



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



ImmuLisa™

PM/Scl Antibody ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

PRODUCT INSERT

REF 5101 PM/Scl Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative and semi-quantitative detection of IgG antibodies to the nucleolar antigen PM/Scl in human serum to aid in the diagnosis of polymyositis, scleroderma or an overlap of polymyositis and scleroderma in conjunction with other laboratory and clinical findings.

SUMMARY AND EXPLANATION

Anti-nuclear antibodies (ANA) are a characteristic feature in the serum of patients with connective tissue disorders (CTD) such as systemic lupus erythematosus (SLE), scleroderma (Scl), polymyositis (PM), dermatomyositis (DM), or PM/Scl overlap. ANA are visualized by various reaction patterns using indirect immunofluorescence methods. Of these, the most common include homogenous, speckled, centromere and nucleolar patterns. Each reaction pattern represents antibodies associated with a particular antigen(s) and hence a disease or disease subset. For example, the centromere reaction is associated with a subset of scleroderma. Similarly, the nucleolar is associated with scleroderma, polymyositis, dermatomyositis and overlap of these conditions. The nucleolar reaction patterns are of three types: homogenous, coarse speckled or clumpy. Each reaction pattern represents antibodies of a particular specificity. The homogenous nucleolar reaction pattern is associated with antibodies to PM/Scl. PM/Scl complex, also commonly referred to as human exosome, consists of a complex of nine proteins and some other proteins that associate with this complex. This core complex is most abundant in the nucleolus.¹⁻⁴ This complex is involved in ribosomal RNA processing and messenger RNA degradation. Antibodies to PM/Scl complex are present in approximately 30% of patients with PM/Scl overlap, 8% of patients with PM, 11% of patients with DM, and 2% of patients with scleroderma.

Polymyositis is a subset of idiopathic inflammatory myopathies (IBM) characterized by chronic muscle weakness and skeletal muscle inflammation. Other subsets of idiopathic inflammatory myopathy are dermatomyositis and inclusion body myositis. IBM is a rare disorder with a reported incidence of 0.5-

EN

1 per 100,000. PM and DM can occur either in childhood or at age 30-50 with female preponderance (F:M 2.5:1). Like many other autoimmune diseases, polymyositis has genetic link and is related to DRB1.

Autoantibodies are important in the diagnosis and understanding of inflammatory myopathies. The antibodies to PM/Scl are associated with PM/Scl overlap and to some extent in patients with PM, DM or Scl, and rarely in SLE.

Antibodies to PM/Scl can be detected by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells with a specific reaction pattern, by immunodiffusion using rabbit thymus extract, by immunoprecipitation and by ELISA. The antigens to which PM/Scl antibodies react are to PM/Scl-75, one of the nine core complex proteins of the human exosome, as well as to an associated protein, PM/Scl-100. Recently, a specific epitope to which the PM/Scl antibodies react has been identified. The use of the peptide rather than the whole molecule may provide higher levels of sensitivity and specificity as compared to the full length molecules because of cross reactivity, antigenic epitope exposure and epitope density. This assay benefits from these findings and incorporates a suitable antigen molecule that presents with the best discrimination in detecting antibodies to PM/Scl.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Individual Microwells are coated with PM/Scl antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Control, calibrator and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells allowing specific antibodies present in the serum to bind to the antigen. Unbound-antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. HRP labeled anti-human IgG conjugate is added to each well. The unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of TMB substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by spectrophotometer at 450 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml) and reported as positive or negative.

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

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.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

Coated microwell strips are for one time use only. Unused microwell strips should be carefully resealed in the pouch containing desiccants to prevent condensation and stored at 2-8°C.

EN

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.⁵

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. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Materials provided

ImmuLISA™ PM/Scl Antibody ELISA

REF 5101

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	MICROPLATE PM/SCL	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with PM/Scl antigen. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL + PM/SCL	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for PM/Scl antibodies. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A PM/SCL CALIBRATOR B PM/SCL CALIBRATOR C PM/SCL CALIBRATOR D PM/SCL CALIBRATOR E PM/SCL	Ready to use set of 5 Calibrators . Calibrator A (green cap) 160 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 80 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 40 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum containing PM/Scl antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgG Conjugate . Ready for use. Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL	Serum Diluent. Ready for use. Color coded purple.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB enzyme substrate. Ready for use. Protect from light.
1 x 15 ml	STOP H ₂ SO ₄	Stop Solution. Ready for use.
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each.
1 x		Protocol Sheets

Optional Components

1 x 60ml	BUF WASH	Liquid concentrated Wash Buffer. Reconstitute to one liter.
----------	------------------	--

Symbols used on labels

LOT	Lot number
REF	Catalog number
IVD	In vitro diagnostic use

EN



Use by



Storage temperature



Read instructions before use



Number of tests



Manufacturer

Materials Required But Not Provided

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

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- ***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.***

EN

- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- 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.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate to 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 Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.

or

For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

Qualitative				Semi-Quantitative			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-Control	S6		B	-Control	S2	
C	+ Control	S7		C	+ Control	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500µl** of Serum Diluent.
- 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 Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.
- Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.

EN

Step 14 Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within **30 minutes** of adding Stop Solution.

Step 15 Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630nm using a 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 <10 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 optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less 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

Abs. of Test Sample

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

Abs. of Calibrator D

It is recommended that qualitative results be reported as “positive” or “negative.” Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as “positive,” “negative,” or “indeterminate” with EU/ml unit values. Indeterminate/borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods.

Interpretation

Interpretation values were determined by testing 64 normal blood donors. The cutoff was established using mean of the normal subjects plus 2 SD and

assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. IMMCO suggests use of the reference range below. Each laboratory should validate assay values for their own conditions.

PM/Scl Ab value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

Calibrator

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

LIMITATIONS OF PROCEDURE

The assay should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only. The results obtained serve only as an aid in the diagnosis. Taken alone, these results should not be interpreted as diagnostic. This assay has not been validated in a pediatric population.

Specimens positive for antiphospholipid antibodies (APL) potentially cross-react with the PM/Scl antigen. It is recommended that additional laboratory testing of positive samples include assays for APL.

EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are usually expected to be negative. If results are positive, additional testing may be warranted to substantiate the serum antibody findings.

Incidence of PM/Scl Antibodies⁴

Disease Group	n	n Positive	% Positive
PM/Scl Group			
Polymyositis/Sceroderma	40	22	55
Polymyositis	40	3	7.5
Scleroderma	205	27	13
Disease Controls			
Rheumatoid Arthritis	69	0	0
Systemic lupus erythematosus	114	3	2.5
Rheumatic disease controls	452	33	7

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ PM/Scl ELISA for the detection of autoantibodies was evaluated by testing nucleolar positive and negative serum specimens from suspected connective tissue disorder subjects, as well as disease controls and "normal" human sera. These specimens were also tested on another ELISA test kit for the detection of PM/Scl antibodies. These results are summarized below.

A. Immulisa™ PM/Scl ELISA vs. other PM/Scl Antibody kit:

		Other PM/Scl ELISA		
IMMCO PM/SCL ELISA		Positive	Negative	Total
	Positive	20	6	26
	Negative	3	56	59
	Total	23	62	85
Positive Percent Agreement:		87.0%		
Negative Percent Agreement:		90.3%		
Overall Percent Agreement:		89.4%		

B. Cross Reactivity: A total of 80 potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders or positive for other autoantibodies were tested for PM/Scl antibodies using the Immulisa™ PM/Scl ELISA.

Condition	n	Positive
ENA positive*	48	5
Celiac Disease	8	2
Autoimmune Vasculitis	8	0
Hashimoto's Disease	8	1
Total	72	8 (11%)

* Antibodies to Extractable Nuclear Antigens

Precision

Precision was tested with positive specimens selected throughout the range of the assay. Assay runs of 3 replicates of each specimen were conducted on 3 days. Repeatability was determined with 6 replicates of each specimen.

S #	Mean (EU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	14	1.01	7.0%	1.03	7.2%	1.40	9.6%
2	29	1.20	4.1%	1.28	4.4%	0.91	3.2%
3	58	2.45	4.2%	3.36	5.8%	0.84	1.4%
4	116	7.30	6.3%	9.07	7.7%	0.19	0.2%
5	231	19.29	8.4%	26.07	11.1%	2.02	0.9%

EN

Linearity

Multiple assay runs were performed using doubling dilutions of samples throughout the linear range of the assay. Average r^2 value was .992 for these runs with no run lower than 0.985. Assay runs are deemed acceptable if r^2 exceeds 0.95.

Interference

Interference was studied by mixing sera with known PM/Scl antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 $\mu\text{mol/L}$), and Rheumatoid Factor (100 EU/ml).

ImmuLisa™

Αντίσωμα PM/ScI ELISA

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 5101 Αντίσωμα PM/ScI ELISA 96 Προσδιορισμοί

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για την ποιοτική και ημι-ποσοτική ανίχνευση αντισωμάτων IgG στο πυρηνικό αντιγόνο PM/ScI στον ανθρώπινο ορό, ως βοήθημα στη διάγνωση της πολυμυοσίτιδας, της σκληροδερμίας ή επικάλυψη πολυμυοσίτιδας και σκληροδερμίας σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) είναι μια χαρακτηριστική ιδιομορφία στον ορό ασθενών με διαταραχές συνδετικού ιστού (CTD), όπως συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE), σκληροδερμία (ScI), πολυμυοσίτιδα (PM), δερματομυοσίτιδα (DM) ή επικάλυψη PM/ScI. Τα ANA οπτικοποιούνται από διάφορα πρότυπα αντίδρασης με τη χρήση μεθόδων έμμεσου ανοσοφθορισμού. Από αυτά, τα πιο συνήθη περιλαμβάνουν ομοιογενή, στικτά, κεντρομεριδικά και πυρηνισκικά μοτίβα. Κάθε πρότυπο αντίδρασης αντιπροσωπεύει αντισώματα συσχετισμένα με συγκεκριμένο(α) αντιγόνο(α) και ως εκ τούτου μία νόσο ή ένα υποσύνολο νόσου. Για παράδειγμα, η κεντρομεριδική αντίδραση σχετίζεται με ένα υποσύνολο σκληροδερμίας. Ομοίως, η πυρηνισκική σχετίζεται με σκληροδερμία, πολυμυοσίτιδα, δερματομυοσίτιδα και επικάλυψη αυτών των παθήσεων. Τα πυρηνισκικά πρότυπα αντίδρασης είναι τριών τύπων: ομοιογενή, χονδροειδώς στικτά ή με δέσμη. Κάθε πρότυπο αντίδρασης αντιπροσωπεύει αντισώματα μια συγκεκριμένης ιδιαιτερότητας. Το ομοιογενές πυρηνισκικό πρότυπο αντίδρασης συσχετίζεται με αντισώματα σε PM/ScI. Σύμπλοκο PM/ScI, επίσης συνήθως αναφερόμενο ως ανθρώπινο εξωσωμάτιο, αποτελείται από ένα σύμπλοκο εννέα πρωτεϊνών και κάποιες άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτό το σύμπλοκο. Αυτό το σύμπλοκο πυρήνα είναι κυρίως άφθονο στον πυρηνίσκο.¹⁻⁴ Αυτό το σύμπλοκο ενέχεται σε ριβοσωμική RNA διαδικασία και διάσπαση αγγελιαφόρου RNA. Αντισώματα σε σύμπλεγμα PM/ScI είναι παρόντα σε περίπου 30% των ασθενών με επικάλυψη PM/ScI, 8% των ασθενών με PM (πολυμυοσίτιδα), 11% των ασθενών με DM (δερματομυοσίτιδα) και 2% των ασθενών με σκληροδερμία.

