



# ImmuBlot™ Anti-Nuclear Antibody (ANA) Western Blot Immunoassay

IVD

## PRODUCT INSERT

Code 1170 20 Determinations

## INTENDED USE

The ANA Western Blot Immunoassay is used for the detection and identification of RNP, Sm, Ro/SS-A, La/SS-B, Scl-70, Jo-1 and other anti-nuclear autoantibodies.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Antinuclear antibodies (ANA), detected by indirect immunofluorescence, aid in the diagnosis of connective tissue disorders including *systemic lupus erythematosus* (SLE), *mixed connective tissue disease* (MCTD), *Sjögren's syndrome* and *scleroderma*<sup>1-5</sup>. ANA occur in about 95% of SLE patients as well as in patients with other connective tissue diseases. ANA may also occur in other disorders such as chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis<sup>6-8</sup>.

ANA are not disease specific. The identification of ANA specificities to various antigens are of help as they may be associated with a particular disease or disease subset. ANA specificities can be determined by gel precipitation, hemagglutination, ELISA, or by western (immuno) blot.

Antibodies to U-1 RNP are characteristic of MCTD patients. Antibodies to Sm antigen occur exclusively in SLE. SS-A (Ro) antibodies are detected in *Sjögren's syndrome* and SLE<sup>1</sup>. Antibodies to Jo-1, or histidyl-tRNA synthetase, occur in patients with myositis<sup>1,3</sup>. SS-B (La) is primarily reported in SLE and *Sjögren's syndrome*. Antibodies to both the 52 kD SS-A (Ro) and the 48 kD SS-B (La) are found in virtually all patients with *neonatal lupus erythematosus* and *complete heart block*, and the presence of both in SLE indicates a later age of disease onset and a lower frequency of *lupus nephritis*<sup>9</sup>. Scl-70 antibodies react with *human topoisomerase* and are found in patients with *diffuse scleroderma*.

## PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the ImmuBlot™ ANA Western Blot Immunoassay, the nuclear and cytoplasmic antigens from a HeLa cell line, supplemented with additional antigens, are separated according to their molecular weight (MW) by *polyacrylamide* gel electrophoresis and then transferred onto a PVDF membrane. A set of 3 different MW markers are processed simultaneously in order to facilitate MW identification and hence, interpretation of the results. The additional MW markers (125 kD, 77 kD, 70 kD) appear as blue-violet bands during the staining process. They serve as internal control markers for the detection system.

Antigen containing strips are incubated with control or patient serum. If present in the serum, anti-nuclear antibodies bind to the specific antigen on the strip. After repeated washing and incubations with two types of conjugates and a chromogen substrate, positive reactions are indicated by a blue-violet banding on the strip. The specificity of the antibody is defined by the identification of the positive bands in comparison with the positive control strip, when aligned with the 3 MW markers (125kD, 77kD, 70kD).

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@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)

or your local product distributor

EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé  
EMERGO Group, Inc.  
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands  
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299  
[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)

## 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 (22-30°C) prior to use.

Coated antigen strips are for one time use only.

### Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>10</sup>.

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

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO Diagnostics. 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

ImmuBlot™ ANA Western Blot Immunoassay

Code: 1170

### Kit contains sufficient reagents to perform 20 determinations.

1 x 20	Western Blot Strips, numbered individually at the top.
1 x 120 µl	*Positive control ( <b>red vial cap</b> ), contains antibodies to RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo-1
1 x 120 µl	*Negative Control ( <b>yellow vial cap</b> )
1 x 250 µl	*Conjugate A ( <b>blue vial cap</b> )
1 x 250 µl	*Conjugate B ( <b>white vial cap</b> )
1 x 60 ml	*Blocking Diluent. Ready to use.
1 x vial	Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter
1 x 25 ml	*Enzyme Substrate ( <b>amber bottle</b> ) contains 5-bromo-4 chloro-3 indoiyl-phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium (NBT)
1	Lot specific Positive Control template to assist in interpretation
3	Assay trays

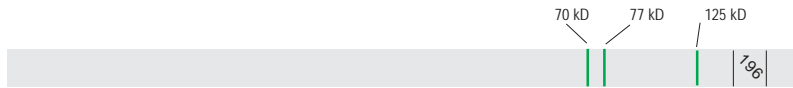
\*Contains <0.1% NaN<sub>3</sub>

### Materials Required But Not Provided

- Clean 1000 ml graduated cylinder
- Blunt forceps (Filter forceps)
- Rocker or rotating shaker
- Disposable polypropylene tubes for mixing reagents
- Absorbent paper or paper towels
- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipet tips
- Timer

## NOTES

**Figure 1: Negative Control Strip**



The presence of blue-violet band(s) (other than molecular markers) indicate a positive reaction. The lot specific template of the Positive Control which is included in each kit should be used as an interpretation aid only.

**Figure 2: Positive Control Strip**



**Table 1: Prevalence of each Type of ANA in Disease**

Antigen	Disease Specificity	Prevalence	Molecular Weight (primary band in bold)
Sm	SLE	75-90%	<b>B' 29 kD, B 28 kD,</b> and D 16 kD
U-1 RNP	SLE MCTD	35-45% 95-98% (high titer)	<b>68 kD,</b> 34 kD, 22 kD
SS-A/Ro	SLE Sjögrens syndrome	25-35% 50-60%	<b>60 kD,</b> 52 kD
SS-B/La	SLE Sjögrens syndrome	10-21% 40-50%	<b>48 kD,</b> 43 kD
Scl 70	Systemic Sclerosis	20-25%	<b>100 kD</b>
Jo-1	Myositis	25-30%	<b>56 kD</b>

**SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Freshly drawn and properly refrigerated sera or plasma should be used in this assay. Do not use icteric, hemolyzed, grossly lipemic or specimens with obvious microbial contamination. Samples can be stored at 2-8°C for 3-5 days or at -20°C or lower for longer periods. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

**PROCEDURE**

**Procedural Notes**

- Read Product Insert carefully before starting with the assay.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate 30 minutes at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Positive and Negative Control strips must be included in each assay run.
- Proper washing technique is critical to the satisfactory performance of the assay.

**Test Method**

- Step 1.** Using blunt forceps, place required **Strips** with number side up into individual wells of the assay tray.
- Step 2.** Pipet **1.0 ml** of Blocking Diluent followed by **10 µl** of Positive and Negative Control and patient sample into appropriate wells to obtain a **1:101 dilution**. Incubate **60 minutes** (± 5 min) at room temperature on a rocker or rotating shaker.
- Step 3.** Aspirate sample solution into waste container. Thoroughly wash strips with Wash Buffer by squirting solution directly onto strips. Soak strips with gentle agitation for **5 minutes** and aspirate solution into waste container. **Repeat 2x for a total of 3 washes.**

*Caution: Complete washing of the strips between incubations is crucial to obtain valid results. Improper washing will result in high background staining. Position the tip of the squirt bottle approximately half a centimeter above each strip and spray directly down its entire length. Before discarding, rock the tray back and forth, loosening the strip from the bottom of the well and rinsing away any reagent trapped beneath it.*

- Step 4.** Pipet **1.0 ml** of Blocking Diluent followed by **10 µl** of Conjugate A into each well. Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature on rocker or rotating shaker.
- Step 5.** Repeat **Step 3.**
- Step 6.** Pipet **1.0 ml** of Blocking Diluent followed by **10 µl** of Conjugate B into each well. Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature on rocker or rotating shaker.
- Step 7.** Repeat **Step 3.**
- Step 8.** Pipet **1.0 ml** Substrate into each well. Incubate with gentle shaking **10 minutes** (± 5 min) at room temperature and reduced light.
- Step 9.** Stop development with deionized water (2 x 1 minute washes).
- Step 10.** Using blunt forceps, remove strips from assay tray and place them gently onto absorbent paper. Handle strips only at the ends and let them dry **15-20 minutes**. Mount strips carefully onto sheet of paper by aligning MW markers and store in the dark.

**Quality Control**

If the following specifications are not met, the run is to be considered invalid, and should be repeated.

1. The Negative Control shows no additional bands other than molecular weight markers at 125 kD, 77 kD, and 70 kD. These markers appear on every strip and help in the interpretation of the reacted strips (Figure 1).

- The Positive Control should be positive for Scl-70 (100 kD), SS-A(Ro) (60 kD), Jo-1(56 kD), SS-B(La) (48 kD), RNP (68 kD) and Sm B/B<sup>1</sup> (28,29 kD) as shown in Figure 2. Additional bands may also be present as indicated in Table 1 on the next page.

## RESULTS

The ANA western blot strips contain three major bands at 125kD, 77kD and 70kD molecular weights (refer to figure 1). These bands serve as molecular weight alignment markers. Use the 125kD band and/or the 77kD and 70kD bands to align patient strips with the Control Card.

The presence of blue-violet band(s) (other than molecular markers) indicate a positive reaction. The lot specific template of the Positive Control which is included in each kit should be used as an interpretation aid only.

### Identification of Individual Autoantibodies

A positive test results in the presence of a band that aligns directly to a reference band on the positive control. For example, anti-Sm antibodies primarily yield a doublet at 28 kD and 29 kD. If the sample has a doublet at 28 and 29 kD that aligns with the positive control Sm bands, then the Sm specificity can be assigned to the patient's serum.

Samples may have other bands than specificities shown. Since the antigens contained on the strips are prepared from whole cell extracts, bands of unknown specificities may also be identified.

Samples can demonstrate more than one specificity and may have bands that do not align with bands in controls. Samples that are strongly positive for Sm, have many bands from 140 kD down to 12.5 kD with the B/B<sup>1</sup> bands at 28 kD, 29 kD being the strongest. These additional bands should not be confused with other specificities.

