



Anti-Extractable Nuclear Antigen (ENA) Antibodies ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1126 Anti-Sm/RNP antibodies (ENA) 96 Determinations

REF 1127 Anti-Sm antibodies (ENA) 96 Determinations

REF 1128 Anti-SS-A(Ro) antibodies (ENA) 96 Determinations

REF 1129 Anti-SS-B(La) antibodies (ENA) 96 Determinations

INTENDED USE

Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection and quantitation of IgG antibodies to extractable nuclear antigens (ENA) [RNP, Sm, SS-A (Ro), or SS-B (La)] in human serum. Antibodies to Sm aid in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). RNP antibodies aid in the diagnosis of mixed connective tissue disease (MCTD) and SLE. SS-A (Ro) and SS-B (La) antibodies aid in the diagnosis of SLE, subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) and Sjögren's syndrome.

SUMMARY AND EXPLANATION

ENA are soluble ribonucleoprotein (snurps) complexes. Autoantibodies directed against various ENA have proven to be of value in the diagnosis and monitoring of various systemic connective tissue diseases. Anti-Sm antibodies are disease specific and thus are a marker for systemic lupus erythematosus (SLE). Antibodies to Sm occur in approximately 30-40% of SLE patients. They are rare in other systemic connective tissue diseases and if present, indicate either overlap of disease or patients that have not yet fulfilled the ARA criteria for SLE¹⁻⁹. Other antibodies such as those directed against SS-A (Ro), SS-B (La) and RNP are not disease specific. Antibodies to RNP occur in 35-45% of SLE patients and in over 95% of patients with mixed connective tissue disease (MCTD). Occasionally they are also found in scleroderma, rheumatoid arthritis and drug induced LE¹⁻⁶. Patients with anti-RNP antibodies have a lower incidence of renal disease as compared to patients with anti-Sm antibodies. Antibodies to SS-A (Ro) and SS-B (La) occur in approximately 30-40% and 10-15% of SLE patients and 60-70% and 40-60% of patients with Sjögren's syndrome respectively. Antibodies to SS-B (La) occur frequently in association with SS-A (Ro) antibodies.

Antibodies to SS-A (Ro) also occur in 60% of patients with subacute cutaneous LE, in almost all cases of neonatal LE and in two thirds of SLE patients with C2 deficiency¹⁰⁻¹³.

These antibodies can be detected by various methods. Because of the difficulties in obtaining ENA antigens in a purified form, the gel immunodiffusion method has been widely used. Immunodiffusion exhibits sufficient specificity but is a qualitative method and lacks sensitivity. Immco Diagnostics Inc. has available ENA antigens in a highly purified form and has developed an ELISA method for the detection of ENA antibodies. ELISA methodology has many advantages over immunodiffusion: assay performance times are reduced, individual subjectivity in reading results is eliminated, quantitation is achieved without serum titration, there is potential for automation and greater sensitivity is achieved¹⁴.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

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

In the RNP test an Sm/RNP antigen is used to coat the wells since the RNP antigen is found associated with the Sm antigen. Therefore in order to calculate the EU/ml for RNP, the EU/ml of Sm for that same serum sample must be determined (**REF** 1127) and this value subtracted from the EU/ml obtained with the RNP test kit (**REF** 1126).

EN

REAGENTS

Storage and Preparation

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

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

Coated microwell strips are for one time use only.

When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer with distilled or deionized water.

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 required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁵.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

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

Materials provided

ImmuliSTM Anti-ENA Antibody Test (Sm/RNP) **REF** 1126

ImmuliSTM Anti-ENA Antibody Test (Sm) **REF** 1127

ImmuliSTM Anti-ENA Antibody Test (SS-A (Ro)) **REF** 1128

ImmuliSTM Anti-ENA Antibody Test (SS-B (La)) **REF** 1129

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE ENA	Microplate with individual breakaway microwells coated with ENA antigen
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A ENA * †	Ready to use Calibrator A (green cap). Human serum containing antibodies to ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B ENA * †	Ready to use Calibrator B (violet cap). Human serum containing antibodies to ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C ENA * †	Ready to use Calibrator C (blue cap). Human serum containing antibodies to ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ENA * †	Ready to use Calibrator D (yellow cap). Human serum containing antibodies to ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ENA * †	Ready to use Positive Control (red cap). Human serum containing antibodies to ENA.






EN

1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPPOS * †	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

† Kits contain components with appropriate antigen-coated microplate and antibody positive control and calibrators. In place of “ENA” on the labels, the specific antigen or antibody appears: “RNP” for **REF** 1126, “Sm” for **REF** 1127, “RO” for **REF** 1128 and “LA” for **REF** 1129.

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

Materials Required But Not Provided

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

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

PROCEDURE

Procedural Notes

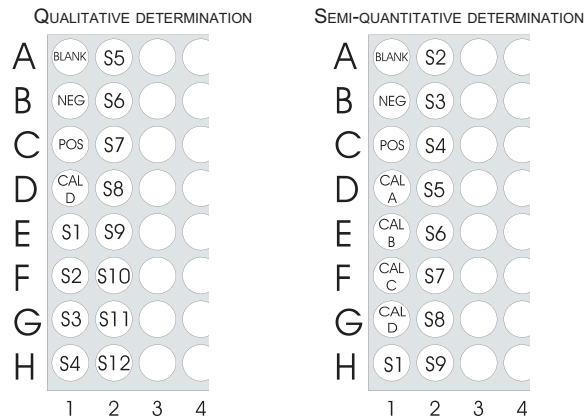
- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should 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 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 For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*) or For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.



Step 4 Prepare a **1:101** dilution of patient specimen by pipetting **5µl** of serum into **0.5 ml** of Serum Diluent. **Mix well.**

Step 5 Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.

Step 6 Pipette **100 µl** of Ready to Use Calibrator, Positive and Negative controls and patient samples to the appropriate microwells as per above sample layout.

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.

EN

- Step 7** Incubate **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with the wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 μ l** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 7.
- Step 12** Pipette **100 μ l** of Enzyme Substrate to each well in the same order and timing as for the conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 μ l** 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 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

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 Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the absorbance of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

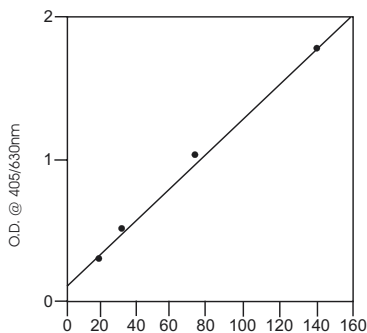
The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

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

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance of the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.



Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum samples should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the results. Each laboratory must determine its own normal values. These may vary with the population examined.

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

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

EXPECTED VALUES

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

Diagnostic Significance of Antibodies to Various Soluble Nuclear Antigens

Antibody Isotype	Disease Association
Sm	SLE - 10-40%
RNP	SLE - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	SLE - 15-33%
	SCLE - 60%
	Neonatal LE - 100%
	Sjögren's syndrome - 40-70%
SS-B (La)	SLE - 10-15%
	SCLE - 25%
	Sjögren's syndrome - 15-60%

SLE = systemic lupus erythematosus

MCTD = mixed connective tissue disease

SCLE = subacute cutaneous lupus erythematosus

Note: The frequency of each antibody specificity in a disease represent compilation from the literature³. The incidence varies depending on the patient population.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Immulisa™ anti-ENA antibody tests [Sm, RNP, SS-A (Ro) or SS-B (La)] were compared with other commercially available ELISA test kits. A total of 67 sera from a clinical reference laboratory were identified by immunodiffusion as being positive or negative for anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) or anti-SS-B (La) antibodies.

EN

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

Comparison of ELISA Methods for the Detection of Antibodies to ENA

		ImmuLisa™ RNP		
		Positive	Negative	Total
OTHER	Positive	11	0	11
	Negative	5	46	51
	Total	16	46	62

Agreement: 92%
Sensitivity: 100%
Specificity: 90%

		ImmuLisa™ Sm		
		Positive	Negative	Total
OTHER	Positive	3	1	4
	Negative	5	53	58
	Total	8	54	62

Agreement: 90%
Sensitivity: 75%
Specificity: 91%

		ImmuLisa™ SS-A (Ro)		
		Positive	Negative	Total
OTHER	Positive	25	1	26
	Negative	9	27	36
	Total	34	28	62

Agreement: 84%
Sensitivity: 96%
Specificity: 75%

		ImmuLisa™ SS-B (La)		
		Positive	Negative	Total
OTHER	Positive	14	1	15
	Negative	5	42	47
	Total	19	43	62

Agreement: 90%
Sensitivity: 93%
Specificity: 89%

Depending on the concentration of the analyte the intra-assay Coefficient of Variation (CV) for the ImmuLisa™ anti-ENA antibody test is 4-11%. The inter-assay CV is 4-10%.



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

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF	1126	νάλυση αντισωμάτων (m/) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (E A) 96 Προσδιορισμοί
REF	1127	νάλυση αντισωμάτων (m) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (E A) 96 Προσδιορισμοί
REF	1128	νάλυση αντισωμάτων -A (ο) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (E A) 96 Προσδιορισμοί
REF	1129	νάλυση αντισωμάτων -B (α) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (E A) 96 Προσδιορισμοί

ΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

έθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG κατά των εκχυλιζόμενων πυρηνικών αντιγόνων (ENA) [RNP, Sm, SS-A (Ro) ή SS-B (La)], σε ορό ανθρώπου. Η ανίχνευση αντισωμάτων κατά του αντιγόνου Sm υποβοηθά τη διάγνωση του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου (ΣΕΛ). Η ανίχνευση αντισωμάτων κατά του αντιγόνου RNP υποβοηθά τη διάγνωση της μικτής νόσου συνδετικού ιστού (ΝΣΙ) και του ΣΕΛ. Η ανίχνευση αντισωμάτων κατά των αντιγόνων SS-A (Ro) και SS-B (La) υποβοηθά τη διάγνωση του ΣΕΛ, του υποξέος δερματικού ερυθηματώδη λύκου (ΥΔΕΛ) και του συνδρόμου του Sjögren.

