



# Anti-Nuclear Antibody (ANA) Screen ELISA

IVD

## PRODUCT INSERT

REF 1175 Anti-Nuclear Antibody Screen ELISA 96 Determinations

### INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antinuclear and cytoplasmic antibodies in human serum to aid in the diagnosis of autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Sjögren's Syndrome (SS), Mixed Connective Tissue Disease (MCTD), and Scleroderma.

### SUMMARY AND EXPLANATION

Anti-nuclear antibodies (ANA) are a group of antibodies directed against various nuclear and some cytoplasmic antigens. Serological tests for ANA play an important role towards the diagnosis of various autoimmune connective tissue disorders especially systemic lupus erythematosus (SLE), scleroderma, mixed connective tissue disorder (MCTD) and sjogren's syndrome<sup>1-5</sup>. ANA are usually detected by indirect immunofluorescence on HEp2<sup>6-10</sup>. Because of certain limitations of IFA, a need for non-subjective method of detecting ANA has been realized. The enzyme immunoassay (ELISA) offer several advantages over IFA method of detecting ANA such as ease of operation and not requiring skills needed to perform and read IFA reactions<sup>11-15</sup>. As the ANA are sensitive but not specific indicators of a connective tissue disease, it is recommended that more specific antibody tests be performed in patients with positive ANA suspected of having an autoimmune connective tissue disorder. Also it is suggested that positive ANA results on ELISA may be confirmed by indirect IF on Hep2 as this may also help to identify the reaction pattern of the ANA reaction which has significance<sup>16</sup>.

### PRINCIPLES OF PROCEDURES

The ANA test is performed as a solid phase immunoassay (ELISA). Microwells of the microplate are coated with antigens from the Hep2 supplemented with other nuclear and cytoplasmic antigens followed by blocking the unreacted sites to reduce nonspecific binding. Controls, calibrator and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows ANA present in the serum to bind to the adsorbed antigen on the microwells. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Antibodies bound to the microwells are detected by adding enzyme labeled anti-human IgG conjugates to the wells. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the ANA bound to the antigen coated wells. Unbound enzyme conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells and the presence of ANA are detected by a color change produced by the conversion of the substrate to a color product. The reaction is stopped by the addition of stop solution and the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 450nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml).

### 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. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

#### Precautions

For *in vitro* diagnostic use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA licensed tests. However, human blood derivatives and patient specimens should always be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>17</sup>.

EN

**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.

Dispose of reagent solutions containing sodium azide and Proclin as preservatives according to all local, state and national regulations.

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 lot 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

Immulin<sup>TM</sup> Anti-Nuclear Antibody Screen ELISA **REF** 1175

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

|            |                         |   |
|------------|-------------------------|---|
| 12 x 8     | <b>MICROPLATE ANA</b>   | <b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with anti-nuclear antigen.            |
| 1 x 1.5 ml | <b>CALIBRATOR ANA</b> * | Ready to use <b>Calibrator</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to ANA.      |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL + ANA</b> *  | Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for IgG ANA. |
| 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 HRP</b> *   | Ready to use <b>HRP 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 TMB</b> *  | Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . <b>Protect from light</b> .                                  |
| 1 x 12 ml  | <b>STOP H2SO4</b>       | Ready to use <b>Stop Solution</b> . Contains 0.5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                    |
| 2 x        | <b>BUF WASH</b>         | Powder <b>Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.   |

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

### Symbols used on labels:

**LOT** Lot number

**REF** Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Read instructions for use

**IVD** In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

EN

### Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettors 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 450nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

### 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 freeze and thaw of samples.

### PROCEDURE

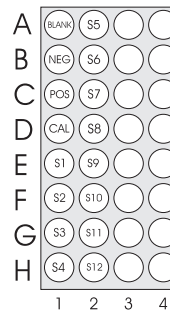
#### Procedural Notes

- 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.
- 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 and specimens 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** Consult the specimen layout for a proper distribution of specimens and reagents.

## SEMI-QUANTITATIVE



Specimen Layout

- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500 µl** of Serum Diluent.
- Step 5** Pipette **100 µl** of Ready to Use Calibrator, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.  
**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 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 towels. 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 into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 12** Incubate **microwells 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 **450 nm** using a single wavelength microplate reader set at zero absorbance. If a dual wavelength is used, set the reference filter to 620 nm.

**Quality Control**

Calibrators, 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 negative control must be  $<20$  EU/ml. If the test is run in duplicate, take the mean of the two readings to determine the concentration of ANA. We recommend borderline samples be tested with a fresh sample taken at a later date to ensure accuracy.

EN

## RESULTS

### Calculations

Concentrations of the patient samples can be determined as follows:

### QUALITATIVE DETERMINATION

Results obtained by this method should be reported as positive or negative.

**Abs. of Test Sample**

----- X EU/ml of Calibrator = EU/ml Test Sample

**Abs. of Calibrator**

### Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. These values were determined by testing 64 adult normal blood donors. The values depicted below are the mean of the normal subjects plus 3SD. Each laboratory must determine its own normal values.

| <b>ANA value</b> | <b>Interpretation</b>      |
|------------------|----------------------------|
| <20 EU/ml        | Negative                   |
| 20-25 EU/ml      | Indeterminate (Borderline) |
| >25 EU/ml        | Positive                   |

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

ANA should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. The method should be used for testing human serum samples only. Results obtained serve only as an aid in the diagnosis and should not be interpreted as diagnostic in themselves. Some patients with some of the connective tissue disorders may be ANA negative. Similarly as the ANA occur in other than connective tissue disorders and hence the presence of ANA must be interpreted in light of clinical and other laboratory findings which may include antigen specific tests such as to RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B(La) and other nuclear and cytoplasmic antigens.

### EXPECTED VALUES

The expected values in a normal population are negative (<20 EU/ml for adults and children). However, it has been determined that some apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for ANA.

### Anti-Nuclear Antibodies (ANA) and Disease Association

| <b>Disease</b>        | <b>% Incidence</b> |
|-----------------------|--------------------|
| SLE                   | 95-100             |
| Scleroderma           | 60-90              |
| MCTD                  | 100                |
| Sjogren's syndrome    | 40-70              |
| Poly/Dermato-myositis | 30-80              |
| Juvenile arthritis    | 20-50              |
| Raynaud's             | 20-60              |
| Rheumatoid arthritis  | 30-50              |
| Infectious disease    | ?                  |
| Thyroid disease       | 30-50              |
| Fibromyalgia          | 15-25              |
| Normal subjects       | ~10                |

Kavanaugh A et al Arch :Pathol Lab Med 2000;124:71-81

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ ANA ELISA was determined by comparing the results with:

- a) another commercially available ANA ELISA method and
- b) ANA immunofluorescence method on Hep2.

Normal Range: The normal range was established by testing 64 serum samples from apparently healthy donors obtained from the Red Cross. The mean plus three standard deviations of the mean of this normal population was used to determine the cut-off between normal and borderline positive individuals.

### Comparative Specificity and Sensitivity

Immulisa™ ANA ELISA vs. another commercial ANA ELISA Method: A total of 66 samples were tested on the Immulisa™ ANA kit and another commercially available FDA approved ANA ELISA kit. The results of these studies follow:

|             |          | Immulisa™ ANA ELISA |          |       |
|-------------|----------|---------------------|----------|-------|
|             |          | Positive            | Negative | Total |
| Other ELISA | Positive | 41                  | 5        | 46    |
|             | Negative | 8                   | 12       | 20    |
|             | Total    | 49                  | 17       | 66    |

Relative Agreement: 80%

Relative Sensitivity: 89%

Relative Specificity: 60%

B. To ensure the reliability of Immulisa™ ANA in detecting ANA, sera were also tested on HEp2, the substrate of choice of detecting ANA by immunofluorescence. Immulisa™ ANA ELISA vs. Immulisa™ ANA on HEp2: A total of 292 samples were tested for ANA and the results are summarized below:

|          |          | Immulisa™ ANA |          |       |
|----------|----------|---------------|----------|-------|
|          |          | Positive      | Negative | Total |
| ANA HEp2 | Positive | 123           | 7        | 130   |
|          | Negative | 6             | 156      | 162   |
|          | Total    | 129           | 163      | 292   |

Relative Agreement: 96%

Relative Sensitivity: 95%

Relative Specificity: 96%

C. Cross Reactivity: A total of 55 disease controls from other autoimmune diseases usually known to be ANA negative such as pemphigus were tested. Only four were tested positive which is about the same number reported to be positive in normal subjects.

### Precision:

Based on 10 replicates, the intra-assay and inter-assay Coefficient of Variation (CV) of the ANA ELISA test were calculated.

|        | Inter-assay |      | Intra-assay |      |
|--------|-------------|------|-------------|------|
|        | EU/ml       | CV   | EU/ml       | CV   |
| High   | 107.7       | 6.4% | 125.9       | 6.8% |
| Medium | 51.4        | 6.2% | 52.7        | 7.0% |
| Low    | 19.5        | 5.2% | 20.3        | 8.1% |

EN

**Recovery:**

Samples with known ANA antibody concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of ANA antibody. ANA levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results are as follows:

|                 | <b>Anti-ANA</b><br><b>Abs. conc. added</b><br><b>(EU/ml)</b> | <b>anti-hu tTG</b><br><b>Abs. conc. obtained</b><br><b>(EU/ml)</b> | <b>% Recovery</b> |
|-----------------|--|--|-------------------|
| <b>Sample 1</b> | 91.6   | 82.2   | 111.4             |
| <b>Sample 2</b> | 93.5   | 93.4   | 100.1             |
| <b>Sample 3</b> | 66.9   | 68.0   | 98.4              |



## Μέθοδος ELISA διαλογής για αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1175 Μέθοδος ELISA διαλογής για αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) 96 Προσδιορισμοί

### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων και αντισωμάτων κατά του κυτταροπλάσματος σε ανθρώπινο ορό, που υποβοηθά στη διάγνωση των αυτοάνοσων παθήσεων όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), το σύνδρομο Sjögren (SS), η μικτή νόσος του συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ) και η σκληροδερμία.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) είναι μια ομάδα αντισωμάτων τα οποία στρέφονται κατά διαφόρων πυρηνικών αντιγόνων και κατά ορισμένων κυτταροπλασματικών αντιγόνων. Οι ορολογικές εξετάσεις για ANA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη διάγνωση διαφόρων αυτοάνοσων διαταραχών του συνδετικού ιστού, ειδικά του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (ΣΕΛ), της σκληροδερμίας, της μικτής νόσου του συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ) και του συνδρόμου Sjogren<sup>1-5</sup>. Τα αντισώματα ANA ανιχνεύονται συνήθως με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε κύτταρα Hep2<sup>6-10</sup>. Εξαιτίας ορισμένων περιορισμών της μεθόδου έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA), έχει αναγνωριστεί η ανάγκη μιας μη υποκειμενικής μεθόδου ανίχνευσης των ANA. Η μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) διαθέτει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι της μεθόδου IFA για την ανίχνευση αντισωμάτων ANA, όπως είναι η ευκολία χρήσης και το γεγονός ότι δεν απαιτεί τις δεξιότητες που είναι απαραίτητες για την εκτέλεση και ανάγνωση των αντιδράσεων IFA<sup>11-15</sup>. Καθώς τα ANA αποτελούν ευαίσθητους, αλλά όχι ειδικούς δείκτες παθήσεων του συνδετικού ιστού, συνιστάται η εκτέλεση πιο ειδικών αναλύσεων αντισωμάτων σε ασθενείς με θετικά ANA, για τους οποίους υπάρχει υποψία αυτοάνοσης διαταραχής του συνδετικού ιστού. Επίσης, προτείνεται τα θετικά αποτελέσματα για αντισώματα ANA με τη μέθοδο ELISA να επιβεβαιώνονται με έμμεσο IF σε κύτταρα Hep2, καθώς αυτό ενδέχεται επίσης να συμβάλλει στην αναγνώριση του προτύπου της αντίδρασης ANA, το οποίο είναι σημαντικό<sup>16</sup>.

### ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η ανάλυση αντισωμάτων ANA διενεργείται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης (ELISA). Οι μικροκυψελίδες του πλακιδίου επικαλύπτονται με αντιγόνα από κύτταρα Hep2 και άλλα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά αντιγόνα και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν παρουσίασαν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, ο βαθμονομητής και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων ANA του ορού με αντιγόνο που έχει απορροφηθεί πάνω στις μικροκυψελίδες. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν στις μικροκυψελίδες ανιχνεύονται με την προσθήκη σε αυτές σημασμένων με ένζυμο συζευκτικών αντισωμάτων κατά της ανθρώπινης IgG. Αυτά τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ANA που έχει δεσμευθεί στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα με το ένζυμο απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (TMB) στις κυψελίδες και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων ANA από την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος τερματισμού και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται με φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 450nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

### 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. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν

ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

### Προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση. 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 πάντα να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών<sup>17</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.

Απορρίψτε τα διαλύματα των αντιδραστηρίων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου και Proclin ως συντηρητικά, σύμφωνα με όλους τους τοπικούς και εθνικούς κανονισμούς.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του kit. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό παρτίδας 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 μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

### Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA διαλογής για αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) ImmuLisa™ **REF** 1175

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

|            |                         |   |
|------------|-------------------------|---|
| 12 x 8     | <b>MICROPLATE ANA</b>   | <b>Πλακίδιο</b> ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιπυρηνικό αντιγόνο.                         |
| 1 x 1.5 ml | <b>CALIBRATOR ANA</b> * | Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής</b> (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ANA.            |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL + ANA</b> *  | Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα θετικού ελέγχου</b> (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα IgG ANA. |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL -</b> *      | Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.                               |
| 1 x 12 ml  | <b>IgG-CONJ HRP</b> *   | Έτοιμο προς χρήση <b>HRP συζυγές</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 TMB</b> *  | Έτοιμο προς χρήση <b>ενζυμικό υπόστρωμα</b> . <b>Να προστατεύεται από το φως</b> .                                    |
| 1 x 12 ml  | <b>STOP H2S04</b>       | Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα τερματισμού</b> . Περιέχει 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .                        |

EL

2 x

**BUF** **WASH**


Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. 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
- 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 450 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

#### 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. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι 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

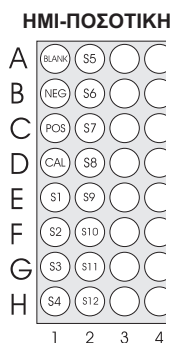
- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, επί τουλάχιστον 30 λεπτά, προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια 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 συμπύκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

### **Μέθοδος ανάλυσης**

- Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- 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.
- Βήμα 3** Συμβουλευτείτε τη διαμόρφωση των δειγμάτων σχετικά με την κατάλληλη κατανομή των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.



**Διαμόρφωση δειγμάτων**

- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **500 μl** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.  
**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 αντιδραστηρίου 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.

EL

- Βήμα 8** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 9** Επωάστε 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** Επωάστε τα **πλακίδια 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 **450 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού μήκους κύματος που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν. Εάν χρησιμοποιηθεί συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, ρυθμίστε το φίλτρο αναφοράς στα 620 nm.

#### Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι  $<0,3$ . Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή  $<20$  EU/ml. Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων ANA. Οι αναλύσεις των δειγμάτων που δίνουν οριακές τιμές συνιστάται να επαναλαμβάνονται με φρέσκο δείγμα που λαμβάνεται σε μεταγενέστερη ημερομηνία, προκειμένου να διασφαλίζεται η ακρίβεια.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν ως εξής:

##### ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο θα πρέπει να αναφέρονται ως θετικά ή ως αρνητικά.

**Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος**

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

**Απ/ση του βαθμονομητή**

##### Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Αυτές οι τιμές προσδιορίστηκαν με την ανάλυση 64 φυσιολογικών ενηλίκων αιμοδοτών. Οι τιμές που απεικονίζονται παρακάτω είναι η μέση τιμή των φυσιολογικών ατόμων συν 3 τυπικές αποκλίσεις. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

| Τιμή ANA    | Ερμηνεία               |
|-------------|------------------------|
| $<20$ EU/ml | Αρνητικό               |
| 20-25 EU/ml | Απροσδιόριστο (οριακό) |
| $>25$ EU/ml | Θετικό                 |

##### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση ANA δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση

EL

δειγμάτων ορού ανθρώπου. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά. Ορισμένοι ασθενείς με διαταραχές του συνδετικού ιστού ενδέχεται να είναι αρνητικοί για ANA. Παρομοίως, εφόσον τα ANA απαντώνται και σε άλλες διαταραχές, εκτός από τις διαταραχές του συνδετικού ιστού, η παρουσία τους θα πρέπει να ερμηνεύεται υπό το πρίσμα των κλινικών και των λοιπών εργαστηριακών ευρημάτων, τα οποία ενδέχεται να περιλαμβάνουν αναλύσεις ειδικές για κάποιο αντιγόνο, όπως το RNP, το Sm, το SS-A (Ro), το SS-B(La) και άλλα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά αντιγόνα.

#### ANAMENOMENES TIMEΣ

Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές (<20 EU/ml για ενήλικες και παιδιά). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι ορισμένα ασυμπτωματικά, φαινομενικά υγιή άτομα, ενδέχεται να βρεθούν θετικά σε αντισώματα ANA.

#### Αντι πυρηνικά αντισώματα (ANA) και συσχέτιση με νόσο

| Νόσος                  | % Συχνότητα εμφάνισης |
|------------------------|-----------------------|
| ΣΕΛ                    | 95-100                |
| Σκληροδερμία           | 60-90                 |
| ΜΝΣΙ                   | 100                   |
| Σύνδρομο Sjögren       | 40-70                 |
| Πολυ/Δερματομυοσίτιδα  | 30-80                 |
| Νεανική αρθρίτιδα      | 20-50                 |
| Raynaud                | 20-60                 |
| Ρευματοειδής αρθρίτιδα | 30-50                 |
| Λοιμώδης νόσος         | ?                     |
| Θυρεοειδοπάθεια        | 30-50                 |
| Ινομυαλγία             | 15-25                 |
| Φυσιολογικά άτομα      | ~10                   |

*Kavanaugh A et al Arch :Pathol Lab Med 2000;124:71-81*

#### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα της μεθόδου ELISA για αντισώματα ANA ImmuLisa™ προσδιορίστηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με:

- α) μία άλλη μέθοδο ELISA ANA που διατίθεται στο εμπόριο και
- β) μία μέθοδο ανοσοφθορισμού ANA σε κύτταρα Hep2.

Φυσιολογικό εύρος: Το φυσιολογικό εύρος καθορίστηκε με την ανάλυση 64 δειγμάτων ορού από φαινομενικά υγιείς δότες που προήλθαν από τον Ερυθρό Σταυρό. Για τον προσδιορισμό της οριακής τιμής (cut-off) μεταξύ των φυσιολογικών και των οριακά θετικών ατόμων, χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή συν τρεις τυπικές αποκλίσεις της μέσης τιμής αυτού του φυσιολογικού πληθυσμού.

#### Συγκριτική ειδικότητα και ευαισθησία

A. Μέθοδος ELISA ANA ImmuLisa™ έναντι μίας άλλης μεθόδου ELISA ANA: Συνολικά αναλύθηκαν 66 δείγματα με το kit ANA ImmuLisa™ και ένα άλλο kit ELISA, εγκεκριμένο από τον FDA, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι τα ακόλουθα:

EL

|                       |          | ANA ELISA Immulisa™ |          |        |
|-----------------------|----------|---------------------|----------|--------|
|                       |          | Θετικά              | Αρνητικά | Σύνολο |
| Άλλη μέθοδος<br>ELISA | Θετικά   | 41                  | 5        | 46     |
|                       | Αρνητικά | 8                   | 12       | 20     |
|                       | Σύνολο   | 49                  | 17       | 66     |

Σχετική συμφωνία: 80%  
Σχετική ευαισθησία: 89%  
Σχετική ειδικότητα: 60%

Β. Για να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία της μεθόδου για ANA Immulisa™ στην ανίχνευση ANA, οι οροί αναλύθηκαν επίσης και σε κύτταρα HEp2, το υπόστρωμα εκλογής για την ανίχνευση ANA με ανοσοφθορισμό. Μέθοδος ELISA για ANA Immulisa™ έναντι μεθόδου για ANA Immulisa™ σε κύτταρα HEp2: Συνολικά αναλύθηκαν 292 δείγματα για αντισώματα ANA και τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω:

|          |          | ANA ELISA Immulisa™ |          |        |
|----------|----------|---------------------|----------|--------|
|          |          | Θετικά              | Αρνητικά | Σύνολο |
| ANA HEp2 | Θετικά   | 123                 | 7        | 130    |
|          | Αρνητικά | 6                   | 156      | 162    |
|          | Σύνολο   | 129                 | 163      | 292    |

Σχετική συμφωνία: 96%  
Σχετική ευαισθησία: 95%  
Σχετική ειδικότητα: 96%

Γ. Διασταυρούμενη αντίδραση: Αναλύθηκαν συνολικά 55 μάρτυρες της νόσου με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις οι οποίες είναι συνήθως αρνητικές για αντισώματα ANA, όπως η πέμφιγα. Μόνο τέσσερις από αυτούς που εξετάστηκαν βρέθηκαν θετικοί, περίπου όσοι βρέθηκαν θετικοί και στην ομάδα των υγιών ατόμων.

