ^f
10. Antitijela na RNP antigen (anti-RNP) ^g
11. Antitijela na topoizomerazu I (anti-Topo I/Scl70)
12. Antitijela na Jo-1 antigen (anti-Jo-1)
13. Antitijela na centromerni protein B (anti-CENP B)
14. Antitijela na PM/Scl antigen (anti-PM/Scl)
15. Antitijela na jezgrin antigen proliferirajuće stanice (anti-PCNA)
16. Antitijela na ribosomski P protein (anti-ribosom P)
17. Antitijela na histone
18. Antitijela na nukleosome
19. Antitijela na RNA polimerazu III (anti-RNA-pol III)
20. Antitijela na DFS70 antigen (anti-DFS70)

^aMetoda može biti specificirana u nazivu testa ili u legendi nalaza; ^bOdnosi se isključivo na IIF test na HEp-2 stanicama; ^cOdnosi se na probirne testove koji su komercijalno dostupni pod uobičajenim nazivom CTD-screen; ^dENA probirni test odnosi se samo na test koji obuhvaća sljedeće antigene: SS-A (Ro) (ukoliko test ne razlikuje Ro52 i Ro 60) ili zasebno SS-A (Ro60) i Ro52 (TRIM21); SS-B (La); Sm (SmD); RNP (U1-RNP ili Sm/RNP, prema specifikaciji proizvođača); Scl-70 (Topo-I) i Jo-1. Ukoliko test uključuje dodatne antigene koji nisu obuhvaćeni ENA definicijom, koristi se nomenklatura pod točkom 2; ^eSS-A (Ro) - ukoliko test ne razlikuje Ro52 i Ro60; ^fAlternativno, anti-SmD ukoliko proizvođač deklarira specifičnost isključivo za SmD antigen; ^ganti-RNP termin obuhvaća anti-U1-RNP i anti-Sm/RNP.

TABLICA B. ICAP nazivlje za opis obrasca fluorescencije i pripadajući klinički značaj. Na nalazu je uz opis fluorescencije preporučljivo navesti samo AC oznaku obrasca fluorescencije, a u napomeni nalaza poveznicu na ICAP mrežnu stranicu.

ICAP kod	Obrazac fluorescencije	Klinički značaj
	Jezgra	
AC-1	Homogena fluorescencija jezgre	SLE, jatrogeni lupus, juvenilni idopatski artritis
AC-2	Gusto fino granulirana fluorescencija jezgre	rijetko kod SjS, SSc i SLE, češće kod zdravih pojedinaca i raznih upalnih bolesti koje nisu autoimune etiologije (npr. atopijski dermatitis, astma i sl.)
AC-3	Fluorescencija centromera	ograničeni kožni oblik SSc, PBC