ΕΡΙΑΛΗΨΗ ΚΑΙ Ε ΕΞΗΓΗΣΗ

Τα ENA είναι διαλυτά σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών (sn rp). Τα αυτοαντισώματα κατά των διαφόρων ENA έχουν αποδειχθεί πολύτιμα στη διάγνωση και την παρακολούθηση διαφόρων συστηματικών νόσων του συνδετικού ιστού. Τα αντι-Sm αντισώματα είναι ειδικά για μία μόνο νόσο και έτσι αποτελούν δείκτη για το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ). Αντισώματα κατά του αντιγόνου Sm απαντούν σε 30-40% περίπου των ασθενών με ΣΕΛ. Είναι σπάνια σε άλλες συστηματικές νόσους του συνδετικού ιστού και, εάν βρεθούν, υποδεικνύουν είτε αλληλοεπικάλυψη των νόσων είτε ότι οι ασθενείς δεν πληρούν ακόμη τα κριτήρια ARA για το ΣΕΛ¹⁻⁹. Τα άλλα αντισώματα κατά των SS-A (Ro), SS-B (La) και RNP δεν είναι ειδικά για μία μόνο νόσο. Τα αντισώματα κατά του RNP εμφανίζονται περίπου στο 35-45% των ασθενών με ΣΕΛ και σε περισσότερο από το 95% των ασθενών με μικτή νόσο συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ). Περιστασιακά, μπορεί επίσης να βρεθούν σε ασθενείς με σκληροδερμία, ρευματοειδή αρθρίτιδα και επαγόμενο από φάρμακα ερυθηματώδη λύκο¹⁻⁶. Οι ασθενείς με αντισώματα αντι-RNP εμφανίζουν μικρότερη επίπτωση νεφροπάθειας σε σχέση με ασθενείς που εμφανίζουν αντισώματα αντι-Sm. Τα αντισώματα κατά των αντιγόνων SS-A (Ro) και SS-B (La) εμφανίζονται περίπου στο 30-40% και 10-15% των ασθενών με ΣΕΛ και στο 60-70% και 40-60% των ασθενών με σύνδρομο Sjögren, αντίστοιχα. Τα αντισώματα κατά του SS-B (La) εμφανίζονται συχνά να συσχετίζονται με τα αντισώματα κατά του αντιγόνου SS-A (Ro).

Τα αντισώματα κατά του SS-A (Ro) εμφανίζονται επίσης στο 60% των ασθενών με υποξύ δερματικό ερυθηματώδη λύκο, σε όλα σχεδόν τα περιστατικά ερυθηματώδη λύκου νεογνών και στα δύο τρίτα των ασθενών με ΣΕΛ που πάσχουν από ανεπάρκεια στο C2¹⁰⁻¹³.

Τα αντισώματα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες μεθόδους. Λόγω των δυσκολιών που παρουσιάζει η απομόνωση των αντιγόνων ENA σε κεκαθαρμένη μορφή, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως η μέθοδος ανοσοδιάχυσης σε πήκτωμα. Η ανοσοδιάχυση εμφανίζει επαρκή ειδικότητα, αλλά είναι μια ποιοτική μέθοδος και δεν έχει επαρκή ευαισθησία. Η εταιρεία Immco Diagnostics Inc. διαθέτει αντιγόνα ENA υψηλής καθαρότητας και έχει αναπτύξει μια μέθοδο ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά των αντιγόνων ENA. Η μέθοδος ELISA παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της ανοσοδιάχυσης: μειωμένο χρόνο ανάλυσης, εξάλειψη της υποκειμενικότητας στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων, επίτευξη ποσοτικού προσδιορισμού χωρίς ανάγκη τιτλοδότησης του ορού, δυνατότητα αυτοματοποίησης και μεγαλύτερη ευαισθησία¹⁴.

ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η ανάλυση διενεργείται ως ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA) στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με τα αντιγόνα RNP/Sm, Sm, SS-A (Ro) ή SS-B (La) και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επάγονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων αντι-ENA του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που

EL

δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη ενός σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA (EU)/ml.

Στην ανάλυση RNP χρησιμοποιείται ένα αντιγόνο Sm/RNP για την επικάλυψη των κυψελίδων, καθώς το αντιγόνο RNP απαντά συνδεδεμένο με το αντιγόνο Sm. Επομένως, για να υπολογιστεί η συγκέντρωση σε EU/ml για τα αντισώματα κατά του RNP, πρέπει να προσδιοριστεί η EU/ml των αντισωμάτων κατά του Sm για το συγκεκριμένο δείγμα ορού (REF 1127) και η τιμή αυτή να αφαιρεθεί από την τιμή EU/ml που προέκυψε με το kit ανάλυσης αντισωμάτων κατά του RNP (REF 1126).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

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

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

Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

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.

ροφυλάξεις

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 να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁵.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

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

Υλικά που παρέχονται

Ανάλυση αντισωμάτων (Sm/RNP) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (ENA) ImmuLisa™ (REF 1126)

Ανάλυση αντισωμάτων (Sm) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (ENA) ImmuLisa™ (REF 1127)

Ανάλυση αντισωμάτων SS-A (Ro) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (ENA) ImmuLisa™ (REF 1128)

Ανάλυση αντισωμάτων SS-B (La) κατά του εκχυλιζόμενου πυρηνικού αντιγόνου (ENA) ImmuLisa™ (REF 1129)

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

EL

12 x 8	MICROPLATE ENA	
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A ENA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B ENA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής B (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C ENA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ENA * †	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ENA * †	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα) Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως .
1 x 12 ml	STOP	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού .
2 x	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

† Τα kit περιέχουν συστατικά μαζί με πλακίδιο επικαλυμμένο με το κατάλληλο αντιγόνο και διάλυμα ελέγχου και βαθμονομητές θετικούς για το αντίσωμα. Στις ετικέτες, εμφανίζεται το ειδικό αντιγόνο ή αντίσωμα στη θέση του "ENA": "RNP" για την [REF](#) 1126, "Sm" για την [REF](#) 1127, "RO" για την [REF](#) 1128 και "LA" για την [REF](#) 1129.

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου



Ημερομηνία λήξης



Θερμοκρασία αποθήκευσης



Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης



In vitro διαγνωστική χρήση



Κατασκευαστής



Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

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

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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

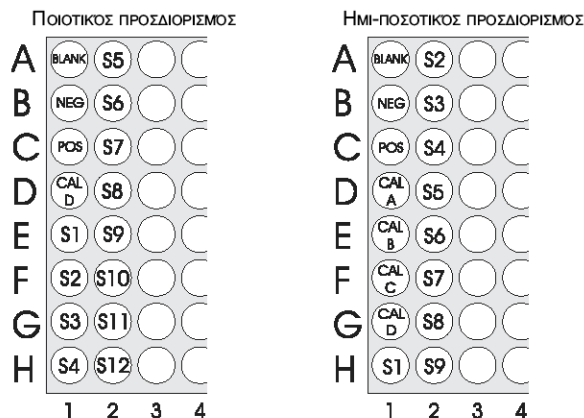
- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως 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. Ε 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 την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις ταινίες μικροκυψελίδων που απαιτείται και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

Μέθοδος ανάλυσης

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

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

- Βήμα 3** Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)
ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές A έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.



- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:101**, προσθέτοντας με πιπέτα **5μl** ορού σε **0,5 ml** αραιωτικού διαλύματος ορού. **Αναμίξτε επιμελώς.**
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη, στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.
- Βήμα 6** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και δειγμάτων ασθενών, όπως απεικονίζεται στην παραπάνω διαμόρφωση δειγματοληψίας.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου. Η απορρόφηση του τυφλού αντιδραστήριου δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3 όταν μετράται έναντι του αέρα.
- Βήμα 7** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** 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 κάθε έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 7.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** 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 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η απορρόφηση του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

A ΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

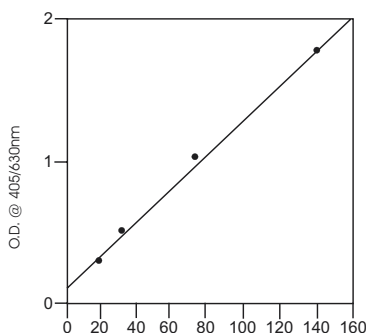
Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

$$\frac{\text{Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος}}{\text{Απ/ση του Βαθμονομητή}} \times \text{EU/ του βαθμονομητή D} = \text{EU/ εξεταζόμενου δείγματος}$$

2. ΗΜΙ- ΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.



Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή A. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσεως.

Ερμηνεία

Οι παρακάτω πληροφορίες παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να ποικίλλουν σε κάθε πληθυσμό που αναλύεται.