#### Ακρίβεια:

Με βάση ανάλυση 10 αντιγράφων, υπολογίστηκε ο συντελεστής ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών της ανάλυσης ANA ELISA.

|         | Μεταξύ σειρών |      | Εντός σειράς |      |
|---------|---------------|------|--------------|------|
|         | EU/ml         | CV   | EU/ml        | CV   |
| Υψηλός  | 107,7         | 6,4% | 125,9        | 6,8% |
| Μέτριος | 51,4          | 6,2% | 52,7         | 7,0% |
| Χαμηλός | 19,5          | 5,2% | 20,3         | 8,1% |

#### Ανάκτηση:

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

| Δείγμα   | Αντι-ANA                           | Αντι-tTG                        | Ανάκτηση % |
|----------|------------------------------------|---------------------------------|------------|
|          | Συγκέντρωση που προστέθηκε (EU/ml) | Συγκέντρωση που λήφθηκε (EU/ml) |            |
| Δείγμα 1 | 91,6                               | 82,2                            | 111,4      |
| Δείγμα 2 | 93,5                               | 93,4                            | 100,1      |
| Δείγμα 3 | 66,9                               | 68,0                            | 98,4       |

ES



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## Ensayo ELISA Screen para detección de anticuerpos anti nucleares (ANA)

IVD

### PROSPECTO

REF 1175 Ensayo ELISA Screen para detección de anticuerpos anti nucleares 96 analisis

#### USO PREVISTO

Enzimoimmunoensayo ELISA para la detección de anticuerpos antinucleares y citoplasmáticos en suero humano, como herramienta de diagnóstico en patologías autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren (SS), enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD) y esclerodermia.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son un grupo de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos nucleares y algunos citoplasmáticos. Los análisis serológicos para detección de ANA desempeñan un papel importante en el diagnóstico de varias patologías autoinmunes del tejido conectivo, en especial lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD) y síndrome de Sjögren<sup>1-5</sup>. Los anticuerpos ANA se detectan habitualmente mediante inmunofluorescencia indirecta en HEp2<sup>6-10</sup>.

Sin embargo, algunas limitaciones del método por IF hicieron sentir la necesidad de un método no subjetivo para detectar los ANA. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) ofrece numerosas ventajas con respecto al método IFA en la detección de ANA, tales como ser más fácil de ejecutar y no requerir la preparación especial necesaria para efectuar y leer las reacciones IF<sup>11-15</sup>. Dado que los ANA, aún siendo sensibles, no son marcadores específicos de una patología determinada del tejido conectivo, se recomienda efectuar análisis de anticuerpos más específicos en pacientes positivos a ANA en los que se sospeche la presencia de una enfermedad autoinmune del tejido conectivo. Ante resultados positivos a ANA obtenidos con ELISA, es aconsejable confirmarlos mediante IF indirecta en HEp2, porque podría ser de ayuda en la identificación del patrón de reacción de ANA que reviste importancia<sup>16</sup>.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis ANA consiste en un inmunoensayo de fase sólida (ELISA). Los pocillos de la microplaca se recubren con antígenos procedentes de HEp2 complementados con otros antígenos nucleares y citoplasmáticos; a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir uniones no específicas. Se incuban los controles, calibradores y muestra de suero del paciente en los pocillos recubiertos de antígeno permitiendo que los anticuerpos ANA presentes en el suero se unan al antígeno absorbido en los pocillos. 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 en los pocillos. Estos anticuerpos de conjugado enzimático se unen específicamente a los ANA ligados al antígeno que recubre los pocillos. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado. Luego se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (TMB). La presencia de ANA se detecta por el cambio de color provocado por la conversión del sustrato en un producto coloreado. Se detiene la reacción añadiendo solución stop y se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo, mediante un espectrofotómetro a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades ELISA por mililitro (EU/ml).

#### 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).

Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

### Precauciones

Para diagnóstico *in vitro*. 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>17</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.

Elimine las soluciones de reactivos que contienen azida de sodio y Proclin conforme con la normativa local y nacional sobre la materia.

**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 para anticuerpos anti nucleares ImmuLisa™ **REF** 1175

El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 96 análisis.

|            |                         |  |
|------------|-------------------------|--|
| 12 x 8     | <b>MICROPLATE ANA</b>   | <b>Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígenos antinucleares.</b> |
| 1 x 1.5 ml | <b>CALIBRATOR ANA</b> * | <b>Calibrador listo para usar (tapa verde).</b> Suero humano con anticuerpos anti ANA.               |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL + ANA</b> *  | <b>Control Positivo listo para usar (tapa roja).</b> Suero humano con anticuerpos anti IgG ANA.      |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL -</b> *      | <b>Control Negativo listo para usar (tapa blanca).</b> Contiene suero humano.                        |
| 1 x 12 ml  | <b>IgG-CONJ HRP</b> *   | <b>Conjugado HRP listo para usar.</b> Color rosado.  |
| 1 x 60 ml  | <b>DIL</b> *            | <b>Diluyente de suero listo para usar.</b> Color azul.   |
| 1 x 12 ml  | <b>SUBSTRATE TMB</b> *  | <b>Substrato enzimático listo para usar. Protéjase de la luz.</b>                                    |
| 1 x 12 ml  | <b>STOP H2S04</b>       | <b>Solución Stop lista para usar.</b> Contiene 0,5M H2SO4  |
| 2 x        | <b>BUF WASH</b>         | <b>Tampón de lavado en polvo.</b> Reconstituir cada unidad hasta un litro.                           |







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

### Símbolos utilizados en las etiquetas:

**LOT** Número de lote

**REF** Número de catálogo

ES

-  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
- 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 450 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

### **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 desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C 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.
- 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.

ES

### 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** Consulte el esquema de muestras para la correcta distribución de muestras y reactivos.

#### SEMI CUANTITATIVO

|   |       |     |   |   |   |   |
|---|-------|-----|---|---|---|---|
| A | BLANQ | 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 |

Esquema de muestras

- Paso 4** Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500 µl de diluyente de suero**.
- Paso 5** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, controles positivo y negativo y muestras del paciente en los correspondientes pocillos siguiendo la hoja de protocolo.  
**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.
- Paso 11** Pipetee **100 µl de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado**.
- Paso 12** Incube **los pocillos 30 minutos** ( $\pm 5$  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 **450 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple regulado en absorbancia cero. Si dispone de un lector de longitud de onda doble, ajuste el filtro de referencia en 620 nm.

### 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  $<0,3$ . El resultado del control negativo debe ser  $<20$  EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar la concentración de ANA. Con la finalidad de verificar la precisión, aconsejamos analizar las muestras de resultado incierto con una muestra nueva tomada en fecha posterior.

ES

## RESULTADOS

### Cálculo

La concentración en las muestras del paciente pueden determinarse como sigue:

### DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Los resultados obtenidos por este método se indicarán como positivos o negativos.

### Abs. de muestra analizada

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

### Abs. del calibrador

### Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Los valores se establecieron analizando sangre de 64 donantes adultos sanos. Los valores indicados más abajo representan el promedio de los sujetos normales más 3DS.

Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

| Valores ANA | Interpretación            |
|-------------|---------------------------|
| <20 EU/ml   | Negativo                  |
| 20-25 EU/ml | Incierto (valores límite) |
| >25 EU/ml   | Positivo                  |

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo ANA no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente par analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos son una herramienta más en el diagnóstico y no deben interpretarse como diagnóstico en sí mismos. Algunos pacientes con patologías del tejido conectivo pueden resultar negativos a ANA. Del mismo modo, los ANA pueden estar presentes en otras patologías que no sean del tejido conectivo y por tanto la presencia de ANA debe interpretarse a la luz de otros estudios de laboratorio, que podrían incluir análisis específicos de detección de antígenos anti-RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La) y otros antígenos nucleares y citoplasmáticos.

### VALORES ESPERADOS

Los valores esperados en una población normal son negativos (<20 EU/ml en adultos y niños). Pese a ello, se ha demostrado que algunos individuos aparentemente sanos y asintomáticos pueden resultar positivos a ANA.

#### **Asociación entre anticuerpos anti nucleares (ANA) y enfermedad**

| Enfermedad             | % Incidencia |
|------------------------|--------------|
| LES                    | 95-100       |
| Esclerodermia          | 60-90        |
| MCTD                   | 100          |
| Síndrome de Sjögren    | 40-70        |
| Poli/dermatomitosi     | 30-80        |
| Artritis juvenil       | 20-50        |
| Raynaud                | 20-60        |
| Artritis reumatoide    | 30-50        |
| Enfermedad infecciosa  | ?            |
| Enfermedad de tiroides | 30-50        |
| Fibromialgia           | 15-25        |
| Individuos normales    | ~10          |

*Kavanaugh A et al Arch :Pathol Lab Med 2000;124:71-81*

### CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN

La utilidad del ensayo ImmuLisa™ ANA ELISA se determinó comparando los resultados con:

- otro método ANA ELISA disponible en comercio;
- método inmunofluorescente ANA en Hep2.

Valores normales: los valores normales se determinaron analizando 64 muestras de suero de donantes sanos. Para establecer la línea de demarcación entre individuos sanos e inciertos positivos se tomó la media más 3DS de esta población normal.