Η πολυμυοσίτιδα είναι ένα υποσύνολο ιδιοπαθών φλεγμονωδών μυοπαθειών (IBM) που χαρακτηρίζεται από χρόνια αδυναμία μυών και μυοσκελετική

EL

φλεγμονή. Άλλα υποσύνολα ιδιοπαθούς φλεγμονώδους μυοπάθειας είναι η δερματομυοσίτιδα και την μυοσίτιδα με έγκλειστα σωματία. Η IBM (μυοσίτιδα με έγκλειστα σωματία) είναι μια σπάνια διαταραχή με αναφερόμενο επιπολασμό 0,5-1 ανά 100 000. Η PM (πολυμυοσίτιδα) και DM (δερματομυοσίτιδα) μπορούν να εμφανισθούν είτε στην παιδική ηλικία είτε στην ηλικία των 30-50 με αριθμητική επικράτηση των γυναικών (Θ:Α 2,5:1). Όπως πολλές άλλες αυτοάνοσες νόσοι, η πολυμυοσίτιδα συνδέεται γενετικά και σχετίζεται με DRB1.

Τα αυτοαντισώματα είναι σημαντικά στη διάγνωση και κατανόηση των φλεγμονωδών μυοπαθειών. Τα αντισώματα σε PM/Scl συσχετίζονται με επικάλυψη PM/Scl και σε κάποιο βαθμό σε ασθενείς με PM, DM ή Scl, και σπάνια με SLE (συστηματικό ερυθηματώδη λύκο).

Αντισώματα σε PM/Scl μπορούν να ανιχνευθούν με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε κύτταρα HEp-2 με συγκεκριμένο πρότυπο αντίδρασης, με ανοσοδιάχυση χρησιμοποιώντας εκχύλισμα θύμου κουνελιού, με ανοσοκαθίζηση και με ELISA. Τα αντιγόνα στα οποία αντιδρούν τα αντισώματα PM/Scl είναι σε PM/Scl-75, ένα από τα εννέα συμπλέγματα πρωτεϊνών του πυρήνα του ανθρώπινου εξωσώματος, καθώς επίσης σε μια συσχετισμένη πρωτεΐνη, την PM/Scl-100. Πρόσφατα, ένα συγκεκριμένο επίτοπο στο οποίο αντιδρούν τα αντισώματα PM/Scl έχει εξακριβωθεί. Η χρήση του πεπτιδίου μάλλον παρά ολόκληρου του μορίου μπορεί να παρέχει υψηλότερα επίπεδα ευαισθησίας και ιδιαιτερότητας σε σύγκριση με τα μόρια πλήρους μήκους λόγω διασταυρωτής αντίδρασης, έκθεσης επίτοπου του αντιγόνου και πυκνότητας του επίτοπου. Η δοκιμασία αυτή ωφελείται από αυτά τα ευρήματα και ενσωματώνει ένα κατάλληλο μόριο αντιγόνου που παρουσιάζει με την καλύτερη διάκριση στην ανίχνευση αντισωμάτων σε PM/Scl.

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία εκτελείται ως στερεά φάση ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA). Τα ατομικά βυθίσματα (microwells) επενδύονται με αντιγόνο PM/Scl και ακολουθεί το μπλοκάρισμα των μη αντιδρώντων τοποθεσιών (unreacted sites) για τη μείωση μη ειδικής δέσμευσης. Έλεγχος, βαθμονομητής και δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στα επενδεδυμένα βυθίσματα αντιγόνου επιτρέποντας σε συγκεκριμένα αντισώματα παρόντα στον ορό για να δεσμεύουν το αντιγόνο. Αδέσμευτα αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες ορού αφαιρούνται με την πλύση των βυθισμάτων. Σύζευξη ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης συνδεδεμένης με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP labeled anti-human IgG conjugate) προστίθεται σε κάθε βύθισμα. Η αδέσμευτη σύζευξη απομακρύνεται με την πλύση. Συγκεκριμένο υπόστρωμα ενζύμου (TMB) προστίθεται στη συνέχεια στις κοιλότητες και η παρουσία αντισωμάτων ανιχνεύεται με χρωματική αλλαγή που παράγεται από την μετατροπή του υποστρώματος TMB σε προϊόν χρωματικής αντίδρασης. Η αντίδραση διακόπτεται και η ακεραιότητα της χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη με την πυκνότητα του αντισώματος, διαβάζεται με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε Μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) και αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αποθήκευση και Προετοιμασία

EL

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης, όταν αποθηκεύονται και μεταχειρίζονται σύμφωνα με την καθοδήγηση.

Μην χρησιμοποιείτε αν το αντιδραστήριο δεν είναι διαυγές ή υπάρχει ένζυμο παρόν. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν τη χρήση.

Ανασυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή απιοντισμένο νερό. Όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C, το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

Οι λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων προορίζονται για χρήση μιας μόνο φοράς. Οι μη χρησιμοποιηθείσες λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες για να αποφευχθεί υγραποίηση και να αποθηκεύονται στους 2-8°C.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, τα προερχόμενα από τον άνθρωπο, έχουν δοκιμαστεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από δοκιμασίες που απαιτούνται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρώπινου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση αυτών των υλικών.⁵

Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος kit για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην εναλλάσσετε στοιχεία του kit με εκείνα από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε μικροβιακή και αλληλο-μόλυνση αντιδραστηρίων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείται στοιχεία του kit μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Υλικά που παρασχέθηκαν

ImmuliSia™ PM/Scl Antibody ELISA

REF 5101

Το kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8

MICROPLATE PM/SCL

Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένη με αντιγόνο PM/Scl. Έτοιμη προς χρήση.

1 x 1.75 ml

CONTROL + PM/SCL

Έτοιμος προς χρήση **Θετικός Έλεγχος (Positive Control)** (κόκκινο πύμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα PM/Scl. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε EU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.

1 x 1.75 ml

CONTROL -

Έτοιμος προς χρήση **Αρνητικός Έλεγχος (Negative Control)** (λευκό πύμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR A PM/SCL

CALIBRATOR B PM/SCL

CALIBRATOR C PM/SCL

CALIBRATOR D PM/SCL

CALIBRATOR E PM/SCL

Έτοιμο προς χρήση σετ 5 **Βαθμονομητών**. Βαθμονομητής A (πράσινο πύμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής B (μωβ πύμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πύμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πύμα) 20 EU/ml και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πύμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει

EL

1 x 15 ml IgG-CONJ|HRP

1 x 60 ml DIL

1 x 15 ml SUBSTRATE|TMB

1 x 15 ml STOP|H2SO4

2 x BUF|WASH

1 x

Προαιρετικά Συστατικά

1 x 60ml BUF|WASH

αντισώματα PM/ScI. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.

Σύζευξη ορού ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα. (HRP goat anti-human IgG Conjugate). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.

Αραιωτικό ορού (Serum Diluent). Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με μωβ χρώμα.

Ενζυμο-υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB enzyme substrate). Έτοιμο προς χρήση. **Προστατέψτε από το φως.**

Διάλυμα παύσης (Stop Solution). Έτοιμο προς χρήση.

Διάλυμα Πλύσης σε μορφή Σκόνης (Powder Wash Buffer). **Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο έκαστο.**

Φύλλα Πρωτοκόλλου

Υγρό Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. **Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.**

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες



Αριθμός Παρτίδας



Αριθμός καταλόγου



Διαγνωστική χρήση in vitro



Χρήση έως



Θερμοκρασία αποθήκευσης



Διαβάστε τις οδηγίες πριν τη χρήση



Αριθμός δοκιμών



Κατασκευαστής

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

- Απιοντισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτο πλαστικό μπουκάλι για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 5 μl έως 1000 μl
- Ρύγχη πιπιετών (pipette tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρης
- Απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες
- Αναγνώστης μικροπλάκας ικανός για την ανάγνωση τιμών απορροφητικότητας στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος αναγνώστης μικροπλάκας διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να οριστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο μικροπλάκας ικανό να διανέμει 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μόνον δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σ' αυτήν τη διαδικασία. Αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα μπορούν να παρεμβληθούν στην εκτέλεση της δοκιμασίας και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για παραπάνω από μία εβδομάδα στους 2°- 8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγετε επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο εντός ενός έτους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Διαδικαστικές Σημειώσεις

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Όλα τα διαλύματα των δειγμάτων του ασθενούς θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη της δοκιμασίας.
- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια δοκιμασίας να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας δοκιμασίας. Προτείνεται τα αντιδραστήρια να παραμείνουν στον πάγκο έξω από το κουτί για 30 λεπτά πριν τη χρήση. Βάζετε πίσω όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρείτε τις απαιτούμενες λωρίδες βυθισμάτων από τη σακούλα και προσεκτικά σφραγίζετε ξανά τη σακούλα για να αποφύγετε υγραποίηση στα μη χρησιμοποιηθέντα βυθίσματα. Βάζετε τη σακούλα πίσω στο ψυγείο αμέσως.
- **Η τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική.** Αν η πλύση εκτελείται με το χέρι, η σωστή πλύση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας δυνατή ροή διαλύματος πλύσης με φιάλη πλύσης με ανοιχτό στόμιο σε ολόκληρη τη μικροπλάκα. **Συνιστάται αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.**
- Χρησιμοποιείτε πολυκάναλη πιπέτα ικανή να απελευθερώνει 8 ή 12 κοιλότητες ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει χρόνους πιο ομοιόμορφης επώασης.
- Σε όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος χρονισμού είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης γίνεται με την ολοκλήρωση της προσθήκης αντιδραστηρίου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να εκτελείται με τον ίδιο ρυθμό και την ίδια ακολουθία.