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ImmuBlot™ ANA Kit should be used as an aid to diagnosis. Positive results may be found in apparently healthy individuals. Therefore, results should be interpreted by a medical authority in light of the patient's complete clinical condition.

### EXPECTED VALUES

Expected values in a normal population are negative. The prevalence of frequently detected autoantibodies related to Collagen-Vascular disorders are summarized below.

### TROUBLESHOOTING GUIDE

- Extra bands on Negative Control strip.** Contaminated Negative Control serum, or cross contamination from another well.
- Positive Control appears like Negative Control strip.** Negative Control serum was confused with Positive Control serum.
- Strips are completely blank.** Addition of Conjugate 1 or 2, Substrate and/or specimens may have been omitted.
- High background, poor contrast between bands and background.** Wash step(s) may have been omitted or incorrectly performed, or incubations were overextended.

## REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

- Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel. 1985, 318-53.
- Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed. 1987, 519-531.
- Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin Immunol Immunopathol; 1988, 47:121-141.
- von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum; 1985, 21:323-58.
- Tan, EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. "Advances in Immunology" Vol. 44; 1987, pp 93-151.
- Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A and Meyer zum Büschenfeld KH. Significant autoimmune markers of autoimmune liver disorders: Current status. J Clin Lab Anal; 1987, 1:362-370.
- Mackay IR. Autoimmunity and the liver. Clin Aspects Immunity. 2: 8- 17, 1988.
- McMillan SA, Alderdice JM, McKee CM et al. Diversity of autoantibodies in patients with anti-mitochondrial antibody and their diagnostic value. J Clin Path 4: 232-236, 1987.
- Ben-Chetrit, E, Fox RI, and Tan EM. Dissociation of Immune Responses to the SS-A(Ro) 52kD and 60kD polypeptides in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. Arth. Rheum. 33, 349-355, 1990.
- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub No [CDC] 93-8395), 1993.

A presença das faixas azul-violeta (à exceção dos marcadores MW) indica uma reação positiva. O molde específico do lote do controle positivo que é incluído em cada jogo deve ser usado como um dae (dispositivo automático de entrada) da interpretação somente.

#### Identificação de autoanticorpos individuais

Resultados de teste do positivo na presença de uma faixa que alinhe diretamente a uma faixa da referência no controle positivo. Para o exemplo, os anticorpos anti-SM programada rendem primeiramente uma faixa dobro o 28 kD e 29kD. Se a amostra tiver uma faixa dobro no 28 kD e 29kD que alinha com as faixas positivas da manutenção programada do controle, então a especificidade da manutenção programada pode ser atribuído ao soro do paciente.

As amostras podem ter outras faixas do que os especificidade mostrados. Desde que os antígenos contidos nas tiras são preparados dos extratos inteiros da pilha, as faixas de especificidade desconhecidos podem também ser identificadas.

As amostras podem demonstrar mais de uma especificidade e podem ter as faixas que não alinham com as faixas nos controles. As amostras que são fortemente positivas para a manutenção programada, têm muitas faixas do 140kD para baixo ao 12.5kD com as faixas de B/B1 no 28 kD, 29 kD que é as mais fortes. Estas faixas adicionais não devem ser confundidas com outras especificidade.

Se as seguintes especificações não forem encontradas com, o funcionamento deve ser considerado inválido, e deve ser repetido.

#### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O jogo ImmuBlot ANA deve ser usado ajudar no diagnóstico. Os resultados positivos podem ser encontrados em indivíduos aparentemente saudáveis. Conseqüentemente, os resultados devem ser interpretados por uma autoridade médica na luz da condição clínica completa do paciente.

#### VALORES PREVISTOS

Os anticorpos a 68 kD (hsp-70) ocorre nos pacientes com titulação idiopático ativos de SNHL e de anticorpo são mostrados ao correlacionado com atividade da doença. Ver as tabelas 1 e 2 na extremidade deste original.

Os estudos que avaliam 34 pacientes com perda de ouvido rapidamente progressiva demonstraram que anti-rhsp-70 OTOBlot teve a sensibilidade de 42%, a especificação de 90%, e o valor predição positivo de 91% para prever da resposta aos esteróides (12).

#### GUIA DE PESQUISA DE DEFEITOS

- **Faixas extra na tira de Controle Negativo.** Causa provável: frasco contaminado de Controle Negativo, ou contaminação transversal do poço que contém um soro positivo.
- **Controle Positivo aparece como a tira de Controle Negativo.** Causa provável: O frasco de controle negativo foi confundido como o frasco de controle positivo.
- **As tiras são completamente em branco.** Causa provável: adição de Conjugado (A ou B) ou Substrato foram omitidos.
- **Contraste do fundo elevado e dos pobres entre faixas e fundo.** Causa provável: o Etapa da lavagem pode ter sido omitido ou incorretamente executado, ou os incubação prolongado.



## ImmuBlot™ Anticorps Antinucléaires (ANA) Western Blot



Code 1170 20 Déterminations

#### UTILISATION PRÉVUE

L'immunoassay ImmuBlot™ d'ANA est employé pour la détection et l'identification de RNP, de SM, de Ro/SS-A, de La/SS-B, de Scl-70, de Jo-1 et d'autres autoanticorps antinucléaires.

#### SOMMAIRE ET EXPLICATION

Anticorps antinucléaires (ANA), détectés par l'immunofluorescence indirecte, l'aide dans le diagnostic des désordres de tissu connectif comprenant la lupus érythémateux disséminé (SLE), le Syndrome de Sjögren, la sclérodémie et les connectivites mixtes<sup>1-5</sup>. ANA se produisent dans environ 95% de patients de SLE aussi bien que dans des patients présentant d'autres maladies de tissu connectif. ANA peut également se produire dans d'autres désordres tels que l'hépatite active chronique et la cirrhose biliaire primaire<sup>6-8</sup>.

ANA ne sont pas détail de la maladie. L'identification des spécificités d'ANA à de divers antigènes sont utiles pendant qu'ils peuvent être associés à une maladie ou à un sous-ensemble particulière de la maladie. Des spécificités d'ANA peuvent être déterminées par la précipitation de gel, le hemagglutination, ELISA, ou par la tache (immuno) occidentale.

Les anticorps à U-1 RNP sont caractéristiques des patients de MCTD. Les anticorps à l'antigène de SM se produisent exclusivement en SLE. SS-A (Ro) que les anticorps sont détectés dans SLE et le Syndrome de Sjögren. Les anticorps à Jo-1, ou la synthétase de histidyl-tRNA, se produisent dans les patients avec le myositis<sup>1,3</sup>. SS-B (La) est principalement rapportés dans le Syndrome de Sjögren et de SLE. Des anticorps 52kD au SS-A (Ro) et 48kD au SS\_B (La) sont trouvés dans pratiquement tous les patients présentant lupus érythémateux néonatal et le bloc complet de coeur, et la présence de tous les deux dans SLE indique un âge postérieur de début de la maladie et une plus basse fréquence de la lupus néphrite 9. Les anticorps Scl-70 réagissent avec la topoisomérase humaine et sont trouvés dans les patients présentant la sclérodémie diffuse.

#### PRINCIPES DE PROCÉDÉ

Dans l'ImmuBlot™ ANA, les antigènes nucléaires et cytoplasmiques d'une cellule HeLa rayent, complété avec des antigènes additionnels, sont séparés selon leur poids moléculaire (MW) par l'électrophorèse de gel polyacrylamide et puis transférés sur une membrane de PVDF. Un ensemble de 3 marqueurs MW différents sont traités simultanément afin de faciliter l'identification de MW et par conséquent, interprétation des résultats. Les marqueurs MW additionnels (125 kD, 77 kD, 70kD) apparaissent comme les bandes bleu-violettes pendant le processus de souillure. Ils servent de marqueurs internes de contrôle au système de détection.

L'antigène contenant des bandes sont incubés avec le contrôle ou le sérum de patient. Si actuel dans le sérum, anticorps anti - nucléaires liez à l'antigène spécifique sur la bande. Après que répété le lavage et les incubations avec deux types des conjugués et d'un substrat de chromogène, des réactions positives sont indiqués par les bandes bleu-violettes sur la bande. La spécificité de l'anticorps est définie par l'identification des bandes positives en comparaison de la bande positive de commande, une fois alignée avec les 3 marqueurs MW (125kD, 77kD, 70kD).

## RÉACTIFS

### Stockage et Préparation

Stockez tous les réactifs à 2-8° C. **Ne gelez pas.** N'employez pas, si les réactifs liquides sont troubles ou un précipité est présent. Avant de commencer l'analyse, des réactifs doivent être équilibrés à la température ambiante (~22°). Des bandes d'antigène peuvent seulement être employées une fois. N'échangez pas les composants de différents sorts. N'employez pas les réactifs au delà de la date d'échéance indiquée sur des étiquettes.

### Précautions

Tous les composants dérivés humains utilisés ont été examinés pour HBsAg, HCV, Hiv-1 et 2 et Htlv-i et négatif trouvé par les essais exigés par FDA des USA. Cependant, tous les dérivés humains de sang et spécimens patients devraient être considérés potentiellement infectieux et de bonnes pratiques en matière de laboratoire en stockant, en distribuant et en ayant ces matériaux doivent être suivies <sup>10</sup>.

Attention - l'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>) peut réagir avec le fil et la tuyauterie de cuivre aux azotures fortement explosifs en métal de forme. Sur la disposition des liquides, éclat avec de grands volumes de l'eau pour empêcher l'habillage d'azoture. NaN<sub>3</sub> est toxique s'ingéré. Rappelez les incidents immédiatement au centre de commande de directeur ou de poison de laboratoire.

Suivez les bonnes pratiques en matière de laboratoire de réduire au minimum la contamination microbienne et en travers des réactifs.

