



## Anti-Extractable Nuclear Antigen (ENA) Screen ELISA

IVD

### PRODUCT INSERT

REF 1149 Anti-ENA Screen ELISA 96 Determinations

#### INTENDED USE

Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and semi-quantitation of IgG antibodies to extractable nuclear antigens RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Jo-1 and Scl-70 in human serum of patients suspected with collagen vascular disorders.

#### SUMMARY AND EXPLANATION

Extractable nuclear antigens (ENA) are soluble ribonucleoprotein (snurps) complexes. Auto-antibodies directed against various ENA have proven to be of value in the diagnosis and monitoring of various systemic connective tissue diseases. Anti-Sm antibodies are disease specific and thus are a marker for *systemic lupus erythematosus* (SLE). Antibodies to Sm occur in approximately 30-40% of SLE patients. They are rare in other systemic connective tissue diseases and if present, indicate either overlap of disease or patients that have not yet fulfilled the ARA criteria for SLE<sup>1-9</sup>. Other antibodies such as those directed against SS-A (Ro), SS-B (La) and RNP are not disease specific. Antibodies to RNP occur in 35-45% of SLE patients and in over 95% of patients with *mixed connective tissue disease* (MCTD). Occasionally they are also found in *scleroderma*, *rheumatoid arthritis* and *drug induced LE*<sup>1-6</sup>. Patients with anti-RNP antibodies have a lower incidence of renal disease as compared to patients with anti-Sm antibodies. Antibodies to SS-A (Ro) and SS-B (La) occur in approximately 30-40% and 10-15% of SLE patients and 60-70% and 40-60% of patients with *Sjögren's syndrome* respectively. Antibodies to SS-B (La) occur frequently in association with SS-A (Ro) antibodies. Antibodies to SS-A (Ro) also occur in 60% of patients with *subacute cutaneous LE*, in almost all cases of neonatal LE and in two thirds of SLE patients with C2 deficiency<sup>10-13</sup>. Antibodies to Scl-70 are a specific serological marker for systemic scleroderma. Varying frequencies of Scl-70 antibodies have been reported. In early studies this antibody was detected in approximately 20% of patients with scleroderma but later studies reported an incidence of 75% in patients with diffuse scleroderma and 44% in patients with acrosclerosis<sup>5</sup>.

Myositis specific antibodies are present in 25-40% of adult patients with idiopathic inflammatory myopathies and are mostly specific for cytoplasmic t-RNA synthetases<sup>12</sup>. Of the five anti-synthetase antibodies described, anti-histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) antibodies in patients with myositis are associated with clinical features like interstitial lung disease, pulmonary fibrosis, Raynaud's phenomenon, fever and non-erosive symmetric small joint arthritis<sup>12</sup>.

Antibodies against extractable nuclear antigens can be detected by various methods. Due to complexities in obtaining highly purified ENA antigens, gel immunodiffusion methods have traditionally been used. However, the ELISA methodology has many advantages over gel immunodiffusion: greater sensitivity<sup>14</sup>, reduced assay times, no subjectivity in reading results, quantitation without serum titration and potential for automation. The ImmuLisa™ ENA Screen ELISA utilizes highly purified antigens to detect ENA antibodies.

#### PRINCIPLES OF PROCEDURES

The test is performed as a solid phase enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Microwells are coated with purified Sm, RNP, SS-A (Ro) or SS-B (La), Scl-70 and Jo-1 antigens followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrator and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows specific anti-ENA antibodies present in the serum to bind. Unbound-antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by an enzyme labeled anti-human IgG conjugate added to the wells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer. Results are expressed in ELISA units (EU)/ml and the results are reported as positive, borderline or negative.

EN

## REAGENTS

### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

Coated microwell strips are for one time use only.

### Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>15</sup>.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

### Materials provided

ImmULisa™ Anti-ENA Screen ELISA **REF** 1149









Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>ENA</b>	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with ENA antigens.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>ENA</b> *	Ready to use <b>Calibrator</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to ENA.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b>   +   <b>ENA</b> *	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Human serum containing antibodies to ENA.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b>   - *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains human serum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . <b>Protect from light</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Ready to use <b>Stop Solution</b> .
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	Powder <b>Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.

\* Contains <0.1% NaN<sub>3</sub>

EN

**Symbols used on labels:**

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

**Materials Required But Not Provided**

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer or Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.

**SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

**PROCEDURE**

**Procedural Notes**

- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature for at least 30 minutes before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

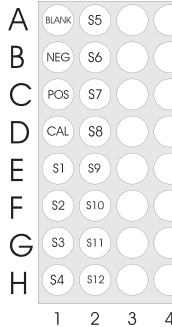
EN

- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

### Test Method

**Step 1** Let all reagents equilibrate at room temperature.

**Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.



**Step 3** Prepare a **1:101** dilution of patient specimen by pipetting **5µl** of serum into **0.5 ml** of Serum Diluent. **Mix well.**

**Step 4** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.

**Step 5** Pipette **100 µl** of Ready to Use Calibrator, Positive and Negative controls and patient samples to the appropriate microwells as per the sample layout below.

**Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of the reagent blank should not be more than 0.3 when read against air.

**Step 6** Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.

**Step 7** Wash **4x** with the wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.

**Step 8** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.

**Step 9** Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.

**Step 10** Wash all microwells as in Step 7.

**Step 11** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate to each well in the same order and timing as for the conjugate.

**Step 12** Incubate **30 minutes** ( $\pm 5$  min) at room temperature.

**Step 13** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the enzyme substrate. Read absorbance within 1 hour of adding Stop Solution.

**Step 14** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

### Quality Control

Calibrator, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be  $<0.3$ . The calibrator should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The positive control must give EU/ml in the range stated on the vial. If the test is run in duplicate the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml.

EN

## RESULTS

### Calculations

#### QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator}} \times \text{EU/ml of Calibrator} = \text{EU/ml Test Sample}$$

This method of calculation should be used only to determine whether a specimen is negative or positive.

### Calibrator

The Calibrator must be included with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator. In such an instance, these serum samples should be diluted further with Serum Diluent and retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by this dilution factor.

### Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the results. Each laboratory must determine its own normal values.

Anti-ENA EU value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The Immulisa™ Anti-ENA Screen ELISA should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only. A diagnosis should not be made solely on the basis of ELISA test results alone.

### EXPECTED VALUES

The incidence of ENA antibodies in various systemic connective tissue diseases is summarized in the following table:

#### *Diagnostic Significance of Antibodies to Various Soluble Nuclear Antigens*

Antibody Isotype	Disease Association
Sm	SLE - 10-40%
RNP	SLE - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	SLE - 15-33%
	SCLE - 60%
	Neonatal LE - 100%
	Sjögren's syndrome - 40-70%
SS-B (La)	SLE - 10-15%
	SCLE - 25%
	Sjögren's syndrome - 15-60%
Jo-1	Polymyositis - 32%
	Polymyositis overlap
	Dermatomyositis - 20%
Scl-70	Scleroderma - 20-40%
	Acrosclerosis - 44%

SLE = systemic lupus erythematosus

MCTD = mixed connective tissue disease

SCLE = subacute cutaneous lupus erythematosus

Note: The frequency of each antibody specificity in a disease represent compilation from the literature<sup>3</sup>. The incidence varies depending on the patient population.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmuLisa™ Anti-ENA Antibody Screen ELISA Test was compared with the ENA ImmunoBlot. A total of 125 sera from a clinical reference laboratory were identified by immunodiffusion as being positive or negative for anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) or anti-SS-B (La), anti-Scl-70 and anti-Jo-1.

These sera were tested according to the procedure recommended by the manufacturer. The results are summarized in the following table:

### *Comparison of ELISA Methods for the Detection of Antibodies to ENA*

		ImmuLisa™ ENA Screen		
		Positive	Negative	Total
Immunoblot	Positive	50	2	52
	Negative	0	73	73
	Total	50	75	125

Agreement: 98%

Sensitivity: 96%

Specificity: 100%

### Precision:

Two samples with known concentrations of ENA were assayed in 10 replicates over a period of two weeks. Intra- and inter-assay coefficient of variation (CV) were as follows:

	inter-assay	intra-assay
	%CV	%CV
	IgG	IgG
Sample 1	3.6	4.5
Sample 2	5.4	3.7

### Recovery:

Samples with known anti-ENA concentrations were mixed with appropriate dilutions of another sample with known amounts of anti-ENA. Anti-ENA levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery were calculated. These results are as follows:

	Anti-ENA	Anti- ENA	% Recovery
	Ab. conc. added (EU/ml)	Ab. conc. obtained (EU/ml)	
Sample 1	85	81	95
Sample 2	34	37	107
Sample 3	51	57	112



## Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (ENA)

IVD

### ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1149 Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (ENA) 96 Προσδιορισμοί

#### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG κατά των εκχυλιζόμενων πυρηνικών αντιγόνων RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Jo-1 και Scl-70, σε ορό ασθενών με υποψία κολλαγονώσεων.