Μέθοδος Δοκιμής

Βήμα 1 Αφήνετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου.

ΕΛ

Βήμα 2 Τοποθετείτε ετικέτα στο φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση δείγματος στις κοιλότητες. Αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική να εκτελείτε τα δείγματα εις διπλούν.

Βήμα 3 Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο Βαθμονομητή Δ (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα).

ή

Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε Βαθμονομητές Α έως Ε, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διάταξη δείγματος.

Ποιοτικός			
A	Κενός	S5	Κ.λπ.
B	-Control	S6	
C	+ Control	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

Ημι-Ποσοτικός			
A	Κενός	S1	Κ.λπ.
B	-Control	S2	
C	+ Control	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

Βήμα 4 Προετοιμάζετε διάλυμα **1:101** από τα δείγματα ασθενών αναμειγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500ul** Ορού Αραίωσης.

Βήμα 5 Αφαιρείτε τα απαιτούμενα βυθίσματα από το σάκο και βάζετε πίσω τις λωρίδες που δεν έχετε χρησιμοποιήσει στη σφραγισμένη σακούλα στο ψυγείο. Τοποθετείτε ασφαλώς τα βυθίσματα στην επιπλέον βάση που παρέχεται.

Βήμα 6 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** τους Έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές, τους Θετικούς και Αρνητικούς ελέγχους και τα αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στα κατάλληλα βυθίσματα σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλλου.

Σημείωση: Συμπεριλαμβάνετε μία κοιλότητα που περιέχει **100 μl** Ορού Αραίωσης ως κενό αντιδραστήριο. Μηδενίζετε την συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του κενού αντιδραστήριου.

Βήμα 7 Επωάζετε για **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 8 Πλένετε **4 φορές** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο με το χέρι, γεμίζετε κάθε βύθισμα με ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης. Πετάξτε το υγρό αναστρέφοντας και κτυπώντας ελαφρά ώστε να βγουν τα περιεχόμενα κάθε κοιλότητας ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κοιλότητα. Για να κάνετε αποτύπωση στο τέλος της τελευταίας πλύσης, αναστρέψτε τις λωρίδες και κτυπήστε τοις κοιλότητες έντονα πάνω σε απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες. Για αυτόματες συσκευές πλυσίματος, προγραμματίστε την συσκευή πλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Βήμα 9 Βάζετε με την πιπέτα **100 μl** της σύζευξης σε βυθίσματα.

Βήμα 10 Επωάζετε για **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

ΕΛ

Βήμα 11 Πλένετε όλα τα βυθίσματα, όπως περιγράφεται στο Βήμα 8.

Βήμα 12 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για τη Σύζευξη.

Βήμα 13 Επωάζετε για **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 14 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Διαλύματος Παύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για την προσθήκη του Ενζυμικού Υποστρώματος. Διαβάζετε τις τιμές απορροφητικότητας εντός **30 λεπτών** από την προσθήκη του Διαλύματος Παύσης.

Βήμα 15 Διαβάστε την απορροφητικότητα κάθε βυθίσματος σε **450 nm** χρησιμοποιώντας μονού ή στα 450/630nm χρησιμοποιώντας διπλού μήκους κύματος συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας έναντι του σετ κενού αντιδραστήριου σε μηδενική απορροφητικότητα.

Ποιοτικός Έλεγχος

Οι Βαθμονομητές, ο Θετικός και Αρνητικός Έλεγχος και ένα κενό αντιδραστήριο πρέπει να εκτελούνται με κάθε δοκιμασία για την εξακρίβωση της ακεραιότητας και ακρίβειας της δοκιμασίας. Η ένδειξη απορροφητικότητας του κενού αντιδραστήριου θα πρέπει να είναι μικρότερη του 0,3. Ο Βαθμονομητής Α θα πρέπει να έχει ένδειξη απορροφητικότητας όχι μικρότερη του 1,0, άλλως η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να είναι μικρότερος από 10 EU/ml. Εάν η δοκιμασία διεξάγεται εις διπλούν, ο μέσος όρος των δύο ενδείξεων θα πρέπει να λαμβάνεται για τον προσδιορισμό EU/ml. Κατά την εκτέλεση των Ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή Δ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνην του αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς ο θετικός έλεγχος πρέπει να δίνει τιμές εντός του φάσματος που δηλώνεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι πυκνότητες των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας

----- X EU/ml Βαθμονομητή Δ = EU/ml Δείγμα Δοκιμασίας

Απορ. Βαθμονομητή Δ

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά” ή “αρνητικά.” Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Αποτυπώστε την απορροφητικότητα των Βαθμονομητών Α έως Ε έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε χαρτί γραφημάτων γραμμικού αρχείου καταγραφής (linear-log graph paper). Αποτυπώστε τις συγκεντρώσεις σε EU/ml στον Χ-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Υ-άξονα και σχεδιάστε μια καμπύλη προσαρμογής από σημείο σε σημείο. Καθορίστε τις

συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφητικότητας. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση της πρότυπης καμπύλης.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά,” “αρνητικά,” ή “απροσδιόριστα” με τιμές μονάδας EU/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγχονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή 64 απλών δοτών αίματος. Το σημείο διαχωρισμού καθιερώθηκε χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο των συνήθων αντικειμένων συν 2 SD και καθόρισε την αυθαίρετη τιμή των 20 EU/ml. Η IMMCO προτείνει τη χρήση του παρακάτω εύρους αναφοράς. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώνει τις τιμές δοκιμασίας για τις δικές τους συνθήκες.

τιμή PM/ScI Ab	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

Βαθμονομητής

Οι Έτοιμοι προς Χρήση Βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για να παρέχουν ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε εκτέλεση. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορούν να δώσουν τιμές απορροφητικότητας μεγαλύτερες από εκείνη του Βαθμονομητή Α. Για τον προσδιορισμό ακριβών ημι-ποσοτικών τιμών, αυτά τα δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω ώστε να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης του βαθμονομητή όταν επανεξετάζονται. Για τον προσδιορισμό τιμών EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που αποκτήθηκαν με τον διαλύτη.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία δεν θα πρέπει να εκτελείται σε αιμολυμένα, βακτηριδιακά επιμολυσμένα ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο δειγμάτων ανθρώπινου ορού μόνον. Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν εξυπηρετούν μόνο ως βοήθημα στη διάγνωση. Μόνα τους, αυτά τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται ως διαγνωστικά. Αυτή η δοκιμασία δεν έχει επικυρωθεί σε παιδιατρικό πληθυσμό.

Δείγματα θετικά για αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (APL) πιθανώς παρουσιάζουν διασταυρωτή αντιδραστικότητα με το αντιγόνο PM/ScI. Συνιστάται η επιπρόσθετη εργαστηριακή δοκιμή θετικών δειγμάτων να περιλαμβάνει δοκιμασίες για APL.

ANAMENOMENES TIMEΣ

ΕΛ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής σε φυσιολογικό πληθυσμό συνήθως αναμένονται να είναι αρνητικά. Αν τα αποτελέσματα είναι θετικά, επιπρόσθετη δοκιμή μπορεί να εγγραφεί να τεκμηριώσει τα ευρήματα αντισώματος του ορού.

Επίπτωση PM/Scl Αντισωμάτων⁴

Ομάδα Νόσου	n	n Θετικό	% Θετικό
Ομάδα PM/Scl			
Πολυμυοσίτιδα/Σκληροδερμία	40	22	55
Πολυμυοσίτιδα	40	3	7,5
Σκληροδερμία	205	27	13
Έλεγχοι Νόσων			
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	69	0	0
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	114	3	2,5
Έλεγχοι ρευματικών νόσων	452	33	7

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα του ImmuLisa™ PM/Scl ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων αξιολογήθηκε με δοκιμή δειγμάτων θετικού και αρνητικού πυρηνιακού ορού από υποκείμενα ύποπτα για διαταραχές συνδετικού ιστού, μαζί με ελέγχους νόσων και “φυσιολογικούς” ανθρώπινους ορούς. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε άλλο kit ELISA για την ανίχνευση PM/Scl αντισωμάτων. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. ImmuLisa™ PM/Scl ELISA έναντι άλλου kit PM/Scl Antibody:

Άλλο PM/Scl ELISA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	20	6	26
PM/SCL	Αρνητικό	3	56	59
ELISA	Σύνολο	23	62	85

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 87,0%

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 90,3%

Συμφωνία Γενικού Ποσοστού: 89,4%

B. Διασταυρωτή Αντιδραστικότητα: Ένα σύνολο από 80 δείγματα με πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση από άτομα με άλλες αυτόνομες διαταραχές ή θετικά για άλλα αυτοαντισώματα εξετάστηκαν για αντισώματα PM/Scl χρησιμοποιώντας το ImmuLisa™ PM/Scl ELISA.

Πάθηση	n	Θετικό
Θετικά ENA*	48	5
Κοιλιοκάκη	8	2
Αυτοάνοση Αγγειίτιδα	8	0
Νόσος του Hashimoto	8	1
Σύνολο	72	8 (11%)

* Αντισώματα σε Εξαγωγή Πυρηνικά Αντιγόνα

Ακρίβεια

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. Σειρές δοκιμασιών 3 επαναλήψεων πειράματος (replicates) διεξήχθησαν σε κάθε δείγμα σε διάστημα 3 ημερών. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 6 επαναλήψεις πειράματος κάθε δείγματος.