ICAP kod	Obrazac fluorescencije	Klinički značaj
AC-4	Fino granulirana fluorescencija jezgre	SjS, SLE, dermatomiozitis
AC-5	Grubo granulirana fluorescencija jezgre	MBVT, SLE, SSc
AC-6	Fluorescencija višestrukih točkica u jezgri	PBC, sistemske autoimune reumatske bolesti, dermatomiozitis
AC-7	Fluorescencija nekoliko točkica u jezgri	SjS, SLE, SSc, polimiozitis, asimptomatski pojedinci
AC-8	Nukleolarna homogena fluorescencija	SSc, sindrom preklapanja SSc/PM
AC-9	Nukleolarna grudasta fluorescencija	SSc
AC-10	Nukleolarna točkasta fluorescencija	SSc, SjS
AC-11	Glatka fluorescencija jezgrine ovojnice	SLE, SjS, seronegativni artritis
AC-12	Točkasta fluorescencija jezgrine ovojnice	PBC
AC-13	Fluorescencija PCNA-tipa	SLE, druga stanja
AC-14	Fluorescencija CENP-F-tipa	karcinom, druga stanja
AC-29	Fluorescencija Topo I-tipa	SSc
	Citoplazma	
AC-15	Citoplazmatska fibrilarna linearna fluorescencija	MBVT, kronični aktivni hepatitis, ciroza jetre, mijastenija gravis, Chronova bolest, PBC, dugotrajna hemodijaliza, rijetko kod sistemskih autoimunih reumatskih bolesti
AC-16	Citoplazmatska fibrilarna nitasta fluorescencija	infektivna ili upalna stanja, dugotrajna hemodijaliza, alkoholna bolest jetre, sistemske autoimune reumatske bolesti, psorijaza, zdravi pojedinci
AC-17	Citoplazmatska fibrilarna segmentirana fluorescencija	mijastenija gravis, Chronova bolest, ulcerozni kolitis
AC-18	Fluorescencija diskretnih točkica	PBC, sistemske autoimune reumatske bolesti, neurološka i autoimuna stanja
AC-19	Citoplazmatska gusto fino granulirana fluorescencija	anti-sintetaza sindrom, polimiozitis/dermatomiozitis, SLE, juvenilni SLE, neuropsihijatrijski SLE
AC-20	Citoplazmatska fino granulirana fluorescencija	anti-sintetaza sindrom, polimiozitis/dermatomiozitis, ograničeni oblik SSc, idiopatski pleuralni izljevi
AC-21	Citoplazmatska retikularna fluorescencija (AMA-tip)	često kod PBC i SSc, rijetko kod drugih sistemskih autoimunih reumatskih bolesti
AC-22	Fluorescencija Golgi-tipa	rijetko kod SjS, SLE, RA, MBVT, granulomatoze s poliangiitismom, idiopatske cerebralne ataksije, paraneoplastične cerebralne degeneracije, virusnih infekcija
AC-23	Fluorescencija štapića i prstenova	kod pacijenata s HCV nakon terapije IFN- γ /ribavirinom, rijetko kod SLE, Hashimotovog tireoiditisa i zdravih pojedinaca
	Mitotski	
AC-24	Fluorescencija centrosoma	rijetko kod SSc, Raynaudovog sindroma, infekcija virusima i mikoplazmama
AC-25	Fluorescencija diobenog vretena	rijetko kod SjS, SLE i drugih bolesti vezivnog tkiva
AC-26	Fluorescencija NuMA-tipa	SjS, SLE, druga stanja
AC-27	Fluorescencija međustaničnog mosta	rijetko kod SSc, Raynaudovog sindroma i maligniteta
AC-28	Fluorescencija mitotskih kromosoma	rijetko kod diskoidnog eritemskog lupusa, kronične limfocitne leukemije, SjS i reumatske polimijalgije

SLE - Sistemski eritemski lupus (engl. *Systemic Lupus Erythematosus*). SjS - Sjogren sindrom (engl. *Sjögren Syndrome*). SSc - Sistemska skleroza (engl. *Systemic Sclerosis*). PM - Polimiozitis. PBC - Primarni bilijarni kolangitis (engl. *Primary Biliary Cholangitis*). PCNA – jezgrin antigen proliferirajuće stanice (engl. *Proliferating cell nuclear antigen*). CENP-F - centromerni protein F. Scl-70 - 70kDa antigen povezan sa sklerodermom (engl. *70kDa antigen associated with scleroderma*). MBVT - Miješana bolest vezivnog tkiva (engl. *Mixed Connective Tissue Disease, MCTD*). AMA - antimitohondrijska antitijela. HCV - Hepatitis C virus. IFN- γ - Interferon gama. NuMA - jezgrin protein mitotskog aparata (engl. *Nuclear mitotic apparatus protein*).

PRILOG 2.

Komentari pristigli tijekom javne rasprave i recenzije Povjerenstva za stručna pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara