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα εκχυλιζόμενα πυρηνικά αντιγόνα (ENA) είναι διαλυτά σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών (snurp). Τα αυτοαντισώματα κατά των διαφόρων ENA έχουν αποδειχθεί πολύτιμα στη διάγνωση και την παρακολούθηση διαφόρων συστηματικών νόσων του συνδετικού ιστού. Τα αντισώματα αντι-Sm είναι ειδικά για μία μόνο νόσο και έτσι αποτελούν δείκτη για το *συστηματικό ερυθηματώδη λύκο* (ΣΕΛ). Αντισώματα κατά του αντιγόνου Sm απαντούν περίπου σε 30-40% των ασθενών με ΣΕΛ. Είναι σπάνια σε άλλες συστηματικές νόσους του συνδετικού ιστού και, εάν βρεθούν, υποδεικνύουν είτε αλληλοεπικάλυψη των νόσων είτε ότι οι ασθενείς δεν πληρούν ακόμη τα κριτήρια ARA για το ΣΕΛ<sup>1-9</sup>. Τα άλλα αντισώματα κατά των αντιγόνων SS-A (Ro), SS-B (La) και RNP δεν είναι ειδικά για μία μόνο νόσο. Τα αντισώματα κατά του αντιγόνου RNP εμφανίζονται στο 35-45% των ασθενών με ΣΕΛ και σε περισσότερο από το 95% των ασθενών με *μικτή νόσο συνδετικού ιστού* (ΜΝΣΙ). Περιστασιακά, μπορεί επίσης να βρεθούν σε ασθενείς με *σκληροδερμία*, *ρευματοειδή αρθρίτιδα* και *επαγόμενο από φάρμακα ερυθηματώδη λύκο*<sup>1-6</sup>. Οι ασθενείς με αντισώματα αντι-RNP εμφανίζουν μικρότερη συχνότητα εμφάνισης νεφροπάθειας σε σχέση με ασθενείς που εμφανίζουν αντισώματα αντι-Sm. Τα αντισώματα κατά των αντιγόνων SS-A (Ro) και SS-B (La) εμφανίζονται περίπου στο 30-40% και 10-15% των ασθενών με ΣΕΛ και στο 60-70% και 40-60% των ασθενών με *σύνδρομο Sjögren*, αντίστοιχα. Τα αντισώματα κατά του SS-B (La) εμφανίζονται συχνά να συσχετίζονται με τα αντισώματα κατά του αντιγόνου SS-A (Ro). Τα αντισώματα κατά του SS-A (Ro) εμφανίζονται επίσης στο 60% των ασθενών με *υποξύ δερματικό ερυθηματώδη λύκο*, σε όλα σχεδόν τα περιστατικά ερυθηματώδη λύκου νεογνών και στα δύο τρίτα των ασθενών με ΣΕΛ που πάσχουν από ανεπάρκεια στο C2<sup>10-13</sup>. Τα αντισώματα κατά του Scl-70 αποτελούν έναν ειδικό ορολογικό δείκτη για τη συστηματική σκληροδερμία. Έχουν αναφερθεί ποικίλες συχνότητες των αντισωμάτων κατά του Scl-70. Σε αρχικές μελέτες, το αντίσωμα αυτό ανιχνεύτηκε περίπου στο 20% των ασθενών με σκληροδερμία, αλλά μεταγενέστερες μελέτες ανέφεραν συχνότητα εμφάνισης 75% σε ασθενείς με διάχυτη σκληροδερμία και 44% σε ασθενείς με σκληροδερμία των άκρων<sup>5</sup>.

Αντισώματα ειδικά για τη μυοσίτιδα βρίσκονται στο 25-40% των ενηλίκων ασθενών με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες και είναι κυρίως ειδικά για κυτταροπλασματικές t-RNA συνθετάσες<sup>12</sup>. Από τα πέντε αντισώματα κατά των συνθετασών που έχουν περιγραφεί, τα αντισώματα κατά της συνθετάσης του ιστιδικού tRNA (Jo-1) σε ασθενείς με μυοσίτιδα είναι αυτά που σχετίζονται με κλινικά χαρακτηριστικά, όπως η διάμεση πνευμονοπάθεια, η πνευμονική ίνωση, το φαινόμενο Raynaud, ο πυρετός και η μη διαβρωτική, συμμετρική αρθρίτιδα μικρών αρθρώσεων<sup>12</sup>.

Τα αντισώματα κατά των εκχυλιζόμενων πυρηνικών αντιγόνων μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες μεθόδους. Λόγω της περίπλοκης διαδικασίας παραγωγής αντιγόνων ENA υψηλής καθαρότητας, στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί μέθοδοι ανοσοδιάχυσης σε πήκτωμα. Ωστόσο, η μεθοδολογία ELISA έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με την ανοσοδιάχυση σε πήκτωμα: μεγαλύτερη ευαισθησία<sup>14</sup>, μειωμένο χρόνο ανάλυσης, απουσία υποκειμενικότητας στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων, ποσοτικό προσδιορισμό χωρίς τιτλοδότηση ορού και δυνατότητα αυτοματοποίησης. Η μέθοδος ELISA διαλογής για την ανίχνευση αντισωμάτων ENA Immulisa™ χρησιμοποιεί αντιγόνα υψηλής καθαρότητας για την ανίχνευση αντισωμάτων ENA.

#### ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η ανάλυση διενεργείται ως ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA) στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με κεκαθαρωμένα αντιγόνα Sm, RNP, SS-A (Ro) ή SS-B (La), Scl-70 και Jo-1 και, στη συνέχεια, τα

EL

σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων αντι-ENA του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη ενός σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA (EU)/ml και αναφέρονται ως θετικά, οριακά ή αρνητικά.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.

Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

### Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών<sup>15</sup>.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ** – Το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μη χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

### Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (ENA) ImmuLisa™ **REF** 1149

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8 **MICROPLATE** | **ENA**

**Πλακίδιο** ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιγόνο ENA.

1 x 1,5 ml **CALIBRATOR** | **ENA** \*

Έτοιμος προς χρήση **Βαθμονομητής** (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ENA.

1 x 1,5 ml **CONTROL** | + | **ENA** \*






Έτοιμο προς χρήση **διάλυμα θετικού ελέγχου** (κόκκινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ENA.

EL

1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPPOS</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση</b> . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>αραιωτικό διάλυμα ορού</b> . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>ενζυμικό υπόστρωμα</b> . <b>Να προστατεύεται από το φως</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα τερματισμού</b> .
2 x	<b>BUF WASH</b>	Σκόνη <b>ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης</b> . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

\* Περιέχει < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

- LOT** Αριθμός παρτίδας
- REF** Αριθμός καταλόγου
-  Ημερομηνία λήξης
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
- IVD** In vitro διαγνωστική χρήση
-  Κατασκευαστής
-  Αριθμός αναλύσεων

#### Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ή αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικό χαρτί
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι

EL

περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, επί τουλάχιστον 30 λεπτά, προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση μιας αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

### Μέθοδος ανάλυσης

**Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Βήμα 2** Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

**Βήμα 3** Προετοιμάστε μια αραιώση του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:101**, προσθέτοντας **5 μl** ορού σε **0,5 ml** αραιωτικού διαλύματος ορού. **Αναμίξτε επιμελώς.**

**Βήμα 4** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.

**Βήμα 5** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.

**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου. Η απορρόφηση του τυφλού αντιδραστήριου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3 όταν μετράται έναντι του αέρα.

- Βήμα 6** Επώαστε επί **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 7** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 8** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 9** Επώαστε επί **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 10** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 7.
- Βήμα 11** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 12** Επώαστε επί **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 13** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε την απορρόφηση εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 14** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

### Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι  $<0,3$ . Ο βαθμονομητής πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές EU/ml εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο. Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Υπολογισμοί

#### ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

#### Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του βαθμονομητή = EU/ml εξεταζόμενου δείγματος

#### Απ/ση του Βαθμονομητή

Αυτή η μέθοδος υπολογισμού πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για να προσδιοριστεί εάν ένα δείγμα είναι αρνητικό ή θετικό.

#### Βαθμονομητής

Ο βαθμονομητής πρέπει να συμπεριλαμβάνεται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες από αυτή του

EL

Βαθμονομητή. Σε μια τέτοια περίπτωση, αυτά τα δείγματα ορού πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω με αραιωτικό διάλυμα ορού και να αναλυθούν εκ νέου. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσεως.

### Ερμηνεία

Οι παρακάτω πληροφορίες παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμή EU αντισωμάτων αντι-ENA	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα αντι-ENA ImmuLisa™ δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλου βαθμού αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου. Η διάγνωση δεν πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στα αποτελέσματα της ανάλυσης ELISA.

### ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Η συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων κατά των ENA σε διάφορες συστηματικές νόσους του συνδετικού ιστού συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα:

#### *Διαγνωστική σημασία των αντισωμάτων κατά διαφόρων διαλυτών πυρηνικών αντιγόνων*

Ισότυπος αντισώματος	Συσχέτιση με τη νόσο
Sm	ΣΕΛ - 10-40%
RNP	ΣΕΛ - 20-30%
	ΜΝΣΙ - 95-100%
SS-A (Ro)	ΣΕΛ - 15-33%
	ΥΔΕΛ - 60%
	ΕΛ νεογνών - 100%
	Σύνδρομο Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	ΣΕΛ - 10-15%
	ΥΔΕΛ - 25%
	Σύνδρομο Sjögren - 15-60%
Jo-1	Πολυμυοσίτιδα - 32%
	Επικαλυπτόμενη πολυμυοσίτιδα
	Δερματομυοσίτιδα - 20%
Scl-70	Σκληροδερμία - 20-40%
	Σκληροδερμία των άκρων - 44%

ΣΕΛ = συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

ΜΝΣΙ = μικτή νόσος συνδετικού ιστού

ΥΔΕΛ = υποξύς δερματικός ερυθηματώδης λύκος

Σημείωση: Η συχνότητα της ειδικότητας κάθε αντισώματος σε μια νόσο αντιπροσωπεύει στοιχεία που συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία<sup>3</sup>. Η συχνότητα εμφάνισης ποικίλλει, ανάλογα με τον πληθυσμό ασθενών.