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

ΕΠΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

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

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

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

Διαγνωστική σημασία των αντισωμάτων κατά διαφόρων διαλυτών πυρηνικών αντιγόνων

Ισότυπος αντισώματος	Συσχέτιση με τη νόσο
Sm	ΣΕΛ - 10-40%
RNP	ΣΕΛ - 20-30%
	MNΣΙ - 95-100%
SS-A (Ro)	ΣΕΛ - 15-33%
	ΥΔΕΛ - 60%
	Ελ νεογνών - 100%
	Σύνδρομο Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	ΣΕΛ - 10-15%
	ΥΔΕΛ - 25%
	Σύνδρομο Sjögren - 15-60%

ΣΕΛ = συστηματικός ερυθματώδης λύκος

MNΣΙ = μικτή νόσος συνδετικού ιστού

ΥΔΕΛ = υποξύς δερμικός ερυθματώδης λύκος

Σημείωση: Η συχνότητα της ειδικότητας κάθε αντισώματος σε μια νόσο αντιπροσωπεύει στοιχεία που συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία³. Η συχνότητα εμφάνισης ποικίλλει, ανάλογα με τον πληθυσμό ασθενών.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Α ΟΔΟΣΗΣ

Οι αναλύσεις αντισωμάτων αντι-ENA ImmuLISA™ [Sm, RNP, SS-A (Ro) ή SS-B (La)] συγκρίθηκαν με άλλα διαθέσιμα στο εμπόριο kit αναλύσεων ELISA. Ένα σύνολο 67 ορών από ένα κλινικό εργαστήριο αναφοράς αναγνωρίστηκαν με ανοσοδιάχυση ως θετικά ή αρνητικά για τα αντισώματα αντι-RNP, αντι-Sm, αντι-SS-A (Ro) ή αντι-SS-B (La).

Οι οροί αυτοί αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που προτείνεται από τον παρασκευαστή. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες:

EL

Σύγκριση των μεθόδων ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά των ENA

		ImmuLisa™ RNP		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
ΑΛΛΟ	Θετικά	11	0	11
	Αρνητικά	5	46	51
	Σύνολο	16	46	62

Συμφωνία: 92%
Ευαισθησία: 100%
Ειδικότητα: 90%%

		ImmuLisa™ Sm		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
ΑΛΛΟ	Θετικά	3	1	4
	Αρνητικά	5	53	58
	Σύνολο	8	54	62

Συμφωνία: 90%
Ευαισθησία: 75%
Ειδικότητα: 91%

		ImmuLisa™ SS-A (Ro)		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
ΑΛΛΟ	Θετικά	25	1	26
	Αρνητικά	9	27	36
	Σύνολο	34	28	62

Συμφωνία: 84%
Ευαισθησία: 96%
Ειδικότητα: 75%

		ImmuLisa™ SS-B (La)		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
ΑΛΛΟ	Θετικά	14	1	15
	Αρνητικά	5	42	47
	Σύνολο	19	43	62

Συμφωνία: 90%
Ευαισθησία: 93%
Ειδικότητα: 89%

Ανάλογα με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, ο συντελεστής ποικιλότητας (CV) εντός σειράς για την ανάλυση αντισωμάτων αντι-ENA ImmuLisa™ είναι 4-11%. Ο CV μεταξύ σειρών είναι 4-10%.



Ensayo ELISA para detección de anticuerpos anti-antígeno nuclear extraíble (ENA)

IVD

PRESENTACIÓN

- REF** 1126 *Anticuerpos anti Sm/RNP (ENA) 96 an lisis*
REF 1127 *Anticuerpos anti-Sm (ENA) 96 an lisis*
REF 1128 *Anticuerpos anti SS-A(Ro) (ENA) 96 an lisis*
REF 1129 *Anticuerpos anti SS-B(La) (ENA) 96 an lisis*

USO PREVISTO

Enzimoimmunoensayo para la detección y cuantificación de anticuerpos IgG anti antígenos nucleares extraíbles (ENA) [RNP, Sm, SS-A (Ro), o SS-B (La)] en suero humano. Los anticuerpos anti Sm son una herramienta en el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico (LES). Los anticuerpos RNP contribuyen al diagnóstico de la enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD) y LES. Los anticuerpos SS-A (Ro) y SS-B (La) son un auxilio en el diagnóstico de LES, de lupus eritematoso cutáneo subagudo (LECS) y síndrome de Sjögren.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las ENA son complejos de ribonucleoproteínas solubles (snurps). Se ha establecido que los auto anticuerpos contra los diferentes ENA son de ayuda en el diagnóstico y control de las enfermedades combinadas sistémicas del tejido conectivo. Los anticuerpos anti-Sm son específicos de determinadas enfermedades y constituyen un marcador del lupus eritematoso sistémico (LES); se detectan en aproximadamente el 30-40% de los pacientes afectados de LES. Son raros en otras patologías sistémicas del tejido conectivo y, si están presentes, indican un solapamiento de la enfermedad o bien pacientes que todavía no satisfacen plenamente los criterios ARA para LES¹⁻⁹. Otros anticuerpos, tales como los dirigidos contra SS-A (Ro), SS-B (La) y RNP no son específicos de una enfermedad. Los anticuerpos anti-RNP están presentes en el 35-45% de los pacientes con LES y en más del 95% de pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD). Ocasionalmente se los encuentra también en esclerodermia, artritis reumatoide y LE inducido por medicamentos¹⁻⁶. En los pacientes con anticuerpos anti-RNP se registra una incidencia menor de patologías renales en comparación con aquellos pacientes que presentan anticuerpos anti-Sm. Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) y anti-SS-B (La) se registran respectivamente en aproximadamente el 30-40% y el 10-15% de pacientes con LES, y en el 60-70% y 40-60% respectivamente de pacientes con síndrome de Sjögren. Los anticuerpos anti-SS-B (La) se presentan frecuentemente asociados con anticuerpos anti-SS-A (Ro).

Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) están presentes también en el 60% de los pacientes afectados de LE cutáneo subagudo, en la mayoría de los casos de LE neonatal y en los dos tercios de pacientes de LES con deficiencia de C2¹⁰⁻¹³.

Estos anticuerpos pueden detectarse por diferentes métodos. Dadas las dificultades para obtener antígenos ENA purificados, se ha utilizado ampliamente el método de inmunodifusión por gel. La inmunodifusión manifiesta suficiente especificidad, pero es un método cualitativo que falla en la sensibilidad. Immco Diagnostics Inc. pone a disposición antígenos ENA en forma altamente purificada y ha desarrollado un método ELISA para la detección de anticuerpos ENA. La metodología ELISA presenta muchas ventajas con respecto a la inmunodifusión: reduce los tiempos del ensayo, elimina la subjetividad individual en la lectura de los resultados, la cuantificación se adquiere sin titulación de suero, se puede automatizar y se consigue mayor sensibilidad¹⁴.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba consiste en un inmunoensayo de fase sólida ligado a enzima (ELISA). Los pocillos se recubren con antígenos purificados RNP/Sm, Sm, SS-A (Ro) o SS-B (La); a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. Controles, calibradores y muestra de suero del paciente se incuban en los pocillos recubiertos de antígeno, permitiendo que se unan los anticuerpos específicos anti-ENA presentes en el suero. Los anticuerpos no unidos y demás proteínas del suero se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan mediante un conjugado de IgG antihumano marcado con un enzima añadido a los pocillos. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado. Luego se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). La presencia de anticuerpos se detecta por el cambio de color provocado por la conversión del sustrato pNPP. Se detiene la reacción y con un espectrofotómetro se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo. Los resultados se expresan en unidades ELISA (EU)/ml.

ES

En la prueba RNP los pocillos se revisten con antígeno Sm/RNP puesto que el antígeno RNP se encuentra asociado con el antígeno Sm. Por tanto, para calcular las EU/ml de RNP, es necesario determinar las EU/ml de Sm para esa misma muestra de suero (REF 1127) y restar este último valor de las EU/ml obtenidas con la prueba de RNP (REF 1126).

REACTIVOS

Conservación y preparación

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

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

Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

Precauciones

Para uso en 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. Respóndase las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹⁵.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

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

Material suministrado

Ensayo para anticuerpos anti ENA (Sm/RNP) ImmuLisa™ (REF 1126)

Ensayo para anticuerpos anti ENA (Sm) ImmuLisa™ (REF 1127)

Ensayo para anticuerpos anti ENA [(SS-A (Ro))] ImmuLisa™ (REF 1128)

Ensayo para anticuerpos anti ENA [SS-B (La)] ImmuLisa™ (REF 1129)

Cada kit contiene reactivos suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE ENA	Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A ENA * †	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos anti ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B ENA * †	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos anti ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C ENA * †	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos anti ENA.



ES

1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ENA * †	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos anti ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ENA * †	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano con anticuerpos anti ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPPOS * †	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Prot jase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Soluci n Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tamp n de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene < 0.1% NaN₃

† El kit contiene componentes con microplacas recubiertas del ant geno adecuado, controles positivos a anticuerpos y calibradores. En las etiquetas, en lugar de "ENA" se indica el antígeno o anticuerpo específico: "RNP" para **REF** 1126, "Sm" para **REF** 1127, "RO" para **REF** 1128 y "LA" para **REF** 1129.