Komentar	Odgovor
<p>Stranica 4, paragraf 3: „Antinuklearna antitijela predstavljaju klasifikacijske kriterije većine BVT, a temeljni su parametar za dijagnozu autoimunog hepatitisa (AIH)...“</p> <p>ANA nisu temeljni parametar za DIJAGNOZU AIH – navedeno čak ne piše niti u referenci 7. Referenca navodi potrebu izvođenja IIF na mozaik preparatima jetrenog, bubrežnog i želučanog tkiva što nije opisivano u ovim smjernicama.</p> <p>Predlažem promjenu dijela rečenice: „Antinuklearna antitijela predstavljaju klasifikacijske kriterije većine BVT, a dio su dijagnostičkog algoritma obrade i drugih autoimunih bolesti poput autoimunog hepatitisa (AIH)...“</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru.</p> <p>U referenci 7. navedeni su dijagnostički kriteriji za AIH (Box 1. i Box 2), među kojima su i ANA antitijela kao jedan od seroloških biljega AIH tipa I.</p> <p>Sugestija je djelomično prihvaćena i rečenica <i>“Antinuklearna antitijela predstavljaju klasifikacijske kriterije većine BVT, a temeljni su parametar za dijagnozu autoimunog hepatitisa (AIH) kao organ-specifične autoimune bolesti i potvrđeni faktor rizika za razvoj uveitisa u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA)”</i> izmijenjena je u <i>“Antinuklearna antitijela predstavljaju klasifikacijske kriterije većine BVT, a jedan su od temeljnih seroloških biljega za dijagnozu autoimunog hepatitisa tipa I (AIH tip I) kao organ-specifične autoimune bolesti i potvrđeni faktor rizika za razvoj uveitisa u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA)”</i></p>
<p>2. Stranica 4., paragraf 4: Naziv „ANA specifičnosti“ je nejasan i zbunjujuć. Predlažem da se preformulira u „specifična ili pojedinačna antinuklearna antitijela (ANA)“ kako se i navodi drugdje u tekstu.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru.</p> <p>Sugestija je prihvaćena i <i>“nazivlje ANA specifičnosti...”</i> izmijenjeno je u <i>“nazivlje ANA specifičnih antitijela...”</i></p>
<p>3. Stranica 4., paragraf 4: „Šest antigena koji su obuhvaćeni nazivom ENA su..“</p> <p>Ekstraktibilnih nuklearnih antigena ima mnogo više od 6. Najčešće određivani u testovima probira i potvrde su 6 navedenih u tekstu.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru.</p> <p>Smatramo da izmjena nije potrebna jer je ENA uvriježen naziv koji u užem smislu obuhvaća ovih 6 antigena, kao što je i objašnjeno na stranicama 4 i 16.</p>
<p>4. Tablica 1. Autoantitijelo: anti-SS-A (Ro60) – Klinički značaj – „... nalaze se u majki djece s NLE...“</p> <p>Predlažem promijeniti u „... prisutna u krvotoku majki čija novorođenčad boluje od NLE“</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru.</p> <p>Tablica po svojoj strukturi zahtijeva sažetu konstrukciju rečenice pa smatramo da predložena izmjena nije prikladna.</p>
<p>5. Stranica 7, Preporuka 2.</p> <p>Pojašnjeni su razlozi upotrebe ANA probirnog testa u svrhu dijagnostike i prepoznavanja autoimunih bolesti, ali u tekstu nisu pojašnjeni razlozi zašto se navedeni test ne preporuča koristiti u svrhu praćenja bolesti i odgovora na terapiju, a isto je navedeno kao preporuka. Pošto se kvantifikacija pojedinih specifičnih ANA koristi za praćenje aktivnosti bolesti (što je kasnije i navedeno u tekstu), zadnji dio rečenice se može i izbaciti za test probira.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru.</p> <p>Neopravdanost korištenja ANA probirnog testa u svrhu praćenja bolesti i odgovora na terapiju potkrijepljeno je kasnije u tekstu (str. 18 i referenca 62)</p>
<p>6. Stranica 7, paragraf 2: „Potrebno je pridržavati se samo standardnih uputa za pripremu pacijenta za rutinske laboratorijske pretrage.“</p> <p>Riječ „samo“ je suvišna. Predlažem: Prije uzorkovanja krvi potrebno je pridržavati se standardnih uputa za pripremu pacijenta za rutinske laboratorijske pretrage.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru.</p> <p>Sugestija je prihvaćena i rečenica izmijenjena iz <i>“Potrebno je pridržavati se samo standardnih uputa za pripremu pacijenata za rutinske laboratorijske pretrage.”</i> u <i>“Prije uzorkovanja krvi potrebno je pridržavati se standardnih uputa za pripremu pacijenta za rutinske laboratorijske pretrage.”</i></p>
<p>“Prema dostupnim podacima, terapija ne utječe na vrijeme uzorkovanja.”</p> <p>Literatura??</p>	<p>Prema dostupnim literaturnim podacima nigdje nismo našli ograničenje vremena uzorkovanja za ANA testiranje s obzirom na terapiju pa zaključujemo da istoga i nema.</p>