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

Η μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα Anti-ENA ImmuLisa™ συγκρίθηκε με ανοσοαποτύπωση ENA. Ένα σύνολο 125 ορών από ένα κλινικό εργαστήριο αναφοράς αναγνωρίστηκαν με ανοσοδιάχυση ως θετικά ή αρνητικά για τα αντισώματα αντι-RNP, αντι-Sm, αντι-SS-A (Ro) ή αντι-SS-B (La), αντι-Scl-70 και αντι-Jo-1. Οι οροί αυτοί αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που συνιστά ο παρασκευαστής. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Σύγκριση των μεθόδων ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά των ENA**

		Ανάλυση διαλογής ImmuLisa™ ENA		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
Ανοσοαποτύπωση	Θετικά	50	2	52
	Αρνητικά	0	73	73
	Σύνολο	50	75	125

Συμφωνία: 98%  
Ευαισθησία: 96%  
Ειδικότητα: 100%

**Ακρίβεια:**

Αναλύθηκαν δύο δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων ENA σε 10 αντίγραφα σε μια περίοδο δύο εβδομάδων. Οι τιμές των συντελεστών ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών ήταν οι ακόλουθες:

	Μεταξύ σειρών %CV	Εντός σειράς %CV
	<b>IgG</b>	<b>IgG</b>
Δείγμα 1	3,6	4,5
Δείγμα 2	5,4	3,7

**Ανάκτηση:**

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων ENA αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων ENA. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων ENA των αναμιχθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

	Αντι-ENA Προστιθέμενη συγκέντρωση (EU/ml)	Αντι-ENA Ληφθείσα συγκέντρωση (EU/ml)	Ανάκτηση%
Δείγμα 1	85	81	95
Δείγμα 2	34	37	107
Δείγμα 3	51	57	112

ES



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## ENSAYO ELISA Screen PARA DETECCIÓN DE ANTI-ANTÍGENOS NUCLEARES EXTRAÍBLES (ENA)

**IVD**

**PROSPECTO**

**REF** 1149 ELISA Screen anti ENA 96 análisis

### USO PREVISTO

Enzimoimmunoensayo para la detección y semi cuantificación de anticuerpos IgG anti-antígenos nucleares extraíbles RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Jo-1 y Scl-70 en suero humano de pacientes en que se sospechan trastornos del colágeno vascular.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los antígenos nucleares extraíbles (ENA) son complejos de ribonucleoproteínas solubles (snurps). Los auto anticuerpos contra los diferentes ENA son importantes en el diagnóstico y control de varias enfermedades sistémicas del tejido conectivo. Los anticuerpos anti-Sm son específicos de una enfermedad y constituyen un marcador del lupus eritematoso sistémico (LES). Los anticuerpos anti-Sm se detectan en aproximadamente el 30-40% de los pacientes afectados de LES. Son raros en otras patologías sistémicas del tejido conectivo y si están presentes, podrían indicar un solapamiento de la enfermedad o bien pacientes que todavía no satisfacen plenamente los criterios ARA para el LES<sup>1-9</sup>. Otros anticuerpos, tales como los dirigidos contra SS-A (Ro), SS-B (La) y RNP no son específicos de una enfermedad. Los anticuerpos anti-RNP están presentes en el 35-45% de los pacientes con LES y en más del 95% de pacientes con *enfermedad mixta del tejido conectivo* (MCTD). Ocasionalmente se los encuentra también en la *esclerodermia*, *artritis reumatoide* y *LE inducido por medicamentos*<sup>1-6</sup>. En los pacientes con anticuerpos anti-RNP se registra una incidencia menor de patologías renales en comparación con aquellos pacientes que presentan anticuerpos anti-Sm. Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) y SS-B (La) se registran en aproximadamente el 30-40% y el 10-15% respectivamente de pacientes con LES, y en el 60-70% y 40-60% respectivamente de pacientes con *síndrome de Sjögren*. Los anticuerpos anti-SS-B (La) se presentan frecuentemente asociados con anticuerpos anti-SS-A (Ro). Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) están presentes también en el 60% de los pacientes que padecen *LE cutáneo subagudo*, en la mayoría de los casos de LE neonatal y en los dos tercios de pacientes de LES con deficiencia de C2<sup>10-13</sup>.

Los anticuerpos anti-SCL-70 son un marcador serológico de la esclerodermia sistémica. Se ha reportado de frecuencias variables de anticuerpos SCL-70. En los primeros estudios, este anticuerpo se detectó en aproximadamente el 20% de pacientes afectados de esclerodermia; estudios posteriores indican una incidencia del 75% en pacientes con esclerodermia difusa y del 44% en pacientes con acrosclerosis<sup>5</sup>.

Los anticuerpos específicos de miositis se detectan en el 25-40% de pacientes adultos con miopatías inflamatorias idiopáticas y son más específicos en las t-RNA sintetasas citoplasmáticas<sup>12</sup>.

De los cinco anticuerpos anti-sintetasas descritos, los anticuerpos anti-histidil-tRNA sintetasas (Jo-1) se asocian en pacientes con miositis a aspectos clínicos tales como patologías pulmonares intersticiales, fibrosis pulmonar, fenómeno de Raynaud, fiebre y artritis no erosiva simétrica de las pequeñas articulaciones<sup>12</sup>.

Los anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles pueden detectarse por diferentes métodos. Dadas las dificultades en obtener antígenos ENA altamente purificados, tradicionalmente se ha utilizado el método de inmunodifusión por gel; sin embargo, la metodología ELISA presenta muchas ventajas con respecto a la inmunodifusión por gel: mayor sensibilidad<sup>14</sup>, menor duración del ensayo, eliminación de la subjetividad en la lectura de resultados, cuantificación sin titulación del suero y posibilidad de automatización. El ensayo ELISA Screen ENA ImmuLISA™ utiliza antígenos altamente purificados para detectar anticuerpos ENA.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba consiste en un ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA). Los pocillos se recubren con antígenos purificados Sm, RNP, SS-A (Ro) o SS-B (La), Scl-70 y Jo-1; a continuación se bloquean los puntos que no han

reaccionado para reducir las uniones no específicas. Se incuban los controles, calibradores y muestra de suero del paciente en los pocillos recubiertos de antígeno, permitiendo que se unan los anticuerpos específicos anti ENA presentes en el suero. Los anticuerpos no unidos y demás proteínas del suero se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan mediante un conjugado de IgG antihumano marcado con un enzima añadido a los pocillos. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado. Luego se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). La presencia de anticuerpos se detecta por el cambio de color provocado por la conversión del sustrato pNPP. Se detiene la reacción y con un espectrofotómetro se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo. Los resultados se expresan en unidades ELISA (EU/ml) y se indican como positivos, inciertos (valores límite) o negativos.

## REACTIVOS

### Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.**

No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C).

Las tiras de micropocillos revestidos deben usarse una sola vez.

### Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales<sup>15</sup>.

**ADVERTENCIA:** la azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos

**Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto.** No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

### Material suministrado

ELISA Screen anti ENA ImmuLisa™ REF 1149


El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MICROPLATE</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ENA</span>	<b>Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígenos ENA</b>
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ENA</span> *	<b>Calibrador listo para usar (tapa verde).</b> Suero humano con anticuerpos anti ENA.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">+</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ENA</span> *	<b>Control Positivo listo para usar (tapa roja).</b> Suero humano con anticuerpos anti ENA.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">-</span> *	<b>Control Negativo listo para usar (tapa blanca).</b> Contiene suero humano.
1 x 12 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">IgG-CONJ</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ALKPHOS</span> *	<b>Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.</b>

ES

1 x 60 ml  \*

**Diluyente de suero listo para usar.** Color azul.

1 x 12 ml  \*

**Substrato enzimático** listo para usar. **Protéjase de la luz.**

1 x 12 ml 

**Solution Stop** lista para usar.

2 x 

**Tampón de lavado en polvo.** Reconstituir cada unidad hasta un litro.

\* Contiene <0.1% NaN<sub>3</sub>

### Símbolos utilizados en las etiquetas:

 Número de lote

 Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Léanse las instrucciones de uso

 Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

### Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido o bien lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplacas para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.

### RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C durante no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

### PROCEDIMIENTO

#### Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente durante 30 minutos por lo menos antes de dar comienzo a la prueba. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y muestras no utilizados.

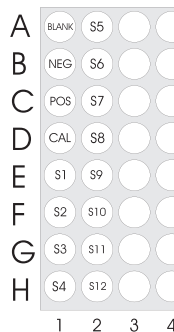
ES

- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado, utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Utilice una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

### Procedimiento del ensayo

**Paso 1** Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

**Paso 2** Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.



**Paso 3** Prepare una dilución de **1:101 de la muestra del paciente, pipeteando 5µl de suero en 0,5 ml de diluyente de suero. Mezcle bien.**

**Paso 4** Coja los pocillos necesarios del sobre; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera. Coloque los pocillos en el soporte suplementario.

**Paso 5** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, de controles positivo y negativo y muestras del paciente en los correspondientes pocillos, como se indica más arriba.

**Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl de diluyente de suero como blanco de reactivo**. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo. La absorbancia del blanco de reactivo no debe ser superior a 0.3 leída contra el aire.

**Paso 6** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.

**Paso 7** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Paso 8** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.

**Paso 9** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.

**Paso 10** Lave los pocillos repitiendo el paso 7.

ES

- Paso 11** Pipetee **100 µl de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.**
- Paso 12** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 13** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 14** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

### Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0,3. La lectura de absorbancia del calibrador no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. Los valores de EU/ml del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml.

### RESULTADOS

#### Cálculo

#### DETERMINACIÓN CUALITATIVA

#### Abs. de muestra analizada

----- **X EU/ml de calibrador = EU/ml muestra analizada**

#### Abs. de calibrador

Este método de cálculo se utilizará únicamente para establecer si una muestra es negativa o positiva.