### Matériaux fournis Code : 1170

Le kit contient les réactifs suffisants pour effectuer 20 déterminations.

<b>20</b>	bandelettes ANA Western Blot
<b>1 x 120 µl</b>	*contrôle positif, prêt à l'emploi
<b>1 x 120 µl</b>	*contrôle négatif, prêt à l'emploi
<b>1</b>	carte de contrôle
<b>1 x 250 µl</b>	*conjugué A
<b>1 x 250 µl</b>	*conjugué B
<b>1 x 60 ml</b>	*diluant pour échantillons
<b>1 x 25 ml</b>	*substrat enzymatique
<b>1</b>	tampon de lavage pour 1 litre/flacon
<b>3</b>	bains d'analyse

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

### Matériaux Requis Mais Non fournis

- Nettoyez le cylindre 1000 ml
- forceps non-dentelé
- Culbuteur ou dispositif trembleur tournant de plateforme
- Papier absorbant ou serviettes de papier
- Désionisé ou eau distillée
- Bouteille de compression à l'amortisseur de lavage dilué par prise
- Pipettes capables de fournir 10 à 1000 µl
- Jetable introduisez à la pipette les bouts
- Temporisateur

## COLLECTION ET MANIPULATION DE SPÉCIMEN

Seulement des spécimens de sérum devraient être employés dans ce procédé. Hémolysés excessivement, les spécimens lipémiques ou par microbes souillés peuvent interférer l'exécution de l'essai et ne devraient pas être employés. Stockez les spécimens à 2-8° C pour plus qu'une semaine. Pour un entreposage plus prolongé, des spécimens de sérum devraient être gelés. Évitez la congélation et le dégel répétés des échantillons.

## PROCEDURE

### Notas Processuais

- Ler instruções com cuidado antes de começar com o teste.
- Deixar espécimes do soro e reagentes do teste equilibrado à temperatura de quarto por os minutos ~30 antes de começar o procedimento de teste. Retornar todos os espécimes e reagentes não utilizados ao depois de uso do refrigerador prontamente.
- A técnica de lavagem apropriada é crítica ao desempenho satisfatório do teste.
- As tiras positivas e negativas do controle devem ser incluídas em cada funcionamento do teste.

### Testar O Método

1. Usando o fórceps sem corte, colocar o número requerido do lado etiquetado **tiras** acima em poços individuais da bandeja do teste.
2. Introduzir com pipeta **1.0 ml** de diluente de amostras em cada um bem.
3. Introduzir com pipeta **10 µl** de controle positivo e de controle negativo e amostra paciente em poços apropriados para obter **uma diluição de 1:101**. Incubar **60 minutos** (± 5 minutos.) na temperatura de quarto em um balancim ou em um sacudidor girando.
4. Aspirar a solução da amostra no recipiente resíduo. Lavar completamente tiras com tampão de lavagem esguinchando aproximadamente 2ml da solução diretamente em tiras. Lavar tiras com agitação delicado por **5 minutos** e aspirar a solução no recipiente resíduo. **Repetir 4x.** *Cuidado: A lavagem completa das tiras entre incubações é crucial obter resultados válidos. A lavagem imprópria resultará no fundo elevado que mancha.*
5. Introduzir com pipeta **1.0 ml** de amostras seguido seguido perto **10 µl** de conjugado A em cada um bem. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) na temperatura de quarto no balancim ou no sacudidor girando.
6. Repetir **Etapa 4.**
7. Introduzir com pipeta **1.0 ml** de diluente de amostras seguido seguido perto **10 µl** de conjugado B em cada um bem. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos.) na temperatura de quarto no balancim ou no sacudidor girando.
8. Repetir **Etapa 4.**
9. Introduzir com pipeta **1.0 ml** substrato em cada um poço e incubar com delicado agitando **15 minutos** (± 5 minutos) na temperatura de quarto e na luz reduzida.
10. Repetir **Etapa 4**, lavando-se duas vezes em vez de quatro vezes.
11. Usando o fórceps sem corte, remover as tiras da bandeja do teste e colocá-las delicadamente no papel absorvente. Segurar tiras somente nas extremidades e deixá-las secar **15-20 minutos.**

### Controle De Qualidade

1. O controle negativo não mostra nenhuma faixa adicional à exceção dos marcadores do MW o 125 kD no 77kD, e o 70kD. Estes marcadores aparecem em cada tira e ajuda na interpretação das tiras reagidas (figura 1).
2. O controle positivo deve ser positivo para o Scl-70 (100kD), SS-A(Ro) (60kD), Jo-1(56kD), SS-B(La) (48kD), RNP (68kD) e SM @B/B<sup>1</sup> (28, 29kD) como mostrado em figura 2. As faixas adicionais podem também ser presente como indicado na tabela 1 na extremidade deste original.

## RESULTADOS

As tiras ANA contêm três faixas principais nos pesos 125kD, 77kD e 70kD MW (consultar a figura 1 na extremidade deste original). Estas faixas servem como marcadores do alinhamento do MW. Usar a faixa 125kD e/ou as faixas 77kD e 70kD alinhar tiras do paciente com o cartão de controle.

## REAGENTES

### Armazenamento e Preparação

Armazenar todos os reagentes em 2-8° C. **Não se congelar.** Não usar, se os reagentes líquidos forem turvo ou um precipitado estiver atual. Antes de começar o teste, os reagentes devem equilibrado à temperatura de quarto (~22°). As tiras do antígeno podem somente ser usadas uma vez. Não intercambiar componentes de lotes diferentes. Não usar reagentes além da data de expiração indicada em etiquetas.

### Precauções

Todos os componentes derivados humanos usados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-i e negativo encontrado por testes requeridos FDA dos E. U.. Entretanto, todos os derivativos humanos do sangue e espécimes pacientes devem ser considerados potencial infeccioso e as práticas boas do laboratório em armazenar, em dispensar e em dispôr destes materiais devem ser seguidas <sup>10</sup>.

Cuidado - o azido de sódio (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com a ligação e o encanamento de cobre aos azidos altamente explosivos do metal do formulário. Em cima da eliminação dos líquidos, resplendor com volumes grandes da água para impedir o acúmulo do azido. NaN<sub>3</sub> é tóxico se mastigado. Relatar incidentes imediatamente ao centro de controle do diretor ou do veneno do laboratório.

Seguir práticas boas do laboratório minimizar a contaminação microbial e transversal dos reagentes.

### Materiais fornecidos Code: 1170

O jogo de ImmuBlot ANA kit, contem reagentes suficientes para executar 20 determinações.

<b>1 x 20</b>	tiras ANA Western Blot
<b>1 x 120 µl</b>	*controle positivo, pronto para uso
<b>1 x 120 µl</b>	*controle negativo, pronto para uso
<b>1</b>	cartão de controle
<b>1 x 250 µl</b>	*conjugado A
<b>1 x 250 µl</b>	*conjugado A
<b>1 x 60 ml</b>	*diluyente de amostras
<b>1 x 25 ml</b>	*substrato enzime
<b>1 frasco</b>	tampão de lavagem do 1 litro/viale
<b>3</b>	bandejas do assay

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

### Materiais Requeridos Mas Não fornecidos

- Limpar o cilindro graduado 1000 ml
- fórcteps Non-serrilhado
- Balancim ou sacudidor girando da plataforma
- Papel absorvente ou toalhas de papel
- Água desionizado ou destilada
- Frasco do aperto ao amortecedor diluído preensão da lavagem
- Pipetas capazes de entregar o 10 a 1000 µl
- Descartável introduzir com pipeta pontas
- Temporizador

### COLEÇÃO E MANIPULAÇÃO DO ESPÉCIME

Somente os espécimes do soro devem ser usados neste procedimento. Hemolizados bruta, os espécimes lipémicos ou microbial contaminados podem interferir com o desempenho do teste e não devem ser usados. Armazenar espécimes em 2-8° C para não mais por muito tempo de uma semana. Para um armazenamento mais longo, os espécimes do soro devem ser congelados. Evitar congelar-se e degelados repetidos das amostras.

## Métode

### Notes Procédurales

- Lisez les instructions soigneusement avant commençant par l'analyse.
- Laissez les spécimens de sérum et les réactifs d'essai équilibrer à la température ambiante pendant les minutes ~30 avant de commencer la méthode d'essai. Renvoyez tous les spécimens et réactifs inutilisés au après utilisation de réfrigérateur promptement.
- La technique de lavage appropriée est critique à l'exécution satisfaisante de l'analyse.
- Des bandelettes positives et négatives de contrôles doivent être incluses dans chaque course d'analyse.

### Examinez La Méthode

1. En utilisant le forceps émoussé, placez le nombre requis de côté marqué **par les bandelettes Western Blot** vers le haut dans différents puits du plateau d'analyse.
2. Introduisez à la pipette **1.0 ml** du **diluant pour échantillons** dans chacun bien.
3. Introduisez à la pipette **10 µl** du contrôles positif et négatif et échantillon patient dans les puits appropriés pour obtenir **une dilution de 1:101**. Incubez **60 minutes** (± 5 minutes.) à la température ambiante sur un culbuteur ou un dispositif trembleur tournant.
4. Aspirez la solution témoin dans le bac à vidange. Lavez complètement les bandes avec le **tampon de lavage** en injectant approximativement 2ml de solution directement sur des bandes. Lavez les bandes avec l'agitation douce pendant **5 minutes** et aspirez la solution dans le bac à vidange. **Répétez 4x.** *Attention : Le lavage complet des bandes entre les incubations est crucial d'obtenir des résultats valides. Le lavage inexact aura comme conséquence le fond élevé souillant.*
5. Introduisez à la pipette **1.0 ml diluant pour échantillons** suivi **10 µl** de Conjugué A dans chacun bien. Incubez **30 minutes** (± 5 minutes) à la température ambiante sur le culbuteur ou le dispositif trembleur tournant.
6. Répétez **L'Étape 4.**
7. Introduisez à la pipette **1.0 ml diluant pour échantillons** suivi **10 µl** de Conjugué B dans chacun bien. Incubez **30 minutes** (± 5 minutes.) à la température ambiante sur le culbuteur ou le dispositif trembleur tournant.
8. Répétez **L'Étape 4.**
9. Introduisez à la pipette **1.0 ml substrat** dans chacun puits et incubez avec doux en secouant **15 minutes** (± 5 minutes) à la température ambiante et à la lumière réduite.
10. Répétez **L'Étape 4**, lavant deux fois au lieu de quatre fois.
11. En utilisant le forceps émoussé, enlevez les bandes du plateau d'analyse et placez-les doucement sur le papier absorbant. Manipulez les bandes seulement aux extrémités et laissez-les sécher **15-20 minutes.**

### Contrôle de qualité

Si les caractéristiques suivantes ne sont pas rencontrées, la course doit être considérée invalide, et devrait être répétée.