Αρ. Δείγματος (S #)	Μέσος όρος (EU/ml)	Ολική Ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	14	1,01	7,0%	1,03	7,2%	1,40	9,6%
2	29	1,20	4,1%	1,28	4,4%	0,91	3,2%
3	58	2,45	4,2%	3,36	5,8%	0,84	1,4%
4	116	7,30	6,3%	9,07	7,7%	0,19	0,2%
5	231	19,29	8,4%	26,07	11,1%	2,02	0,9%

Γραμμικότητα

Πολλαπλές εκτελέσεις της δοκιμασίας εκτελέστηκαν με τη χρήση αναδιπλασιασμού των αραιώσεων των δειγμάτων σε όλο το γραμμικό φάσμα της δοκιμασίας. Ο μέσος όρος τιμής r^2 ήταν 0,992 γι' αυτές τις εκτελέσεις με καμία εκτέλεση χαμηλότερη από 0,985. Οι εκτελέσεις των δοκιμασιών θεωρούνται αποδεκτές αν η r^2 υπερβαίνει το 0,95.

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα PM/ScI αντισωμάτων με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μ mol/L), και Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml).

**ImmuLISA™**

ELISA Anticuerpos Anti-PM/Scl

IVD

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF

5101

ELISA Anticuerpos Anti-PM/Scl

96 Determinaciones

UTILIZACIÓN PREVISTA

Inmunoensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos IgG anti-antígeno nucleolar PM/Scl en el suero humano para ayudar en el diagnóstico de la polimiositis, la escleroderma y una coincidencia de polimiositis y escleroderma junto con otras conclusiones clínicas y de laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos anti-nucleares (AAN) son una parte característica del suero de pacientes con afecciones de los tejidos conectivos como el lupus eritematoso sistémico (LES), la escleroderma (Scl), la polimiositis (PM), la dermatomiositis (DM) o una coincidencia de PM/Scl. Los AAN son visualizador por varios patrones de reacción mediante la utilización de métodos de inmunofluorescencia indirecta. Entre ellos, los más comunes incluyen patrones homogéneos, moteados, centrómero y nucleolar. Cada patrón de reacción representa a anticuerpos asociados con unos antígenos concretos y por consiguiente a una enfermedad o un subconjunto de enfermedades. Por ejemplo, la reacción centrómero se relaciona con un subconjunto de escleroderma. De un modo similar, la nucleolar se relaciona con la escleroderma, la polimiositis, la dermatomiositis y una coincidencia de estas afecciones. Los patrones de reacción nucleolar son de tres tipos: homogéneos, con motas gruesas o aterronados. Cada patrón de reacción representa a anticuerpos de una especificidad concreta. El patrón de reacción nucleolar homogéneo está relacionado con los anticuerpos anti-PM/Scl. El complejo PM/Scl, también conocido comúnmente como exosoma humano, consiste en un complejo de nueve proteínas y algunas otras proteínas que se asocian con este complejo. Este complejo nuclear es más abundante en el nucleolo.¹⁻⁴ Este complejo está relacionado con el procesamiento del ARN y la degradación del ARN mensajero. Los anticuerpos anti-complejo PM/Scl están presentes en aproximadamente un 30% de los pacientes con coincidencia PM/Scl, un 8% de los pacientes con PM, un 11% de los pacientes con DM, y un 2% de los pacientes con escleroderma.

ES

La polimiositis es un subconjunto de miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) caracterizado por una debilidad muscular crónica y la inflamación de los músculos esqueléticos. Otros subconjuntos de la miopatía inflamatoria idiopática son la dermatomiositis y la miositis del cuerpo de inclusión. La MII es una afección rara con una incidencia de 0,5-1 por cada 100 000 habitantes. La PM y la DM pueden presentarse durante la infancia o a la edad de 30-50 años y es más común entre las mujeres (M:H 2,5:1). Como muchas otras enfermedades autoinmunes, la polimiositis tiene un vínculo genético y está relacionada con el DRB1.

Los autoanticuerpos son importantes para el diagnóstico y la comprensión de las miopatías inflamatorias. Los anticuerpos anti-PM/Scl se asocian con la coincidencia de PM/Scl y hasta cierto punto con pacientes que sufren PM, DM o Scl, y raramente LES.

Los anticuerpos anti-PM/Scl pueden ser detectados por inmunofluorescencia indirecta en células HEP-2 con un patrón de reacción específico, por inmunodifusión utilizando extracto de timo de conejo, por inmunoprecipitación y por ELISA. Los antígenos contra los que reaccionan los anticuerpos PM/Scl son la PM/Scl-75, una de las nueve proteínas del núcleo del exosoma humano, así como una proteína asociada, PM/Scl-100. Recientemente se ha identificado un epítipo específico contra el que reaccionan los anticuerpos anti-PM/Scl. La utilización del péptido en lugar de la molécula entera puede proporcionar niveles más altos de sensibilidad y especificidad en comparación con las moléculas largas por la reactividad cruzada, la exposición del epítipo antigénico y la densidad del epítipo. Este ensayo saca provecho de esos hallazgos e incorpora una molécula de antígeno adecuada que presenta la mejor discriminación a la hora de detectar los anticuerpos anti-PM/Scl.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis se realiza como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los micropocillos son recubiertos con antígeno PM/Scl y a continuación se realiza una fase de bloqueo de los sitios sin reacción para reducir los vínculos no específicos. Se incuban en los pozos recubiertos con el antígeno controles, calibradores y muestras del suero del paciente para que los anticuerpos específicos puedan presentarse en el suero para unirse al antígeno. Los anticuerpos separados y otras proteínas del suero son eliminados lavando los micropocillos. Se añade en cada micropocillo conjugado IgG anti-humana con etiqueta HRP. El conjugado no unido es eliminado lavándolo. A continuación se añade a los pocillos sustrato de enzima específica (TMB) y se detecta la presencia de anticuerpos gracias a un cambio de color producido por la conversión del sustrato de TMB en un producto de reacción de color. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 250 nm. Los resultados son expresados en unidades de ELISA por milímetro (EU/ml) y consignados como positivos o negativos.

REACTIVOS

Almacenamiento y preparación

ES

Guarde todos los reactivos a entre 2 y 8°C. **No los congele.** Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se los maneja y almacena de acuerdo con estas instrucciones.

No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su utilización.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Si lo guarda entre 2 y 8°C, el tampón de lavado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad del equipo.

Las tiras de micropocillos recubiertos son de un solo uso. Las tiras de micropocillos no utilizadas deberían ser recolocadas con cuidado en la bolsa con desecantes para evitar la condensación y ser almacenadas a 2-8°C.

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.⁵

Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos. No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

Materiales proporcionados

ELISA ImmuLisTM Anticuerpos Anti-PM/ScI

[REF] 5101

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8 **[MICROPLATE|PM/ScI]**

Microplaca con micropocillos individuales escindibles. Revestida con antígeno PM/ScI. Lista para su utilización.

1 x 1.75 ml **[CONTROL|+|PM/ScI]**

Control Positivo listo para su utilización (*tapón rojo*). Contiene suero humano positivo en anticuerpos PM/ScI. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml **[CONTROL|-]**

Control Negativo listo para su utilización (*tapón blanco*). Contiene suero humano.

5 x 1.75 ml **[CALIBRATOR|A|PM/ScI]**

Juego de 5 calibradores listos para su utilización. Calibrador A (*tapón verde*) 160 EU/ml, Calibrador B (*tapón violeta*) 80 EU/ml, Calibrador C (*tapón azul*) 40 EU/ml, Calibrador D (*tapón amarillo*) 20 EU/ml, y Calibrador E (*tapón naranja*) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos PM/ScI. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.

[CALIBRATOR|B|PM/ScI]

[CALIBRATOR|C|PM/ScI]

[CALIBRATOR|D|PM/ScI]

[CALIBRATOR|E|PM/ScI]

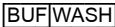
1 x 15 ml **[IgG-CONJ|HRP]**

Conjugado IgG antihumano de cabra HRP. Listo

ES

1 x 60 ml		para su utilización. De color rosa. Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color morado.
1 x 15 ml		Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. Proteger de la luz.
1 x 15 ml		Solución de parada. Lista para su utilización.
2 x		Tampón de lavado en polvo. Reconstituir a un litro cada uno.
1 x		Hojas de protocolo

Componentes opcionales

1 x 60ml		Tampón de lavado líquido concentrado. Reconstituir a un litro.
----------	---	--

Símbolos utilizados en las etiquetas

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Leer las instrucciones antes de utilizar
	Número de análisis
	Fabricante

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella de plástico blando para el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar de 5 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm y rejilla para tubos de ensayo
- Temporizador
- Toallitas de papel absorbentes
- Lector de microplaca capaz de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si está disponible el lector de microplaca de longitud de onda dual, el filtro de referencia debería fijarse a 600-650 nm
- Lavador de microplaca automático capaz de suministrar 200 µl

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2° y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras

ES

repetidamente. Es recomendable que los especímenes congelados sean analizados al cabo de un año.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de empezar el ensayo.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente deberían prepararse antes de empezar con el ensayo.
- Deje que los especímenes del paciente y los reactivos de los análisis se adapten a la temperatura ambiente antes de empezar con el procedimiento de análisis. Le sugerimos que deje los reactivos sobre la mesa de trabajo y fuera de la caja unos 30 minutos antes de su utilización. Vuelva a meter todos los especímenes y reactivos no utilizados en la nevera después de su utilización.
- Saque las tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y vuelva a cerrarla cuidadosamente para evitar la condensación de los pocillos no utilizados. Vuelva a meter la bolsa a la nevera inmediatamente.
- ***Una buena técnica de lavado es fundamental.*** Si el lavado va a ser realizado a mano, aplique una corriente fuerte de tampón de lavado con una botella de lavado de boca ancha por toda la microplaca. ***Se recomienda utilizar un lavador de microplacas automático.***
- Utilice una pipeta multicanal capaz de proveer a 8 a 12 pozos simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.
- En todos los pasos es necesario controlar cuidadosamente el tiempo. El inicio de todos los periodos de incubación empieza al terminar de añadir el reactivo.
- Todas las muestras y reactivos deberían ser añadidos a la misma velocidad y en el mismo orden.

Método de análisis

Paso 1 Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.

Paso 2 Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.

Paso 3 Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).

O

Para una **determinación semi-cuantitativa** utilice los Calibradores A a E tal como aparece en el plan de muestras siguiente.