<p>7. Stranica 7, paragraf 3: „Većina proizvođača preporuča izbjegavanje upotrebe izrazito hemolitičnih, lipemičnih i ikteričnih uzoraka...“ - Zamijeniti riječ upotreba sa riječi analiza.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Rečenica je izmijenjena prema sugestiji iz <i>“Većina proizvođača preporuča izbjegavanje upotrebe izrazito hemolitičnih, lipemičnih i ikteričnih uzoraka ne navodeći pritom koncentracije pri kojima se interferencija pojavljuje.”</i> u <i>“Većina proizvođača preporuča izbjegavanje analize izrazito hemolitičnih, lipemičnih i ikteričnih uzoraka ne navodeći pritom koncentracije pri kojima se interferencija pojavljuje.”</i></p>
<p>8. Stranica 7, preporuke za vrstu uzorka i stabilnost. „Preporučena vrsta uzorka za određivanje autoantitijela je serum.“ Predlažem specificirati da se radi o ANA autoantitijelima. Predlažem dodati i preporuku o temperaturi pohranjivanja i transporta uzoraka seruma</p>	<p>Zahvaljujemo na komentarima Sugestija je prihvaćena i rečenice izmijenjene. Pod podnaslovom Vrsta uzorka i stabilnost: Rečenica <i>“Uzorak izbora za određivanje autoantitijela je serum.”</i> izmijenjena je u <i>“Uzorak izbora za određivanje ANA je serum.”</i> Pod Preporuka za vrstu uzorka: Rečenica <i>“Preporučena vrsta uzorka za određivanje autoantitijela je serum.”</i> izmijenjena je u <i>“Preporučena vrsta uzorka za određivanje ANA je serum.”</i></p> <p>Smatramo da su navedeni temperaturni uvjeti koji osiguravaju stabilnost uzorka jednako primjenjivi i za pohranu i za transport uzoraka pa nije potrebno navoditi posebne preporuke za transport.</p>
<p>9. Stranica 8, paragraf 2: „ Primjerice, za ELISA metodu to je +/- 2 SD što iznosi otprilike +/- 30% do 40% na temelju CV unutar serije od 15% do 20%.“ Nejasno je koliki je kriterij prihvatljivosti unutrašnje kontrole kvalitete?</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Osim za IIF metodu, za ostale metode ne postoji jasna preporuka za kriterije prihvatljivosti rezultata unutrašnje kontrole kvalitete već se uglavnom koriste kriteriji proizvođača kontrolnog uzorka. Ovdje je dan općeniti primjer na osnovi prihvatljivog koeficijenta varijacije za ELISA metodu koji iznosi 20%.</p>
<p>10. Nisu navedeni preporučeni kriteriji prihvatljivosti za ostale metode (CLIA, multipleks tehnologiju i sl.) ili barem okvir dozvoljene varijacije, kako je navedeno za ELISA metode.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Kriteriji prihvatljivosti CV UKK za metode na čvrstoj podlozi definirani i upravo je u tijeku projekt radne skupine Europske inicijative za standardizaciju u autoimunosti (engl. European Autoimmunity Standardisation Initiative- EASI) čiji je cilj definirati kriterije prihvatljivosti CV za pojedina autoantitijela.</p>
<p>11. Stranica 8, paragraf 4: „Drugi oblik unutarnje kontrole kvalitete analitičkog procesa je praćenje udjela negativnih rezultata u ukupnom broju rezultata za određenu analizu (jednako za ANA probir kao i za pojedinačna specifična antitijela).“ Nejasno, postoji li literaturni izvor za ovakav način unutarnje kontrole kvalitete i što se točno na ovaj način kontrolira? Može li se pojasniti ovaj način praćenja unutarnje kontrole kvalitete te postupanje u slučaju većeg ili manjeg udjela negativnih rezultata u seriji mjerenja, pošto navedeno ne mora biti rezultat analitičke greške?</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. S obzirom da je populacija u kojoj se određuje prisutnost ANA u nekom laboratoriju uglavnom konstantna time će i udio negativnih rezultata biti u jednakoj mjeri konstantan. Svako značajnije odstupanje u udjelu ukazuje na moguću analitičku pogrešku. Iza navedene rečenice u tekstu dodana je referenca i sve sljedeće reference su prenumerirane: <i>Bogaert L, Van den Brecht S, Schouwers S, Bossuyt X, Van Hoovels L. Harmonizing by reducing inter-run variability: performance evaluation of a quality assurance program for antinuclear antibody detection by indirect immunofluorescence. Clin Chem Lab Med. 2019;57:990-8.</i></p>
<p>12. Stranica 9, paragraf 1. Preporučam navesti jasno koje se metode smatraju alternativnim testovima za probir. Isto navesti i u tablici A u prilogu.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. U tekstu (str. 13) se jasno navodi da se različiti testovi na čvrstoj podlozi koji se često koriste kao alternativa IIF metodi ne mogu smatrati ANA probirom zbog ograničenog broja autoantigena. Takvi testovi se moraju definirati kao probir na ograničeni broj specifičnih antigena pri čemu ni internacionalne pa tako ni ove preporuke ne daju prednost bilo kojoj metodi pred ostalima.</p>