1. La cõntrole négative ne montre aucune bande additionnelle autres que des marqueurs de poids moléculaire le 125 kD au 77kD, et le 70kD. Ces marqueurs apparaissent sur chaque bande et aide dans l'interprétation des bandes réagies (le schéma 1).
2. La cõntrole positive devrait être positive pour le Scl-70 (100kD), SS-A(Ro) (60kD), Jo-1(56 kD), les SS-B (La) (48kD), le RNP (68kD) et le SM B/B<sup>1</sup> (28, 29kD) comme représenté sur le schéma 2. Les bandes additionnelles peuvent également être présent comme indiqué dans le tableau 1 à la fin de ce document.

## RÉSULTATS

Les bandelettes ANA contiennent trois bandes principales aux poids 125kD, 77kD et 70kD moléculaires (référez-vous au schéma 1 à la fin de ce document). Ces bandes servent de marqueurs d'alignement de poids moléculaire. Employez la bande 125kD et/ou les bandes 77kD et 70kD pour aligner des bandes de patient avec la carte de contrôle.

La présence du bandes bleu-violette (autre que les marqueurs moléculaires) indiquent une réaction positive. Le calibre spécifique de sorte de la contrôle positive qui est incluse dans chaque kit devrait être employé comme aide d'interprétation seulement.

### Identification de différents autoanticorps

Résultats d'essai de positif en présence d'une bande qui aligne directement sur une bande de référence sur la contrôle positive. Par exemple, les anticorps de anti-SM rapportent principalement un doublet au 28 kD et 29 kD. Si l'échantillon a un doublet au 28 kD et 29 kD qui aligne avec les bandes contrôles positives de SM, alors la spécificité de SM peut être assignée au sérum du patient.

Les échantillons peuvent avoir d'autres bandes que des spécificités montrées. Puisque les antigènes contenus sur les bandes sont préparés à partir des extraits entiers de cellules, des bandes des spécificités inconnues peuvent également être identifiées.

Les échantillons peuvent démontrer plus d'une spécificité et peuvent avoir des bandes qui n'alignent pas avec des bandes dans les contrôles. Les échantillons qui sont fortement positifs pour le SM, ont beaucoup de bandes du 140 kD vers le bas au 12.5 kD avec les bandes de B/B1 au 28 kD, le 29 kD étant les plus forts. Ces bandes additionnelles ne devraient pas être confondues avec d'autres spécificités.

### LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Le kit ImmuBlot ANA devrait être employé comme aide au diagnostic. Des résultats positifs peuvent être trouvés dans les individus apparent en bonne santé. Par conséquent, des résultats devraient être interprétés par une autorité médicale à la lumière de l'état clinique complet du patient.

### VALEURS PRÉVUES

Les valeurs prévues dans une population normale sont négatives. La prédominance des autoanticorps fréquemment détectés liés aux désordres Collagène-Vasculaires sont récapitulées à la fin de ce document.

### GUIDE DE DÉPANNAGE

- **Plus bandes sur la bande de Contrôle Negative.** Cause probable : fiole souillée de **Contrôle Negative**, ou contamination en travers à partir du puits contenant un sérum positif.
- **Contrôle Positif apparaît comme la bande de Contrôle Negative.** Cause probable : La fiole Contrôle Négative a été confondue comme fiole de Contrôle Positif.
- **Les bandes sont complètement blanches.** Cause probable : addition de Conjugué (A ou B) ou Substrat ont été omis.
- **Contraste de fond élevé et de pauvres entre les bandes et le fond.** Cause probable : L'Étape de lavage a pu avoir été omis ou inexactement exécuté, ou des incubations ont été étendues.



ImmuBlot™

## Anticorpos Anti-Nucleares (ANA) Western Blot

IVD

Code 1170 20 Determinações

### USO PRETENDIDO

O Western Blot Immunoassay de ANA é usado para a detecção e a identificação de RNP, Sm, Ro/SS-A, La/SS-B, de Scl-70, de Jo-1 e de outros autoanticorpos anti-nucleares.

### SUMÁRIO E EXPLANAÇÃO

Anticorpos anti-nucleares (ANA), detectados pelo imunofluorescência indireto, pelo ajuda no diagnóstico de doenças do tecido conexivo incluindo o Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE), doença misturada do tecido conexivo, síndrome de Sjögren e escleroderma<sup>1-5</sup>. ANA ocorrem em aproximadamente 95% de pacientes de SLE e em pacientes com outras doenças do tecido conexivo. ANA pode também ocorrer em outras doenças tais como o hepatitis ativo crônico e o PBC<sup>6-8</sup>.

ANA não são específico da doença. A identificação de especificação de ANA aos vários antígenos é da ajuda como podem ser associados com uma doença ou um subconjunto particular da doença. Os especificações de ANA podem ser determinados pela precipitação do gel, hemaglutinação, ELISA, ou Western blot.

Os anticorpos a U-1 RNP são característicos de pacientes de MCTD. Os anticorpos ao antígeno da manutenção programada ocorrem exclusivamente em SLE. SS-A (Ro) que os anticorpos são detectados no síndrome de Sjögren e no SLE<sup>1</sup>. Os anticorpos a Jo-1 ocorrem nos pacientes com miosite<sup>1,3</sup>. Os SS-B (Lla) são relatados primeiramente no síndrome de Sjögren e de SLE. Os anticorpos ao 52 kD SS-A (Ro) e ao 48 kD SS-B (La) são encontrados em virtualmente todos os pacientes com o Lupus Eritematoso neonatal do e bloco completo do coração, e na presença de ambos em SLE indicam uma idade mais atrasada do início da doença e uma frequência mais baixa do nefrite do lupus<sup>9</sup>. Os anticorpos Scl-70 reagem com o topoisomerase humano e são encontrados nos pacientes com escleroderma difuso.

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No ImmuBlot Western Blot Immunoassay de ANA, os antígenos nucleares e citoplasmático de uma pilha linha HeLa, suplementado com os antígenos adicionais, são separados de acordo com seu peso molecular (MW) pelo electroforese do gel *polyacrylamide* e transferidos então em uma membrana de PVDF. Um jogo de 3 marcadores diferentes do MW é processado simultaneamente a fim facilitar a identificação do MW e daqui, interpretação dos resultados. Os marcadores adicionais do MW (125 kD, 77 kD, 70kD) aparecem como as faixas azul-violetas durante o processo manchando. Servem como marcadores internos do controle para o sistema da detecção.

O antígeno que contem tiras incubado com controle ou soro do paciente. Se atual no soro, os anticorpos anti-nucleares ligam ao antígeno específico na tira. Depois que repetido a lavagem e os incubações com dois tipos de conjugados e de uma carcaça do chromogen, reações positivas são indicadas pelo as bordas azul-violetas na tira. O especificação do anticorpo é definido pela identificação das faixas positivas em comparação com a tira positiva do controle, quando alinhado com os 3 marcadores do MW (125kD, 77Kd, 70kD).

## RISULTATI

Le strisce ANA contengono tre fasce importanti ai pesi molecolari 125kD, 77kD e 70kD (riferirsi a figura 1 all'estremità di questo documento). Queste fasce servono da indicatori di allineamento del peso molecolare. Usare la fascia 125kD e/o le fasce 77kD e 70kD per allineare le strisce del paziente con la scheda di controllo.

La presenza di fasce blu-viola (tranne gli indicatori molecolari) indica una reazione positiva. La mascherina specifica del lotto del controllo positivo che è incluso in ogni corredo dovrebbe essere usata come sussidio di interpretazione soltanto.

### Identificazione di diversi autoanticorpi

Risultati della prova del positivo in presenza di una fascia che si allinea direttamente ad una fascia di riferimento sul controllo positivo. Per esempio, gli anticorpi anti-SM soprattutto rendono un doppia fascia a 28 kD e 29kD. Se il campione ha un doppia fascia a 28 kD e 29kD che si allinea con le fasce positive di controllo SM, allora la specificità di SM può essere assegnata al siero del paziente.

I campioni possono avere altre fasce che le specificità indicate. Poiché gli antigeni contenuti sulle strisce sono preparati dagli estratti interi delle cellule, le fasce delle specificità sconosciute possono anche essere identificate.

I campioni possono dimostrare più di una specificità e possono avere fasce che non si allineano con le fasce nei controlli. I campioni che sono fortemente positivi per SM, hanno molte fasce da 140 kD giù a 12.5 kD con le fasce di B/B1 a 28 kD, 29 kD che è il più forte. Queste fasce supplementari non dovrebbero essere confuse con altre specificità.

### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il corredo del ImmuBlot ANA dovrebbe essere usato come sussidio alla diagnosi. I risultati positivi possono essere trovati in individui apparentemente in buona salute. Di conseguenza, i risultati dovrebbero essere interpretati da un'autorità medica alla luce dello stato clinico completo del paziente.