Cualitativo				Semi-cuantitativo			
A	Base	S5	Etc.	A	Base	S1	Etc.
B	-Control	S6		B	-Control	S2	
C	+ Control	S7		C	+ Control	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Paso 4** Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500ul** de Diluyente de Suero.
- Paso 5** Saque los micropocillos necesarios de la bolsa y vuelva a meter en la nevera las tiras no utilizadas dentro de la bolsa cerrada. Coloque los micropocillos en la funda adicional proporcionada.
- Paso 6** Vierta **100 µl** de Calibradores listos para usar, controles positivos y negativos y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en los micropocillos adecuados en base a la hoja de protocolo.
- Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** del Diluyente de Suero como reactivo base. Ajuste el medidor ELISA en función del reactivo base.
- Paso 7** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.
- Paso 10** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.
- Paso 12** Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.
- Paso 13** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Vierta **100 µl** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.
- Paso 15** Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a 450/630nm si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

Control de calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y el reactivo base deben comprobarse en cada ensayo para verificar la integridad y la precisión del análisis. La medición de absorbencia del reactivo base debería ser <0,3. El Calibrador A debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser <10 EU/ml. Si se realiza la prueba por duplicado, debería tomarse la media de ambas lecturas para determinar la lectura en EU/ml. Al realizar determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semicuantitativas el control positivo debe arrojar valores dentro del registro estipulado en el vial.

RESULTADOS

Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. muestra de análisis

----- X EU/ml de Calibrador D = EU/ml Muestra Análisis

Abs. de Calibrador D

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son “positivos” o “negativos”. Los resultados de los análisis iguales o superiores al Calibrador D son considerados positivos.

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Determine la absorbencia de los Calibradores A a E en base a sus concentraciones respectivas sobre papel para gráficos lineales logarítmicos. Determine las concentraciones en EU/ml en el eje X y la absorbencia en el eje Y y dibuje una curva de punto a punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente desde la curva de acuerdo con los valores de absorbencia correspondientes. Como alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son “positivos”, “negativos” o “indeterminados” con valores en unidades EU/ml. Los resultados indeterminados/al límite deberían ser analizados de nuevo y evaluados con otros métodos de laboratorio.

Interpretación

Los valores de interpretación fueron determinados analizando las muestras de sangre de 64 donantes normales. El límite fue establecido utilizando la media de los sujetos normales más 2 SD y se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. IMMCO recomienda la utilización del registro de referencia

ES

siguiente. Cada laboratorio debería validar los valores del ensayo para sus propias condiciones.

Valor anticuerpos anti-PM/Scl	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado (Límite)
>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

Los calibradores listos para utilizar vienen incluidos para proporcionar una determinación semi-cuantitativa y deben ser utilizados en cada análisis. Las muestras de pacientes que contienen niveles altos de anticuerpos pueden arrojar unos valores de absorbencia superiores que los del Calibrador A. Para determinar unos valores semi-cuantitativos precisos, esos especímenes deberían diluirse más para que entren en el registro de la curva del calibrador al volver a analizarlos. Para determinar los valores en EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo no debería ser realizado en muestras muy hemolizadas, con contaminación microbiana o lipémicas. Este método debería ser utilizado únicamente para analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos solo sirven como ayuda en el diagnóstico. Independientemente, estos resultados no deberían ser interpretados como diagnósticos. Este ensayo no ha sido validado en una población pediátrica.

Los especímenes positivos en anticuerpos antifosfolípidos (AFL) pueden presentar reactividad cruzada con el antígeno PM/Scl. Es recomendable que los análisis de laboratorio adicionales de muestras positivas incluyan ensayos para AFL.

VALORES ESPERADOS

Normalmente se espera que los resultados de los análisis en la población normal sean negativos. Si los resultados son positivos, pueden necesitarse análisis adicionales para confirmar los hallazgos de anticuerpos en el suero.

Incidencia de anticuerpos anti-PM/Scl⁴

Grupo de enfermedades	n	n Positivo	% Positivo
Grupo PM/Scl			
Polimiositis/Escleroderma	40	22	55
Polimiositis	40	3	7,5
Escleroderma	205	27	13
Controles de enfermedades			
Artritis reumatoide	69	0	0

ES

Lupus eritematoso sistémico	114	3	2,5
Controles de enfermedades reumáticas	452	33	7

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA Immulisa™ OM/Scl para la detección de autoanticuerpos fue evaluada analizando especímenes de suero nucleolar positivos y negativos de sujetos sospechosos de sufrir afecciones del tejido conectivo junto con controles de enfermedades y sueros humanos "normales". Estos especímenes también fueron analizados con otro equipo de análisis ELISA para la detección de anticuerpos anti-PM/Scl. Los resultados se resumen a continuación.

A. ELISA Immulisa™ PM/Scl vs. otro equipo de anticuerpos PM/Scl:

		Otro ELISA PM/Scl		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	20	6	26
PM/SCL	Negativo	3	56	59
ELISA	Total	23	62	85
Concordancia de porcentaje positivo:		87,0%		
Concordancia de porcentaje negativo:		90,3%		
Concordancia de porcentaje total:		89,4%		

B. Reactividad cruzada: Un total de 80 especímenes potencialmente reactivos cruzados de individuos con otras afecciones autoinmunes o que dieron positivo en otros autoanticuerpos fueron analizados en anticuerpos PM/Scl utilizando el sistema ELISA Immulisa™ Anticuerpos PM/Scl.

Enfermedad	n	Positivo
Positivo ENA*	48	5
Enfermedad celíaca	8	2
Vasculitis autoinmune	8	0
Enfermedad de Hashimoto	8	1
Total	72	8 (11%)

* Anticuerpos de Antígenos Nucleares Extraíbles

Precisión

La precisión fue analizada con especímenes positivos seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron análisis de tres muestras duplicadas de cada espécimen durante tres días. La repetibilidad fue determinada con 6 muestras duplicadas de cada espécimen.

Nº S	Media (EU/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	14	1,01	7,0%	1,03	7,2%	1,40	9,6%
2	29	1,20	4,1%	1,28	4,4%	0,91	3,2%
3	58	2,45	4,2%	3,36	5,8%	0,84	1,4%
4	116	7,30	6,3%	9,07	7,7%	0,19	0,2%
5	231	19,29	8,4%	26,07	11,1%	2,02	0,9%

Linealidad

Se realizaron múltiples series de ensayos utilizando diluciones dobles de muestras en todo el ámbito lineal del ensayo. El valor medio r^2 fue de 0,992 para esas series y ninguna serie fue inferior a 0,985. Las series de ensayos se consideraban aceptables cuando el r^2 era superior a 0,95.

Interferencia

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de anticuerpos PM/ScI conocidos con muestras de suero con interferencia potencial y estudiando la desviación respecto a los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 $\mu\text{mol/L}$), y Factor Reumatoide (100 EU/ml).

ImmuLisa™

PM/Scl-Antikörper-ELISA

IVD**PRODUKTBEILAGE****REF** 5101 PM/Scl-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen**VERWENDUNGSZWECK**

Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) für die qualitative und semiquantitative Erfassung von IgG Antikörpern zum nukleolären Antigen PM/Scl im Humanserum, um in der Diagnose von Polymyositis, Sklerodermie oder einer Überlagerung von Polymyositis und Sklerodermie in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden zu unterstützen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antinukleäre Antikörper (ANA) sind ein besonderes Merkmal im Serum von Patienten mit Bindegewebserkrankungen (CTD) wie z. B. systemischer Lupus erythematoses (SLE), Sklerodermie (Scl), Polymyositis (PM), Dermatomyositis (DM), oder PM/Scl-Überlagerung. ANA wird durch verschiedene Reaktionsmuster unter Verwendung von indirekten Immunfluoreszenz-Methoden visualisiert. Die üblichsten davon umfassen homogene, gesprenkelte, Zentromer und nukleoläre Muster. Jedes Reaktionsmuster repräsentiert Antikörper, die mit einem bestimmten Antigen oder Antigenen und folglich einer Erkrankungs- oder Erkrankungsuntergruppe assoziiert sind. Zum Beispiel ist die Zentromer-Reaktion mit einer Untergruppe der Sklerodermie assoziiert. Entsprechend ist das Nukleoläre mit Sklerodermie, Polymyositis, Dermatomyositis und einer Überlagerung dieser Zustände assoziiert. Die nukleolären Reaktionsmuster sind von dreierlei Art: homogen, grob gesprenkelt oder klumpig. Jedes Reaktionsmuster stellt Antikörper einer bestimmten Spezifität dar. Das homogene nukleoläre Reaktionsmuster ist mit Antikörpern zu PM/Scl assoziiert. Der PM/Scl-Komplex, der auch allgemein als menschliches Exosom bezeichnet wird, besteht aus einem Komplex von neun Eiweißstoffen und einigen anderen Eiweißstoffen, die mit diesem Komplex assoziieren. Dieser Kernkomplex ist im Nukleolus am reichlichsten.¹⁻⁴ Dieser Komplex ist an der Verarbeitung der ribosomalen Ribonukleinsäure und am Boten-RNA-Abbau beteiligt. Antikörper zum PM/Scl-Komplex sind in etwa 30 % von Patienten mit PM/Scl-Überlagerung, 8 % von Patienten mit PM, 11 % von Patienten mit DM und 2 % von Patienten mit Sklerodermie vorhanden.

Polymyositis ist eine Untergruppe von idiopathischen inflammatorischen Myopathien (IBM) gekennzeichnet durch chronische Muskelschwäche und

DE

Skelettmuskelentzündung. Andere Untergruppen der idiopathischen inflammatorischen Myopathie sind Dermatomyositis und Einschlusskörpermyositis. IBM ist eine seltene Erkrankung mit einer berichteten Inzidenz von 0,5-1 pro 100 000. PM und DM können entweder in der Kindheit oder im Alter von 30-50 Jahren bei überwiegend weiblichen Personen (F:M 2,5:1) auftreten. Wie viele andere Autoimmunerkrankungen hat Polymyositis eine genetische Verbindung und ist mit DRB1 verbunden.

Autoantikörper sind bei der Diagnose und dem Verständnis von inflammatorischen Myopathien wichtig. Die Antikörper zu PM/Scl sind mit der PM/Scl-Überlagerung und in gewissem Grade bei Patienten mit PM, DM oder Scl und selten bei SLE assoziiert.