#### Calibrador

El calibrador debe utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de paciente que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del calibrador. En estos casos, las muestras con esas características se han de volver a diluir con diluyente de suero y se analizarán nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

#### Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

Valor anti-ENA EU	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (valores límite)
>25 EU/ml	Positivo

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo ELISA Screen anti-ENA ImmuLisa™ no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente par analizar muestras de suero humano. El diagnóstico no debe basarse solamente en los resultados del ensayo ELISA.

#### VALORES ESPERADOS

La incidencia de anticuerpos ENA en varias patologías sistémicas del tejido conectivo se resume en la siguiente tabla:

**Importancia diagnóstica de anticuerpos contra diferentes antígenos nucleares solubles**

Isotipo de anticuerpo	Asociación con la dolencia
Sm	LES - 10-40%
RNP	LES - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	LES - 15-33%
	SCLE - 60%
	LE Neonatal - 100%
	Síndrome de Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	LES - 10-15%
	SCLE - 25%
	Síndrome de Sjögren - 15-60%
Jo-1	Polimiositis - 32%
	Polimiositis solapada
	Dermatomiositis - 20%
Scl-70	Esclerodermia - 20-40%
	Acrosclerosis - 44%

LES = lupus eritematoso sistémico

MCTD = enfermedad mixta del tejido conectivo

SCLE = lupus eritematoso cutáneo subagudo

Nota: La frecuencia de especificidad de cada anticuerpo en una enfermedad resulta de datos tomados de la literatura<sup>3</sup>. La incidencia varía según la población de pacientes.

**CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN**

El ensayo ELISA Screen anti-ENA ImmuLisa™ se comparó con el análisis ENA ImmunoBlot. Mediante inmunodifusión se identificaron 125 sueros procedentes de un laboratorio clínico de referencia, indicándolos como positivos o negativos a anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) o anti-SS-B (La), anti-Scl-70 y anti-Jo-1.

Dichos sueros se analizaron siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Los resultados se resumen en las siguientes tablas.

**Comparación de métodos ELISA para detección de anticuerpos anti ENA**

		ImmuLisa™ ENA Screen		
		Positivo	Negativo	Total
Immunoblot	Positivo	50	2	52
	Negativo	0	73	73
	Total	50	75	125

Correspondencia: 98%

Sensibilidad: 96%

Especificidad: 100%

ES

**Precisión:**

Se analizaron por diez veces dos muestras con concentración conocida de ENA a lo largo de dos semanas. Los coeficientes de variación (CV) intra y entre ensayo son los siguientes:

	<b>entre ensayo intra-ensayo</b>	
	<b>%CV</b>	<b>%CV</b>
	<b>IgG</b>	<b>IgG</b>
<b>Muestra 1</b>	3.6	4.5
<b>Muestra 2</b>	5.4	3.7

**Recuperación:**

Muestras con concentración conocida de anti-ENA se mezclaron con la dilución adecuada de otra muestra positiva con cantidad conocida de anti-ENA. Se determinaron los niveles de anti-ENA en las muestras mezcladas y se calculó el porcentaje de recuperación a partir de los valores obtenidos. Los resultados se indican a continuación:

	<b>Anti-ENA</b>	<b>Anti- ENA</b>	<b>% Recuperación</b>
	<b>Ab. conc. añadida (EU/ml)</b>	<b>Ab. conc. obtenida (EU/ml)</b>	
<b>Muestra 1</b>	85	81	95
<b>Muestra 2</b>	34	37	107
<b>Muestra 3</b>	51	57	112



## ELISA-Screeningtest für Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA)

IVD

### BEIPACKTEXT

REF 1149 Anti-ENA-ELISA-Screeningtest 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen die extrahierbaren nukleären Antigene RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, Jo-1 und Scl-70 in Humanserum von Patienten, bei denen ein Verdacht auf eine Kollagengefäßkrankheit besteht.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) sind lösliche Ribonukleoproteinkomplexe (Snurps). Autoantikörper gegen verschiedene ENA haben sich als wertvoll für die Diagnose und Überwachung von verschiedenen systemischen Bindegewebserkrankungen erwiesen. Anti-Sm-Antikörper sind krankheitsspezifisch und sind daher ein Marker für *systemischen Lupus erythematodes* (SLE). Antikörper gegen Sm treten in etwa 30-40% von SLE-Patienten auf. Sie erscheinen nur selten mit anderen systemischen Bindegewebserkrankungen, und ihr Auftreten zeigt in diesem Fall entweder ein Überschneiden von Krankheiten oder Patienten, die die ARA-Kriterien für SLE noch nicht erfüllt haben, an<sup>1-9</sup>. Andere Antikörper, z.B. gegen SS-A/Ro, SS-B/La und RNP, sind nicht krankheitsspezifisch. Antikörper gegen RNP treten in 35-45% von Patienten mit SLE und über 95% von Patienten mit *Mischkollagenose* (MCTD) auf. Sie erscheinen gelegentlich auch bei *Sklerodermie*, *rheumatoider Arthritis* und *medikamenteninduziertem LE*<sup>1-6</sup>. Im Vergleich mit Patienten mit Anti-Sm-Antikörpern weisen Patienten mit Anti-RNP-Antikörpern eine geringere Häufigkeit von Nierenkrankheiten auf. Antikörper gegen SS-A/Ro und SS-B/La treten in etwa 30-40% bzw. 10-15% von SLE-Patienten und 60-70% bzw. 40-60% von Patienten mit Sjögren-Syndrom auf. Antikörper gegen SS-B/La treten häufig gemeinsam mit Antikörpern gegen SS-A/Ro auf. Antikörper gegen SS-A/Ro treten auch in 60% von Patienten mit *subakutem kutanen LE*, in fast allen Fällen von *neonatalem LE* und in zwei Dritteln der SLE-Patienten mit C2-Mangel auf<sup>10-13</sup>. Antikörper gegen Scl-70 sind spezifische serologische Marker für systemische Sklerodermie. Es wurden unterschiedliche Häufigkeiten für Scl-70-Antikörper gemeldet. In frühen Studien wurde dieser Antikörper in etwa 20% von Patienten mit Sklerodermie nachgewiesen, spätere Studien berichteten jedoch über eine Häufigkeit von 75% in Patienten mit diffuser Sklerodermie und 44% in Patienten mit Akrosklerose<sup>5</sup>.

Myositis-spezifische Antikörper liegen in 25-40% von erwachsenen Patienten mit idiopathischen Muskelentzündungen vor und sind meist spezifisch für zytoplasmische tRNA-Synthetasen<sup>12</sup>. Eine der fünf beschriebenen Arten von Anti-Synthetase-Antikörpern, Anti-Histidyl-tRNA-Synthetase-Antikörper (Jo-1), steht bei Patienten mit Myositis mit klinischen Merkmalen wie interstitieller Lungenkrankheit, Lungenfibrose, Raynaud-Phänomen, Fieber und nicht-erosiver symmetrischer Arthritis in kleinen Gelenken in Verbindung<sup>12</sup>.

Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene können mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Beschaffung von stark gereinigten ENA-Antigenen wurden traditionell Gel-Immunodiffusionsmethoden verwendet. Die ELISA-Technik bietet jedoch zahlreiche Vorteile gegenüber der Immunodiffusion: größere Sensitivität<sup>14</sup>, kürzere Testzeiten, keine Subjektivität beim Ablesen der Ergebnisse, Quantifizierung ohne Serumtitrierung und die Möglichkeit einer Automatisierung. Der Immulisa™ ELISA-Screeningtest für ENA verwendet stark gereinigte Antigene für den Nachweis von ENA-Antikörpern.

### TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasen-ELISA durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit gereinigten Sm-, RNP-, SS-A/Ro- oder SS-B/La-, Scl-70- und Jo-1-Antigenen beschichtet, und die unreaktierten Stellen werden blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibrator und Serumproben von Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen spezifischen Anti-ENA-Antikörper. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-

DE

IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Nicht-gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten (EU)/ml angegeben und als positiv, Grenzfall oder negativ gemeldet.

## REAGENZIEN

### Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

### Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis<sup>15</sup>.

WARNUNG – Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

### Mitgeliefertes Material

ImmuLisa™ Anti-ENA-ELISA-Screeningtest **REF** 1149

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>ENA</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit ENA-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>ENA</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator</b> ( <i>grüne Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen ENA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>ENA</b> *	Gebrauchsfertiges <b>positives Kontrollserum</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen ENA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	Gebrauchsfertiges <b>negatives Kontrollserum</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat</b> . Farbkennzeichnung rosa.

DE

1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Serumverdünner</b> . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Enzymsubstrat</b> . <b>Vor Licht schützen</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Gebrauchsfertige <b>Stopplösung</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Waschpuffer in Pulverform</b> . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

\* Enthält <0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Auf den Etiketten verwendete Symbole:

<b>LOT</b>	Chargennummer
<b>REF</b>	Bestellnummer
	Verwendbar bis
	Lagerungstemperatur
	Gebrauchsanleitung lesen
<b>IVD</b>	In-vitro-Diagnostikum
	Hersteller
	Anzahl an Tests

#### Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer oder automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähiges Papier
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.

#### PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

#### VERFAHREN

##### Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Lassen Sie den Serumproben und Testreagenzien mindestens 30 Minuten Zeit, um Raumtemperatur zu

erreichen, bevor Sie mit dem Test beginnen. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.

- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

### Testmethode

**Schritt 1** Lassen Sie alle Reagenzien Raumtemperatur erreichen.

**Schritt 2** Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

**Schritt 3** Verdünnen Sie die Patientenprobe im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Serums in **0,5 ml** Probenverdünner pipettieren. **Gut mischen.**

**Schritt 4** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.

**Schritt 5** Pipettieren Sie **100 µl** des gebrauchsfertigen Kalibrators, der positiven und negativen Kontrollseren sowie der Patientenproben wie auf der Probenanordnung unten angezeigt in die entsprechenden Vertiefungen.