### VALORI PREVISTI

Gli anticorpi a 68 kD (hsp-70) si presenta in pazienti con i titoli idiopatici attivi dell'anticorpo e di SNHL sono indicati alla componente con attività di malattia. Vedere le tabelle 1 e 2 all'estremità di questo documento.

Gli studi che valutano 34 pazienti con perdita della capacità uditiva velocemente progressiva hanno dimostrato che anti rhsp-70 OTOBlot ha avuto sensibilità di 42%, la specificità di 90% ed il valore di previsione positivo di 91% per la predizione della risposta steroide <sup>12</sup>.

### GUIDA D'ANALISI GUASTI

- **Fascia supplementari sulla striscia di Controllo Negativo.** Causa probabile: fiala contaminata di Controllo Negativo, o contaminazione trasversale dal pozzo che contiene un siero positivo.
- **Controllo Positivo compare come la striscia di Controllo Negativo.** Causa probabile: La fiala di controllo negativo di è stata confusa come fiala di controllo positivo.
- **Le strisce sono completamente in bianco.** Causa probabile: aggiunta di coniugato (A o B) o substrato sono stati omissi.
- **Alta priorità bassa e contrasto insufficiente fra le fasce e la priorità bassa.** Causa probabile: lo punto della lavata può essere omissi o essere effettuato in modo errato, o le incubazioni erano sovraestese.



ImmuBlot™

# Anticuerpos Antinucleares (ANA) Western Blot

IVD

Code 1170 20 Determinaciones

### USO PREVISTO

La ImmuBlot™ Anticuerpos Antinucleares (ANA) Western Blot se utiliza para la detección y la identificación de RNP, del SM, de Ro/SS-A, de La/SS-B, de Scl-70, de Jo-1 y de otros autoanticuerpos antinucleares.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Anticuerpos antinucleares (ANA), detectados por inmunofluorescencia indirecta, la ayuda en la diagnosis de de los desórdenes del tejido conjuntivo incluyendo lupus eritematoso sistémico (SLE), el síndrome de Sjögren el escleroderma y enfermedades combinadas del tejido conjuntivo <sup>1-5</sup>. ANA ocurren en el cerca de 95% de pacientes de SLE así como en pacientes con otras enfermedades del tejido conjuntivo. ANA puede también ocurrir en otros desórdenes tales como hepatitis activa crónica y cirrosis biliar primaria <sup>6-8</sup>.

ANA no son específico de la enfermedad. La identificación de las especificidades de ANA a los varios antígenos está de ayuda como pueden ser asociados a una enfermedad o a un subconjunto particular de la enfermedad. Las especificidades de ANA se pueden determinar por la precipitación del gel, hemaglutinación, ELISA, o western (inmuno) blot.

Los anticuerpos a U-1 RNP son característicos de pacientes de MCTD. Los anticuerpos al antígeno del SM ocurren exclusivamente en SLE. SS-A (Ro) que los anticuerpos se detectan en SLE y el síndrome de Sjögren <sup>1</sup>. Los anticuerpos a Jo-1 ocurren en pacientes con el myositis<sup>1,3</sup>. Los SS-B (La) se divulgan sobre todo en SLE y el síndrome de Sjögren. Los anticuerpos al 52 kD SS-A (Ro) y al 48 kD SS-B (La) se encuentran en virtualmente todos los pacientes con lupus eritematoso neonatal y el bloque completo del corazón, y la presencia de ambos en SLE indican una edad más última del inicio de la enfermedad y una frecuencia más baja de la lupus nefritis<sup>9</sup>. Los anticuerpos Scl-70 reaccionan con *topoisomerase humano* y se encuentran en pacientes con escleroderma difuso.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En la ImmuBlot ANA Western Blot prueba, los antígenos nucleares y citoplásmicos de una célula HeLa alinean, suprido con los antígenos adicionales, son separados según su peso molecular (MW) por electroforesis del gel de *polyacrylamide* y después transferidos sobre una membrana de PVDF. Un sistema de 3 diversos marcadores del MW se procesa simultáneamente para facilitar la identificación del MW y por lo tanto, interpretación de los resultados. Los marcadores adicionales del MW (125 kD, 77 kD, 70kD) aparecen como las banda azul-violetas durante el proceso que se mancha. Sirven como marcadores internos del control para el sistema de la detección.

El antígeno que contiene tiras se incuba con control o el suero del paciente. Si es presente en el suero, los anticuerpos antinucleares atan al antígeno específico en la tira. Después de que esté repetido el lavado y las incubaciones con dos tipos de conjugaciones y de un substrato del chromogen, las reacciones positivas sean indicados por las bandas azul-violetas en la tira. La especificidad del anticuerpo es definida por la identificación de las vendas positivas en comparación con la tira positiva del control, cuando está alineada con los 3 marcadores del MW (125kD, 77Kd, 70kD).

## REACTIVOS

### Almacenaje y preparación

Almacenar todos los reactivos en 2-8° C. **No congelar.** No utilizar, si los reactivos líquidos son turbios o un precipitado está presente. Antes de comenzar el análisis, los reactivos se deben equilibrar a la temperatura ambiente (~22°). Las tiras del antígeno se pueden utilizar solamente una vez. No intercambiar los componentes de diversas porciones. No utilizar los reactivos más allá de la fecha de vencimiento indicada en etiquetas.

### Precauciones

Todos los componentes derivados humanos usados han sido probados para HBsAg, HCV, Hiv-1 y 2 y Htlv-i y negativa encontrada por las pruebas requeridas FDA de los E.E.U.U. Sin embargo, todos los derivados humanos de la sangre y especímenes pacientes se deben considerar potencialmente infecciosos y las buenas prácticas del laboratorio en almacenar, dispensar y disponer de estos materiales deben ser seguidas <sup>10</sup>.

Precaución - el azide de sodio (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con el plomo y la plomería de cobre a los ácidos altamente explosivos del metal de la forma. Sobre la disposición de líquidos, rubor con los volúmenes grandes de agua para prevenir la acumulación del ácido. NaN<sub>3</sub> es tóxico si está ingerido. Divulgar los incidentes inmediatamente al centro de control del director o del veneno del laboratorio.

Seguir las buenas prácticas del laboratorio de reducir al mínimo la contaminación microbiana y cruzada de reactivo.

### Materiales proporcionados

Code: 1170

El ImmuBlot ANA kit , contiene los suficientes reactivos para realizar 20 determinaciones.

<b>1 x 20</b>	tiras ANA Western Blot
<b>1 x 120 µl</b>	*control positivo, listo para uso
<b>1 x 120 µl</b>	*control negativo, listo para uso
<b>1</b>	tarjeta de control
<b>1 x 250 µl</b>	*conjugado A
<b>1 x 250 µl</b>	*conjugado B
<b>1 x 60 ml</b>	*tampón de dilución para muestras
<b>1 x 25 ml</b>	*substrato enzimático
<b>1 frasco</b>	tampón de lavado para 1 litro/vial
<b>3</b>	bandejas de análisis

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

### Materiales Requeridos Pero No proporcionados

- Limpiar el cilindro graduado 1000 ml
- Fórceps No-serrado
- Eje de balancín o coctelera de la plataforma que rota
- Papel absorbente o toallas de papel
- Agua desionizada o destilada
- Botella del apretón al almacenador intermediario diluido asimiento de la colada
- Pipetas capaces de entregar 10 a 1000 µl
- Disponible medir con una pipeta las extremidades
- Contador de tiempo

### COLECCIÓN Y DIRECCIÓN DEL ESPÉCIMEN

Solamente los especímenes del suero se deben utilizar en este procedimiento. Hemolizadas grueso, los especímenes lipémicos o microbiano contaminados pueden interferir con el funcionamiento de la prueba y no deben ser utilizados. Almacenar los especímenes en 2-8° C para no más de largo de una semana. Para un almacenaje más largo, los especímenes del suero deben ser congelados. Evitar congelar y deshelar repetidos de muestras.

## METODO

### Note Procedurali

- Leggere con attenzione prima le istruzioni cominciando dall'analisi.
- Lasciare gli esemplari del siero ed i reagenti della prova equilibrare alla temperatura ambiente per il resoconto ~30 prima dell'iniziare il metodo di prova. Restituire subito tutti gli esemplari e reagenti inutilizzati alla post-utilizzazione del frigorifero.
- La tecnica di lavaggio adeguata è critica alle prestazioni soddisfacenti dell'analisi.
- Le strisce positive e negative di controllo devono essere incluse in ogni funzionamento di analisi.

### Verificare Il Metodo

1. Per mezzo del forcipe smussato, disporre il numero richiesto di lato identificato **strisce** in su nei diversi pozzi del vassoio di analisi.
2. Pipettare **1.0 ml** di diluente per campioni in ciascuno.
3. Pipettare **10 µl** di controllo positivo e di controllo negativo e campione paziente nei pozzi adatti per ottenere **una diluizione di 1:101**. Incubare **60 minuti** (± 5 minuti.) alla temperatura ambiente su un attuatore o su un agitatore di rotazione.
4. Aspirare la soluzione del campione nel contenitore di rifiuti. Lavare completamente le strisce con tampone di lavaggio erogazione approssimativamente 2ml della soluzione direttamente sulle strisce. Lavare le strisce con agitazione delicata per **5 minuti** ed aspirare la soluzione nel contenitore di rifiuti. **Ripetere 4x**. *Attenzione: Il lavaggio completo delle strisce fra le incubazioni è cruciale da ottenere i risultati validi. Il lavaggio improprio provocherà l'alta priorità bassa che macchia.*
5. Pipettare **1.0 ml** di diluente per campioni seguito bene **10 µl** di coniugato A in ciascuno. Incubare **30 minuti** (± 5 minuti) alla temperatura ambiente sull'attuatore o sull'agitatore di rotazione.
6. Ripetere **Punto 4**.
7. Pipettare **1.0 ml** di diluente per campioni seguito bene **10 µl** di coniugato B in ciascuno. Incubare **30 minuti** (± 5 minuti.) alla temperatura ambiente sull'attuatore o sull'agitatore di rotazione.
8. Ripetere **Punto 4**.
9. Pipettare **1.0 ml** substrato in ciascuno pozzo ed incubare con delicato agitando **15 minuti** (± 5 minuti) alla temperatura ambiente ed alla luce ridotta.
10. Ripetere **Punto 4**, lavantesi due volte anziché quattro volte.
11. Per mezzo del forcipe smussato, rimuovere le strisce dal vassoio di analisi e disporle delicatamente su carta assorbente. Maneggiare le strisce soltanto alle estremità e lasciarle asciugare **15-20 minuti**.