S mbolos utilizados en las etiquetas:

LOT	N mero de lote
REF	N mero de cat logo
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservaci n
	L anse las instrucciones de uso
IVD	Para diagn stico <i>in vitro</i>
	Fabricante
	N mero de an lisis

Materiales necesarios no suministrados

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

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el 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 establezcan a temperatura ambiente 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.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

Procedimiento del ensayo

Paso 1 Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

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

Paso 3 Para la **determinación cualitativa**, use únicamente el Low Calibrator D (*vial de tapa amarilla*) listo para usar. Para la **determinación semi cuantitativa use los calibradores de A a D listos para usar como se muestra en el ejemplo siguiente:**

DETERMINACIÓN CUALITATIVA

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

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

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

Paso 4 Prepare una dilución de **1:101 de la muestra del paciente mezclando 5 µl de suero con 0,5 ml de diluyente de suero. Mezcle bien.**

ES

- Paso 5** Coja los pocillos necesarios del sobre, ciérrelo bien y póngalo nuevamente en la nevera de inmediato. Ponga los pocillos en el soporte suplementario.
- Paso 6** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, controles positivo y negativo y muestras de paciente en los correspondientes pocillos, como se indica más arriba en el esquema.
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 de este pocillo no debe ser superior a 0,3 leída contra el aire.
- Paso 7** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** 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 9** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 µl** de sustrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el sustrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser $<0,3$. La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la absorbancia del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

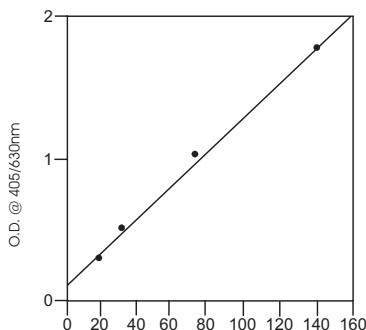
Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada
----- X EU/ml de calibrador D = EU/ml muestra analizada
Abs. de calibrador

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X contra la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.



Calibrador

Los calibradores listos para usar proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrían variar según la población examinada.

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

VALORES ESPERADOS

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

Importancia diagnóstica de anticuerpos contra diferentes antígenos nucleares solubles

Isotipo de anticuerpo	Asociación con la dolencia
Sm	LES - 10-40%
RNP	LES - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	LES - 15-33%
	SCLE - 60%
	LE Neonatal - 100%
	Síndrome de Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	LES - 10-15%
	SCLE - 25%
	Síndrome de Sjögren - 15-60%

LES = lupus eritematoso sistémico

MCTD = enfermedad mixta del tejido conectivo

SCLE = lupus eritematoso cutáneo subagudo

Nota: La frecuencia de especificidad de cada anticuerpo en una enfermedad resulta de datos tomados de la literatura³. La incidencia varía según la población de pacientes.

CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN

Los ensayos ImmuLisa™ para detección de anticuerpos anti ENA [Sm, RNP, SS-A (Ro) o SS-B (La)] se compararon con otros ensayos ELISA disponibles en comercio. Mediante inmunodifusión se identificaron 67 sueros procedentes de un laboratorio clínico de referencia, indicándolos como positivos o negativos a anticuerpos anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) o anti-SS-B (La).

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

Comparación de métodos ELISA para detección de anticuerpos anti ENA

		ImmuLisa™ RNP		
		Positivo	Negativo	Total
OTRO	Positivo	11	0	11
	Negativo	5	46	51
	Total	16	46	62

Correspondencia: 92%

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 90%

		ImmuLisa™ Sm		
		Positivo	Negativo	Total
OTRO	Positivo	3	1	4
	Negativo	5	53	58
	Total	8	54	62

Correspondencia: 90%

Sensibilidad: 75%

Especificidad: 91%

		ImmuLisa™ SS-A (Ro)		
		Positivo	Negativo	Total
OTRO	Positivo	25	1	26
	Negativo	9	27	36
	Total	34	28	62

Correspondencia: 84%

Sensibilidad: 96%

Especificidad: 75%

		ImmuLisa™ SS-B (La)		
		Positivo	Negativo	Total
OTRO	Positivo	14	1	15
	Negativo	5	42	47
	Total	19	43	62

Correspondencia: 90%

Sensibilidad: 93%

Especificidad: 89%

Según la concentración del analito, el coeficiente de variación (CV) intraensayo del análisis ImmuLisa™ de detección de anticuerpos anti-ENA es del 4-11%. El CV interensayo es de 4-10%.



ELISA für Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA)

IVD

BEIPACKTEXT

- REF** 1126 Anti-ENA-Antikörperperitest (Sm/RNP) 96 Bestimmungen
REF 1127 Anti-ENA-Antikörperperitest (Sm) 96 Bestimmungen
REF 1128 Anti-ENA-Antikörperperitest (SS-A (Ro)) 96 Bestimmungen
REF 1129 Anti-ENA-Antikörperperitest (SS-B (La)) 96 Bestimmungen

VERWENDUNGS WECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) (RNP, Sm, SS-A/Ro oder SS-B/La) in Humanserum. Antikörper gegen Sm helfen bei der Diagnose von systemischem Lupus erythematodes. RNP-Antikörper helfen bei der Diagnose von Mischkollagenose (MCTD) und SLE. SS-A/Ro- und SS-B/La-Antikörper helfen bei der Diagnose von SLE, subakutem kutanen Lupus erythematodes (SCLE) und Sjögren-Syndrom.

USAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

ENA sind lösliche Ribonukleoproteinkomplexe (Snurps). Autoantikörper gegen verschiedene ENA haben sich als wertvoll für die Diagnose und Überwachung von verschiedenen systemischen Bindegewebserkrankungen erwiesen. Anti-Sm-Antikörper sind krankheitsspezifisch und sind daher ein Marker für systemischen Lupus erythematodes (SLE). Antikörper gegen Sm treten in etwa 30-40% von SLE-Patienten auf. Sie erscheinen nur selten mit anderen systemischen Bindegewebserkrankungen, und ihr Auftreten zeigt in diesem Fall entweder ein Überschneiden von Krankheiten oder Patienten, die die ARA-Kriterien für SLE noch nicht erfüllt haben, an¹⁻⁹. Andere Antikörper, z.B. gegen SS-A/Ro, SS-B/La und RNP, sind nicht krankheitsspezifisch. Antikörper gegen RNP treten in 35-45% von Patienten mit SLE und über 95% von Patienten mit Mischkollagenose (MCTD) auf. Sie erscheinen gelegentlich auch bei Sklerodermie, rheumatoider Arthritis und medikamenteninduziertem LE¹⁻⁶. Im Vergleich mit Patienten mit Anti-Sm-Antikörpern weisen Patienten mit Anti-RNP-Antikörpern eine geringere Häufigkeit von Nierenkrankheiten auf. Antikörper gegen SS-A/Ro und SS-B/La treten in etwa 30-40% bzw. 10-15% von SLE-Patienten und 60-70% bzw. 40-60% von Patienten mit Sjögren-Syndrom auf. Antikörper gegen SS-B/La treten häufig gemeinsam mit Antikörpern gegen SS-A/Ro auf.

Antikörper gegen SS-A/Ro treten auch in 60% von Patienten mit subakutem kutanen LE, in fast allen Fällen von neonatalem LE und in zwei Dritteln der SLE-Patienten mit C2-Mangel auf¹⁰⁻¹³.

Diese Antikörper können mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Aufgrund der Schwierigkeit, ENA-Antigene in gereinigter Form zu erhalten, ist die Gel-Immunodiffusionsmethode weit verbreitet. Immunodiffusion bietet eine ausreichende Spezifität, ist jedoch eine qualitative Methode mit unzureichender Sensitivität. Immco Diagnostics Inc. stehen ENA-Antigene in stark gereinigter Form zur Verfügung, und die Firma hat eine ELISA-Methode für den Nachweis von ENA-Antikörpern entwickelt. Die ELISA-Technik bietet viele Vorteile gegenüber der Immunodiffusion: Die Testdurchlaufzeiten sind verringert, individuelle Subjektivität beim Ablesen der Ergebnisse wird eliminiert, die quantitative Bestimmung wird ohne Serumtitrierung erreicht, Automatisierung ist möglich und es wird eine größere Sensitivität erreicht¹⁴.

TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasen-ELISA durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit gereinigten RNP/Sm-, Sm-, SS-A/Ro- oder SS-B/La-Antigenen beschichtet, und die unreaktierten Stellen werden blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen spezifischen Anti-ENA-Antikörper. Nicht-gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Nicht-gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten (EU)/ml angegeben.

DE

Beim RNP-Test wird ein Sm/RNP-Antigen zur Beschichtung der Vertiefungen verwendet, da das RNP-Antigen in Verbindung mit dem Sm-Antigen auftritt. Daher müssen für die Berechnung der EU/ml für RNP in derselben Serumprobe die EU/ml für Sm bestimmt werden (REF 1127); dieser Wert wird von den mit dem RNP-Testkit (REF 1126) erhaltenen EU/ml abgezogen.

REAGENZIEN

Lagerung und Vorbereitung

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

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

Die beschichteten Mikrotitervertiefungsstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer mit destilliertem oder entionisiertem Wasser.

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁵.

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

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

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ Anti-ENA-Antikörpertest (Sm/RNP) (REF 1126)

ImmuLisa™ Anti-ENA-Antikörpertest (Sm) (REF 1127)

ImmuLisa™ Anti-ENA-Antikörpertest (SS-A (Ro)) (REF 1128)

ImmuLisa™ Anti-ENA-Antikörpertest (SS-B (La)) (REF 1129)

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

12 x 8	MICROPLATE ENA	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit ENA-Antigen beschichtet
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A ENA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (grüne Kappe). Humanserum mit Antikörpern gegen ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B ENA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (lila Kappe). Humanserum mit Antikörpern gegen ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C ENA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (blaue Kappe). Humanserum mit Antikörpern gegen ENA.

DE

1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ENA * †	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (gelbe Kappe). Humanserum mit Antikörpern gegen ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ENA * †	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (rote Kappe). Humanserum mit Antikörpern gegen ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (weiße Kappe). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdinner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen .
1 x 12 ml	STOP	Gebrauchsfertige Stopplösung .
2 x	BUF WASH	Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält < 0,1% NaN₃

† Die Kits enthalten Bestandteile mit den angemessenen antigenbeschichteten Mikrotiterplatten, positiven Kontrollseren und Kalibratoren. Anstelle von "ENA" ist auf den Etiketten das spezifische Antigen bzw. der spezifische Antikörper angegeben: RNP^o für **REF** 1126, Sm^o für **REF** 1127, RO^o für **REF** 1128 und LA^o für **REF** 1129.