**Anmerkung:** Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die gegen Luft abgelesene Extinktion der Blindprobe sollte nicht größer als 0,3 sein.

**Schritt 6** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm$  5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

**Schritt 7** Waschen Sie **4x** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie

zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

- Schritt 8** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 9** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 10** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 7 beschrieben.
- Schritt 11** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 12** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 13** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 14** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

### Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen der Kalibrator, die positiven und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Der Kalibrator sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Die EU/ml-Werte des positiven Kontrollserums müssen innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen.

## ERGEBNISSE

### Berechnungen

#### QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{EU/ml des Kalibrators} = \text{EU/ml Testprobe}$$

Diese Berechnungsmethode sollte nur verwendet werden um festzustellen, ob eine Probe negativ oder positiv ist.

### Kalibrator

Der Kalibrator muss bei jedem Testlauf mitverwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als der Kalibrator. In diesem Fall sollten diese Serumproben nochmals mit Serumverdünner verdünnt und erneut getestet werden. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

### Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Ergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

Anti-ENA-EU-Wert	Interpretation
<20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
>25 EU/ml	positiv

DE

## EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuLisa™ Anti-ENA-ELISA-Screeningtest sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiologisch verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen. Eine Diagnose sollte nicht ausschließlich aufgrund der ELISA-Testergebnisse gestellt werden.

## ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von ENA-Antikörpern bei verschiedenen systemischen Bindegewebserkrankungen wird in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Diagnostische Bedeutung von Antikörpern gegen

### *verschiedene lösliche nukleäre Antigene*

<b>Isotyp des Antikörpers</b>	<b>Assoziierung mit Krankheiten</b>
Sm	SLE - 10-40%
RNP	SLE - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A/Ro	SLE - 15-33%
	SCLE - 60%
	Neonataler LE - 100%
	Sjögren-Syndrom - 40-70%
SS-B/La	SLE - 10-15%
	SCLE - 25%
	Sjögren-Syndrom - 15-60%
Jo-1	Polymyositis - 32%
	Polymyositis-Überschneidung
	Dermatomyositis - 20%
Scl-70	Sklerodermie - 20-40%
	Akrosklerose - 44%

SLE = systemischer Lupus erythematodes

MCTD = Mischkollagenose

SCLE = subakuter kutaner Lupus erythematodes

Anmerkung: Die Häufigkeiten jedes spezifischen Antikörpers bei einer Krankheit wurden aus der Literatur zusammengestellt<sup>3</sup>. Die Häufigkeit schwankt je nach Patientenpopulation.

## LEISTUNGSMERKMALE

Der ImmuLisa™ Anti-ENA-Antikörper-ELISA-Screeningtest wurde mit dem Test ENA ImmunoBlot verglichen. Insgesamt 125 von einem klinischen Referenzlabor bezogene Seren wurden mittels Immunodiffusion als positiv oder negativ für Anti-RNP-, Anti-Sm-, Anti-SS-A/Ro- oder Anti-SS-B/La-, Anti-Scl-70- und Anti-Jo-1-Antikörper identifiziert.

DE

Diese Seren wurden gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren getestet. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

**Vergleich von ELISA-Methoden für den Nachweis von Antikörpern gegen ENA**

		ImmuLisa™ ENA-Suchtest		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immunoblot	Positiv	50	2	52
	Negativ	0	73	73
	Gesamt	50	75	125

Übereinstimmung: 98%  
Sensitivität: 96%  
Spezifität: 100%

**Genauigkeit:**

Zwei Proben mit bekannter ENA-Konzentration wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen 10-mal getestet. Es ergaben sich folgende intraserielle und interserielle Variationskoeffizienten (VK):

	interseriell	intraseriell
	% VK	% VK
	IgG	IgG
Probe 1	3,6	4,5
Probe 2	5,4	3,7

**Wiederfindung:**

Proben mit bekannter Anti-ENA-Konzentration wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an Anti-ENA-Antikörpern gemischt. Die Anti-ENA-Spiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	Anti-ENA	Anti-ENA	% Wiederfindung
	AK-Konz. zugefügt (EU/ml)	AK-Konz. gemessen (EU/ml)	
Probe 1	85	81	95
Probe 2	34	37	107
Probe 3	51	57	112



## Dépistage anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) ELISA

**IVD**

### ENCART DU PRODUIT

**REF** 1149 Test Anti-ENA Screen 96 Tests

### USAGE PREVU

Dosage immunoenzymatique de type ELISA destiné à la détection et la quantification des anticorps IgG des antigènes nucléaires solubles (ENA) [RNP, Sm, SS-A (Ro), ou S-B (La)] dans le sérum humain de patients chez qui l'on soupçonne des collagénoses vasculaires.

### RESUME ET EXPLICATION

Les antigènes nucléaires solubles (ENA) sont des complexes ribonucléoprotéiques solubles (snurps). Les auto-anticorps dirigés contre divers antigènes nucléaires solubles (ENA) se sont montrés utiles dans le diagnostic et le contrôle de diverses maladies du tissu systémique connectif. Les anticorps anti-Sm sont spécifiques de la maladie et représentent donc un marqueur pour le lupus érythémateux systémique (SLE). Les anticorps anti-Sm se manifestent chez approximativement 30-40% des patients atteints de SLE. Ils sont rares dans les autres maladies du tissu conjonctif systémique et, s'ils sont présents, ils indiquent des formes de chevauchement ou des patients qui n'ont pas encore répondu aux critères ARA (American Rheumatism Association) pour le SLE<sup>1-9</sup>. D'autres anticorps tels que ceux qui sont dirigés contre SS A (Ro), SS-B (La) et RNP ne sont pas spécifiques de la maladie. Les anticorps anti-RNP (ribonucléoprotéine) se manifestent chez 35-45% des patients atteints de SLE et chez 95% des patients atteints de connectivité mixte (MCTD). Parfois ils apparaissent également dans la sclérodémie, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux induit par des médicaments<sup>1-6</sup>. Les patients présentant des anticorps anti-RNP présentent une incidence plus basse d'affections rénales par rapport aux patients avec des anticorps anti-Sm. Les anticorps anti-SS A (Ro) et SS-B (La) se manifestent respectivement chez approximativement 30-40% et 10-15% des patients atteints de SLE et 60-70% et 40-60% des patients atteints du syndrome de Sjögren. Les anticorps anti-SS-B (La) se manifestent plus fréquemment en association avec des anticorps anti-SS A (Ro). Les anticorps anti-SS A (Ro) se manifestent également chez 60% des patients avec *lupus érythémateux subaigu (LE)*, dans presque tous cas de lupus érythémateux (LE) néo-natal et chez les deux-tiers des malades SLE avec déficit en C2<sup>10-13</sup>. Les anticorps anti-Scl-70 sont un marqueur sérologique spécifique pour la sclérose systémique. Des fréquences variables d'anticorps Scl-70 ont été signalées. Dans les premières études, cet anticorps a été détecté chez approximativement 20% de malades avec sclérodémie mais des études plus récentes mentionnent une fréquence de 75% chez les patients avec sclérodémie diffuse et 44% chez les patients avec acrosclérose<sup>5</sup>.

Des anticorps spécifiques de la myosite sont présents chez 25-40% des patients adultes souffrant de myopathies inflammatoires idiopathiques et sont principalement spécifiques pour les t-ARN synthétases cytoplasmiques<sup>12</sup>. Sur les cinq anticorps anti-synthétases décrits, les anticorps anti-histidyl-tRNA synthétase (Jo-1) chez les patients souffrant de myosite sont associés avec des caractéristiques cliniques telles que maladie du poumon interstitielle, fibrose pulmonaire, phénomène de Raynaud, fièvre et polyarthrite symétrique non-érosive des petites articulations.

Les anticorps contre les antigènes nucléaires solubles peuvent être détectés par plusieurs méthodes. En raison des difficultés pour obtenir des antigènes ENA hautement purifiés, les méthodes de l'immunodiffusion sur gel sont traditionnellement utilisées. Cependant, la méthode ELISA présente de nombreux avantages par rapport à l'immunodiffusion sur gel : une plus grande sensibilité<sup>14</sup>, des délais de test limités, aucune subjectivité dans la lecture des résultats, une quantification sans titrage du sérum et la possibilité de procéder à une automatisation. Le dépistage ImmuLisa™ ENA Screen ELISA a recours à des antigènes hautement purifiés pour détecter les anticorps ENA.

### PRINCIPE DE LA METHODE

Le test est réalisé sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA). Des microplaques à puits sont enduites d'antigènes purifiés Sm, RNP, SS-A (Ro) ou SS-B

(La), Scl-70 et Jo-1, suivi par un blocage des sites inaltérés pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les étalons et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés par un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain ajouté aux puits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat spécifique (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion du substrat pNPP. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (EU)/ml et les résultats sont rapportés sous la forme de positif, cas limite ou négatif.

## REACTIFS

### Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage.

Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

### Précautions

Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux<sup>15</sup>.

**AVERTISSEMENT** – L'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources, si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue de Immco Diagnostics Inc. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

### Matériel fourni

ImmLisa™ Test Anti-ENA Screen REF 1149

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.






12 x 8	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MICROPLATE</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ENA</span>	<b>Microplaques</b> avec micropuits individuels séparables enduits d'antigènes ENA.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ENA</span> *	<b>Étalon</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle vert</i> ). Sérum humain contenant des anticorps anti-ENA.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">+</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ENA</span> *	<b>Régulation Positive</b> prête à l'emploi ( <i>couvercle rouge</i> ). Sérum humain contenant des anticorps anti-ENA.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">-</span> *	<b>Régulation Négative</b> prête à l'emploi ( <i>couvercle blanc</i> ). Contient du sérum humain.