#### Especificidad y sensibilidad comparadas

**A.** ImmuLisa™ ANA ELISA comparado con otro método comercial ANA ELISA: se analizaron 66 muestras con el ensayo ImmuLisa™ ANA y con otro sistema ANA ELISA disponible en comercio y aprobado por la FDA. Los resultados se indican a continuación:

|            |          | ELISA ANA ImmuLisa™ |          |       |
|------------|----------|---------------------|----------|-------|
|            |          | Positivo            | Negativo | Total |
| Otro ELISA | Positivo | 41                  | 5        | 46    |
|            | Negativo | 8                   | 12       | 20    |
|            | Total    | 49                  | 17       | 66    |

Correspondencia relativa: 80%

Sensibilidad relativa: 89%

Especificidad relativa: 60%

**B.** Para garantizar la fiabilidad de ImmuLisa™ ANA en la detección de ANA, los sueros se analizaron también en HEp2, el substrato de elección para detectar ANA mediante inmunofluorescencia. Ensayo ELISA ANA ImmuLisa™ comparado con ANA en HEp2 ImmuLisa™: se analizó un total de 292 muestras, los resultados se indican abajo:

|          |          | ANA ImmuLisa™ |          |       |
|----------|----------|---------------|----------|-------|
|          |          | Positivo      | Negativo | Total |
| ANA HEp2 | Positivo | 123           | 7        | 130   |
|          | Negativo | 6             | 156      | 162   |
|          | Total    | 129           | 163      | 292   |

Correspondencia relativa: 96%

Sensibilidad relativa: 95%

Especificidad relativa: 96%

**C.** Reactividad cruzada: se analizó un total de 55 controles de patologías de otras enfermedades autoinmunes habitualmente negativas a ANA, tales como penfigus. Solo cuatro resultaron positivas, número prácticamente equivalente al establecido como positivo en individuos normales.

#### Precisión:

Basándose en 10 duplicados, se calculó el coeficiente de variación (CV) intra ensayo e inter ensayo de la prueba ELISA ANA.

|       | Inter-ensayo |      | Intra-ensayo |      |
|-------|--------------|------|--------------|------|
|       | UE/ml        | CV   | EU/ml        | CV   |
| Alto  | 107,7        | 6,6% | 125,9        | 6,8% |
| Medio | 51,4         | 6,2% | 52,7         | 7,0% |
| Bajo  | 19,5         | 5,2% | 20,3         | 8,1% |

ES

**Recuperación:**

Muestras con concentración conocida de anticuerpos ANA se mezclaron con la dilución adecuada de otra muestra positiva con cantidad conocida de anticuerpos ANA. Se determinaron los niveles de ANA 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-ANA</b>           | <b>anti-hu tTG</b>         |                       |
|------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
|                  | <b>Abs. conc. añadida</b> | <b>Abs. conc. obtenida</b> | <b>% Recuperación</b> |
|                  | <b>(EU/ml)</b>            | <b>(EU/ml)</b>             |                       |
| <b>Muestra 1</b> | 91,6                      | 82,2                       | 111,4                 |
| <b>Muestra 2</b> | 93,5                      | 93,4                       | 100,1                 |
| <b>Muestra 3</b> | 66,9                      | 68,0                       | 98,4                  |



## ELISA-Screeningtest für antinukleäre Antikörper (ANA)

IVD

### BEIPACKTEXT

REF 1175 Antinukleäre-Antikörper-ELISA-Screeningtest 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis von antinukleären und zytoplasmatischen Antikörpern in Humanserum als Hilfsmittel bei der Diagnose von Autoimmunkrankheiten wie systemischem Lupus erythematodes (SLE), Sjögren-Syndrom (SS), Mischkollagenose (MCTD) und Sklerodermie.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antinukleäre Antikörper (ANA) sind eine Gruppe von Antikörpern, die gegen verschiedene nukleäre und einige zytoplasmatische Antigene gerichtet sind. Serologische Tests für ANA spielen eine wichtige Rolle bei der Diagnose verschiedener autoimmuner Bindegewebskrankheiten, insbesondere für systemischen Lupus erythematodes (SLE), Sklerodermie, Mischkollagenose (MCTD) und Sjögren-Syndrom<sup>1-5</sup>. ANA werden normalerweise mittels indirekter Immunfluoreszenz auf HEp2 nachgewiesen<sup>6-10</sup>. Aufgrund gewisser Einschränkungen der IFA-Methode bestand die Notwendigkeit einer nicht-subjektiven Methode für den Nachweis von ANA. Der Enzymimmuntest (ELISA) bietet mehrere Vorteile gegenüber der IFA-Methode für den Nachweis von ANA, z.B. eine einfache Anwendung und die Tatsache, dass das für die Durchführung und das Ablesen von IFA-Reaktionen notwendige Fachkönnen überflüssig ist<sup>11-15</sup>. Da ANA sensitive aber nicht spezifische Anzeichen für eine Bindegewebskrankheit sind, wird empfohlen, bei Patienten mit einem positiven ANA-Ergebnis, bei denen ein Verdacht auf eine autoimmune Bindegewebskrankheit besteht, spezifischere Antikörpertests durchzuführen. Es wird außerdem empfohlen, positive ANA-Ergebnisse mit ELISA durch indirekte IF auf HEp2 zu bestätigen, da dies dabei helfen kann, das Reaktionsmuster der ANA-Reaktion, welches ebenfalls Bedeutung hat, zu identifizieren<sup>16</sup>.

### TESTPRINZIP

Der ANA-Test wird als Festphasen-Immuntest durchgeführt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden mit Antigenen von HEp2, die um andere nukleäre und zytoplasmatische Antigene ergänzt wurden, beschichtet, und die unreaktierten Stellen werden blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibrator und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen ANA an die in der Mikrotitervertiefung vorhandenen adsorbierten Antigene. Nicht-gebundene Antikörper und andere Serumproteine werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. An die Vertiefungen gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an die ANA, die an die antigenbeschichteten Vertiefungen gebunden sind. Nicht-gebundenes Enzymkonjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (TMB) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von ANA wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 450 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

### REAGENZNIEN

#### 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. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

DE

### Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA genehmigten 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>17</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.

Entsorgen Sie Reagenzienlösungen, die Natriumazid oder Proclin als Konservierungsmittel enthalten, allen örtlichen, regionalen und nationalen Regelungen entsprechend.

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 Chargennummer. 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.

### Mitgelieferte Materialien

ImmLisa™ Antinukleäre-Antikörper-ELISA-Screeningtest **REF** 1175

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

|            |                         |  |
|------------|-------------------------|--|
| 12 x 8     | <b>MICROPLATE ANA</b>   | <b>Mikrotiterplatte</b> mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit antinukleärem Antigen beschichtet |
| 1 x 1.5 ml | <b>CALIBRATOR ANA</b> * | Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator</b> ( <i>grüne Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen ANA.              |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL + ANA</b> *  | Gebrauchsfertiges <b>positives Kontrollserum</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Enthält IgG-ANA-positives Humanserum.  |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL -</b> *      | Gebrauchsfertiges <b>negatives Kontrollserum</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Humanserum.                   |
| 1 x 12 ml  | <b>IgG-CONJ HRP</b> *   | Gebrauchsfertiges <b>HRP-Konjugat</b> . Farbkennzeichnung rosa.  |
| 1 x 60 ml  | <b>DIL</b> *            | Gebrauchsfertiger <b>Serumverdünner</b> . Farbkennzeichnung blau.  |
| 1 x 12 ml  | <b>SUBSTRATE TMB</b> *  | Gebrauchsfertiges <b>Enzymsubstrat</b> . <b>Vor Licht schützen</b> .   |
| 1 x 12 ml  | <b>STOP H2S04</b>       | Gebrauchsfertige <b>Stopplösung</b> . Enthält 0,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                              |
| 2 x        | <b>BUF WASH</b>         | <b>Waschpuffer in Pulverform</b> . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.                                    |

\* Enthält <0,1% NaN<sub>3</sub>






### Auf den Etiketten verwendete Symbole:

**LOT** Chargennummer

**REF** Bestellnummer

 Verwendbar bis

DE

-  Lagerungstemperatur
-  Gebrauchsanleitung lesen
-  In-vitro-Diagnostikum
-  Hersteller
-  Anzahl an Tests

### **Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien**

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- 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 450 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

### **PROBENTNAHME 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 Proben und Testreagenzien mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen, 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

DE

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 und Proben 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.
- Schritt 3** Konsultieren Sie die Probenanordnung für eine korrekte Verteilung der Proben und Reagenzien.

#### SEMI-QUANTITATIV

|   |       |     |   |   |   |   |
|---|-------|-----|---|---|---|---|
| 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 |

Probenanordnung

- Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **500 µl** Probenverdünner vermischen.
- Schritt 5** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten 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 über 0,3 liegen.
- 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** ( $\pm$  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 die Mikrotitervertiefungen **30 Minuten** ( $\pm$  5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 13** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge

DE

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 Mikrotitervertiefung **bei 450 nm** mit einem auf Null-Extinktion eingestellten Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge ab. Falls eine doppelte Wellenlänge verwendet wird, stellen Sie den Referenzfilter auf 620 nm ein.

#### **Qualitätskontrolle**

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive 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 Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, verwenden Sie den Mittelwert der beiden Messungen, um die Konzentration der ANA zu bestimmen. Im Fall von Proben im Grenzbereich empfehlen wir, mit einer frischen, zu einem späteren Zeitpunkt entnommenen Probe den Test zu wiederholen, um die Genauigkeit zu gewährleisten.

#### **ERGEBNISSE**

##### **Berechnungen**

Die Konzentrationen der Patientenproben können wie folgt bestimmt werden:

##### **Qualitative Bestimmung**

Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse sollten als positiv oder negativ gemeldet werden.

**Ext. der Testprobe**

----- X **EU/ml des Kalibrators = EU/ml Testprobe**

**Ext. von Kalibrator**

##### **Interpretation**

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Auslegung der Laborergebnisse. Diese Werte wurde bestimmt, indem 64 normale, erwachsene Blutspender getestet wurden. Die unten angezeigten Werte sind der Durchschnitt der normalen Testpersonen plus 3 SD. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

| <b>ANA-Wert</b> | <b>Interpretation</b>     |
|-----------------|---------------------------|
| <20 EU/ml       | negativ                   |
| 20-25 EU/ml     | unbestimmt (Grenzbereich) |
| >25 EU/ml       | positiv                   |

#### **EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS**

Der ANA-Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiologisch verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen. Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden. Einige Patienten mit einigen der Bindegewebskrankheiten können ANA-negativ sein. Andererseits können ANA bei anderen als den Bindegewebskrankheiten auftreten, und ihr Vorhandensein muss daher unter Berücksichtigung der klinischen Befunde und anderer Laborbefunde, zu denen antigen-spezifische Tests wie z.B. auf RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La und andere nukleäre und zytoplasmatische Antigene zählen, ausgelegt werden.