### Controllo di qualità

Se le seguenti specifiche non sono venute a contatto di, il funzionamento deve essere considerato non valido e dovrebbe essere ripetuto.

1. Il controllo negativo non mostra fasce supplementari tranne gli indicatori del peso molecolare 125 kD a 77 kD, e 70kD. Questi indicatori compaiono su ogni striscia ed aiuto nell'interpretazione delle strisce reagite (figura 1).
2. Il controllo positivo dovrebbe essere positivo per Scl-70 (100kD), SS-A(Ro) (60kD), Jo-1(56kD), SS-B(La) (48kD), RNP (68kD) e SM @B/B<sup>1</sup> (28, 29kD) come appare figura 2. Le fasce supplementari possono anche essere presente come indicato in tabella 1 all'estremità di questo documento.

## REAGENTI

### Immagazzinaggio e Preparazione

Immagazzinare tutti i reagenti a 2-8° C. **Non congelare.** Non usare, se i reagenti liquidi sono torbidi o un precipitato è presente. Prima dell'iniziare l'analisi, i reagenti devono essere equilibrati alla temperatura ambiente (~22°). Le strisce dell'antigene possono essere usate soltanto una volta. Non interscambiare i componenti dei lotti differenti. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

### Precauzioni

Tutte le componenti derivate umane usate sono state esaminate a HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-i e negazione trovata dalle prove richieste FDA degli Stati Uniti. Tuttavia, tutti i derivati umani di anima ed esemplari pazienti dovrebbero essere considerati potenzialmente contagiosi e le buone pratiche del laboratorio nella memorizzazione, nell'erogazione e nell'avere dei questi materiali devono essere seguite <sup>10</sup>.

Attenzione - l'azide di sodio (NaN<sub>3</sub>) può reagire con cavo e l'impianto idraulico di rame agli azoturi altamente esplosivi del metallo della forma. Su eliminazione dei liquidi, a livello di grandi volumi di acqua per impedire accumulazione dell'azoturo. NaN<sub>3</sub> è tossico se ingerito. Segnalare immediatamente gli avvenimenti al centro di controllo del direttore o del veleno del laboratorio.

Seguire le buone pratiche del laboratorio minimizzare la contaminazione microbica e trasversale dei reagenti.

**Materiali forniti** Code: 1170

Il corredo di ImmuBlot ANA Kit, contiene i reagenti sufficienti per realizzare 20 determinazioni.

<b>1 x 20</b>	strisce ANA Western Blot
<b>1 x 120 µl</b>	*controllo positivo, pronto al uso
<b>1 x 120 µl</b>	*controllo negativo, pronto al uso
<b>1</b>	scheda di controllo
<b>1 x 250 µl</b>	*coniugato A
<b>1 x 250 µl</b>	*coniugato B
<b>1 x 60 ml</b>	*diluyente per campioni
<b>1 x 25 ml</b>	*substrato enzimatico
<b>1 fiala</b>	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala
<b>3</b>	bagni di analisi

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

### Materiali Richiesti Ma Non forniti

- Pulire il cilindro 1000 ml
- forcipe Non-seghettato
- Attuatore o agitatore di rotazione della piattaforma
- Carta assorbente o tovaglioli di carta
- Deionizzato o acqua distillata
- Bottiglia di compressione all'amplificatore della lavata diluito stretta
- Pipette capaci di trasporti del 10 – 1000 µl
- A gettare pipettare le punte
- Temporizzatore

### ACCUMULAZIONE E MANEGGIAMENTO DELL'ESEMPLARE

Soltanto gli esemplari del siero dovrebbero essere usati in questa procedura. Grossolanamente emolizzati, gli esemplari lipemici o da microbi contaminati possono interferire con le prestazioni della prova e non dovrebbero essere usati. Immagazzinare gli esemplari a 2-8° C per più che una settimana. Per immagazzinaggio più di lunga durata, gli esemplari del siero dovrebbero essere congelati. Evitare il congelamento e lo scioglimento ripetuti dei campioni.

## Método

### Notas Procesales

- Leer las instrucciones cuidadosamente antes comenzando con el análisis.
- Dejar los especímenes del suero y los reactivo de la prueba equilibrar a la temperatura ambiente por los minutos ~30 antes de comenzar el método de prueba. Volver todos los especímenes y reactivo inusitados al uso posterior del refrigerador puntualmente.
- La técnica que se lava apropiada es crítica al funcionamiento satisfactorio del análisis.
- Las tiras positivas y negativas del controls se deben incluir en cada funcionamiento del análisis.

### Probar El Método

1. Con el fórceps embotado, poner el número requerido del lado etiquetado **tiras** para arriba en los pozos individuales de la bandeja del análisis.
2. Medir con una pipeta **1.0 ml** de tampón de dilución en cada uno bien.
3. Medir con una pipeta **10 µl** de control positivo y de negativo y muestra paciente en pozos apropiados para obtener **una dilución de 1:101**. Incubar **60 minutos** (± 5 minutos.) en la temperatura ambiente en un eje de balancín o una coctelera que rota.
4. Aspirar la solución de la muestra en el recipiente para residuos. Lavar a fondo las tiras con tampón de lavado arrojando a chorros aproximadamente 2ml de la solución directamente sobre tiras. Lavar las tiras con la agitación apacible por **5 minutos** y aspirar la solución en el recipiente para residuos. **Repetir 4x.** *Precaución: El lavado completo de las tiras entre las incubaciones es crucial obtener resultados válidos. El lavado incorrecto dará lugar al alto fondo que se mancha.*
5. Medir con una pipeta **1.0 ml** de tampón de dilución seguidos por **10 µl** de conjugado A en cada uno bien. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente en eje de balancín o la coctelera que rota.
6. Repetir **El Paso 4.**
7. Medir con una pipeta **1.0 ml** de tampón de dilución seguidos por **10 µl** de conjugado B en cada uno bien. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos.) en la temperatura ambiente en eje de balancín o la coctelera que rota.
8. Repetir **El Paso 4.**
9. Medir con una pipeta **1.0 ml** substrato en cada uno pozo e incubar con apacible sacudariendo **15 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente y la luz reducida.
10. Repetir **El Paso 4**, lavándose dos veces en vez de cuatro veces.
11. Con el fórceps embotado, quitar las tiras de la bandeja del análisis y ponerlas suavemente sobre el papel absorbente. Manejar las tiras solamente en los extremos y dejarlos secar **15-20 minutos.**

### Control de calidad

Si las especificaciones siguientes no se resuelven, el funcionamiento debe ser considerado inválido, y debe ser repetido.

1. El control negativo no demuestra ninguna venda adicional con excepción de marcadores del peso molecular en el 125 kD el 77kD, y el 70kD. Estos marcadores aparecen en cada tira y ayuda en la interpretación de las tiras reaccionadas (cuadro 1).
2. El control positivo debe ser positivo para el Scl-70 (100kD), SS-A(Ro) (60kD), Jo-1(56kD), SS-B(La) (48kD), RNP (68kD) y SM @B/B<sup>1</sup> (28, 29kD) según lo demostrado en el cuadro 2. Las vendas adicionales pueden también ser presente según lo indicado en la tabla 1 en el extremo de este documento.

### RESULTADOS

Las tiras de ANA contienen tres vendas importantes en los pesos moleculares 125kD, 77kD y 70kD (referir al cuadro 1 en el extremo de este documento). Estas vendas sirven como

marcadores de la alineación del peso molecular. Utilizar la venda 125kD y/o las vendas 77kD y 70kD para alinear tiras del paciente con la tarjeta de control.

La presencia del bands azul-violeta (con excepción de marcadores moleculares) indica una reacción positiva. La plantilla específica de la porción del control positivo que se incluye en cada kit se debe utilizar como ayuda de la interpretación solamente.

### Identificación de autoanticuerpos individuales

Resultados de una prueba del positivo en la presencia de una venda que alinea directamente con una venda de la referencia en el control positivo. Por ejemplo, los anticuerpos contra-SM rinden sobre todo un doblete en el 28 kD y el 29kD. Si la muestra tiene un doblete en el 28 kD y el 29kD que alinea con las vendas positivas del control SM, entonces la especificidad del SM se puede asignar al suero del paciente.

Las muestras pueden tener otras vendas que las especificidades demostradas. Puesto que los antígenos contenidos en las tiras están preparados de los extractos enteros de la célula, las vendas de especificidades desconocidas pueden también ser identificadas.

Las muestras pueden demostrar más de una especificidad y pueden tener vendas que no alineen con las vendas en controles. Las muestras que son fuertemente positivas para el SM, tienen muchas vendas a partir del 140 kD el abajo al 12.5 kD con las vendas de B/B1 en 28kD, 29 kD que es las más fuertes. Estas vendas adicionales no se deben confundir con otras especificidades.