Antikörper zu PM/Scl können durch die indirekte Immunfluoreszenz auf HEp-2-Zellen mit einem spezifischen Reaktionsmuster, durch Immundiffusion unter Verwendung von Kaninchen-Thymusextrakt, durch Immunpräzipitation und durch ELISA erkannt werden. Die Antigene auf die PM/Scl-Antikörper reagieren, sind PM/Scl-75, eines der neun Kernkomplexproteine des menschlichen Exosoms, sowie auf einen assoziierten Eiweißstoff PM/Scl-100. Kürzlich wurde ein spezifisches Epitop, auf das die PM/Scl-Antikörper reagieren, identifiziert. Das Verwenden des Peptids anstatt des ganzen Moleküls kann höhere Empfindlichkeitsstufen und Spezifität aufgrund von Kreuzreaktivität, Antigenepitop-Exposition und Epitopdichte im Vergleich zu den Volllängen-Molekülen bereitstellen. Diese Prüfung profitiert von diesen Befunden und enthält ein geeignetes Antigen-Molekül, das mit dem Besten Unterscheidungsvermögen im Erkennen von Antikörpern zu PM/Scl aufwartet.

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Der Test wird als ein enzymgekoppelter Festphasenimmunadsorptionstest (ELISA) ausgeführt. Individuelle Mikrovertiefungen werden mit dem PM/Scl-Antigen beschichtet gefolgt von der Blockade der unreaktierten Stellen, um das nichtspezifische Binden zu reduzieren. Kontrolle, Kalibrator und Patientenserum-Proben werden in den mit Antigen beschichteten Vertiefungen inkubiert und ermöglichen spezifischen im Serum vorhandenen Antikörpern sich an die Antigene zu binden. Ungebundene Antikörper und andere Serumproteine werden durch Waschen der Mikrovertiefungen entfernt. Mit HRP markiertes anti-menschliches IgG-Konjugat wird zu jeder Vertiefung hinzugegeben. Das ungebundene Konjugat wird durch Waschen entfernt. Spezifisches Enzymsubstrat (TMB) wird dann zu den Vertiefungen hinzugefügt und das Vorhandensein von Antikörpern wird durch einen Farbwechsel, erzeugt durch die Umwandlung des TMB-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt, erkannt. Die Reaktion wird gestoppt und die Intensität des Farbwechsels, der zur Konzentration an Antikörpern proportional ist, wird durch ein Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen. Die Resultate werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) ausgedrückt und als positiv oder negativ berichtet.

REAGENZIEN

Lagerung und Vorbereitung

DE

Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie es nicht, wenn das Reagenz nicht farblos oder wenn ein Präzipitat vorhanden ist. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht werden.

Den Waschpuffer zu 1 Liter mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser herstellen. Bei Lagerung mit 2-8°C bleibt der hergestellte Waschpuffer bis zum Kit-Ablaufdatum stabil.

Beschichtete Mikrovertiefungsstreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Ungebrauchte Mikrovertiefungsstreifen sollten im Trocknungsmittel enthaltenden Beutel sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8°C gelagert werden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle verwendeten menschlichen Komponenten sind auf HBsAg, HCV, HIV 1 und 2 und HTLV-I geprüft und durch erforderliche Tests anhand FDA als negativ festgestellt worden. Menschliche Blutderivate und Patientenproben sollten jedoch als potenziell ansteckend betrachtet werden. Gute Laborpraktiken bei der Lagerung, beim Abgeben und dem Entsorgen dieser Materialien befolgen.⁵

Die Anweisungen wie sie in dieser Kit-Beilage angegeben sind sollten genau befolgt werden, um gültige Resultate sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Gute Laborpraktiken befolgen, um mikrobiische und Querkontamination von Reagenzien beim Handling zu minimieren. Verwenden Sie die Kit-Komponenten nicht über das auf den Etiketten angegebene Ablaufdatum hinaus.

Bereitgestellte Materialien

ImmuLisa™ PM/Scl-Antikörper-ELISA

[REF] 5101

Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

12 x 8 **[MICROPLATE|PM/SCL]**

Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit PM/Scl-Antigen. Gebrauchsfertig.

1 x 1.75 ml **[CONTROL+|PM/SCL]**

Einsatzbereite **Positivkontrolle** (roter Verschlussdeckel) Enthält für PM/Scl-Antikörper positives Humanserum. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.

1 x 1.75 ml **[CONTROL-]**

Einsatzbereite **Negativkontrolle** (weißer Verschlussdeckel). Enthält Humanserum.

5 x 1.75 ml **[CALIBRATOR|A|PM/SCL]**

Einsatzbereiter Satz von 5 **Kalibratoren**. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 160 EU/ml, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 80 EU/ml, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 20 EU/ml und Kalibrator E (orangener Verschlussdeckel) 1 EU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das PM/Scl Antikörper enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.

[CALIBRATOR|B|PM/SCL]

[CALIBRATOR|C|PM/SCL]

[CALIBRATOR|D|PM/SCL]

[CALIBRATOR|E|PM/SCL]

DE

1 x 15 ml IgG-CONJ|HRP

HRP-Ziege anti-menschliches **IgG-Konjugat**.
Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.

1 x 60 ml DIL

Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig.
Farbcode violett.

1 x 15 ml SUBSTRATE|TMB

TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. **Vor Licht schützen.**

1 x 15 ml STOP|H2SO4

Stopp-Lösung. Gebrauchsfertig.

2 x BUF|WASH

Pulver Waschpuffer. **Zu je einem Liter wiederherstellen.**

1 x

Protokollblätter

Optionale Komponenten

1 x 60 ml BUF|WASH

Flüssiger konzentrierter Waschpuffer. **Zu einem Liter herstellen.**

Auf Etiketten verwendete Symbole



Chargen nummer



Katalognummer



In vitro diagnostischer Gebrauch



Verwenden bis



Lagertemperatur



Die Anleitung vor dem Gebrauch durchlesen



Anzahl an Tests



Hersteller

Erforderliche Aber Nicht Bereitgestellte Materialien

- Entsalztes oder destilliertes Wasser
- Quetschflasche, um verdünnten Waschpuffer aufzunehmen
- Pipetten für 5 µl bis 1000 µl
- Einwegpipettenspitzen
- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Reagenzglasgestell
- Zeitmesser
- Saugfähige Papierhandtücher
- Mikroplattenleser, fähig Absorptionswerte bei 450 nm abzulesen. Wenn ein Zweiwellenlängen-Mikroplattenleser verfügbar ist, sollte der Referenzfilter bei 600-650 nm eingestellt werden
- Automatischer Mikroplattenwascher, fähig 200 µl zu dispensieren

PROBENENTNAHME UND HANDLING

Bei diesem Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Grob hämolisierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2-8°C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollten die Serumproben eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden. Es wird empfohlen, eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres zu prüfen.

VERFAHREN

Verfahrenshinweise

- Die Produktbeilage vor dem Beginn der Untersuchung sorgfältig durchlesen.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor dem Beginn der Untersuchung vorbereitet werden.
- Die Patientenproben und Testreagenzien auf Raumtemperatur bringen, bevor mit dem Prüfverfahren begonnen wird. Es wird empfohlen, dass Reagenzien vor dem Gebrauch auf dem Labortisch außerhalb des Kastens für 30 Minuten verbleiben. Alle ungebrauchten Proben und Reagenzien sofort nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank stellen.
- Erforderliche Mikrovertiefungsstreifen aus dem Beutel entnehmen und den Beutel sorgfältig wieder versiegeln, um Kondensation in den ungebrauchten Vertiefungen zu verhindern. Den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank stellen.
- **Eine gute Waschtechnik ist entscheidend.** Bei manuellem Waschen wird adäquates Waschen dadurch erreicht, dass ein kräftiger Waschpufferstrom mit einer breitspitzigen Spritzflasche über die komplette Mikroplatte gerichtet wird. **Ein automatisierter Mikroplattenwascher wird empfohlen.**
- Eine Mehrkanalpipette verwenden, die 8 oder 12 Vertiefungen gleichzeitig versorgen kann. Das beschleunigt den Prozess und ermöglicht einheitlichere Inkubationszeiten.
- Bei allen Schritten ist die sorgfältige Kontrolle der Zeitmessung wichtig. Der Start aller Inkubationszeiten beginnt mit der Beendigung der Reagenzzugabe.
- Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte bei der gleichen Geschwindigkeit und in der gleichen Reihenfolge ausgeführt werden.

Prüfmethode

Schritt 1 Alle Reagenzien und Proben bei Raumtemperatur ins Gleichgewicht bringen.

Schritt 2 Protokollblatt kennzeichnen, um die Probenanordnung in den Vertiefungen anzuzeigen. Es ist gute Laborpraktik, mit einer zweifachen Ausführung der Proben zu arbeiten.

Schritt 3 Für eine **qualitative Bestimmung** nur den Kalibrator D (*Phiole mit gelbem Verschlussdeckel*) verwenden

oder

für eine **semiquantitative Bestimmung** die Kalibratoren A bis E, wie im nachfolgenden Proben-Layout verwenden.

Qualitativ			
A	Leerprobe	S5	usw.
B	-Kontrolle	S6	
C	+ Kontrolle	S7	
D	Cal D	S8	

Semiquantitativ			
A	Leerprobe	S1	usw.
B	-Kontrolle	S2	
C	+ Kontrolle	S3	
D	Cal A	S4	

DE

E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

Schritt 4 **1:101** Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von **5 µl** der Patientenseren mit **500ul** des Serumverdünnungsmittels vorbereiten.

Schritt 5 Die erforderlichen Mikrovertiefungen aus dem Beutel entnehmen und ungebrauchte Streifen im versiegelten Beutel wieder zurück in den Kühlschrank stellen. Die Mikrovertiefungen sicher im extra bereitgestellten Halter platzieren.

Schritt 6 Mit der Pipette **100 µl** von einsatzbereiten Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und verdünnte Patientenproben (**1:101**) gemäß dem Protokollblatt in die zugehörigen Mikrovertiefungen geben.

Hinweis: Eine Vertiefung, die **100 µl** an Serumverdünnungsmittel enthält, als eine Reagenz-Leerprobe einschließen. Den ELISA-Leser gegen die Reagenz-Leerprobe nullen.

Schritt 7 **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 8 **4x** mit dem Waschpuffer waschen. Um manuell zu waschen, füllen Sie jede Mikrovertiefung mit dem wiederhergestellten Waschpuffer. Die Flüssigkeit durch Umkehren und Ausklopfen des Inhalts jeder Vertiefung oder durch Ansaugen der Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entsorgen. Die Streifen umkehren und die Vertiefungen kräftig auf saugfähigen Papierhandtüchern ausklopfen, um am Ende des letzten Waschens zu blotten. Bei einer automatischen Wascheinrichtung programmieren Sie diese gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Schritt 9 Mit der Pipette **100 µl** des Konjugats in die Mikrovertiefungen geben.