#### **ERWARTETE WERTE**

Die erwarteten Werte in einer normalen Bevölkerung sind negativ (<20 EU/ml in Erwachsenen und Kindern). Es wurde jedoch festgestellt, dass bei einigen anscheinend gesunden Personen ohne Symptome der Test auf ANA positiv ausfällt.

### Anti-nukleäre Antikörper (ANA) und Krankheitszusammenhang

| Krankheit             | Häufigkeit % |
|-----------------------|--------------|
| SLE                   | 95-100       |
| Sklerodermie          | 60-90        |
| MCTD                  | 100          |
| Sjögren-Syndrom       | 40-70        |
| Poly-/Dermatomyositis | 30-80        |
| Juvenile Arthritis    | 20-50        |
| Raynaud-Syndrom       | 20-60        |
| Rheumatoide Arthritis | 30-50        |
| Infektionskrankheit   | ?            |
| Schilddrüsenkrankheit | 30-50        |
| Fibromyalgie          | 15-25        |
| Normale Testpersonen  | ~10          |

*Kavanaugh A et al Arch :Pathol Lab Med 2000;124:71-81*

#### LEISTUNGSMERKMALE

Die Nützlichkeit des ImmuLisa™ ANA ELISA wurde bestimmt, indem die Ergebnisse mit folgenden Methoden verglichen wurden:

- einer anderen im Handel erhältlichen ANA-ELISA-Methode und
- ANA-Immunfluoreszenz-Methode auf HEp2.

Normaler Bereich: Der normale Bereich wurde bestimmt, indem 64 vom Roten Kreuz erhaltene Serumproben von anscheinend gesunden Spendern getestet wurden. Der Durchschnitt plus drei Standardabweichungen vom Durchschnitt dieser normalen Bevölkerung wurde verwendet, um die Trennlinie zwischen normalen und grenzwertig positiven Personen festzulegen.

#### Vergleichende Spezifität und Sensitivität

ImmuLisa™ ANA ELISA gegen eine andere im Handel erhältliche ANA-ELISA-Methode: Insgesamt 66 Proben wurden mit dem ImmuLisa™ ANA-Kit und einem anderen im Handel erhältlichen, von der FDA genehmigten ANA-ELISA-Kit untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien waren wie folgt:

|                  |         | ImmuLisa™ ANA ELISA |          |        |
|------------------|---------|---------------------|----------|--------|
|                  |         | Positiv             | Negative | Gesamt |
| anderer<br>ELISA | Positiv | 41                  | 5        | 46     |
|                  | Negativ | 8                   | 12       | 20     |
|                  | Gesamt  | 49                  | 17       | 66     |

Relative Übereinstimmung: 80%

Relative Sensitivität: 89%

Relative Spezifität: 60%

B. Um die Zuverlässigkeit von ImmuLisa™ ANA für den Nachweis von ANA zu gewährleisten, wurden die Seren auch auf HEp2 getestet, dem beim Nachweis von ANA mittels Immunfluoreszenz gewählten Substrat. ImmuLisa™ ANA-ELISA gegen ImmuLisa™ ANA auf HEp2: Insgesamt 292 Proben wurden auf ANA getestet. Die Ergebnisse sind untenstehend zusammengefasst:

DE

|          |         | ImmuLisa™ ANA |          |        |
|----------|---------|---------------|----------|--------|
|          |         | Positiv       | Negative | Gesamt |
| ANA HEp2 | Positiv | 123           | 7        | 130    |
|          | Negativ | 6             | 156      | 162    |
|          | Gesamt  | 129           | 163      | 292    |

Relative Übereinstimmung: 96%

Relative Sensitivität: 95%

Relative Spezifität: 96%

C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 55 Krankheitskontrollen von anderen Autoimmunkrankheiten, die normalerweise ANA-negativ sind (z.B. Pemphigus), wurden untersucht. Von diesen zeigten nur vier ein positives Ergebnis, was in etwa der Anzahl der positiven Ergebnisse bei normalen Testpersonen entspricht.

#### Genauigkeit:

Auf der Grundlage von 10 Wiederholungen wurden der intraserielle und der interserielle Variationskoeffizient (VK) des ANA-ELISA-Tests berechnet.

|         | interseriell |      | intraseriell |      |
|---------|--------------|------|--------------|------|
|         | EU/ml        | VK   | EU/ml        | VK   |
| Hoch    | 107,7        | 6,4% | 125,9        | 6,8% |
| Mittel  | 51,4         | 6,2% | 52,7         | 7,0% |
| Niedrig | 19,5         | 5,2% | 20,3         | 8,1% |

#### Wiederfindung:

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

|         | Anti-ANA                     | anti-hu tTG                  | % Wiederfindung |
|---------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
|         | AK-Konz. zugefügt<br>(EU/ml) | AK-Konz. gemessen<br>(EU/ml) |                 |
| Probe 1 | 91,6                         | 82,2                         | 111,4           |
| Probe 2 | 93,5                         | 93,4                         | 100,1           |
| Probe 3 | 66,9                         | 68,0                         | 98,4            |



# Anticorps anti-nucléaires (ANA) Screen ELISA

IVD

## ENCART DU PRODUIT

REF 1175 Anticorps Anti-nucléaires Screen Elisa 96 Tests

### USAGE PREVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destinée à la détection des anticorps antinucléaires et cytoplasmiques dans le sérum humain fournissant un support pour le diagnostic de maladies auto-immunes tels que le lupus érythémateux systémique (SLE), le syndrome de Sjögren, la connectivité mixte (MCTD), la sclérodermie.

### RESUME ET EXPLICATION

Les anticorps antinucléaires (ANA) représentent un groupe d'anticorps dirigés contre divers antigènes nucléaires et certains antigènes cytoplasmiques. Les tests sérologiques pour les antigènes antinucléaires jouent un rôle important pour le diagnostic de différentes maladies auto-immunes du tissu conjonctif, spécialement le lupus érythémateux systémique (SLE), la sclérodermie, la connectivité mixte (MCTD) et le syndrome de Sjogren<sup>1-5</sup>. Les antigènes antinucléaires (ANA) sont normalement détectés par l'immunofluorescence indirecte sur HEp2<sup>6-10</sup>. En raison de certaines limites de l'IFA, le besoin d'une méthode de détection non-subjective des ANA s'est fait sentir. Le test de dosage immuno-enzymatique (ELISA) offre de nombreux avantages par rapport à la méthode par immunofluorescence indirecte (IFA) de détection des ANA, tels que la facilité des opérations et le fait que aucune des compétences techniques nécessaires pour réaliser et lire les réactions en IFA (test immuno-fluorescent n'est exigée<sup>11-15</sup>. Dans la mesure où les ANA sont des indicateurs sensibles mais pas spécifiques d'une maladie du tissu conjonctif, il est conseillé de procéder à des tests d'anticorps plus spécifiques chez les patients qui présentent une positivité ANA et chez qui on suspecte une maladie auto-immune du tissu conjonctif. On conseille également que les résultats positifs aux anticorps anti-nucléaires ANA obtenus avec ELISA soient confirmés par une IF indirecte sur Hep2, dans la mesure où cela peut aider à identifier le modèle de réaction de la réaction ANA qui présente une signification<sup>16</sup>.

### PRINCIPES DE LA METHODE

Le test ANA est réalisé sous la forme d'un dosage immunologique sur phase solide (ELISA). Des microplaques à puits sont enduites d'antigènes du Hep2 additionnés d'autres antigènes nucléaires et cytoplasmiques, 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 ANA 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 en ajoutant un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux puits. Ces anticorps conjugués à une enzyme se lient spécifiquement aux ANA liés aux puits enduits d'antigènes. Le conjugué à une enzyme non-lié est éliminé par lavage. Un substrat enzyme spécifique est ensuite ajouté aux puits et la présence d'anticorps antinucléaires (ANA) est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion du substrat vers un produit coloré. La réaction est arrêtée par l'addition d'une solution d'arrêt et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 450nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU)/ml.

### 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. Quand il est entreposé à 2-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

## Précautions

Pour usage diagnostique *in vitro* Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV-I 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>17</sup>.

**AVERTISSEMENT** – L'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) 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.

Il faut éliminer les solutions de réactif qui contiennent de l'azide de sodium et du Proclin comme agents conservants conformément aux normes locales, régionales et nationales.

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 d'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

ImmULisa™ Anticorps Anti-nucléaires Screen Elisa **REF** 1175

L'équipement contient des réactifs qui sont suffisants pour exécuter 96 tests.

|            |                                |   |
|------------|--------------------------------|---|
| 12 x 8     | <b>MICROPLATE</b> <b>ANA</b>   | <b>Microplaques</b> avec micropuits individuels séparables enduits d'antigène anti-nucléaire.                             |
| 1 x 1.5 ml | <b>CALIBRATOR</b> <b>ANA</b> * | <b>Calibreur prêt à l'emploi</b> ( <i>couvercle vert</i> ), sérum humain contenant des anticorps antinucléaires ANA.      |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL</b> + <b>ANA</b> *  | <b>Régulateur positif</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle rouge</i> ). Contient du sérum humain positif pour anti-IgG ANA. |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL</b> - *             | <b>Régulateur négatif</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle blanc</i> ). Contient du sérum humain.                           |
| 1 x 12 ml  | <b>IgG-CONJ</b> <b>HRP</b> *   | <b>Conjugué HRP</b> prêt à l'emploi. Codé en 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>TMB</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>H2SO4</b>       | <b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi. Contient H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5M                                    |
| 2 x        | <b>BUF</b> <b>WASH</b>         | Poudre <b>Wash Buffer</b> (solution de lavage). Reconstituer en un litre chacun.  |

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

## Symboles utilisés sur les étiquettes:

**LOT** Numéro de lot

**REF** Numéro de référence catalogue

FR



A utiliser avant



Température de conservation



Lire les instructions d'utilisation



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
- 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 de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 450nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaques en mesure de dispenser 200 µl

### RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou atteints de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats du test 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 le test, 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 devraient 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 et les spécimens 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** Consulter le schéma des spécimens pour avoir une répartition appropriée des spécimens et des réactifs.