FR

1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines.</b> Prêt à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant de sérum</b> prêt à l'emploi. Codé en couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat d'enzyme</b> prêt à l'emploi. <b>Conserver à l'abri de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Poudre Wash Buffer (solution de lavage).</b> Reconstituer dans un litre chacun.

\* Contient <0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Symboles utilisés sur les étiquettes:

<b>LOT</b>	Numéro de lot
<b>REF</b>	Numéro de référence catalogue
	A utiliser avant
	Température de conservation
	Lire les instructions d'utilisation
<b>IVD</b>	Pour usage diagnostique In vitro
	Fabricant
	Nombre de tests

#### Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée ou le dispositif de lavage de microplaques automatique en mesure de dispenser 200 µl
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.

#### RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum devraient être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou atteints de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

## PROCEDURE

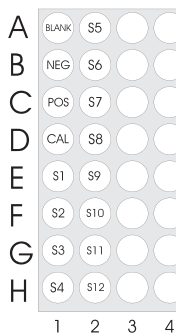
### Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Laisser les spécimens de sérum et les réactifs de test arriver à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

### Méthode de test

**Etape 1** Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante.

**Etape 2** Étiqueter la feuille de protocole pour indiquer le placement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.



**Etape 3** Préparer une dilution **1:101** de spécimens patient en pipétant **5µl** de sérum dans **0.5 ml** de diluant de sérum. **Bien mélanger.**

**Etape 4** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.

**Etape 5** Pipeter **100 µl** de étalon prêt à l'emploi, de régulateur positif et négatif et d'échantillons patients dans les puits appropriés, comme dans le schéma de l'échantillon ci-dessus.

**Note :** Inclure un puits qui contient **100 µl** de diluant de sérum à titre de réactif blanco. Mettre à zéro le lecteur ELISA sur le réactif blanco. L'absorption du réactif à blanc ne doit pas être supérieure à 0,3 quand elle est mesurée par rapport à l'air.

**Etape 6** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm$  5 min) à température ambiante.

**Etape 7** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Eliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque

FR

puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.

- Etape 8** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Etape 9** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 10** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 7.
- Etape 11** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrage que pour le conjugué.
- Etape 12** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 13** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Etape 14** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

#### Contrôle de qualité

Les étalons, les régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés lors de chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanco doit être inférieure à 0,3. L'étalon doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le régulateur positif doit fournir des valeurs EU/ml dans la plage figurant sur le flacon. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise en considération pour déterminer EU/ml

#### RESULTATS

##### Calculs

##### DOSAGE QUALITATIF

**Abs. de l'échantillon d'essai**

----- X EU/ml de l'étalon = EU/ml échantillon d'essai

**Abs. de l'étalon**

Cette méthode de calcul doit être utilisée uniquement pour déterminer si un spécimen est négatif ou positif.

##### Etalon

L'étalon doit être inclus à chaque opération. Les échantillons patients qui contiennent des niveaux d'anticorps très élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon. Dans un tel cas, ces échantillons de sérum doivent être dilués davantage avec du diluant de sérum et retestés. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

##### Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeur anti-ENA EU	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (cas limite)
>25 EU/ml	Positif

## LIMITES DE LA PROCEDURE

Le test Immulisa™ Anti-ENA Screen ELISA ne devrait pas être exécuté sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit uniquement être utilisée pour le test d'échantillons de sérum humain. Il ne faut pas poser de diagnostic en se basant uniquement sur le test ELISA.

## VALEURS ATTENDUES

L'incidence des anticorps ENA dans plusieurs maladies du tissu conjonctif systémique est résumée dans le tableau suivant :

### Signification diagnostique des anticorps de différents antigènes nucléaires solubles

Isotype anticorps	Association maladie
Sm	SLE - 10-40%
RNP	SLE - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	SLE - 15-33%
	SCLE - 60%
	Lupus érythémateux néo-natal - 100%
	Syndrome de Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	SLE - 10-15%
	SCLE - 25%
	Syndrome de Sjögren - 15-60%
<Jo-1	Polymyosite – 32%
	Chevauchement polymyosite
	Dermatomyosite - 20%
Scl-70	Sclérodermie - 20-40%
	Acrosclérose - 44%

SLE = Lupus érythémateux systémique

MCTD = connectivité mixte

SCLE = Lupus érythémateux cutané subaigu

Note : La fréquence de la spécificité de chaque anticorps dans une maladie représente une compilation de la littérature<sup>3</sup>. L'incidence varie selon la population des patients

## DONNEES DE RENDEMENT

Le test Immulisa™ Anti-ENA Antibody Screen ELISA a été comparé avec l'ENA ImmunoBlot. Un total de 125 sérums d'un laboratoire clinique de référence ont été identifiés par immunodiffusion comme étant positifs ou négatifs pour les anticorps anti-RNP, anti-Sm, anti-SS A (Ro) ou anti SS-B (La), anti-Scl-70 et anti-Jo-1.

Ces sérums ont été testés d'après la procédure recommandée par le fabricant. Les résultats sont repris dans le tableau :

### Comparaison des méthodes ELISA pour la détection d'anticorps des antigènes nucléaires solubles (ENA)

		Immulisa™ ENA Screen		
		Positif	Négatif	Négatif
Immunoblot	Positif	50	2	52
	Négatif	0	73	73
	Négatif	50	75	125

Accord : 98%

Sensibilité : 96%

Spécificité : 100

FR

**Précision :**

Deux échantillons avec des concentrations connues d'ENA ont été analysés dans 10 mesures sur une période de deux semaines. Les coefficients de variation Intra - et inter- essai (CV) étaient les suivants :

	<b>inter-essai</b>	<b>intra-essai</b>
	<b>%CV</b>	<b>%CV</b>
	<b>IgG</b>	<b>IgG</b>
<b>Échantillon 1</b>	3.6	4.5
<b>Échantillon 2</b>	5.4	3.7

**Récupération :**

Des échantillons avec des concentrations connues anti-ENA ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des quantités connues d'anti-ENA. Les niveaux anti-ENA des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	<b>Anti-ENA</b>	<b>Anti- ENA</b>	
	<b>Ab. conc. ajoutée</b>	<b>Ab. conc. obtenue</b>	<b>% Récupération</b>
	<b>(EU/ml)</b>	<b>(EU/ml)</b>	
<b>Échantillon 1</b>	85	81	95
<b>Échantillon 2</b>	34	37	107
<b>Échantillon 3</b>	51	57	112



## Anticorpi Anti-Antigene Nucleare Estraibile (ENA) ELISA

IVD

### INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1149 Anticorpi Anti-ENA ELISA 96 Determinazioni

#### FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la ricerca e la semiquantificazione di anticorpi anti-ENA RPN, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Jo-1 e Scl-70 di classe IgG nel siero umano di pazienti con sospette malattie collagene-vascolari.

#### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli ENA sono complessi di ribonucleoproteine solubili (snurps). Gli autoanticorpi diretti contro i vari ENA si sono dimostrati importanti nella diagnosi e nel monitoraggio di diverse malattie sistemiche del tessuto connettivo. Gli anticorpi anti-Sm sono specifici della malattia, e quindi sono un marcatore per il lupus eritematoso sistemico (LES). Gli anticorpi anti-Sm compaiono nel 30-40% circa dei pazienti con LES; sono rari in altre malattie sistemiche del tessuto connettivo e, se presenti, indicano o sovrapposizione di patologie o pazienti che non hanno ancora soddisfatto i criteri ARA per il LES<sup>1-9</sup>. Altri anticorpi, come quelli diretti contro SS-A (Ro), SS-B (La) e RNP non sono specifici della malattia. Gli anticorpi anti-RNP sono presenti nel 35-45% dei pazienti con LES e in più del 95% dei pazienti con malattia mista del tessuto connettivo (MCTD). In alcuni casi sono stati individuati anche in pazienti con sclerodermia, artrite reumatoide e LE indotto da farmaci<sup>1-6</sup>. I pazienti con anticorpi anti-RNP presentano una minore incidenza di nefropatie rispetto ai pazienti con anticorpi anti-Sm. Gli anticorpi anti SS-A (Ro) e SS-B (La) compaiono rispettivamente in circa il 30-40% e nel 10-15% dei pazienti con LES e nel 60-70% e 40-60% dei pazienti con sindrome di Sjögren. Gli anticorpi anti SS-B (La) si trovano spesso in associazione con gli anticorpi anti SS-A (Ro). Gli anticorpi anti SS-A (Ro) sono presenti anche nel 60% dei pazienti con LE cutaneo subacuto, in quasi tutti i casi di LE neonatale e nei due terzi dei pazienti LES con carenza di C2<sup>10-13</sup>.

Gli anticorpi anti Scl-70 rappresentano un marcatore sierologico specifico per la sclerodermia sistemica. Sono state riscontrate frequenze variabili di anticorpi anti Scl-70. Negli studi iniziali questo anticorpo è stato rilevato nel 20% circa dei pazienti con sclerodermia, studi successivi hanno riportato un'incidenza del 75% in pazienti con sclerodermia cutanea diffusa e del 44% in pazienti con acrosclerosi<sup>5</sup>.

Anticorpi miosite-specifici sono presenti nel 25-40% dei pazienti adulti con miopatie infiammatorie idiopatiche e sono maggiormente specifici per le t-RNA sintetasi citoplasmiche<sup>12</sup>. Delle cinque sintetasi descritte, gli anticorpi anti-istidil-tRNA sintetasi (Jo-1) in pazienti con miosite sono associati con manifestazioni cliniche quali malattia interstiziale del polmone, fibrosi polmonare, fenomeno di Raynaud, febbre e artrite simmetrica non-erosiva delle piccole articolazioni<sup>12</sup>.