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

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

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

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

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

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

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

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

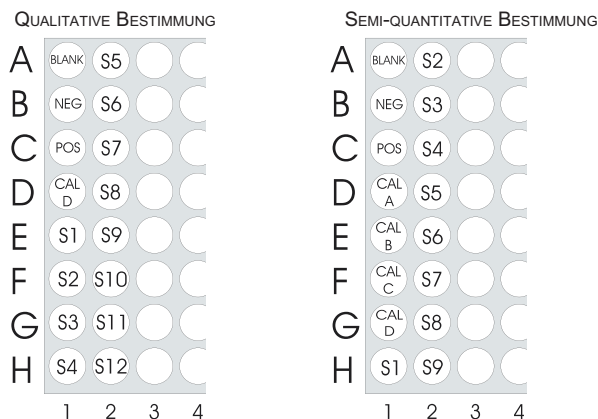
Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien 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 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Flaschen mit gelberappe*).

oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.



DE

- Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenprobe im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Serums in **0,5 ml** Probenverdünner pipettieren. **Gut mischen**.
- Schritt 5** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.
- Schritt 6** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, positiven und negativen Kontrollseren sowie der Patientenproben wie auf der obigen Probenanordnung angezeigt in die entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die gegen Luft abgelesene Extinktion der Blindprobe sollte nicht größer als 0,3 sein.
- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** 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 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen 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. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

DE

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

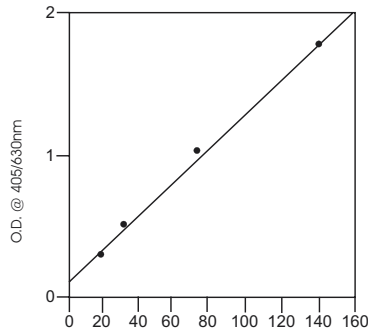
Ext. der Testprobe

Ext. von Kalibrator

X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml Testprobe

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.



Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Ergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen. Diese können je nach der untersuchten Patientenpopulation schwanken.

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

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

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

ERWARTETE WERTE

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

Diagnostische Bedeutung von Antikörpern gegen verschiedene klinische nukleäre Antigene

Isotyp des Antikörper	Assoziierung mit Krankheiten
Sm	SLE - 10-40%
RNP	SLE - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A/Ro	SLE - 15-33%
	SCLE - 60%
	Neonataler LE - 100%
	Sjögren-Syndrom - 40-70%
SS-B/La	SLE - 10-15%
	SCLE - 25%
	Sjögren-Syndrom - 15-60%

SLE = systemischer Lupus erythematoses

MCTD = Mischkollagenose

SCLE = subakuter Lupus erythematoses

Anmerkung: Die Häufigkeiten jedes spezifischen Antikörpers bei einer Krankheit wurden aus der Literatur zusammengestellt³. Die Häufigkeit schwankt je nach Patientenpopulation.

LEISTUNGSMERKMALE

Die ImmuLisa™ Anti-ENA-Antikörpertests (Sm, RNP, SS-A/Ro oder SS-B/La) wurden mit anderen im Handel erhältlichen ELISA-Testkits verglichen. Insgesamt 67 von einem klinischen Referenzlabor bezogene Seren wurden mittels Immunodiffusion als positiv oder negativ für Anti-RNP-, Anti-Sm-, Anti-SS-A/Ro- oder Anti-SS-B/La-Antikörper identifiziert.

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

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

		ImmuLisa™ RNP		
		Positiv	Negativ	Gesamt
ANDERER TEST	Positiv	11	0	11
	Negativ	5	46	51
	Gesamt	16	46	62

Übereinstimmung: 92%

Sensitivität: 100%

Spezifität: 90%

		ImmuLisa™ Sm		
		Positiv	Negativ	Gesamt
ANDERER TEST	Positiv	3	1	4
	Negativ	5	53	58
	Gesamt	8	54	62

Übereinstimmung: 90%

Sensitivität: 75%

Spezifität: 91%

DE

		ImmuLisa™ SS-A (Ro)		
		Positiv	Negativ	Gesamt
ANDERER TEST	Positiv	25	1	26
	Negativ	9	27	36
	Gesamt	34	28	62

Übereinstimmung: 84%
Sensitivität: 96%
Spezifität: 75%

		ImmuLisa™ SS-B (La)		
		Positiv	Negativ	Gesamt
ANDERER TEST	Positiv	14	1	15
	Negativ	5	42	47
	Gesamt	19	43	62

Übereinstimmung: 90%
Sensitivität: 93%
Spezifität: 89%

Je nach Konzentration des Analyten liegt der intraserielle Variationskoeffizient (VK) für den ImmuLisa™ Anti-ENA-Antikörpertest bei 4-11%. Der interserielle VK liegt bei 4-10%.



Anticorps anti-antig nes nucléaires solubles (ENA) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1126 *Test Anticorps Anti-ENA (Sm/RNP) 96 Tests*

REF 1127 *Test Anticorps Anti-ENA (Sm) 96 Tests*

REF 1128 *Test Anticorps Anti-ENA (SS-A (Ro)) 96 Tests*

REF 1129 *Test Anticorps Anti-ENA (SS-B (La)) 96 Tests*

USAGE PREVU

Tests de dosage enzymatique par la méthode ELISA, destiné à la détection et la quantification des anticorps IgG des antig nes nucléaires solubles (ENA) [RNP, Sm, SS-A (Ro), ou S-B (La)] dans le sérum humain. Les anticorps anti-Sm constituent une aide pour le diagnostic du lupus érythémateux systémique (SLE). Les anticorps RNP constituent une aide pour le diagnostic de connectivité mixte (MCTD) et du SLE. Les anticorps SS-A (Ro) et SS-B (La) constituent une aide pour le diagnostic du lupus érythémateux systémique (SLE), du lupus érythémateux cutané subaigu (SCLE) et du syndrome de Sjögren.

RESUME ET EXPLICATION

Les antig nes nucléaires solubles (ENA) sont des complexes ribonucléoprotéines solubles (snurps). Les auto-anticorps dirigés contre divers antig nes nucléaires solubles (ENA) se sont montrés utiles dans le diagnostic et le contrôle de diverses maladies du tissu systémique connectif. Les anticorps anti-Sm sont spécifiques de la maladie et représentent donc un marqueur pour le lupus érythémateux systémique (SLE). Les anticorps anti-Sm apparaissent chez approximativement 30-40% des patients atteints de SLE. Ils sont rares dans les autres maladies du tissu conjonctif systémique et, s'ils sont présents, ils indiquent des formes de chevauchement ou des patients qui n'ont pas encore répondu aux critères ARA (American Rheumatism Association) pour le SLE¹⁻⁹. D'autres anticorps tels que ceux qui sont dirigés contre SS A (Ro), SS-B (La) et RNP ne sont pas spécifiques de la maladie. Les anticorps anti-RNP (ribonucléoprotéine) se manifestent chez 35-45% des patients atteints de SLE et chez 95% des patients atteints de connectivité mixte (MCTD). Parfois, ils apparaissent également dans la sclérodémie, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux induit par des médicaments¹⁻⁶. Les patients présentant des anticorps anti-RNP présentent une incidence plus basse d'affections rénales par rapport aux patients avec des anticorps anti-Sm. Les anticorps de SS A (Ro) et SS-B (La) se manifestent respectivement chez approximativement 30-40% et 10-15% des patients atteints de SLE et 60-70% et 40-60% des patients atteints du syndrome de Sjögren. Les anticorps de SS-B (La) se manifestent plus fréquemment en association avec des anticorps SS A (Ro).

Les anticorps anti-SS A (Ro) se manifestent également chez 60% des patients avec lupus érythémateux subaigu, dans presque tous les cas de LE néo-natal et chez les deux-tiers des malades SLE avec déficit en C2¹⁰⁻¹³.

Ces anticorps peuvent être détectés par plusieurs méthodes. À cause des difficultés qui se posent pour obtenir des antig nes ENA sous forme purifiée, la méthode de l'immunodiffusion sur gel a été largement utilisée. L'immunodiffusion montre une spécificité suffisante mais représente une méthode qualitative et manque de sensibilité. Immco Diagnostics Inc. met à disposition des antig nes ENA sous forme hautement purifiée et a développé une méthode ELISA pour la détection des anticorps des antig nes nucléaires solubles. La méthodologie ELISA présente de nombreux avantages par rapport à l'immunodiffusion : les temps de réalisation de l'essai sont diminués, la subjectivité individuelle au cours de la lecture des résultats est éliminée, la quantification est effectuée sans titrage du sérum, il existe un potentiel d'automatisation et une plus grande sensibilité est garantie¹⁴.

PRINCIPE DE LA METHODE

L'essai est exécuté sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA). Des microplaques à puits sont enduites d'antig nes RNP/Sm, Sm, SS-A (Ro) ou SS-B (La), suivies 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'antig nes qui permettent aux anticorps spécifiques anti-antig nes nucléaires solubles (ENA) qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés par un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain.

FR

ajouté aux puits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat spécifique (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (EU)/ml.

Dans le test RNP, un antigène Sm/RNP est utilisé pour enduire les puits dans la mesure où l'antigène RNP s'est révélé associé avec l'antigène Sm. Par conséquent, pour calculer l'EU/ml pour RNP, l'EU/ml de Sm pour ce même échantillon du sérum doit être déterminé (REF 1127) et cette valeur est soustraite au EU/ml obtenu avec le kit de test RNP (REF 1126).