**SEMI-QUANTITATIF**

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

**Schéma des spécimens**

- Etape 4** Préparer une dilution **1:101** des échantillons patients en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **500 µl** de diluant de sérum.
- Etape 5** Pipeter **100 µl** des étalons prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés, conformément au feuillet de protocole.  
**Note** : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif blanc. Mettre à zéro le lecteur ELISA sur le réactif blanc. L'absorption du réactif 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. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque 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** ( $\pm 5$  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 chronométrer comme pour le conjugué.
- Etape 12** Incuber les **micropuits** pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  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.

FR

**Etape 14** Lire l'absorption de chaque puits à **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 450/630nm, programmé sur une absorption zéro. Si une longueur d'onde double est utilisée, il faut placer le filtre de référence à 620 nm.

#### **Contrôle de qualité**

Des étalons, des régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés à chaque essai pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanco devrait être inférieure à 0,3. Le régulateur négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, il faut prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer la concentration d'ANA. Nous conseillons de tester les échantillons limites avec un échantillon frais pris à une date plus tardive pour garantir l'exactitude.

#### **RESULTATS**

##### **Calculs**

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées comme suit :

##### **DOSAGE QUALITATIF**

Les résultats obtenus par cette méthode doivent être enregistrés comme étant positifs ou négatifs.

**Abs. de l'échantillon d'essai**

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

**Abs. de l'étalon**

##### **Interprétation**

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Ces valeurs ont été déterminées en testant 64 donateurs de sang adultes normaux. Les valeurs fournies ci-dessous représentent la moyenne des sujets normaux plus 3SD. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

| <b>Valeur anticorps antinucléaires ANA</b> | <b>Interprétation</b>    |
|--|--------------------------|
| <20 EU/ml                                  | Négatif                  |
| 20-25 EU/ml                                | Indéterminé (cas limite) |
| >25 EU/ml                                  | Positif                  |

#### **LIMITES DE LA PROCEDURE**

Le test ANA 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. Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes. Certains malades atteints de certaines maladies du tissu conjonctif peuvent être négatifs aux anticorps antinucléaires. De la même façon les anticorps antinucléaires ANA se manifestent dans d'autres maladies que les maladies du tissu conjonctif, en conséquence de quoi la présence de ceux-ci doit être interprétée sur la base des résultats cliniques et sur d'autres résultats de laboratoire qui peuvent inclure les tests antigènes spécifiques tels que RNP, Sm, SS A (Ro), SS-B(La) et d'autres antigènes nucléaires et cytoplasmiques.

#### **VALEURS ATTENDUES**

Les valeurs attendues dans une population normale sont négatives (< 20 EU/ml pour les adultes et les enfants). Cependant, on a remarqué que certains individus apparemment sains, asymptomatiques peuvent apparaître positifs aux anticorps antinucléaires.

### Association anticorps anti-nucléaires (ANA) et maladies

| Maladie                 | Incidence % |
|-------------------------|-------------|
| SLE                     | 95-100      |
| Sclérodermie            | 60-90       |
| Connectivité mixte      | 100         |
| Syndrome de Sjogren     | 40-70       |
| Poly/dermato-myosite    | 30-80       |
| Arthrite juvénile       | 20-50       |
| Raynaud                 | 20-60       |
| Polyarthrite rhumatoïde | 30-50       |
| Maladie infectieuse     | ?           |
| Maladie thyroïdienne    | 30-50       |
| Fibromyalgie            | 15-25       |
| Sujets normaux          | ~10         |

*Kavanaugh A et al Arch :Pathol Lab Med 2000;124:71-81*

### DONNEES DE RENDEMENT

L'utilité du test ImmuLisa™ ANA ELISA a été déterminée en comparant les résultats avec :

- une autre méthode ELISA ANA disponible dans le commerce et
- une méthode ANA par immunofluorescence sur Hep2.

Gamme normale : La gamme normale a été établie en testant 64 échantillons de sérum de donateurs apparemment sains obtenus par la Croix Rouge. La moyenne plus trois écarts types de la moyenne de cette population normale a été utilisée pour déterminer la valeur limite entre individus normaux et individus positifs limites.

### Spécificité et sensibilité comparatives :

ImmuLisa™ ANA ELISA vis-à-vis d'une autre méthode ELISA ANA disponible dans le commerce : Un total de 66 échantillons ont été testés sur le kit ImmuLisa™ ANA et un autre kit ANA ELISA approuvé par l'administration FDA. Les résultats de ces études sont les suivants :

|             |         | ImmuLisa™ ANA ELISA |          |       |
|-------------|---------|---------------------|----------|-------|
|             |         | Positif             | Negative | Total |
| Autre ELISA | Positif | 41                  | 5        | 46    |
|             | Négatif | 8                   | 12       | 20    |
|             | Total   | 49                  | 17       | 66    |

Concordance relative : 80%

Sensibilité relative : 89%

Spécificité relative : 60%

B. Pour garantir la précision de ImmuLisa™ ANA pour la détection ANA, les sérums ont également été testés sur HEp2, le substrat courant de détection ANA par immunofluorescence. ImmuLisa™ ANA ELISA vis-à-vis de ImmuLisa™ ANA sur HEp2 : un total de 292 échantillons ont été testés pour ANA et les résultats sont fournis ci-dessous :

FR

|          |         | ImmuLisa™ ANA |          |       |
|----------|---------|---------------|----------|-------|
|          |         | Positif       | Negative | Total |
| ANA HEp2 | Positif | 123           | 7        | 130   |
|          | Négatif | 6             | 156      | 162   |
|          | Total   | 129           | 163      | 292   |

Concordance relative : 96%

Sensibilité relative : 95%

Spécificité relative : 96%

C. Réactivité croisée : Un total de 55 systèmes de contrôle des maladies liées à d'autres maladies auto-immunes qui sont habituellement réputées être négatives ANA, telles que le pemphigus, ont été testés. Quatre seulement ont été testés positifs, ce qui équivaut au même nombre que celui qui est considéré comme étant positif chez les sujets normaux.

#### Précision :

Su la base de 10 mesures, le Coefficient de Variation intra et inter-test (CV) du test ANA ELISA a été calculé.

|         | inter-essai |      | intra-essai |      |
|---------|-------------|------|-------------|------|
|         | EU/ml       | CV   | EU/ml       | CV   |
| Élevée  | 107,7       | 6,4% | 125,9       | 6,8% |
| Moyenne | 51,4        | 6,2% | 52,7        | 7,0% |
| Basse   | 19,5        | 5,2% | 20,3        | 8,1% |

#### Récupération :

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps antinucléaires ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des montants connus d'anticorps de type ANA. Les niveaux ANA des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

|               | Anti-ANA                     | anti-hu tTG                  | % Récupération |
|---------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
|               | Ab. conc. ajoutée<br>(EU/ml) | Ab. conc. obtenue<br>(EU/ml) |                |
| Échantillon 1 | 91,6                         | 82,2                         | 111,4          |
| Échantillon 2 | 93,5                         | 93,4                         | 100,1          |
| Échantillon 3 | 66,9                         | 68,0                         | 98,4           |



# Anticorpi Anti-nucleari (ANA) ELISA

IVD

## INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1175 Anticorpi Anti-nucleari ELISA 96 Determinazioni

### FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione di anticorpi anti-nucleari e anti-citoplasmatici nel siero umano come strumento di aiuto nella diagnosi di malattie autoimmuni quali il lupus eritematoso sistemico (LES), la sindrome di Sjögren (SS), la malattia mista del tessuto connettivo (MCTD) e lo scleroderma.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli anticorpi antinucleari (ANA) sono un gruppo di anticorpi diretti contro vari antigeni nucleari e alcuni antigeni citoplasmatici. I test sierologici per gli ANA hanno un ruolo importante nella formulazione della diagnosi di una serie di malattie autoimmuni del tessuto connettivo, particolarmente del lupus eritematoso sistemico (LES), della sclerodermia, della malattia mista del tessuto connettivo e della sindrome di Sjögren<sup>1-5</sup>. Gli ANA vengono solitamente individuati con il metodo dell'immunofluorescenza indiretta su cellule epiteliali HEp2<sup>6-10</sup>. A causa di alcune limitazioni presentate dal metodo IFA, si è resa necessaria la realizzazione di una metodologia non soggettiva per la rilevazione degli ANA. Il test immunoenzimatico (ELISA) per l'individuazione degli ANA, offre una serie di vantaggi rispetto al metodo IFA: una maggiore facilità di operazione e nessuna esperienza necessaria nell'esecuzione e nella lettura delle reazioni richiesta invece per il metodo IFA<sup>11-15</sup>. È stato inoltre suggerito che i risultati ANA positivi su ELISA possono essere confermati con IF indiretta su cellule epiteliali HEp2 ed essere utili per l'identificazione dei pattern della reazione ANA che mostrano significatività<sup>16</sup>.

### PRINCIPI DELLE METODICHE

Il test ANA viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con antigeni da cellule epiteliali HEp2 supplementate con altri antigeni nucleari e citoplasmatici; 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-ANA presenti nel siero di legarsi all'antigene assorbito sul pozzetto. 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. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in maniera specifica agli ANA legati ai pozzetti rivestiti di antigene. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (TMB) e la presenza di anticorpi ANA viene indicata da un cambiamento di colore causato dalla conversione del substrato in un prodotto colorato. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 450nm. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU)/ml.

### 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. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

#### Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. 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>17</sup>.

**ATTENZIONE** – L'azide sodica ( $\text{NaN}_3$ ) 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.

Smaltire le soluzioni reagenti contenenti azide sodica e Proclina come conservanti secondo le normative locali e nazionali specifiche.