Gli anticorpi agli antigeni anti-nucleari estraibili possono essere individuati utilizzando varie metodologie. A causa della complessità nell'ottenere antigeni ENA altamente purificati, tradizionalmente sono stati utilizzati metodi di immunodiffusione su gel. Tuttavia, la metodologia ELISA presenta numerosi vantaggi rispetto all'immunodiffusione su gel: viene garantita una maggiore sensibilità<sup>14</sup>, i tempi di analisi sono più brevi, viene eliminata la soggettività individuale nella lettura dei risultati, la quantificazione si ottiene senza titolazione sierica, esistono potenzialità di automazione. Il Test ENA ELISA Immulisa™ utilizza antigeni in forma altamente purificata per rilevare gli anticorpi anti-ENA.

#### PRINCIPIO DELLA METODICA

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con antigeni purificati Sm, RNP, Sm, SS-A (Ro) o SS-B (La), Scl-70 e Jo-1; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, ciò permette agli anticorpi specifici anti-ENA presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati da un anticorpo anti IgG umane marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di

anticorpi viene indicata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU/ml) e vengono riportati come positivi, borderline o negativi.

## REAGENTI

### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Le strisce con i pozzetti sono monouso.

### Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali<sup>15</sup>.

**ATTENZIONE** – L'azide sodica (NaN<sub>3</sub>) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

### Materiali forniti



Anticorpi Anti-ENA ELISA Immulisa™ **REF** 1149

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>ENA</b>	<b>Micropiastra</b> con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene ENA
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>ENA</b> *	<b>Calibratore</b> (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti ENA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>ENA</b> *	<b>Controllo Positivo</b> (tappo rosso) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti ENA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	<b>Controllo Negativo</b> (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	<b>Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso</b> ; di colore rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluente siero</b> pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato Enzimatico pronto all'uso. Proteggere dalla luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Soluzione di Stop</b> pronta all'uso.
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	<b>Tampone di Lavaggio</b> in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

\* Contiene < 0,1% NaN<sub>3</sub>

**Simboli usati sulle etichette:**

-  Numero di lotto
-  Numero catalogo
-  Scadenza
-  Temperatura di conservazione
-  Leggere le istruzioni per l'uso
-  Uso diagnostico in vitro
-  Produttore
-  Numero di test

**Materiali necessari ma non forniti**

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito o lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.

**RACCOLTA DEL CAMPIONE**

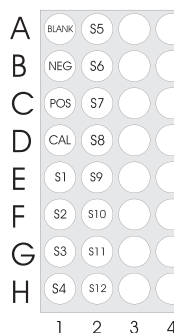
In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

**PROCEDURA****Note sul test**

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

**Metodo del test**

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.



- Fase 3** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente pipettando **5 µl** di siero in **0,5 ml** di Diluente del Campione. **Miscelare bene.**
- Fase 4** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 5** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.  
**Nota:** Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. L'assorbanza del bianco non deve essere superiore a 0,3.
- Fase 6** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 7** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 8** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 9** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 10** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 7.
- Fase 11** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 12** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 13** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 14** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

**Controllo di Qualità**

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere  $<0,3$ . Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il Controllo Positivo deve dare EU/ml che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture.

IT

## RISULTATI

### Calcoli

#### DETERMINAZIONE QUALITATIVA

##### Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml di Calibratore = EU/ml del Campione

##### Assorbanza del calibratore

Questo metodo di calcolo dovrebbe essere usato unicamente per determinare se un campione è negativo o positivo.

### Calibratore

Usare il Calibratore in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore. In questi casi, i campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti con il Diluente del Siero e testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

### Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

Valore anti-ENA EU/ml	Interpretazione
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Borderline
>25 EU/ml	Positivo

### LIMITAZIONI DEL TEST

Il test anti-ENA ImmuLisa™ non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano. La diagnosi non deve basarsi unicamente sui risultati del test ELISA.

### VALORI ATTESI

L'incidenza degli anticorpi anti-ENA in varie malattie sistemiche del tessuto connettivo è riassunta nella tabella seguente:

Significato diagnostico degli anticorpi a differenti antigeni nucleari solubili

Anticorpo	Malattia Associata
Sm	LES - 10-40%
RNP	LES - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	LES - 15-33%
	LECS - 60%
	LE neonatale - 100%
	Sindrome di Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	LES - 10-15%
	LECS - 25%
	Sindrome di Sjögren - 15-60%
Jo-1	Polimiosite - 32%
	Polimiosite sovrapposta
	Dermatomiosite - 20%
Scl-70	Scleroderma - 20-40%
	Acrosclerosi - 44%

LES = lupus eritematoso sistemico

MCTD = malattia mista del tessuto connettivo

LECS = lupus eritematoso cutaneo subacuto

IT

Nota: La frequenza della specificità di ciascun anticorpo in una malattia è presa dalla letteratura<sup>3</sup>. L'incidenza varia a seconda della popolazione di pazienti.

### Caratteristiche di PERFORMANCE

I test ImmuLisa™ per la ricerca di anticorpi anti-ENA ELISA è stato confrontato con il test ENA ImmunoBlot. 125 sieri provenienti da un laboratorio clinico di riferimento sono stati identificati mediante immunodiffusione, come positivi o negativi per gli anticorpi anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) o anti-SS-B (La), anti-Scl-70 e anti-Jo-1.

Questi sieri sono stati testati secondo la procedura raccomandata dal produttore. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

### Confronto tra differenti metodi ELISA per l'individuazione di anticorpi anti-ENA

		ImmuLisa™ ENA		
		Positivo	Negativo	Totale
Immunoblot	Positivo	50	2	52
	Negativo	0	73	73
	Totale	50	75	125

Concordanza: 98%

Sensibilità: 96%

Specificità: 100%

### Precisione:

Due campioni con concentrazioni note di ENA sono state analizzate in 10 replicati nell'arco di un periodo di due settimane. Il coefficiente di variazione (CV) all'interno di uno stesso saggio e tra un saggio e l'altro è il seguente:

	Inter-analisi	Intra-analisi
	%CV	%CV
	IgG	IgG
Campione 1	3,6	4,5
Campione 2	5,4	3,7

### Recupero:

I campioni con concentrazioni note di anti-ENA sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di anti-ENA. Sono stati determinati i livelli di anticorpi anti-ENA dei campioni miscelati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

	Anti-ENA	Anti-ENA	% Recupero
	Ass. conc. add. (EU/ml)	Ass. conc. add. (EU/ml)	
Campione 1	85	81	95
Campione 2	34	37	107
Campione 3	51	57	112



## ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-Antigénio Nuclear Extraível (ENA)

IVD

### FOLHETO DO PRODUTO

REF 1149 ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-ENA 96 Determinações

#### APLICAÇÃO

É um imunoensaio de absorção enzimática para a detecção e semiquantificação de anticorpos IgG contra antígenos nucleares extraíveis RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Jo-1 e Scl-70 em soro humano de doentes suspeitos com doenças vasculares de colagénio.

#### DESCRIÇÃO E EXPLICAÇÃO

Os antígenos nucleares extraíveis (ENA) são compostos de ribonucleoproteínas solúveis (“snurps”). Os auto-anticorpos dirigidos contra diversos ENA provaram ser de valor no diagnóstico e monitorização de variadas doenças sistémicas do tecido conjuntivo. Os anticorpos anti-Sm são específicos da doença e portanto são marcadores para *Lúpus eritematoso sistémico* (LES). Os anticorpos contra Sm apresentam-se em aproximadamente 30 a 40% dos doentes com LES. Esses são raros noutras doenças sistémicas do tecido conjuntivo e, se presentes, indicam também sobreposição da doença ou doentes que ainda não correspondem aos critérios ARA para LES<sup>1-9</sup>. Outros anticorpos tais como os designados contra SS-A (Ro), SS-B (La) e RNP não são específicos da doença. Os anticorpos contra RNP apresentam-se em 35 a 45% dos doentes com LES e em mais de 95% dos doentes com *doenças mistas do tecido conjuntivo* (DMTC). Ocasionalmente também se podem apresentar na *esclerodermia*, *artrite reumatóide* e *LE induzida por medicamentos*<sup>1-6</sup>. Os doentes com anticorpos anti-RNP têm uma menor incidência de doença renal se comparados com os doentes com anticorpos anti-Sm. Os anticorpos contra SS-A (Ro) e SS-B (La) apresentam-se em aproximadamente 30 a 40% e 10 a 15% dos doentes com LES e em 60 a 70% e 40 a 60% dos doentes com *Síndrome de Sjögren*, respectivamente. Os anticorpos contra SS-B (La) apresentam-se frequentemente em associação com os anticorpos SS-A (Ro). Os anticorpos contra SS-A (Ro) também se apresentam em 60% dos doentes com *LE cutâneo subagudo*, em quase todos os casos de LE neonatal e em dois terços dos doentes com LES com deficiência de C2<sup>10-13</sup>. Os anticorpos contra Scl-70 são um marcador serológico específico de esclerodermia sistémica. Foram registadas variações de frequência dos anticorpos Scl-70. Em antigos estudos este anticorpo foi detectado em aproximadamente 20% dos doentes com esclerodermia, mas em estudos mais recentes foi registada uma incidência de 75% em doentes com esclerodermia difusa e 44% em doentes com acrosclerose<sup>5</sup>.

Os anticorpos específicos de Miosite estão presentes em 25 a 40% dos doentes adultos com Miopatias inflamatórias idiopáticas e são principalmente específicos de Sintetases t-ARN citoplasmáticas<sup>12</sup>. Dos cinco anticorpos anti-sintetase descritos, os anticorpos anti-histidil-tARN sintetase (Jo-1) em doentes com miosite estão associados a patologias clínicas como a doença pulmonar intersticial, a fibrose pulmonar, o Fenómeno de Raynaud, febre e artrite simétrica não erosiva das pequenas articulações<sup>12</sup>.