REACTIFS

Stockage et Préparation

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

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

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

Quand elle est entreposée 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 en 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée.

Précautions

Destiné à un usage diagnostique *in vitro*. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humains 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 ce matériel¹⁵.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN₃) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue 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

Immula™ Test Anticorps Anti-ENA (Sm/RNP) (REF 1126)

Immula™ Test Anticorps Anti-ENA (Sm) (REF 1127)

Immula™ Test Anticorps Anti-ENA (SS-A (Ro)) (REF 1128)

Immula™ Test Anticorps Anti-ENA (SS-B (La)) (REF 1129)

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

12 x 8

MICROPLATE **ENA**

Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène ENA.

1 x 1.5 ml

CALIBRATOR **A** **ENA** * †

Etalon A (*couvercle vert*), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ENA.






FR

1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B ENA * †	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C ENA * †	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ENA * †	Etalon D (<i>couvercle aune</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti- ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ENA * †	Contr le positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps anti-ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Contr le négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines . Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Protéger de la lumière.
1 x 12 ml	STOP	Solution d'arrêt prête à l'emploi.
2 x	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient < 0.1 % NaN₃

† Les kits contiennent les micro-lamelles recouvertes d'antigène et les contrôles positifs pour les anticorps et les étalons. Au lieu de "ENA" sur les étiquettes, apparaît l'antigène spécifique ou l'anticorps: "RNP" pour **REF** 1126, "Sm" pour **REF** 1127, "RO" pour **REF** 1128 et "LA" pour **REF** 1129.

Symboles utilisés sur les étiquettes:

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

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée ou dispositif de lavage de microplaques automatique en mesure de dispenser 200 µl
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Prouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprovettes
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant

- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.

RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

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

PROCEDURE

Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à une température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer le test.
- 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 devrait avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

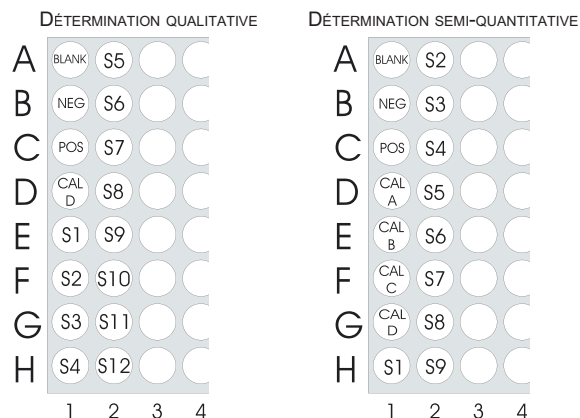
Méthode de test

Etape 1 Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante.

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

Etape 3 Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement l'Etalon Bas D prêt à l'emploi (*flacon avec couvercle jaune*).

ou Pour un dosage semi-quantitatif, utiliser les Etalons A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



FR

- Etape 4** Préparer une dilution **1:101** de spécimen patient en pipetant 5µl de sérum dans 0.5 ml de diluant de sérum. **Bien mélanger.**
- Etape 5** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.
- Etape 6** Pipeter **100 µl** d'étalon prêt à l'emploi, de régulateur positif et négatif et d'échantillons patients dans les puits appropriés comme dans le schéma de l'échantillon ci-dessus.
Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif blanc. Mettre à zéro le lecteur ELISA sur le réactif à blanc. L'absorption du réactif blanc ne doit pas être supérieure à 0,3 quand elle est mesurée contre l'air.
- Etape 7** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 8** 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 9** Pipeter **100 µl** de Conjugué dans les microplaques à puits.
- Etape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 7.
- Etape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrage que pour le conjugué.
- Etape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Etape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des étalons, des régulateurs positif et négatif et un réactif blanc doivent être utilisés lors de chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanc doit être inférieure à 0,3. L'étalon A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer EU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, l'absorption due à l'étalon D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calculs

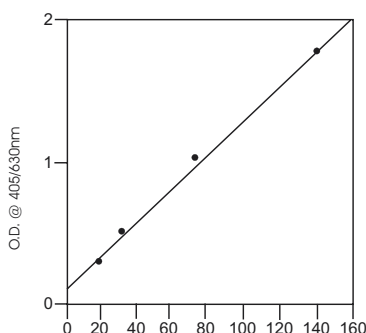
Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. de l'étalon}} \times \text{EU/ml de l'étalon D} = \text{EU/ml échantillon d'essai}$$

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption des Etalons A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons patients de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.



Etalon

Les étalons prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patients qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués, de telle manière qu'elles s'inscrivent dans la plage de la courbe de l'étalon quand on refait le test. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier en fonction de la population examinée.

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

LIMITES DE LA PROCEDURE

Le test ImmuLisa™ anti-ENA 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. Un diagnostic ne devrait pas être fait en se basant uniquement sur le test ELISA.

VALEURS ATTENDUES

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

Signification diagnostique des anticorps de divers antigènes nucléaires solubles

Isotype anticorps	Association maladie
Sm	SLE - 10-40%
RNP	SLE - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	SLE - 15-33%
	SCLE - 60%
	Lupus érythémateux néo-natal - 100%
SS-B (La)	Syndrome de Sjögren - 40-70%
	SLE - 10-15%
	SCLE - 25%
	Syndrome de Sjögren' - 15-60%

SLE = Lupus ryth mateux syst mi ue
MCTD = connectivit mixte
SCLE = Lupus ryth mateux cutan subaigu

Note : La fréquence de la spécificité de chaque anticorps dans une maladie représente une compilation de la littérature³. L'incidence varie selon la population des patients.

DONNEES DE RENDEMENT

Les tests Immulisa™ anticorps anti-ENA [Sm, RNP, SS-A (Ro) ou SS-B (La)] ont été comparés avec d'autres kits de test ELISA. Un total de 67 sérums d'un laboratoire clinique de référence ont été identifiés par immunodiffusion comme étant positifs ou négatifs pour les anticorps anti-RNP, anti-Sm, anti-SS A (Ro) ou anti SS-B (La).

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

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

		Immulisa™ RNP		
		Positive	Negative	Total
AUTRES	Positive	11	0	11
	Negative	5	46	51
	Total	16	46	62

Accord : 92%
 Sensibilité : 100%
 Spécificité : 90%

		Immulisa™ Sm		
		Positive	Negative	Total
AUTRES	Positive	3	1	4
	Negative	5	53	58
	Total	8	54	62

Accord : 90%
 Sensibilité : 75%
 Spécificité : 91%

FR

		Immulin™ SS-A (Ro)		
		Positive	Negative	Total
AUTRES	Positive	25	1	26
	Negative	9	27	36
	Total	34	28	62

Accord : 84%
Sensibilité : 96%
Spécificité : 75%

		Immulin™ SS-B (La)		
		Positive	Negative	Total
AUTRES	Positive	14	1	15
	Negative	5	42	47
	Total	19	43	62

Accord : 90%
Sensibilité : 93%
Spécificité : 89%%

Selon la concentration de la substance à analyser le coefficient de variation intra-essai (CV) pour le test anticorps anti l'ENA Immulin™ est 4-11%. Le CV inter-essai est 4-10%.



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anticorpi Anti-Antigene Nucleare Estraibile (ENA) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1126 *Anticorpi Anti-Sm/RNP (ENA) 96 Determinazioni*

REF 1127 *Anticorpi anti-Sm (ENA) 96 Determinazioni*

REF 1128 *Anticorpi anti-SS-A(Ro) (ENA) 96 Determinazioni*

REF 1129 *Anticorpi anti-SS-B(La) (ENA) 96 Determinazioni*

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la ricerca e la quantificazione di anticorpi anti-ENA [RNP, Sm, SS-A (Ro) oppure SS-B (La)] di classe IgG nel siero umano. La rilevazione di anticorpi anti Sm è utile nella diagnosi di LES (lupus eritematoso sistemico). La rilevazione di anticorpi anti RNP è utile nella diagnosi di MCTD (malattia mista del tessuto connettivo) e di LES. La rilevazione di anticorpi anti SS-A (Ro) e SS-B (La) è utile nella diagnosi di LES, di LECS (lupus eritematoso cutaneo subacuto) e della sindrome di Sjögren (SS).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Gli ENA sono complessi di ribonucleoproteine solubili (snurps). Gli autoanticorpi diretti contro i vari ENA si sono dimostrati importanti nella diagnosi e nel monitoraggio di diverse malattie sistemiche del tessuto connettivo. Gli anticorpi anti-Sm sono specifici della malattia, e quindi sono un marker per il lupus eritematoso sistemico (LES). Gli Anticorpi anti-Sm compaiono nel 30-40% circa dei pazienti LES ; sono rari in altre malattie sistemiche del tessuto connettivo e, se presenti, indicano o sovrapposizione di patologie o pazienti che non hanno ancora soddisfatto i criteri ARA per il LES¹⁻⁹. Altri anticorpi, come quelli diretti contro SS-A (Ro), SS-B (La) e RNP non sono specifici della malattia. Anticorpi anti-RNP compaiono nel 35-45% dei pazienti con LES e in più del 95% dei pazienti con malattia mista del tessuto connettivo (MCTD). Occasionalmente essi sono stati rilevati anche in casi di sclerodermia, artrite reumatoide e LE indotto da farmaci¹⁻⁶. I pazienti con anticorpi anti-RNP presentano una minore incidenza di nefropatie rispetto ai pazienti con anticorpi anti-Sm. Anticorpi anti SS-A (Ro) e SS-B (La) compaiono rispettivamente in circa il 30-40% e nel 10-15% dei pazienti con LES e nel 60-70% e 40-60% dei pazienti con sindrome di Sjögren. Gli anticorpi anti SS-B (La) compaiono spesso in associazione con gli anticorpi anti SS-A (Ro).