<p>13. Stranica 9, paragraf 2: „ Određivanje specifičnih antitijela bi trebalo uključivati barem testove na čvrstoj podlozi koji uključuju klasične ENA antigene ...“ Izbaciti riječ „klasični“ ENA antigeni. Jasno se dalje u zagradi navode autoantitijela koja se preporučuju.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Ne smatramo nužnom ovu izmjenu s obzirom da u cijelom tekstu navodimo termin “klasična ENA” (vidi odgovor na komentar 3)</p>
<p>14. Stranica 9, paragraf 2 – imunometoda s laserski adresabilnim mikročesticama – ALBIA Ispraviti englesku riječ „addressable“ u „addressable“. - ISPRAVITI Naziv ALBIA je vrlo teško prevesti na hrvatski jezik. Iz prijevoda se teško može zaključiti o kakvoj metodi se radi i što su adresabilne mikročestice. Najčešće se Luminex metoda u literaturi naziva multipleks tehnologija na mikročesticama.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. U skladu sa sugestijom rečenica je izmijenjena iz “Multipleks testovi na mikročesticama poput imunometode s laserski adresabilnim mikročesticama (engl. Addressable laser bead immunoassay - ALBIA) omogućuju određivanje različitih ANA specifičnih antitijela istovremeno (obično dsDNA, ENA, CENP B).” u “Multipleks testovi na mikročesticama poput imunometode s laserski adresabilnim mikročesticama (engl. Addressable laser bead immunoassay - ALBIA), odnosno Luminex metode, omogućuju određivanje različitih ANA specifičnih antitijela istovremeno (obično dsDNA, ENA, CENP B).”</p>
<p>15. Stranica 11, paragraf 4: „Prema ICAP preporuci, ANA probir metodom IIF treba izvještavati kao pozitivno...“ Promijeniti riječ „pozitivno“ u „pozitivan“.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. U skladu sa sugestijom rečenica je izmijenjena iz “Prema ICAP preporuci, ANA probir metodom IIF treba izvještavati kao pozitivno u slučajevima pozitivne fluorescencije jezgre, ali i kod jasnih citoplazmatskih i mitotskih obrazaca imunofluorescencije (2,41).” u “Prema ICAP preporuci, ANA probir metodom IIF treba izvještavati kao pozitivan u slučajevima pozitivne fluorescencije jezgre, ali i kod jasnih citoplazmatskih i mitotskih obrazaca imunofluorescencije (2,42).”</p>
<p>16. Stranica 12, paragraf 2. Ako je klinički značajan titar 1:640, preporuka o diluciji maksimalno do 1:5120 izgleda nepotrebno. Pošto je klinički važno znati raste li ili pada titar, mislim da se može jasno dati preporuka o maksimalnom titru.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. U preporuci je jasno navedeno titriranje barem do klinički značajnog titra od 1:640. U tekstu, na str. 18 je navedeno: “Određivanje ANA je primarno dijagnostički test i serijsko praćenje titra nije opravdano s obzirom da promjena titra ne korelira s aktivnošću bolesti i ne može se koristiti u procjeni uspješnosti terapije (1, 63).” Određivanje titra ima primarnu svrhu u razlučivanju zdravih osoba i onih s ne-autoimunim bolestima kod kojih ANA mogu biti prisutna u niskom titru od osoba s autoimunim bolestima, što je objašnjeno na str.12.</p>
<p>17. Stranica 13, paragraf 2. „...IIF test ima i neke nedostatke: subjektivnost, kompleksnost izvođenja, potrebno iskustvo i vremenski je zahtjevno.“ Predlažem preoblikovati rečenicu prema slijedećem: „... nedostatci metode IIF su potrebno iskustvo i subjektivnost u procjeni obrazaca fluorescencije te vremenski zahtjevno i kompleksno izvođenje testa.“</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Smatramo da predložena promjena nije bitno drugačija od napisanog.</p>
<p>Stranica 13, paragraf 2. „...međutim nije moguće prepoznati sve ANA obrasce fluorescencije s ovim sustavima.“ Predlažem preoblikovati rečenicu: „...međutim ovim sustavima nije moguće prepoznati sve ANA obrasce fluorescencije.“</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. U skladu sa sugestijom rečenica je izmijenjena iz “Neki od ovih nedostataka reducirani su uvođenjem automatiziranih mikroskopskih sustava temeljenih na digitalnoj akviziciji i analizi imunofluorescentnih slika kroz algoritam prepoznavanja obrazaca, međutim nije moguće prepoznati sve ANA obrasce fluorescencije s ovim sustavima (47, 48).” u “Neki od ovih nedostataka reducirani su uvođenjem automatiziranih mikroskopskih sustava temeljenih na digitalnoj akviziciji i analizi imunofluorescentnih slika kroz algoritam prepoznavanja obrazaca, međutim ovim sustavima nije moguće prepoznati sve ANA obrasce fluorescencije (48,49).”</p>