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 di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

### Materiali forniti

Anticorpi Antinucleari ELISA ImmuLisa™ **REF** 1175

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

|            |                         |  |
|------------|-------------------------|--|
| 12 x 8     | <b>MICROPLATE ANA</b>   | <b>Micropiastra</b> con micropozzetti asportabili rivestiti con antigeni antinucleari.             |
| 1 x 1.5 ml | <b>CALIBRATOR ANA</b> * | <b>Calibratore</b> (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ANA.        |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL + ANA</b> *  | <b>Controllo Positivo</b> (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per ANA IgG. |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL -</b> *      | <b>Controllo Negativo</b> (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.                     |
| 1 x 12 ml  | <b>IgG-CONJ HRP</b> *   | <b>Coniugato HRP</b> pronto all'uso. 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 TMB</b> *  | <b>Substrato Enzimatico pronto all'uso. Proteggere dalla luce.</b>                                 |
| 1 x 12 ml  | <b>STOP H2S04</b>       | <b>Soluzione di Stop</b> pronta all'uso. Contiene 0,5M $\text{H}_2\text{SO}_4$                     |
| 2 x        | <b>BUF WASH</b>         | <b>Tampone di Lavaggio</b> in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.                           |

\* Contiene < 0,1%  $\text{NaN}_3$


### Simboli usati sulle etichette:

**LOT** Numero di lotto

**REF** Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

**IVD** 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.
- 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.
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

**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.

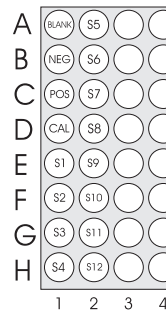
**PROCEDURA****Note sul test**

- 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** Consultare la disposizione dei campioni per una distribuzione appropriata di campioni e reagenti.

## SEMIQUANTITATIVA



Disposizione Campioni

- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **500 µl** di Diluente del Siero.
- 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 **450 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola impostato su assorbanza 0. Se viene utilizzato un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda doppia, impostare il filtro di riferimento a 620 nm.

**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 controllo negativo deve essere inferiore  $<20$  EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, prendere la media delle due letture per determinare la concentrazione degli ANA. Si raccomanda che i campioni borderline vengano testati con un campione fresco prelevato ad una data successiva per assicurare l'accuratezza.

IT

## RISULTATI

### Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con:

#### DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

I risultati ottenuti con questo metodo dovrebbero essere riportati come positivi o negativi.

#### Assorbanza del campione del test

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

#### Assorbanza del calibratore

#### Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Questi valori sono stati determinati analizzando campioni da 64 donatori adulti normali. I valori illustrati sotto corrispondono alla media dei valori da individui normali + 3DS. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

| Valore ANA  | Interpretazione |
|-------------|-----------------|
| <20 EU/ml   | Negativo        |
| 20-25 EU/ml | Borderline      |
| >25 EU/ml   | Positivo        |

#### LIMITAZIONI DEL TEST

Il test per gli ANA non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata per analizzare solo campioni di siero umano. I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi, ma considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica. Alcuni pazienti affetti da determinate malattie del tessuto connettivo possono risultare negativi agli ANA. Similmente, dato che gli ANA possono essere presenti anche in patologie diverse da quelle che interessano il tessuto connettivo, la presenza degli ANA dovrebbe essere interpretata alla luce delle evidenze cliniche e dei risultati di altri esami di laboratorio che possono includere test specifici per gli antigeni come ad esempio quelli per RNP, SM, SS-A (Ro), SS-B (La) e per altri antigeni nucleari e citoplasmatici.

#### VALORI ATTESI

I valori attesi in una popolazione normale sono negativi (<20 EU/ml per adulti i bambini). Tuttavia, è stato determinato che alcuni individui apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi agli ANA.

#### Associazione Patologica degli Anticorpi Antinucleari (ANA)

| Malattia             | % Incidenza |
|----------------------|-------------|
| LES                  | 95-100      |
| Scleroderma          | 60-90       |
| MCTD                 | 100         |
| Sindrome di Sjögren  | 40-70       |
| Poli/Dermato-miosite | 30-80       |
| Artrite giovanile    | 20-50       |
| Raynaud              | 20-60       |
| Artrite reumatoide   | 30-50       |
| Malattie infettive   | ?           |
| Patologia tiroidea   | 30-50       |
| Fibromialgia         | 15-25       |
| Individui normali    | ~10         |

Kavanaugh A et al Arch :Pathol Lab Med 2000;124:71-81

## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

L'utilità del Test per gli Anticorpi ANA (ELISA) ImmuLisa™ è stata determinata confrontando i risultati con:

- un altro metodo ANA ELISA disponibile in commercio e
- il metodo ANA in immunofluorescenza su cellule epiteliali HEp2.

Intervallo normale: L'intervallo normale è stato stabilito analizzando 64 campioni di siero da donatori apparentemente sani ottenuti dalla Croce Rossa. Per determinare il valore cut-off di questa popolazione normale è stata utilizzata la media + tre deviazioni standard della media.

### Comparabilità, Specificità e Sensibilità

A. Metodo ANA ELISA ImmuLisa™ rispetto a un altro Metodo ANA ELISA disponibile in commercio: sono stati testati complessivamente 66 campioni con il Kit ANA ImmuLisa™ e con un altro kit ANA ELISA approvato dalla FDA disponibile in commercio. I risultati di questi studi sono i seguenti:

|             |          | ANA ELISA ImmuLisa™ |          |        |
|-------------|----------|---------------------|----------|--------|
|             |          | Positivo            | Negativo | Totale |
| Altro ELISA | Positivo | 41                  | 5        | 46     |
|             | Negativo | 8                   | 12       | 20     |
|             | Totale   | 49                  | 17       | 66     |

Concordanza: 80%

Sensibilità: 89%

Specificità: 60%

B. Per assicurare l'affidabilità della metodologia ANA ImmuLisa™ nella rilevazione degli ANA, i sieri sono stati testati anche su cellule epiteliali HEp2, il substrato privilegiato per la rilevazione degli ANA in immunofluorescenza.

Metodo ANA ELISA ImmuLisa™ rispetto a Metodo ANA ImmuLisa™ su cellule HEp2: sono stati testati per la presenza di ANA complessivamente 292 campioni e i risultati sono riassunti nella tabella che segue:

|          |          | ANA ImmuLisa™ |          |        |
|----------|----------|---------------|----------|--------|
|          |          | Positivo      | Negativo | Totale |
| ANA HEp2 | Positivo | 123           | 7        | 130    |
|          | Negativo | 6             | 156      | 162    |
|          | Totale   | 129           | 163      | 292    |

Concordanza: 96%

Sensibilità: 95%

Specificità: 96%

C. Reattività incrociata: Sono stati testati complessivamente 55 controlli patologici prelevati da pazienti affetti da malattie autoimmuni, per le quali è nota la negatività agli ANA, quali il pemfigo. Solo 4 sono risultati positivi, ciò rappresenta approssimativamente lo stesso valore considerato come positivo in individui normali.

### Precisione:

Il coefficiente di variazione (CV) per il test ANA ELISA all'interno di uno stesso saggio tra un saggio e l'altro è stato calcolato sulla base dei risultati di 10 replicati.

|       | Inter-analisi |      | Intra-analisi |      |
|-------|---------------|------|---------------|------|
|       | EU/ml         | CV   | EU/ml         | CV   |
| Alto  | 107,7         | 6,4% | 125,9         | 6,8% |
| Medio | 51,4          | 6,2% | 52,7          | 7,0% |
| Basso | 19,5          | 5,2% | 20,3          | 8,1% |

IT

**Recupero:**

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

|                   | <b>Anti-ANA</b>                | <b>anti-hu tTG</b>             | <b>Recupero:</b> |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|
|                   | <b>Ass. conc. add. (EU/ml)</b> | <b>Ass. conc. add. (EU/ml)</b> |                  |
| <b>Campione 1</b> | 91,6                           | 82,2                           | 111,4            |
| <b>Campione 2</b> | 93,5                           | 93,4                           | 100,1            |
| <b>Campione 3</b> | 66,9                           | 68,0                           | 98,4             |



## ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-nucleares (ANA)

IVD

### FOLHETO DO PRODUTO

REF 1175 ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-Nucleares 96 Determinações

### APLICAÇÃO

É um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-nucleares e citoplásmicos em soro humano para auxiliar o diagnóstico de doenças auto-imunes tais como Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), Síndrome de Sjögren (SS), Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC) e Esclerodermia.

### DESCRIÇÃO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-nucleares (ANA) são um grupo de anticorpos contra vários antígenos nucleares e alguns antígenos citoplásmicos. Os testes serológicos de ANA têm um papel importante no diagnóstico de diversas doenças auto-imunes do tecido conjuntivo, especialmente no Lúpus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, doença mista do tecido conjuntivo (MCTD) e síndrome de Sjögren<sup>1-5</sup>. Geralmente, os ANA são detectados por imunofluorescência indirecta em HEp2<sup>6-10</sup>. Em virtude de certas limitações de IFA, apresentou-se a necessidade de um método não subjectivo de detecção de ANA. O imunoensaio enzimático (ELISA) oferece muitas vantagens em relação ao método de IFA de detecção de ANA tais como a facilidade de utilização e não necessita de capacidades especiais para a execução e leitura das reacções IFA<sup>11-15</sup>. Como os ANA são indicadores sensíveis mas não específicos de uma doença do tecido conjuntivo, recomenda-se a execução de testes de anticorpos mais específicos em doentes com ANA positivo suspeitos de terem doença auto-imune do tecido conjuntivo. Também se sugere que os resultados de ANA positivos em ELISA sejam confirmados por IF indirecta em Hep2 pois também poderão auxiliar na identificação do padrão de reacção a ANA que tem significado<sup>16</sup>.

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste de ANA é executado como um imunoensaio de fase sólida (ELISA). Os micropoços das microplacas são revestidos com antígenos Hep2 complementados com outros antígenos nucleares e citoplásmicos seguidos pelo bloqueio dos locais não reactivos para reduzir a ligação não específica. Os controlos, calibradores e amostras de soro dos doentes são incubados nos micropoços o que permite que os ANA, presentes no soro, se liguem ao antígeno adsorvido nos micropoços. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem dos micropoços. Os anticorpos que se ligaram aos micropoços são detectados juntando aos micropoços um conjugado de IgG anti-humano marcado com enzima. Estes anticorpos com conjugado enzimático ligam-se especificamente aos ANA que se ligaram aos micropoços revestidos com antígeno. O conjugado enzimático que não se ligou é eliminado por lavagem. Depois junta-se um Substrato Enzimático específico (TBM) aos poços e a presença de ANA é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato num produto colorido. A reacção é interrompida pela adição de uma solução de paragem e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

### 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. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

#### Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. 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 aprovados 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>17</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 azida. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director do laboratório ou o Centro Anti-Venenos.