Anticorpi anti SS-A (Ro) compaiono anche nel 60% dei pazienti con LE cutaneo subacuto, in quasi tutti i casi di LE neonatale e nei due terzi dei pazienti LES con carenza di C2¹⁰⁻¹³.

Questi anticorpi possono essere rilevati utilizzando metodiche diverse. A causa della difficoltà nell'ottenere antigeni ENA in forma purificata, è stato largamente usato il metodo dell'immunodiffusione su gel. L'immunodiffusione mostra una sufficiente specificità, ma è un metodo qualitativo e manca di sensibilità. La Immco Diagnostics ha disponibili antigeni ENA in forma altamente purificata e ha sviluppato una metodologia di dosaggio immunoenzimatico (ELISA) per l'individuazione degli anticorpi anti-ENA. Tale metodologia presenta numerosi vantaggi rispetto all'immunodiffusione: i tempi di analisi sono più brevi, viene eliminata la soggettività individuale nella lettura dei risultati, la quantificazione viene ottenuta senza titolazione sierica, esistono potenzialità di automazione e viene garantita una maggiore sensibilità¹⁴.

PRINCIPI DELLE METODICHE

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con antigeni purificati RNP/Sm, Sm, SS-A (Ro) o SS-B (La); 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, e ci permette agli anticorpi specifici anti-ENA presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati vengono rilevati da un anticorpo anti IgG umano marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU)/ml.

Nel test RNP, per rivestire i pozzetti viene usato un antigene Sm/RNP, in quanto l'antigene RNP si trova associato all'antigene Sm. Per calcolare le EU/ml relative a RNP si devono determinare le EU/ml di Sm per quello stesso campione di siero (REF 1127) e questo valore deve essere sottratto dalle EU/ml ottenute con il kit per il test RNP (REF 1126).

REAGENTI

Conservazione e preparazione

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

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

Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone con acqua distillata o deionizzata.

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 materiali¹⁵.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN₃) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

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

Materiali forniti

ImmLISA™ Test anticorpi anti-ENA (Sm/RNP) REF 1126

ImmLISA™ Test anticorpi anti-ENA (Sm) REF 1127

ImmLISA™ Test anticorpi anti-ENA (SS-A (Ro)) REF 1128

ImmLISA™ Test anticorpi anti-ENA (SS-B (La)) REF 1129

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE ENA	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A ENA * †	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B ENA * †	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C ENA * †	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ENA.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ENA * †	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ENA.


IT

1 x 1.5 ml	CONTROL + ENA * †	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS * †	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane ; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente del siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso. Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN₃

† I kit contengono tra i componenti appropriate micropiastre rivestite di antigene, controlli positivi e calibratori. Sulle etichette al posto della dicitura "ENA", compare l'indicazione dello specifico antigene o dell'anticorpo: "RNP" per 1126, "Sm" per 1127, "RO" per 1128 e "LA" per 1129.

Simboli usati sulle etichette:

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

Materiali necessari ma non forniti

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

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni

ESECUZIONE DEL TEST

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente 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 tutti gli step 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

- 1 Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- 2 Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- 3 Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (fiala con tappo giallo) mentre per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA

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

DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA

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

- 4 Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente pipettando **5µl** di siero in **0.5 ml** di Diluente del Campione. **Miscelare bene**.

IT

- 5 Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- 6 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.
- 7 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- 8 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.
- 9 Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- 10 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- 11 Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 7.
- 12 Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- 13 Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- 14 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.
- 15 Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1.0, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore < 20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, l'assorbanza del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore di quella del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

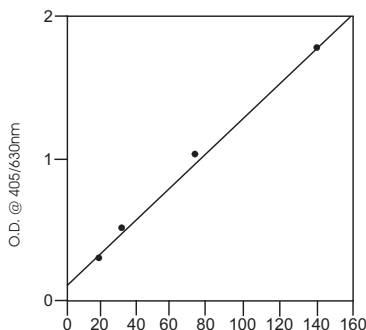
Assorbanza del campione del test

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

Assorbanza del calibratore

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semi-quantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali, che possono variare a seconda della popolazione esaminata.

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

LIMITAZIONI DEL TEST

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

VALORI ATTESI

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

Significato diagnostico degli anticorpi a differenti antigeni nucleari solubili

Anticorpo	Malattia Associata
Sm	LES - 10-40%
RNP	LES - 20-30%
	MCTD - 95-100%
SS-A (Ro)	LES - 15-33%
	LECS - 60%
	LE Neonatale - 100%
	Sindrome di Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	LES - 10-15%
	LECS - 25%
	Sindrome di Sjögren - 15-60%

LES = lupus eritematoso sistemico

MCTD = malattia mista del tessuto connettivo

LECS = lupus eritematoso cutaneo subacuto

Nota La frequenza della specificità di ciascun anticorpo in una malattia è presa dalla letteratura³. L'incidenza varia a seconda della popolazione di pazienti.

PERFORMANCE DEL TEST

I test ImmuLisa™ per la ricerca di anticorpi anti-ENA [Sm, RNP, SS-A (Ro) o SS-B (La)] sono stati confrontati con altri kit immunoenzimatici disponibili in commercio. 67 sieri provenienti da un laboratorio clinico di riferimento sono stati identificati, mediante immunodiffusione, come positivi o negativi per gli anticorpi anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) o anti-SS-B (La).

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

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

		ImmuLisa™ RNP		
		Positivo	Negativo	Totale
ALTRO	Positivo	11	0	11
	Negativo	5	46	51
	Totale	16	46	62

Concordanza: 92%

Sensibilità :100%

Specificità:90%

		ImmuLisa™ Sm		
		Positivo	Negativo	Totale
ALTRO	Positivo	3	1	4
	Negativo	5	53	58
	Totale	8	54	62

Concordanza: 90%

Sensibilità : 75%

Specificità: 91%

		ImmuLisa™ SS-A (Ro)		
		Positivo	Negativo	Totale
ALTRO	Positivo	25	1	26
	Negativo	9	27	36
	Totale	34	28	62

Concordanza: 84%

Sensibilità 96%

Specificità: 75%

		ImmuLisa™ SS-B (La)		
		Positivo	Negativo	Totale
ALTRO	Positivo	14	1	15
	Negativo	5	42	47
	Totale	19	43	62

Concordanza: 90%

Sensibilità 93%

Specificità: 89%

A seconda della concentrazione della sostanza analizzata il coefficiente di variazione (CV) all'interno di uno stesso saggio per il test ImmuLisa™ di ricerca dell'anticorpo anti-ENA è pari al 4-11%. Il CV tra un saggio e l'altro è pari al 4-10%.



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA para Anticorpos contra Antígenos Nucleares Extraíveis (ENA)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1126 *Teste de Anticorpos Anti-ENA (Sm/RNP) 96 Determina es*

REF 1127 *Teste de Anticorpos Anti-ENA (Sm) 96 Determina es*

REF 1128 *Teste de Anticorpos Anti-ENA (SS-A [Ro]) 96 Determina es*

REF 1129 *Teste de Anticorpos Anti-ENA (SS-A [La]) 96 Determina es*

APLICAÇÃO

Exames de imunoabsorção enzimática para a detecção e quantificação de anticorpos IgG contra antígenos nucleares extraíveis (ENA) [RNP, Sm, SS-A (Ro), ou SS-B (La)] em soro humano. Os anticorpos Sm ajudam no diagnóstico de lúpus eritematoso sistémico (LES). Os anticorpos RNP ajudam no diagnóstico da doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) e LES. Os anticorpos SS-A (Ro) e SS-B (La) ajudam no diagnóstico de LES, Lúpus eritematoso cutâneo subagudo (LECS) e síndrome de Sjögren.

DESCRIÇÃO E EXPLICAÇÃO

Os ENAs são compostos de ribonucleoproteína solúvel (“snurps”). Os auto-anticorpos dirigidos contra diversos ENAs provaram ser de valor no diagnóstico e monitorização de diversas doenças sistémicas do tecido conjuntivo. Os anticorpos Anti-Sm são específicos da doença e portanto são marcadores de Lúpus eritematoso sistémico (LES). Os anticorpos a Sm apresentam-se em aproximadamente 30 a 40% dos doentes de LES. Esses são raros noutras doenças sistémicas do tecido conjuntivo e, se presentes, indicam sobreposição da doença ou doentes que ainda não correspondem aos critérios ARA para LES¹⁻⁹. Outros anticorpos como os dirigidos contra SS-A (Ro), SS-B (La) e RNP não são específicos da doença. Os anticorpos anti-RNP aparecem em 35 a 45% dos doentes de LES e em mais de 95% dos doentes com doença mista do tecido conjuntivo (DMTC). Ocasionalmente também podem ser encontrados em esclerodermia, artrite reumatóide e LE provocado por medicamentos¹⁻⁶. Os doentes com anticorpos anti-RNP têm uma menor incidência de patologia renal em comparação com os doentes com anticorpos anti-Sm. Os anticorpos a SS-A (Ro) e SS-B (La) apresentam-se em aproximadamente 30 a 40% e 10 a 15% de doentes LES e em 60 a 70% e 40 a 60% de doentes com a síndrome de Sjögren, respectivamente. Os anticorpos a SS-B (La) apresentam-se frequentemente em associação com os anticorpos SS-A (Ro).

Os anticorpos a SS-A (Ro) também se apresentam em 60% dos doentes com LE cutâneo subagudo, em quase todos os casos de LE neonatal e em dois terços dos doentes de LES com deficiência de C2¹⁰⁻¹³.