<p>Stranica 13, paragraf 2. „Prednosti metoda na čvrstoj podlozi su temeljene na više čimbenika: visoka analitička specifičnost i osjetljivost, bolja reproducibilnost, kraće vrijeme izrade i nepotrebno iskustvo kao za IIF, što sve osigurava pouzdanost i dosljednost.“</p> <p>Predlažem preoblikovati rečenicu: „ Prednosti metoda na čvrstoj podlozi su u većoj analitičkoj specifičnosti i osjetljivosti, boljoj reproducibilnosti i kraćem vremenu izvedbe analize. Ove metode ne zahtijevaju profesionalno iskustvo u definiranju rezultata poput metode IIF.“</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Smatramo da se predloženom izmjenom donekle gubi smisao rečenice.</p>
<p>Stranica 14, ANA specifični testovi (uključujući ENA) Podnaslov – samo ANA specifični testovi ili samo ENA specifični testovi jer se ovako čini kao da su ENA antitijela nešto potpuno odvojeno od ANA antitijela. Predlažem ostaviti ANA specifični testovi.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Paragraf je naslovljen na ovaj način iz razloga da čitatelju odmah bude vidljivo da obuhvaća i podskupinu ENA specifičnosti za razliku od anti-dsDNA na koje je osvrt dan u zasebnom paragrafu.</p>
<p>Stranica 14. paragraf 2: „Ovisno o korištenoj tehnologiji, određivanje ANA specifičnosti može se provesti primjenom pojedinačnih testova ili u obliku testova koji omogućuju određivanje nekoliko specifičnosti u isto vrijeme (ELISA, LIA i ALBIA).“</p> <p>Prijedlog identičan kao pod točkom 2.</p> <p>Kako se ELISA metodom može kvantificirati nekoliko specifičnih ANA u isto vrijeme? Takav test je kvalitativan. Za svako specifično ANA antitijelo koristi se poseban ELISA kit, čime bi se ELISA uvrstila u pojedinačne testove. Predlažem iz zgrade maknuti ELISA metodu.-</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Prijedlog identičan kao pod točkom 2 je prihvaćen i rečenica izmijenjena iz “Ovisno o korištenoj tehnologiji, određivanje ANA specifičnosti može se provesti primjenom pojedinačnih testova ili u obliku testova koji omogućuju određivanje nekoliko specifičnosti u isto vrijeme (ELISA, LIA i ALBIA).“ u “<i>Ovisno o korištenoj tehnologiji, određivanje ANA specifičnih antitijela može se provesti primjenom pojedinačnih testova ili u obliku testova koji omogućuju određivanje nekoliko specifičnosti u isto vrijeme (ELISA, LIA i ALBIA).</i>“</p> <p>ELISA testom je moguće u jednom koraku odrediti više specifičnih antitijela tako da se serum istovremeno stavlja u više jažica (obično jedan strip ELISA pločice) od kojih je svaka obložena različitim antigenom – to su tzv. ELISA profil testovi i nisu kvantitativni što u tekstu i nije navedeno.</p>
<p>Stranica 14, Antitijela na dsDNA, paragraf 1: „Usprkos međunarodno dostupnom standardu, primjena različitih metoda rezultira različitim izmjerenim koncentracijama za iste uzorke.“</p> <p>Predlažem preoblikovati rečenicu: „ Usprkos međunarodno dostupnom standardu, značajna je interlaboratorijska varijabilnost zbog primjene različitih metoda.“</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Smatramo da originalna rečenica bolje odgovara kontekstu.</p>
<p>Na temelju prethodne konstatacije o značajnoj interlaboratorijskoj varijabilnosti, bilo bi dobro navesti da se specifična ANA antitijela kod pacijenata s postavljenom dijagnozom BVT prate istom metodom. –</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Uz izuzetak anti-dsDNA, određivanje ANA specifičnih antitijela ne služi u praćenju pacijenata s postavljenom dijagnozom BVT, što je objašnjeno u tekstu (Podnaslov Poslijeanalitička faza).</p>
<p>Stranica 17, granična vrijednost</p> <p>Iz smjernica nije jasno koja se vrijednost titra preporuča kao granična? Iako granična vrijednost nije jasno definirana niti ostalim, već postojećim smjernicama, bilo bi bolje navesti da svaki laboratorij odredi svoju graničnu vrijednost, ovisno o proizvođaču i testu koji koriste. Međutim, to ne bi trebao biti cilj dokumenta koji donosi preporuke s ciljem harmonizacije.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Preporuka 2 za Analitičku fazu navodi da laboratorij može preuzeti preporučenu graničnu vrijednost titra (koja odgovara početnom razrjeđenju uzorka) od proizvođača ili odrediti granični titar na lokalnoj populaciji, uz uvjet da odgovara 95-oj percentili zdravih kontrola. Za sve nestandardizirane testove, pa tako i za testove određivanja pojedinih antitijela preporučljivo je da laboratorij odredi referentni interval ili graničnu vrijednost na lokalnoj populaciji, ali to nije uvijek financijski izvedivo pa ostaje samo na razini preporuke, kao i u ovom slučaju.</p>