Schritt 10 **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 11 Alle Mikrovertiefungen wie in Schritt 8 waschen.

Schritt 12 Mit der Pipette **100 µl** des Enzymsubstrats in jede Mikrovertiefung in der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für das Konjugat zugeben.

Schritt 13 **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 14 Mit der Pipette **100 µl** der Stopp-Lösung in jede Mikrovertiefung unter Verwendung der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für die Zugabe des Enzymsubstrats zugeben. Die Absorptionswerte innerhalb von **30 Minuten** nach Hinzufügen der Stopp-Lösung ablesen.

Schritt 15 Die Absorption jeder Mikrovertiefung bei **450 nm** unter Verwendung eines Ein- oder bei 450/630nm unter Verwendung eines Zweiwellenlängen-Mikroplattenlesers gegen die auf Null-Absorption gesetzte Reagenz-Leerprobe ablesen.

Qualitätskontrolle

Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und eine Reagenz-Leerprobe müssen mit jeder Prüfung eingesetzt werden, um die Vollständigkeit und Genauigkeit des Tests zu verifizieren. Die Absorptionsanzeige der Reagenz-Leerprobe sollte $<0,3$ sein. Der Kalibrator A sollte eine Absorptionsanzeige von nicht weniger als 1,0 haben, andernfalls muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss <10 EU/ml sein. Wenn der Test als zweifache Ausführung durchgeführt wird, sollte der Mittelwert der zwei Messdaten aufgenommen werden, um EU/ml zu bestimmen. Beim Durchführen von Qualitativen Bestimmungen muss die optische Dichte von Kalibrator D größer sein als die der Negativkontrolle und kleiner als die Absorption der Positivkontrolle. Für semiquantitative Bestimmungen muss die Positivkontrolle Werte im auf der Phiole angegebenen Bereich ergeben.

RESULTATE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können durch zwei Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Abs. des Prüfmusters

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

Abs. von Kalibrator D

Es wird empfohlen, dass qualitative Resultate als "positiv" oder "negativ" berichtet werden. Probenresultate größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv angesehen.

2. SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG

Die Absorption von Kalibrator A bis E gegen ihre jeweiligen Konzentrationen auf dem linear-logarithmischen Millimeterpapier aufnehmen. Die Konzentrationen in EU/ml auf der X-Achse gegenüber der Absorption auf der Y-Achse aufnehmen und eine Punkt-Zu-Punkt-Kurvenanpassung zeichnen. Die Konzentrationen der Patientenproben von der Kurve gemäß den entsprechenden Absorptionswerten bestimmen. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve verwendet werden, um die Standardkurve aufzunehmen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als "positiv", "negativ", oder "unbestimmt" mit EU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenz-Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden bewertet werden.

Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen von 64 normalen Blutspendern bestimmt. Der Cutoff wurde unter Verwendung des Mittelwerts der normalen Probanden plus 2 SD bestimmt und einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugeordnet. IMMCO empfiehlt den Gebrauch des nachstehenden

DE

Referenzbereichs. Jedes Labor sollte Prüfungswerte für seine eigenen Bedingungen validieren.

PM/Scl Ab Wert	Ausdeutung
<20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	Unbestimmt (Grenzlinie)
> 25 EU/ml	Positiv

Kalibrator

Die einsatzbereiten Kalibratoren sind enthalten, um Semiquantifizierung zu ermöglichen, und müssen mit jedem Durchgang verwendet werden. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Absorptionswerte ergeben als die von Kalibrator A. Um genaue semiquantitative Werte festzulegen, sollte man solche Proben weiter verdünnen, damit sie sich innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve befinden, wenn erneut getestet wird. Um EU/ml-Werte zu bestimmen, multiplizieren Sie die durch den Verdünnungsfaktor erhaltenen Einheiten.

BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS

Die Prüfung sollte nicht bei äußerst hämolisierten, mikrobisch verunreinigten oder lipämischen Proben ausgeführt werden. Diese Methode sollte nur zur Prüfung von Humanserum-Proben verwendet werden. Die erhaltenen Resultate dienen nur als eine Hilfe bei der Diagnose. Für sich alleine genommen, sollten diese Resultate nicht als diagnostisch interpretiert werden. Diese Prüfung wurde nicht an einer pädiatrischen Population validiert.

Proben positiv für Antiphospholipid-Antikörper (APL) kreuzreagieren potenziell mit dem PM/Scl-Antigen. Es wird empfohlen, dass zusätzliche Laborprüfungen von positiven Proben Prüfungen für APL einschließen.

ERWARTETE WERTE

Bei einer normalen Population sind die Testresultate gewöhnlich als negativ zu erwarten. Bei positiven Resultaten können zusätzliche Tests gerechtfertigt sein, um die Serum-Antikörperbefunde zu erhärten.

Inzidenz von PM/Scl-Antikörpern⁴

Krankheitsgruppe	n	n Positiv	Positiv %
PM/Scl-Gruppe			
Polymyositis/Sklerodermie	40	22	55
Polymyositis	40	3	7,5
Sklerodermie	205	27	13
Krankheitskontrollen			
Rheumatoidarthritis	69	0	0

DE

Systemischer Lupus erythematodes	114	3	2,5
Rheumatische Krankheitsbekämpf,	452	33	7

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Nützlichkeit des Immulisa™ PM/Scl ELISA für die Erfassung von Autoantikörpern wurde durch Prüfen nukleolärer positiver und negativer Serumproben von vermuteten Bindegewebserkrankungsprobanden sowie Krankheitsbekämpfungen und "normalen" Humansenen bewertet. Diese Proben wurden auch bei einem anderen ELISA-Prüf-Kit für die Erfassung von PM/Scl-Antikörpern geprüft. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

A. Immulisa™ PM/Scl ELISA gegenüber anderem PM/Scl-Antikörper-Kit:

Andere PM/Scl ELISA

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	20	6	26
PM/SCL	Negativ	3	56	59
ELISA	Gesamt	23	62	85

Positive Prozent-Übereinstimmung: 87,0 %

Negative Prozent-Übereinstimmung: 90,3 %

Gesamte Prozent-Übereinstimmung: 89,4 %

B. Kreuzreaktivität: Insgesamt 80 potenziell kreuzreaktive Proben von Personen mit anderen Autoimmunerkrankungen oder positiv für andere Autoantikörper wurden auf PM/Scl-Antikörper unter Verwendung von Immulisa™ PM/Scl ELISA geprüft.

Zustand	n	Positiv
ENA positiv *	48	5
Zöliakie	8	2
Autoimmune Vasculitis	8	0
Hashimoto Erkrankung	8	1
Gesamt	72	8 (11%)

* Antikörper zu Extrahierbaren Kernantigenen

Präzision

Die Präzision wurde mit 6 aus dem gesamten Bereich der Prüfung ausgewählten positiven Proben geprüft. Prüfungsabläufe von 3 Replikaten jeder Probe wurden in 3 Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 6 Replikaten jeder Probe bestimmt.

S #	Mittelwert EU/ml	Gesamtungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
		SD EU/ml	CV %	SD EU/ml	CV %	SD EU/ml	CV %
1	14	1,01	7,0%	1,03	7,2%	1,40	9,6%
2	29	1,20	4,1%	1,28	4,4%	0,91	3,2%

DE

3	58	2,45	4,2%	3,36	5,8%	0,84	1,4%
4	116	7,30	6,3%	9,07	7,7%	0,19	0,2%
5	231	19,29	8,4%	26,07	11,1%	2,02	0,9%

Linearität

Mehre Prüfungsabläufe wurden unter Verwendung von verdoppelten Verdünnungen von Proben überall im linearen Bereich der Prüfung durchgeführt. Der durchschnittliche r^2 -Wert war 0,992 für diese Durchgänge ohne einen Durchgang niedriger als 0,985. Prüfungsabläufe werden als annehmbar erachtet, wenn r^2 0,95 überschreitet.

Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten PM/ScI-Antikörperspiegeln mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Es wurde keine bedeutende Interferenz für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 μ mol/L) und Rheumafaktor (100 EU/ml).

**ImmuLisa™**

PM/Scl Anticorps ELISA

IVD

ENCART PRODUIT

REF 5101 PM/Scl Anticorps ELISA 96 Déterminations

UTILISATION VISEE

L'immunoanalyse par liaison enzymique (ELISA) pour la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps IgG à l'antigène nucléolaire PM/Scl dans le sérum humain en tant qu'outil d'aide au diagnostic de la polymyosite, de la sclérodermie ou d'un chevauchement de la polymyosite et de la sclérodermie en conjonction avec d'autres résultats de laboratoire et cliniques.

RESUME ET EXPLICATION

Les anticorps anti-nucléaires (AAN) sont un trait caractéristique des patients atteints de désordres du tissu conjonctif (DTC) tel que le lupus érythémateux disséminé (LED), la sclérodermie (Scl), la polymyosite (PM), la dermatomyosite (DM) ou le chevauchement PM/Scl. Les AANs sont visualisés par différents modèles de réaction en utilisant des méthodes d'immunofluorescence indirectes. Par celles-ci, les plus répandues sont les modèles homogènes, tachetés, centromères et nucléolaires. Chaque modèle de réaction représente des anticorps associés avec un ou des antigène(s) particuliers et ainsi à une maladie ou à un sous-ensemble de la maladie. Par exemple, la réaction centromère est associée à un sous-ensemble de la sclérodermie. De la même façon, la nucléolaire est associée avec la sclérodermie, la polymyosite, la dermatomyosite et aux chevauchements de ces conditions. Il existe trois types de réactions dans le modèle de réaction nucléolaire : homogène, tacheté significativement ou une masse compacte. Chaque modèle de réaction représente des anticorps d'une spécificité particulière. Le modèle de réaction homogène nucléolaire est associé avec les anticorps au PM/Scl. Le complexe PM/Scl, aussi appelé communément l'exosome humain, est formé d'un complexe de neuf protéines et de quelques autres protéines qui s'associent à ce complexe. Le cœur du complexe est plus abondant que la nucléole¹⁻⁴. Ce complexe est impliqué dans le traitement des ARN ribosomiques et annonce la dégradation des ARN. Les anticorps au complexe PM/Scl se trouvent chez environ 30% des patients avec un chevauchement PM/Scl, 8% des patients avec la PM, 11% des patients avec la DM et 2% des patients atteints de sclérodermie.