Estes anticorpos podem ser detectados por vários métodos. Em virtude das dificuldades na obtenção de antígenos ENA em forma pura, tem sido muito utilizado o método de imunodifusão em gel. A imunodifusão apresenta uma especificidade suficiente mas é um método qualitativo e perde em sensibilidade. A Immco Diagnostics Inc. tem à disposição antígenos ENA numa forma altamente purificada e desenvolveu um método ELISA para a detecção de anticorpos ENA. A metodologia ELISA tem numerosas vantagens em relação à imunodifusão: os tempos de exame são reduzidos, é eliminada a subjectividade individual na leitura dos resultados, a quantificação é obtida sem a titulação do soro, tem potencial de automatização e obtém-se uma maior sensibilidade¹⁴.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é executado como imunoensaio de absorção enzimática de fase sólida. Os microporos são revestidos com antígenos RNP/Sm, Sm, SS-A (Ro) ou SS-B (La) purificados seguidos por um bloqueio dos locais não reactivos para reduzir a ligação não específica. Os controlos, os calibradores e as amostras de soro do doente são incubados nos poços revestidos com antígeno o que permite a ligação específica dos anticorpos anti-ENA presentes no soro. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem dos microporos. Os anticorpos que se ligaram são detectados juntando um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima aos poços. O conjugado que não se tiver ligado é eliminado por lavagem. Depois junta-se aos microporos um substrato enzimático específico (pNPP) e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração de cor, provocada pela conversão do substrato pNPP. A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro. Os resultados são apresentados em unidades ELISA (UE)/ml.

No teste RNP é usado um antígeno Sm/RNP para revestir os microporos pois o antígeno RNP encontra-se

PT

associado ao antigénio Sm. Portanto, para calcular as UE/ml de RNP, devem ser determinadas as UE/ml de Sm na mesma amostra de soro (REF 1127) e este valor subtraído às UE/ml obtidas com o kit de teste RNP (REF 1126).

REAGENTES

Conservação e Preparação

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

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

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

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 com água destilada ou desionizada.

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 requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais em matéria de conservação, distribuição e eliminação desses materiais¹⁵.

ATENÇÃO – a azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as tubagens de cobre ou chumbo para formar azidas metálicas muito explosivas. Na eliminação de líquidos, junte quantidades abundantes de água para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director do laboratório ou o Centro Anti-Venenos.

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

Materiais fornecidos

Teste de Anticorpos Anti-ENA (Sm/RNP) ImmuLisa™ (REF 1126)

Teste de Anticorpos Anti-ENA (Sm) ImmuLisa™ (REF 1127)

Teste de Anticorpos Anti-ENA (SS-A [Ro]) ImmuLisa™ (REF 1128)

Teste de Anticorpos Anti-ENA (SS-A [La]) ImmuLisa™ (REF 1129)

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8

MICROPLATE ENA

Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio ENA.

1 x 1.5 ml

CALIBRATOR A ENA * †

Calibrador A pronto a usar (tampa verde). Soro humano contendo anticorpos para ENA.

1 x 1.5 ml

CALIBRATOR B ENA * †

Calibrador B pronto a usar (tampa violeta). Soro humano contendo anticorpos para ENA.

1 x 1.5 ml

CALIBRATOR C ENA * †

Calibrador C pronto a usar (tampa azul). Soro humano contendo anticorpos para ENA.






PT

1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D ENA * †	Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos para ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ENA * †	Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-ENA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPPOS * †	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Soluto de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém < 0,1% NaN₃

† Os kits contêm componentes com microplacas revestidas com antigénios adequados, controlo positivo para anticorpos e calibradores. Nos rótulos, aparece o antigénio ou anticorpo específico em substituição de “ENA”: “RNP” para **REF** 1126, “Sm” para **REF** 1127, “RO” para **REF** 1128 e “LA” para **REF** 1129.

Símbolos utilizados nos rótulos:

LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
	Prazo de validade
	Temperatura de armazenamento
	Ler as instruções de utilização
IVD	Utilização em diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído ou lavador automático de microplacas com a capacidade de 200 µl
- Pipetas para 5 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Papel absorvente

- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o 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 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 junta o reagente.
- O adição de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e com na mesma sequência.
- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no congelador.

Método do teste

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

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

Passo 3 Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo, pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).
ou Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D prontos a usar, como descrito no esquema abaixo.

DETERMINA O QUALITATIVA

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

DETERMINA O SEMIQUANTITATIVA

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

PT

- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de Diluente para Soro. **Misture bem.**
- Passo 5** Retire do pacote os micropoços necessárias e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas. Coloque correctamente os micropoços no suporte extra fornecido.
- Passo 6** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nos respectivos micropoços como ilustrado no esquemas das amostras acima.
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 não deverá ser superior a 0,3 quando lido em relação ao ar.
- Passo 7** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** 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 9** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como no Passo 7.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** 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 15** Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas a comprimento de onda simples ou duplo de 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser $< 0,3$. O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar UE/ml deverá ser calculada a média das duas leituras. Quando se efectuam determinações qualitativas, a absorvância do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

PT

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

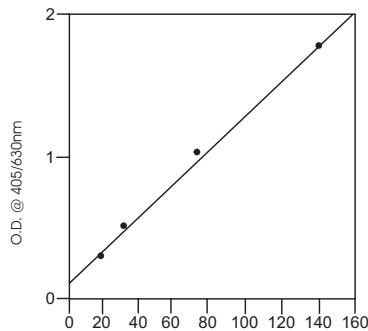
Abs. da Amostra de Teste

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

Abs. do Calibrador D

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.



Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em cada teste. As amostras dos doentes com níveis de anticorpos mais elevados devem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para a determinação com precisão dos valores semiquantitativos essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de solução.

Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais. Esses poderão variar em função da população examinada.

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

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

VALORES PREVISTOS

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

Significado Diagnóstico de Anticorpos a vários Antígenos Nucleares Solúveis

Isótipo de Anticorpo	Associação a doença
Sm	LES - 10-40%
RNP	LES - 20-30%
	DMTC - 95-100%
SS-A (Ro)	LES - 15-33%
	LECS - 60%
	LE Neonatal - 100%
	Síndrome de Sjögren - 40-70%
SS-B (La)	LES - 10-15%
	LECS - 25%
	Síndrome de Sjögren - 15-60%

LES = Lúpus eritematoso sistêmico

DMTC = doença mista do tecido conjuntivo

LECS = Lúpus eritematoso cutâneo subagudo

Nota: A frequência de especificidade de cada anticorpo numa doença representa uma compilação extraída da literatura³. A incidência varia em função da população de doentes.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Os testes para anticorpos anti-ENA ImmuLisa™ [Sm, RNP, SS-A (Ro) ou SS-B (La)] foram comparados a outros kits de teste ELISA obtidos comercialmente. Um total de 67 soros, de um laboratório clínico de referência, foi identificado por imunodifusão como positivos ou negativos a anticorpos anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A (Ro) ou anti-SS-B (La).

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

Comparação dos Métodos ELISA para a Detecção de Anticorpos anti-ENA

		RNP ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Total
OUTROS	Positivo	11	0	11
	Negativo	5	46	51
	Total	16	46	62

Concordância: 92%

Sensibilidade: 100%

Especificidade: 90%

		Sm ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Total
OUTROS	Positivo	3	1	4
	Negativo	5	53	58
	Total	8	54	62

Concordância: 90%

Sensibilidade: 75%

Especificidade: 91%

PT

		SS-A (Ro) Immulisa™		
		Positivo	Negativo	Total
OUTROS	Positivo	25	1	26
	Negativo	9	27	36
	Total	34	28	62

Concordância: 84%
Sensibilidade: 96%
Especificidade: 75%

		SS-B (La) Immulisa™		
		Positivo	Negativo	Total
OUTROS	Positivo	14	1	15
	Negativo	5	42	47
	Total	19	43	62

Concordância: 90%
Sensibilidade: 93%
Especificidade: 89%

Dependendo da concentração do analisado o Coeficiente de Variação intra-teste (CV) para o Teste para anticorpos anti-ENA Immulisa™ é 4-11%. O inter-teste CV é 4-10%.

REFERENCES BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ Λ•TERATUR B•BL•OGRAPH•E B•BL•OGRAF•A

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Tan EM. Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 25: 753-756, 1982.
3. Tan EM, Chan E, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
4. Reichlin M. Current perspectives on serological reactions in SLE patients. *Clin Exp Immunol* 44: 1-10, 1981.
5. Reichlin M and Harley JB. Antibodies to extractable nuclear antigens: clinical significance. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 555-563, 1987.
6. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity and the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
7. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Medical Clinics of North America* 70: 237-261, 1986.
8. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 29: 457-460, 1986.
9. Williamson GG and Boyle JA. Antigenic relatedness of small ribonucleoprotein particles. *Biochem Biophys Acta* 798:149-155, 1984.
10. Clark G, Reichlin M and Tomasi TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 110:117-124, 1969.
11. Alspaugh MA and Maddison P. Resolution of the identity of certain antigen antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arth Rheum* 22: 796-798, 1979.
12. Sontheimer RD, Thomas JR and Gilliam JN. Subacute cutaneous lupus erythematosus subset. *Arch Dermatol* 115: 1409-1415, 1979.
13. Sontheimer RD, Maddison PJ and Reichlin M. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 97:664-671, 1982.
14. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennard DM and Hough D. Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 62: 337- 245, 1985.
15. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub No [CDC] 88-8395), 1988.



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

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

E-Mail: info@immco.com

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