<p>Predlažem da se u prilogu Smjernica prikaže prijedlog izgleda nalaza sa svim navedenim stavkama koje treba izdati na nalazu i za test probira i za potvrdne testove. –</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Ovaj dodatak ne smatramo potrebnim jer Preporuke za poslijeanalitičku fazu navode što sve treba navesti na nalazu, a Tablica A jasno navodi preporučenu nomenklaturu.</p>
<p>Za test probira IIF predlažem da se u tekstu navede preporučeno povećanje na fluorescentnom mikroskopu pod kojim treba ocjenjivati obrasce imunofluorescencije te navede važnost pregleda i Hep-2 stanica u interfazi i stanica u mitozu (što podkrijepljuje i Slika 2 ICAP klasifikacije ANA IIF obrazaca na Hep-2).</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Važnost pregleda stanica u interfazi i mitozu jasna je već iz obrazaca fluorescencije prema ICAP klasifikaciji koje možemo očekivati kod pacijenata. Smatramo da je optimalno povećanje pod kojim treba analizirati obrazac fluorescencije ono pod kojim se obrazac može jasno definirati pa nema potrebe za preporukom specifičnog povećanja.</p>
<p>Pošto je metoda IIF kvalitativna i ocjena rezultata subjektivna, logično bi bilo čuvati pripremljene preparate određeno vrijeme. Iz iskustva smo svi svjesni da se fluorescencija gubi, čak i kada se preparati čuvaju u mraku. Zbog toga smatram da, radi potencijalnog zahtjeva za provjerom rezultata nakon izdavanja nalaza, čuvanje preparata duže od tjedan dana nema smisla, a i čuvanje od tjedan dana je prekratko. Međutim, pošto, vjerujem svi, ručno unosimo takav kvalitativan nalaz u LIS, predlažem da se smjericama definira vremenski period (jednu godinu?) obaveznog čuvanja barem radnih lista? Navedeno nije problem za automatizirane sustave prikaza imunofluorescencije koji imaju mogućnost elektronske pohrane rezultata kroz duži vremenski period.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Preporučeno vrijeme čuvanja laboratorijske dokumentacije dio je preporuka HKMB i Preporuka za poslijeanalitičku fazu laboratorijskog rada pa ne smatramo potrebnim posebno se osvrtni na to u okviru ovih preporuka.</p>
<p>Komentari Povjerenstva za stručna pitanja HKMB</p>	