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El kit ImmuBlot ANA se debe utilizar como ayuda a la diagnosis. Los resultados positivos se pueden encontrar en individuos al parecer sanos. Por lo tanto, los resultados se deben interpretar por una autoridad médica en la luz de la condición clínica completa del paciente.

### VALORES PREVISTOS

El kit ImmuBlot ANA se debe utilizar como ayuda a la diagnosis. Los resultados positivos se pueden encontrar en individuos al parecer sanos. Por lo tanto, los resultados se deben interpretar por una autoridad médica en la luz de la condición clínica completa del paciente.

### GUÍA DE LOCALIZACIÓN DE AVERÍAS

- **Banda adicionales en la tira de Control Negativo.** Causa probable: frasco contaminado de Control Negativo, o contaminación cruzada del pozo que contiene un suero positivo.
- **Control Positivo aparece como la tira de Control Negativo. Causa probable:** El frasco de Control Negativo fue confundido como frasco de Control Positivo.
- **Las tiras están totalmente en blanco.** Causa probable: adición de conjugado (A o B) o substrato fueron omitidos.
- **Contraste del alto fondo y de los pobres entre las bandas y el fondo.** Causa probable: el paso(s) de la colada pudo haber sido omitido o haber sido realizado incorrectamente, o las incubaciones fueron extendidas demasiado.



ImmuBlot

# Anticorpi Antinucleari (ANA) Western Blot



Code 1170

20 Determinazioni

### USO PROGETTATO

La Western Blot Immunoassay del ANA è usata per la rilevazione e l'identificazione di RNP, Sm, Ro/SS-A, La/SS-B, Scl-70, Jo-1 e di altri autoanticorpi antinucleari.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Anticorpi antinucleari (ANA), rilevati da immunofluorescenza indiretta, dal sussidio nella diagnosi dei disordini del tessuto connettivo compreso lupus eritematoso sistemico (SLE), sindrome di Sjögren, scleroderma, e malattia del tessuto connettivo misto (MCTD)<sup>1-5</sup>. ANA si presentano in circa 95% dei pazienti di SLE così come nei pazienti con altre malattie del tessuto connettivo. ANA può anche accadere in altri disordini quali epatite attiva cronica e la cirrosi biliare primaria<sup>6-8</sup>.

ANA non sono malattia specifica. L'identificazione delle specificità del ANA ai vari antigeni è di aiuto come possono essere associati con una malattia o un sottoinsieme particolare di malattia. Le specificità del ANA possono essere determinate dalla precipitazione del gel, il hemagglutination, ELISA, o Western Blot.

Gli anticorpi a U-1 RNP sono caratteristici dei pazienti di MCTD. Gli anticorpi all'antigene di Sm si presentano esclusivamente in SLE. SS-A (Ro) che gli anticorpi sono rilevati nella sindrome di Sjögren ed in SLE1. Gli anticorpi a Jo-1 si presentano in pazienti con il miosite<sup>1,3</sup>. SS-B (La) soprattutto è segnalato nella sindrome di Sjögren e di SLE. Gli anticorpi al 52 kD SS-A (Ro) che al 48 kD SS-B (La) sono trovati in virtualmente tutti i pazienti con il lupus eritematoso neonatale ed il blocchetto completo del cuore e nella presenza di entrambi in SLE indica un'età successiva dell'inizio di malattia e una frequenza più bassa della nefrite di lupus9. Gli anticorpi Scl-70 reagiscono con il topoisomerase umano e sono trovati in pazienti con la dermatosclerosi diffusa.

### PRINCIPII DELLA PROCEDURA

Nella ImmuBlot Western Blot del ANA, gli antigeni nucleari e citoplasmici da una cellula linea HeLa si, completato con gli antigeni supplementari, sono separati secondo il loro peso molecolare (MW) tramite l'elettroforesi del gel di poliaccrilammide ed allora sono trasferiti su una membrana di PVDF. Un insieme di 3 indicatori differenti di MW è proceduto simultaneamente per facilitare l'identificazione di MW e quindi, l'interpretazione dei risultati. Gli indicatori supplementari di MW (125 kD, 77 kD, 70kD) compaiono come fasce blu-viola durante il processo di macchiatura. Servono da indicatori interni di controllo per il sistema di rilevazione. L'antigene che contiene le strisce è incubato con controllo o il siero del paziente. Se presente nel siero, gli anticorpi antinucleari si legano all'antigene specifico sulla striscia. Dopo che ripetuto il lavaggio e le incubazioni con due tipi di coniugati e di substrati del cromogeno, reazioni positive siano indicati dall'fasce blu-viola sulla striscia. La specificità dell'anticorpo è definita tramite l'identificazione delle fasce positive in paragone alla striscia positiva di controllo, una volta allineata con i 3 indicatori di Mw (125kD, 77kD, 70kD).

## RESULTATE

Die ANA streifen enthalten drei Hauptbänder an den Molekulargewichten 125kD, 77kD und 70kD (auf Tabelle 1 am Ende dieses Dokumentes) sich beziehen. Diese Bänder dienen als Molekulargewichtsausrichtung Markierungen. Das Band 125kD benutzen und/oder die Bänder 77kD und 70kD, um Patient Streifen mit der Steuerkarte auszurichten.

Das Vorhandensein des blau-violetten Bänder (anders als molekulare Markierungen) zeigt eine positive Reaktion an. Die spezifische Schablone des Loses der positiven Steuerung, die in jedem Installationssatz eingeschlossen ist, sollte als nur Deutung Hilfsmittel benutzt werden.

### Kennzeichnung der einzelnen Autoantikörper

Positivtestergebnisse in Anwesenheit eines Bandes, das direkt mit einem Bezugsband auf der positiven Steuerung übereinstimmt. Z.B. erbringen Antikörper Anti-SM hauptsächlich ein doppeltes Band bei 28kD und 29kD. Wenn die Probe ein doppeltes Band bei 28 und 29 kD hat, das mit den positiven Steuerinspektion Bändern übereinstimmt, dann kann die Inspektion Besonderheit dem Serum des Patienten zugewiesen werden.

Proben können andere Bänder als die gezeigten Besonderheiten haben. Da die Antigene, die auf den Streifen enthalten werden, aus vollständigen Zelle Extrakten vorbereitet werden, können Bänder der unbekanntenen Besonderheiten auch gekennzeichnet werden.

Proben können mehr als eine Besonderheit zeigen und können Bänder haben, die nicht mit Bändern in den Kontrollen übereinstimmen. Proben, die für Inspektion stark positiv sind, haben viele Bänder von 140 kD unten zu 12.5 kD mit den B/B<sup>1</sup> Bändern bei 28 kD, das 29kD, das das stärkste ist. Diese zusätzlichen Bänder sollten nicht mit anderen Besonderheiten verwirrt werden.

### BESCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuBlot ANA Installationssatz sollte als Hilfsmittel für Diagnose benutzt werden. Positive Resultate können in den anscheinend gesunden Einzelpersonen gefunden werden. Folglich sollten Resultate durch eine medizinische Berechtigung im Licht des kompletten klinischen Zustandes des Patienten gedeutet werden.

### ERWARTETE WERTE

Antikörper bis 68 kD (hsp-70) bei Patienten mit aktiven idiopathisch SNHL und Antikörpertitern auftreten, werden zum Korrelat mit Krankheittätigkeit gezeigt. Tabellen 1 und 2 am Ende dieses Dokumentes sehen.

Die Studien, die 34 Patienten mit schnell progressivem Verlust der Hörfähigkeit auswerten, zeigten, daß Anti- rhsp-70 OTOBlot die 42% Empfindlichkeit hatte, die 90% Besonderheit und 91% den positiven vorbestimmten Wert für das Voraussagen des Steroide-Reaktionsvermögens (12).

### ÜBERPRÜFUNGSFÜHRER

- **Extrabänder auf Negative Kontrollle Streifen.** Wahrscheinliche Ursache: verschmutzte Negative Kontrolle Phiole oder Kreuzverschmutzung vom Brunnen, der ein positives Serum enthält.
- **Positive Kontrolle erscheint wie Negative Kontrolle Streifen.** Wahrscheinliche Ursache: Negative Kontrolle Phiole wurde als Positive Kontrolle Phiole verwirrt.
- **Streifen sind vollständig leer.** Wahrscheinliche Ursache: Hinzufügung von Konjugat (A oder B) oder Substrat wurden ausgelassen.
- **Kontrast des hohen Hintergrundes und der Armen zwischen Bändern und Hintergrund.** Wahrscheinliche Ursache: Wäsche Schritt kann ausgelassen worden sein oder falsch durchgeführt worden sein, oder Ausbrütungen wurden übernommen.



## ImmuBlot™ Anti-Nuklear Antikörper (ANA) Western Blot



Code 1170

20 Ermittlungen

### BEABSICHTIGTER GEBRAUCH

Der ANA Western Blot wird für die Entdeckung und die Kennzeichnung von RNP, Sm, Ro/SS-A, La/SS-B, Scl-70, Jo-1 und von anderen anti-nuklear Autoantikörper benutzt.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

ANA, ermittelt durch indirekte Immunofluoreszenz, Hilfsmittel in der Diagnose der Bindegewebestörungen einschließlich Systemischem Lupus Erythematoses (SLE), Sjögren Syndrom, Sklerodermie und Mischkollagenosen<sup>1-5</sup>. ANA treten in ungefähr 95% von SLE Patienten sowie bei Patienten mit anderen Bindegewebekrankheiten auf. ANA kann in anderen Störungen wie chronischer aktiver Hepatitis und Primärgallenzerrhose auch auftreten<sup>6-8</sup>.