Os Anticorpos contra os Antígenos nucleares extraíveis podem ser detectados por diversos métodos. Em virtude da complexidade na obtenção de antígenos ENA altamente purificados, tradicionalmente têm sido utilizados os métodos a imunodifusão em gel. Contudo, a metodologia ELISA tem muitas vantagens em relação à imunodifusão em gel: maior sensibilidade<sup>14</sup>, tempos de exame reduzidos, nenhuma subjectividade na leitura dos resultados, quantificação sem a titulação do soro e potencial de automatização. O exame ELISA para Anticorpos Anti-ENA ImmuLisa™ utiliza antígenos altamente purificados para detectar os anticorpos anti-ENA.

#### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é executado como imunoensaio de absorção enzimática de fase sólida. Os micropoços são revestidos com antígenos Sm, RNP, SS-A (Ro) ou SS-B (La), Scl-70 e Jo-1 purificados seguidos por um bloqueio dos locais não reactivos para reduzir a ligação não específica. Os controlos, os calibradores e as amostras de soro do doente são incubados nos poços revestidos com antígeno o que permite a ligação específica dos anticorpos anti-ENA presentes no soro. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem

PT

dos micropoços. Os anticorpos que se ligaram são detectados juntando um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima aos poços. O conjugado que não se tiver ligado é eliminado por lavagem. Depois junta-se aos micropoços um substrato enzimático específico (pNPP) e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração de cor provocada pela conversão do substrato pNPP. A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro. Os resultados são apresentados em unidades ELISA (UE)/ml e registados como positivos, indefinidos ou negativos.

## REAGENTES

### Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.**

Não utilize o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da utilização.

As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

### Precauções

Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais em matéria de conservação, distribuição e eliminação desses materiais<sup>15</sup>.

**ATENÇÃO** - a azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com as tubagens de cobre ou chumbo para formar azidas metálicas muito explosivas. Na eliminação de líquidos, juntar quantidades abundantes de água para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director do laboratório ou o Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

### Materiais fornecidos

ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-ENA ImmuLisa™ **REF** 1149

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>ENA</b>	<b>Microplaca</b> com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio ENA.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>ENA</b> *	<b>Calibrador pronto a usar</b> ( <i>tampa verde</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-ENA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>ENA</b> *	<b>Controlo positivo pronto a usar</b> ( <i>tampa vermelha</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-ENA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	<b>Controlo negativo pronto a usar</b> ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina</b> pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de soro</b> pronto a usar. Cor azul.

PT

1 x 12 ml **SUBSTRATE** \*

**Substrato enzimático** pronto a usar. **Proteger da luz.**

1 x 12 ml **STOP**

**Solução de paragem** pronta a usar.

2 x **BUF WASH**

**Tampão de lavagem em pó.** Reconstituir cada unidade em um litro.

\* Contém < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### **Símbolos utilizados nos rótulos:**

**LOT** Número de lote

**REF** Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

**IVD** Utilização em diagnóstico in vitro

 Fabricante

 Número de testes

#### **Materiais necessários mas não fornecidos**

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído ou lavador automático de microplacas com a capacidade de 200 µl
- Pipetas para 5 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.

#### **COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA**

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o desempenho do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

#### **PROCEDIMENTO**

##### **Notas sobre o procedimento**

- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste estabilizem a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no congelador todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.

PT

- É essencial uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adição de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e com na mesma sequência.
- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no congelador.

#### Método do teste

**Passo 1** Deixe que todos os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.

**Passo 2** Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É aconselhável executar o teste nas amostras em duplicado.

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

**Passo 3** Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de Diluente para Soro. **Misture bem.**

**Passo 4** Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas. Coloque correctamente as micropoços no suporte extra fornecido.

**Passo 5** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores, prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nas respectivas micropoços como ilustrado no esquema das amostras acima ilustrado.

**Nota:** Inclua também uma micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente. A absorvância do branco de reagente não deve ser superior a 0,3 quando lida em relação ao ar.

**Passo 6** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.

**Passo 7** Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força os poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.

**Passo 8** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.

**Passo 9** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.

PT

- Passo 10** Lave todos os micropoços como no Passo 7.
- Passo 11** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 12** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 13** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Paragem.
- Passo 14** Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas a comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

### Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser < 0,3. O Calibrador deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, o teste deverá ser repetido. O Controlo Positivo deverá dar valores dentro do intervalo referido na ampola. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar UE/ml deverá ser calculada a média das duas leituras.

## RESULTADOS

### Cálculos

### DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

#### Abs. da Amostra de Teste

----- X UE/ml de Calibrador = UE/ml da Amostra de Teste

#### Abs. do Calibrador D

Este método de cálculo só deve ser utilizado para determinar se uma amostra é negativa ou positiva.

#### Calibrador

O Calibrador deve ser incluído em cada teste. As amostras do doente que contenham níveis de anticorpos elevados podem dar valores de absorvância superiores aos do Calibrador. Nessa condição, essas amostras de soro devem ser mais diluídas com Diluente de Soro e testadas novamente. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

#### Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

Valor EU Anti-ENA	Interpretação
< 20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminado (Limiar)
>25 UE/ml	Positivo

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-ENA ImmuLisa™ não deve ser efectuado em amostras muito hemolisadas, contaminadas com micróbios ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. O diagnóstico não deve ser efectuado apenas em base aos resultados dos testes ELISA.

PT

## VALORES PREVISTOS

A incidência de anticorpos ENA em diversas doenças sistêmicas do tecido conjuntivo está resumida na seguinte tabela:

### Significado Diagnóstico de Anticorpos a vários Antígenos Nucleares Solúveis

Isótipo de Anticorpo	Associação de doença
Sm	LES - 10-40%
RNP	LES - 20-30%
	DTCM - 95-100%
SS-A (Ro)	LES - 15-33%
	LECS - 60%
	LE Neonatal - 100%
	Síndrome de Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	LES - 10-15%
	LECS - 25%
	Síndrome de Sjögren - 15-60%
Jo-1	Polimiosite - 32%
	Polimiosite sobreposta
	Dermatomiosite - 20%
Scl-70	Escleroderma - 20-40%
	Acrosclerose - 44%

LES = Lúpus eritematoso sistémico

DMTC = Doença mista do tecido conjuntivo

LECS = Lúpus eritematoso cutâneo subagudo

Nota: A frequência de especificidade de cada anticorpo numa doença representa uma compilação extraída da literatura<sup>3</sup>. A incidência varia em função da população de doentes.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Teste ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-ENA ImmuLISA™ foi comparado com o ImmunoBlot ENA. Um total de 125 soros de um laboratório clínico de referência foi identificado por imunodifusão como positivo ou negativo a anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) ou anti-SS-B (La), anti-Scl-70 e anti-Jo-1.

Estes soros foram testados de acordo com o processo recomendado pelo fabricante. Os resultados estão resumidos na seguinte Tabela:

### Comparação dos Métodos ELISA para a Detecção de Anticorpos a ENA

		Exame ENA Immco™		
		Positivo	Negativo	Total
Immunoblot	Positivo	50	2	52
	Negativo	0	73	73
	Total	50	75	125

Concordância: 98%

Sensibilidade: 96%

Especificidade: 100%

### Precisão:

Foram testadas duas amostras com concentrações conhecidas de ENA em 10 cópias por um período de duas semanas. Os coeficientes de variação (CV) intra- e inter-teste foram os seguintes:

PT

	<b>inter-teste</b>	<b>intra-teste</b>
	<b>%CV</b>	<b>%CV</b>
	<b>IgG</b>	<b>IgG</b>
<b>Amostra 1</b>	3,6	4,5
<b>Amostra 2</b>	5,4	3,7

**Recuperação:**

As amostras com concentrações anti-ENA conhecidas foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra com quantidades conhecidas de anti-ENA. Foram determinados os níveis de Anti-ENA das amostras misturadas e dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados são os seguintes:

	<b>Anti-ENA</b>	<b>Anti-ENA</b>	
	<b>Conc. ac. adicionada</b>	<b>Conc. ac. obtida</b>	<b>% Recuperação</b>
	<b>(UE/ml)</b>	<b>(UE/ml)</b>	
<b>Amostra 1</b>	85	81	95
<b>Amostra 2</b>	34	37	107
<b>Amostra 3</b>	51	57	112

## REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Tan EM. Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 25: 753-756, 1982.
3. Tan EM, Chan E, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear anti- bodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
4. Reichlin M. Current perspectives on serological reactions in SLE patients. *Clin Exp Immunol* 44: 1-10, 1981.
5. Reichlin M and Harley JB. Antibodies to extractable nuclear antigens: clinical significance. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 555-563, 1987.
6. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity and the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
7. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Medical Clinics of North America* 70: 237-261, 1986.
8. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 29: 457-460, 1986.
9. Williamson GG and Boyle JA. Antigenic relatedness of small ribonucleoprotein particles. *Biochem Biophys Acta* 798:149-155, 1984.
10. Clark G, Reichlin M and Tomasi TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 110:117-124, 1969.
11. Alspaugh MA and Maddison P. Resolution of the identity of certain antigen antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arth Rheum* 22: 796-798, 1979.
12. Targoff IN, Reichlin M. Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. *J Immunol* 138:2874-2882, 1987.
13. Jarzabek-Chozelska M et al. Scl-70 antibody - a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol*; 115:393-401, 1986.
14. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennan DM and Hough D. Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 62: 337- 245, 1985.
15. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub No [CDC] 88-8395), 1988.









*For technical assistance please contact:*

**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immco.com](mailto:info@immco.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299  
[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)