<p>Glede točke 3. Preporuke za racionalni algoritam (<i>"Ukoliko potpuna evaluacija ANA (probir i potvrda specifičnosti) nije uključena u zahtjev, preporuča se provesti potpunu evaluaciju ili bi, kao minimalni zahtjev, u napomeni na nalazu trebalo navesti preporuku za određivanje specifičnih antitijela."</i>) napomenuli bismo da se otvara pitanje naplate potpune evaluacije ako nije navedena u originalnoj uputnici.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Upravo za slučajeve kad je zahtjev upućen putem uputnice CEZIH-a gdje nije moguće dodavanje pretraga, navedena je opcija napomene na nalazu s preporukom za određivanje specifičnih antitijela kao minimalni zahtjev. Mogućnost potpune evaluacije ANA u slučaju kad ista nije primarno sadržana u zahtjevu, ponegdje je moguća u bolničkom sustavu putem BIS-a.</p>
<p>Vežano za rečenicu <i>"Prije odabira metode za određivanje anti-dsDNA treba uzeti u obzir i na kojoj razini zdravstvene zaštite (primarna ili sekundarna/tercijarna zdravstvena zaštita) će se analiza provoditi."</i>, koja se nalazi u dijelu pod naslovom "Antitijela na dsDNA", napomenuli bismo da se ANA probir i potvrda ne izvodi u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, a ukoliko se misli na razinu zdravstvene zaštite koja potražuje zahtjev za testovima ANA probira i potvrde, rečenicu bi trebalo preoblikovati.</p>	<p>Zahvaljujemo na komentaru. Rečenica je izmijenjena u skladu sa sugestijom iz <i>"Prije odabira metode za određivanje anti-dsDNA treba uzeti u obzir i na kojoj razini zdravstvene zaštite (primarna ili sekundarna/tercijarna zdravstvena zaštita) će se analiza provoditi."</i> u <i>"Prije odabira metode za određivanje anti-dsDNA treba uzeti u obzir s koje razine zdravstvene zaštite (primarna ili sekundarna/tercijarna zdravstvena zaštita) se upućuje većina zahtjeva za analizom."</i></p>

Dragi članovi,

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu definiralo je unaprjeđenje kvalitete laboratorijskog rada u Hrvatskoj kao jedan od svojih glavnih strateških ciljeva. U tu svrhu osnovan je velik broj Radnih grupa čiji je cilj promicanje harmonizacije i standardizacije laboratorijskih postupaka u svim fazama laboratorijskog rada.

Kao rezultat rada Radne grupe za ekstravaskularne uzorke HDMBLM-a nastale su ove preporuke, a još je nekoliko dokumenata u pripremi te će uskoro biti dostupne svim članovima Društva.

U nadolazećem razdoblju najavljujemo:

- Preporuke za postupanje s hemolitičnim, lipemičnim i ikteričnim uzorcima
- Preporuka za obradu mokraće
- Preporuke za određivanje antitijela na citoplazmu neutrofilnih granulocita (ANCA)
- Preporuke za pretrage uz bolesnika

ISBN: 978-953-96611-4-2