ANA sind nicht Krankheitbesondere. Die Kennzeichnung der ANA Besonderheiten zu den verschiedenen Antigenen sind hilfreich, wie sie mit einer bestimmten Krankheit oder einer Krankheitsmenge verbunden können. ANA Besonderheiten können durch Gelniederschlag, hemagglutination, ELISA oder durch das Western (Immun) Blot festgestellt werden.

Antikörper zu U-1 RNP sind von den MCTD Patienten charakteristisch. Antikörper zum Sm Antigen treten ausschließlich in SLE. SS-A (Ro), das Antikörper in SLE und Sjögren Syndrom ermittelt werden<sup>1</sup>. Antikörper zu Jo-1 treten bei Patienten mit Myositis auf<sup>1,3</sup>. SS-B (La) wird hauptsächlich SLE und Sjögren Syndrom berichtet. Antikörper zum 52 kD SS-A (Ro) und zum 48 kD SS-B (La) werden in praktisch allen Patienten mit Neugeborenem Lupus Erythematoses und komplettem Herzblock und im Vorhandensein von beiden in SLE anzeigt ein neueres Alter des Krankheitsangriffes und eine niedrigere Frequenz von Lupus Nephritis gefunden<sup>9</sup>. Scl-70 Antikörper reagieren mit menschlichem topoisomerase und werden bei Patienten mit verbreiteter Sklerodermie gefunden.

### GRUNDREGELN DES VERFAHRENS

Im ImmuBlot™ ANA Western Blot Immunoassay, zeichnen die nuklear- und zellplasmatischen Antigene von einer Zelle HeLa, ergänzt mit zusätzlichen Antigenen, werden getrennt entsprechend ihrem Molekulargewicht (MW) durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und gebracht dann auf eine PVDF Membrane. Ein Satz von 3 unterschiedlichen MW Markierungen werden gleichzeitig verarbeitet, um MW Kennzeichnung zu erleichtern und folglich, Deutung der Resultate. Die zusätzlichen MW Markierungen (125 kD, 77 kD, 70kD) erscheinen wie blau-violette Bänder während des befleckenden Prozesses. Sie dienen als interne Steuermarkierungen für das Abfragung System.

Das Antigen, das Streifen enthält, werden mit Steuerung oder Patient Serum ausgebrütet. Wenn anwesend im Serum, binden Anti-nuklear Antikörper an das spezifische Antigen auf dem Streifen. Nachdem wiederholt, werden Reinigung und Ausbrütungen mit zwei Arten Paronyme und Chromogensubstrat, positive Reaktionen durch blau-violette Streifenbildungen auf dem Streifen angezeigt. Die Besonderheit des Antikörpers wird durch die Kennzeichnung der positiven Bänder im Vergleich mit dem positiven Steuerstreifen definiert, wenn sie mit den 3 MW Markierungen übereingestimmt wird (125kD, 77kD, 70kD).

## REAGENS

### Ablage und Vorbereitung

Alle Reagenzien an 2-8° C speichern. **Nicht einfrieren.** Nicht verwenden, wenn flüssige Reagenzien trüb sind, oder ein Niederschlag anwesend ist. Vor dem Beginnen der Probe, müssen Reagenzien zur Raumtemperatur (~22°) abgeglichen werden. Antigenstreifen können nur einmal benutzt werden. Bestandteile der unterschiedlichen Lose nicht austauschen. Reagenzien über dem Verfallsdatum hinaus nicht benutzen, das auf Aufklebern angezeigt wird.

### Vorkehrungen

Alle menschlichen abgeleiteten benutzten Bestandteile sind auf HBsAg, HCV, Hiv-1 und 2 und Htlv-i und gefundenes Negativ durch US FDA erforderliche Tests geprüft worden. Jedoch sollten alle menschlichen Blutleitungen und geduldigen Probestücke als möglicherweise ansteckend gelten und gute Laborpraxis, in der Speicherung, dem Zuführen und dieser Materialien entledigend, muß gefolgt werden <sup>10</sup>.

ACHTUNG - Natrium Azid (NaN<sub>3</sub>) kann mit Leitung und kupferner Klempnerarbeit explosiven Aziden der Form reagieren zu den in hohem Grade Metall. Nach Beseitigung der Flüssigkeiten, bündiges mit große Volumen Wasser, zum von von Azidanhäufung zu verhindern. NaN<sub>3</sub> ist giftig, wenn es eingenommen wird. Ereignissen Labordirektor oder -giftsteuermitte sofort berichten.

Guter Laborpraxis folgen, Mikroben- und Kreuzverschmutzung der Reagenzien herabzusetzen.

### Materialien bereitgestellt Code: 1170

Der ImmuBlot ANA kit, enthält genügende Reagenzien, um 20 Ermittlungen durchzuführen.

1 x 20	ANA Western Blot Streifen
1 x 120 µL	*Positive Kontrolle, gebrauchsfertig
1 x 120 µL	*Negative Kontrolle, gebrauchsfertig
1	Kontrollkarte
1 x 250 µL	*Konjugat A
1 x 250 µL	*Konjugat B
1 x 60 ml	*Gepuffertes Probendiluent
1 x 25 ml	*Enzym Substrat
1 Phiole	Waschpuffer für je 1 Liter
3	Assay Wannen

\* Enthält < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Materialien Erfordert Aber Nicht Bereitgestellt

- 1000 ml graduierten Zylinder säubern
- Nicht-gezackte Zange
- Schalthebel oder drehender Plattformschüttel-Apparat
- Saugfähiges Papier oder Papiertücher
- Entionisiert oder destilliertes Wasser
- Pressungflasche zu Einfluß verdünntem Wäschepuffer
- Pipetten fähig zum Liefern von von µ 10 bis 1000 L
- Wegwerf Spitzen pipettieren
- Timer

### PROBESTÜCK-ANSAMMLUNG UND BEHANDLUNG

Nur Serumprobestücke sollten in diesem Verfahren benutzt werden. Hämolytische grob, können lipämische oder durch Mikroben verschmutzte Probestücke die Leistung des Tests behindern und sollten nicht verwendet werden. Probestücke an 2-8° C für nicht mehr als eine Woche speichern. Für längere Lagerung sollten Serumprobestücke eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und das Auftauen der Proben vermeiden.

## METHODE

### Verfahrensmerkungen

- Anweisungen beginnend mit der Probe sorgfältig vorher lesen.
- Serumprobestücke und Testreagenzien zur Raumtemperatur für Minuten ~30 vor dem Beginnen des Testverfahrens abgleichen lassen. Alle unbenutzten Probestücke und Reagenzien zum Nachgebrauch des Kühlraums sofort zurückbringen.
- Korrekte waschende Technik ist zur ordnungsgemäßen Erfüllung der Probe kritisch.
- Positive und negative Kontrollstreifen müssen in jedem Probe Durchlauf eingeschlossen werden.

### Methode Prüfen

1. Mit stumpfer Zange erforderliche Zahl **der Streifen** beschrifteten Seite oben in einzelne Brunnen des Probe Behälters setzen.
2. **1.0 ml** von Probendiluent in jedes Kavität pipettieren.
3. **10 µL** von Positive und von Negative Kontrolle und geduldige Probe in passende Brunnen pipettieren, **um eine 1:101 Verdünnung** zu erreichen. **60 Minuten** (± 5 Minuten) ausbrüten bei der Raumtemperatur auf einem Schalthebel oder einem drehenden Schüttel-Apparat.
4. Beispiellösung in Abfallbehälter ansaugen. Streifen mit Waschpuffer gänzlich waschen, indem Sie ungefähr 2ml der Lösung direkt auf Streifen spritzen. Streifen mit leichter Bewegung für **5 Minuten** waschen und Lösung in Abfallbehälter ansaugen. **4x wiederholen.** *Vorsicht: Komplette Reinigung der Streifen zwischen Ausbrütungen ist entscheidend, gültige Resultate zu erreichen. Unsachgemäße Reinigung ergibt den hohen befleckenden Hintergrund.*
5. **1.0 ml** von Probendiluent pipettieren gut gefolgt von **10 µL** von Konjugat A in jedes. **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei der Raumtemperatur auf Schalthebel oder drehendem Schüttel-Apparat ausbrüten.
6. **Schritt 4** wiederholen.
7. **1.0 ml** von Probendiluent pipettieren gut gefolgt von **10 µL** von Konjugate B in jedes. **30 Minuten** (± 5 Minuten.) ausbrüten bei der Raumtemperatur auf Schalthebel oder drehendem Schüttel-Apparat.
8. **Schritt 4** wiederholen.
9. **1.0 ml** Substrat in jedes pipettieren Brunnen und mit leichtem ausbrüten, **15 Minuten** (± 5 Minuten) bei der Raumtemperatur und bei verringertem Licht rüttelnd.
10. **Schritt 4** wiederholen und anstelle von viermal zweimal waschen.
11. Mit stumpfer Zange Streifen vom Probe Behälter entfernen und sie auf saugfähiges Papier leicht setzen. Streifen nur an den Enden anfassen und sie **15-20 Minuten** trocknen lassen.

### Qualitätskontrolle

Wenn die folgenden Spezifikationen nicht getroffen werden, soll der Durchlauf gelten als Invaliden und sollte wiederholt werden.

1. Die negative Steuerung zeigt keine zusätzlichen Bänder anders als Molekulargewichtmarkierungen bei 125 kD, 77 kD, und 70kD. Diese Markierungen erscheinen auf jedem Streifen und Hilfe in der Deutung der reagierten Streifen (Tabelle 1).
2. Die positive Steuerung sollte für Scl-70 (100kD), SS-A(Ro) (60kD), Jo-1(56kD), SS-B(La) (48kD), RNP (68kD) und SM @B/B<sup>1</sup> (28, 29kD) wie in Tabelle 2 gezeigt positiv sein. Zusätzliche Bänder können auch sein Geschenk, wie in Tabelle 1 am Ende dieses Dokumentes.