Elimine as soluções reagentes que contêm como conservantes azida de sódio e Proclin de acordo com todas as normas locais, estatais e nacionais em vigor.

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 lote 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-Nucleares ImmuLisa™ **REF** 1175

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.


|            |                         |  |
|------------|-------------------------|--|
| 12 x 8     | <b>MICROPLATE ANA</b>   | <b>Microplaca</b> com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio anti-nuclear.                  |
| 1 x 1.5 ml | <b>CALIBRATOR ANA</b> * | <b>Calibrador pronto a usar</b> ( <i>tampa verde</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-ANA.                |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL + ANA</b> *  | <b>Controlo positivo pronto a usar</b> ( <i>tampa vermelha</i> ). Contém soro humano positivo para anti-IgG ANA. |
| 1 x 1.5 ml | <b>CONTROL -</b> *      | <b>Controlo negativo pronto a usar</b> ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano.                              |
| 1 x 12 ml  | <b>IgG-CONJ HRP</b> *   | <b>Conjugado de HRP</b> pronto a usar. Cor-de-rosa.  |
| 1 x 60 ml  | <b>DIL</b> *            | <b>Diluyente de soro</b> pronto a usar. Cor azul.  |
| 1 x 12 ml  | <b>SUBSTRATE TMB</b> *  | <b>Substrato enzimático</b> pronto a usar. <b>Proteger da luz.</b>   |
| 1 x 12 ml  | <b>STOP H2SO4</b>       | <b>Solução de paragem</b> pronta a usar. Contém H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M                             |
| 2 x        | <b>BUF WASH</b>         | <b>Tampão de lavagem em pó.</b> 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

PT

 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
- 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.
- Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl.

### **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 rendimento 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 à temperatura ambiente pelo menos por 30 minutos antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- 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 adicionamento 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 frigorífico.

**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 das amostras em duplicado.
- Passo 3** Consulte o esquema das amostras para uma distribuição correcta das amostras e dos reagentes.

**SEMIQUANTITATIVA**

|   |       |     |   |   |
|---|-------|-----|---|---|
| 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 |

**Esquema das amostras**

- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **500 µl** de Diluente para Soro.
- Passo 5** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibrador, pronto a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nas respectivas micropoços de acordo com a folha de protocolo.  
**Nota:** Inclua também um 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 deve ser inferior 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.
- 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 os micropoços por **30 minutos** ( $\pm 5$  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 **450 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de ondas individual regulado em absorvância zero. Se for usado um comprimento de onda duplo, regule o filtro de referência para 620 nm.

**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 <

PT

0,3. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for executado em duplicado, faça a média das duas leituras para determinar a concentração de ANA. Aconselhamos efectuar um teste das amostras que estiverem nos limites de leitura com amostras frescas recolhidas numa data posterior para assegurar a precisão.

## RESULTADOS

### Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser assim determinadas:

### DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Os resultados obtidos por este método devem ser indicados como positivo ou negativo.

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador}} \times \text{UE/ml de Calibrador} = \text{UE/ml da Amostra de Teste}$$

### Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Estes valores foram determinados testando 64 amostras de sangue de doadores adultos normais. Os valores abaixo descritos são a média dos sujeitos normais mais 3 DP. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

| Valor ANA   | Interpretação          |
|-------------|------------------------|
| <20 UE/ml   | Negativo               |
| 20-25 UE/ml | Indeterminado (Limiar) |
| >25 UE/ml   | Positivo               |

### LIMITES DO PROCEDIMENTO

O teste de ANA 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. Os resultados obtidos servem apenas como auxílio no diagnóstico e não devem ser interpretados como um verdadeiro diagnóstico. Alguns doentes com algumas das doenças do tecido conjuntivo podem ser negativos para ANA. Do mesmo modo, como os ANA ocorrem noutras doenças do tecido conjuntivo e como a presença de ANA deve ser interpretada à luz de exames clínicos e outros exames laboratoriais os quais poderão incluir testes específicos antigénios como RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B(La) e outros antigénios nucleares e citoplásmicos.

### VALORES PREVISTOS

Os valores previstos numa população normal são negativos (< 20 UE/ml nos adultos e crianças). Todavia, foi determinado que alguns indivíduos assintomáticos, aparentemente saudáveis podem dar resultados positivos a ANA.

#### Anticorpos Antinucleares (ANA) e Associação a Doenças

| Doença              | Incidência % |
|---------------------|--------------|
| LES                 | 95-100       |
| Esclerodermia       | 60-90        |
| DMTC                | 100          |
| Síndrome de Sjögren | 40-70        |
| Poli/Dermatomiosite | 30-80        |
| Artrite juvenil     | 20-50        |
| Raynaud             | 20-60        |
| Artrite reumatóide  | 30-50        |
| Doença infecciosa   | ?            |
| Doença da Tiróide   | 30-50        |
| Fibromialgia        | 15-25        |
| Sujeitos normais    | ~10          |

*Kavanaugh A et al Arch :Pathol Lab Med 2000;124:71-81*

**CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**

A utilidade do ELISA para ANA ImmuLisa™ foi determinada comparando os resultados com:

- outro método ELISA para ANA adquirido no comércio e
- método de imunofluorescência de ANA em Hep2.

Intervalo normal: O intervalo normal foi estabelecido testando 64 amostras de soro de doadores aparentemente saudáveis obtidos através da Cruz Vermelha. A média mais três desvios padrão da média desta população normal foram usados para determinar a diferença entre indivíduos normal e positivos no limiar.

Especificidade e sensibilidade comparativas

A. ELISA para ANA ImmuLisa™ comparado com outro método ELISA para ANA comercial: Foi testado um total de 66 amostras com o Kit para ANA ImmuLisa™ e outro Kit ELISA para ANA aprovado pela FDA adquirido no comércio. Os resultados destes estudos foram:

|              |          | ELISA para ANA ImmuLisa™ |          |       |
|--------------|----------|--------------------------|----------|-------|
|              |          | Positivo                 | Negativo | Total |
| Outros ELISA | Positivo | 41                       | 5        | 46    |
|              | Negativo | 8                        | 12       | 20    |
|              | Total    | 49                       | 17       | 66    |

Concordância Relativa: 80%

Sensibilidade Relativa: 89%

Especificidade Relativa: 60%

B. Para assegurar a fiabilidade do kit para ANA ImmuLisa™ na detecção de ANA, o soro também deve ser testado em HEp2, o substrato de eleição da detecção de ANA por imunofluorescência. ELISA para ANA ImmuLisa™ comparado com kit para ANA ImmuLisa™ em HEp2: Foi testado um total de 292 amostras para detecção de ANA e os resultados estão indicados abaixo:

|          |          | ANA ImmuLisa™ |          |       |
|----------|----------|---------------|----------|-------|
|          |          | Positivo      | Negativo | Total |
| ANA HEp2 | Positivo | 123           | 7        | 130   |
|          | Negativo | 6             | 156      | 162   |
|          | Total    | 129           | 163      | 292   |

Concordância Relativa: 96%

Sensibilidade Relativa: 95%

Especificidade Relativa: 96%

C. Reactividade cruzada: Foi testado um total de 55 controlos de outras doenças auto-imunes normalmente conhecidas como negativas a ANA tais como pênfigo. Somente quatro foram positivas, o que se trata da mesma quantidade registada como positiva em sujeitos normais.

**Precisão:**

Baseadas em 10 repetições, foi calculado o Coeficiente de variação (CV) intra-teste e inter-teste do teste ANA ELISA.

|       | inter-teste |      | intra-teste |      |
|-------|-------------|------|-------------|------|
|       | UE/ml       | CV   | EU/ml       | CV   |
| Alta  | 107,7       | 6,4% | 125,9       | 6,8% |
| Média | 51,4        | 6,2% | 52,7        | 7,0% |
| Baixa | 19,5        | 5,2% | 20,3        | 8,1% |

PT

**Recuperação:**

Amostras com concentrações conhecidas de anticorpos ANA foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas de anticorpos ANA. Foram determinados os níveis de ANA das amostras misturadas e dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados são os seguintes:

|                  | <b>Anti-ANA</b>              | <b>anti-hu tTG</b>       |                      |
|------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|
|                  | <b>Abs. conc. adicionada</b> | <b>Abs. conc. obtida</b> | <b>% Recuperação</b> |
|                  | <b>(EU/ml)</b>               | <b>(EU/ml)</b>           |                      |
| <b>Amostra 1</b> | 91,6                         | 82,2                     | 111,4                |
| <b>Amostra 2</b> | 93,5                         | 93,4                     | 100,1                |
| <b>Amostra 3</b> | 66,9                         | 68,0                     | 98,4                 |

## REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-1277.
2. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome: results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum.* 1993;36:340-347.
3. Tanimoto K, Nakano K, Kano S, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol.* 1995;22:668-674.
4. Leroy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988;15:202-205.
5. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M, et al. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue diseases in patients with anti-RNP antibodies. *J Rheumatol.* 1996;23:2055-2062.
6. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1601-1611.
7. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995;24:323-358.
8. Slater CA, Davis RB, Shmerling RH. Antinuclear antibody testing; a study of clinical utility. *Arch Intern Med.* 1996;156:1421-1425.
9. Molden DP, Nakamura RM, Tan EM. Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity. *Am J Clin Pathol.* 1984;82:57-66.
10. Hollingsworth PN, Pummer SC, Dawkins RL. Antinuclear antibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies.* Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science BV; 1996:74-90.
11. Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, et al. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol.* 1996;105:468-473.
12. Emlen W, O'Neill L. Clinical significance of antinuclear antibodies: comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1612-1618.
13. Monce NM, Bogusky RT, Cappel NN. An enzyme immunoassay screening test for the detection of total antinuclear antibodies. *J Clin Lab Anal.* 1991;5:439-442.
14. Jitsukawa T, Nakajima S, Usui J, et al. Detection of anti-nuclear antibodies from patients with systemic rheumatic diseases by ELISA using HEp -2 cell nuclei. *J Clin Lab Anal.* 1991;5:49-53.
15. Gniewek RA, Stites DP, McHugh TM, et al. Comparison of antinuclear antibody testing methods: immunofluorescence assay versus enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4:185-188.
16. Renato Tozzoli, Nicola Bizzaro, Elio Tonutti, et al. Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases. *Am J Clin Pathol.* 2002; 117:316-24.
17. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).





*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)