La polymyosite est un sous-ensemble des myopathies idiopathiques inflammatoires (MII) qui sont caractérisés par une faiblesse musculaire et une inflammation des muscles squelettiques. Parmi les autres sous-ensembles des

FR

myopathies idiopathiques inflammatoires nous trouvons la dermatomyosite et la myosite corporelle incluse. La MII est un désordre rare avec une incidence signalée de 0,5-1 pour 100 000. La PM et la DM ont lieu soit durant l'enfance soit entre 30 et 50 ans avec une prépondérance féminine (F M 2,5 :1). Comme beaucoup d'autre maladies auto-immunes, la polymyosite à un lien génétique et elle est liée à la DRB1.

Les auto-anticorps sont importants dans le diagnostic et la compréhension des myopathies inflammatoires. Les anticorps au PM/Scl sont associés avec le chevauchement PM/Scl et jusqu'à un certain point avec les patients atteints de PM, de DM ou de Scl et rarement chez ceux ayant le LED.

Les anticorps au PM/Scl peuvent être détectés par le biais d'une immunofluorescence indirecte sur les cellules Hep-2 avec un modèle de réaction spécifique, par immunodiffusion en utilisant un extrait de thymus de lapin, par immunoprécipitation et par ELISA. Les antigènes auxquels les anticorps PM/Scl réagissent sont au PM/Scl-75, l'un des neuf protéines du cœur de complexe de l'exosome humain, ainsi qu'à une protéine associée, la PM/Scl-100. Récemment, un épitope spécifique auquel les anticorps PM/Scl réagissent a été identifié. L'utilisation du peptide à la place de la molécule entière peut procurer des niveaux de sensibilité et de spécificité supérieurs par rapport à des molécules entières à cause de la réactivité croisée, de l'exposition à l'épitope antigénique et de la densité de l'épitope. Cette analyse tire bénéfice de ces résultats et incorpore une molécule antigène adaptée qui représente la meilleure discrimination pour la détection des anticorps au PM/Scl.

PRINCIPE DE LA PROCEDURE

Le test est réalisé en tant qu'immunoanalyse par liaison enzymatique (ELISA). Les micro-réipients individuels sont couverts d'antigène PM/Scl suivi d'une mesure de blocage des emplacements inaltérés afin de réduire les liaisons non-spécifiques. Les contrôles, les calibreurs et les échantillons de sérum patient sont incubés dans les récipients couverts d'antigènes pour permettre à des anticorps spécifiques présents dans le sérum de se relier à l'antigène. Les anticorps non-reliés et les autres protéines de sérum sont enlevés en lavant les micro-réipients. Le conjugué IgG anti-humain marqué HRP est ajouté à chaque récipient. Le conjugué non-relié est enlevé par lavage. Un substrat d'enzyme spécifique (TMB) est alors ajouté aux récipients et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur qui est généré par la conversion du substrat TMB en un produit à réaction coloré. La réaction est arrêté est l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnel à la concentration d'anticorps, est mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont donnés en ELISA Units par millilitre (EI/ml) et signalés comme positifs ou négatifs.

LES REACTIFS

Stockage et préparation

Stockez tous les réactifs entre 2 et 8°C. **A ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont stockés et manipulés comme indiqué.

FR

A 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 utilisation.

Réhydratez le tampon à eau jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Lorsque stocké entre 2 et 8°C, le tampon à eau réhydraté est stable jusqu'à la date d'expiration du kit.

Les lamelles enduites des micro-réceptacles sont pour un usage unique. Les lamelles de micro-réceptacles non utilisées doivent être réapposés avec précaution dans le sachet contenant les déshydratants pour empêcher une condensation et stockés entre 2 et 8°C.

Précautions

Tous les composants de dérivée humaine utilisés ont été testés pour le HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et le HTLV-1 et les résultats ont été négatifs en accord avec les tests obligatoires de la FDA. Cependant, les dérivés de sang humain et les spécimens patient doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Suivez de bonnes pratiques de laboratoire pour le stockage, la délivrance et l'écoulement de ces matériaux⁵.

Les instructions doivent être suivies exactement telles qu'elles apparaissent dans cet encart d'utilisation afin d'assurer des résultats valides. N'échangez pas les composants de l'encart avec ceux d'autres sources. Suivez de bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs lors de la manipulation. N'utilisez pas les composants de l'encart après la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Les matériaux fournis

ImmuLISA™ PM/Scl Anticorps ELISA

REF 5101

Le kit contient assez de réactifs pour réaliser 96 déterminations

12 x 8 **MICROPLATE**PM/SCL

Microplaque avec des micro-réceptacles individuels séparés. Couverte avec de l'antigène PM/Scl. Prête à l'emploi.

1 x 1.75 ml **CONTROL**+PM/SCL

Contrôle positif (capsule rouge) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain positif aux anticorps PM/Scl. L'éventail de concentration espéré en EU/ml est imprimé sur l'étiquette.

1 x 1.75 ml **CONTROL**-

Contrôle négatif (capsule blanche) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain.

5 x 1.75 ml **CALIBRATOR**A|PM/SCL

CALIBRATORB|PM/SCL

CALIBRATORC|PM/SCL

CALIBRATORD|PM/SCL

CALIBRATORE|PM/SCL

Série de **5 Calibreurs** prêts à l'emploi. Calibreur A (capsule verte) 320 EU/ml, Calibreur B (capsule violette) 80 EU/ml, Calibreur C (capsule bleu) 40 EU/ml, Calibreur D (capsule jaune) 20 EU/ml et Calibreur E (capsule orange) 1 EU/ml. Dérivés de sérum humain contenant des anticorps PM/Scl. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.

1 x 15 ml **IgG**-CONJ|HRP

Conjugué IgG d'HRP goat antihumain. Prêt à l'emploi. Code couleur rose.

1 x 60 ml **DIL**

Diluant sérum. Prêt à l'emploi. Code couleur bleu.

1 x 15 ml **SUBSTRATE**TMB

Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi. **A**

FR

1 x 15 ml

STOP|H₂SO₄

protéger de la lumière.

Solution stop. Prête à l'emploi.

2 x

BUF|WASH

Tampon de lavage en poudre. **Réhydratez jusqu'à un litre chacun.**

1 x

Feuilles de protocole

Composants optionnels

1 x 60ml

BUF|WASH

Tampon de lavage en liquide concentré. **Réhydratez jusqu'à un litre.**

Symboles utilisés sur les étiquettes

LOT

Numéro de Lot

REF

Numéro catalogue

IVD

Utilisation à diagnostic in vitro



A utiliser avant le:



Température de stockage



Lire les instructions avant utilisation



Nombre de tests



Fabricant

Matériaux nécessaires mais non fournis

- Eau déminéralisée ou distillée
- Bouteille comprimée pour tenir le tampon de lavage
- Pipettes capables de distribuer de 5 µl à 1000 µl
- Embouts de pipettes jetables
- Des tubes test 12 x 75 mm propres et un casier pour tubes test
- Un compte-minutes
- Des serviettes en papier absorbantes
- Un lecteur de microplaques capable de lire des valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaques à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm
- Un laveur de microplaques automatique capable de distribuer 200 µl

COLLECTE ET MANIUPULATION DES SPECIMENS

Seuls les spécimens de sérum doivent être utilisés lors de cette procédure. Des spécimens largement contaminés d'hématolizes, de lipémiques et de microbes peuvent interférer avec la réalisation du test et ne doivent pas être utilisés. Stockez les spécimens entre 2° et 8°C pour une période n'excédant pas une semaine. Pour un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être congelés. Evitez la congélation répétée et le dégel des échantillons. Il est recommandé de tester les spécimens congelés dans un délai d'un an.

PROCEDURE

Notes concernant la procédure

- Lire avec attention l'encart du produit avant de commencer l'analyse.
- Toutes les dilutions avec les échantillons patient doivent être préparées avant le début de l'analyse.
- Laissez les spécimens patient et les réactifs test s'équilibrer à la température ambiante avant de commencer avec la procédure test. Il est suggéré de laisser les réactifs sur la banquette en dehors de la boîte pendant 30 minutes avant utilisation. Remplacez tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur immédiatement après utilisation.
- Enlevez les lamelles obligatoires des micro-récipients du sachet et recollez avec précaution le sachet pour éviter la condensation des récipients non utilisés. Reposez le sachet dans le réfrigérateur immédiatement.
- **Une bonne technique de lavage est cruciale.** Si le lavage est effectué manuellement, un lavage adéquat est réalisé en dirigeant un flot fort de tampon de lavage accompagné d'une bouteille de lavage avec un embout large sur l'intégralité de la microplaque. **Une laveuse automatique de microplaques est recommandée.**
- Utilisez une pipette multicanaux capable de distribuer 8 à 12 récipients en même temps. Cela accélère le processus et génère des temps d'incubation plus uniformes.
- Pour toutes les étapes, un contrôle minutieux du minutage est important. Le début de toute période d'incubation commence avec la réalisation de l'addition de réactif.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit être réalisée au même rythme et dans le même ordre.

Méthode de test

Etape 1 Laissez tous les réactifs et tous les spécimens s'adapter à la température ambiante.

Etape 2 Etiquetez les feuilles de protocole pour indiquer l'emplacement des échantillons dans les récipients. Une bonne pratique de laboratoire est de réaliser les échantillons en double.

Etape 3 Pour une **détermination qualitative** utilisez uniquement le Calibreur D (fiolle avec la capsule jaune).

ou

Pour une **détermination semi-quantitative** utilisez les Calibreurs A jusqu'à E tels que représentés dans la présentation échantillon ci-dessous.

Qualitative

A	Vierge	S5	Etc.
B	-Contrôle	S6	
C	+ Contrôle	S7	
D	Cal D	S8	

Semi-quantitative

A	Vierge	S1	Etc.
B	-Contrôle	S2	
C	+ Contrôle	S3	
D	Cal A	S4	

FR

E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

- Etape 4** Préparez une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec 500ul de diluant sérum.
- Etape 5** Enlevez les micro-récipients requis du sachet et replacez les lamelles non utilisées dans le sachet refermé dans le réfrigérateur. Placez fermement les micro-récipients dans le support supplémentaire fournis.
- Etape 6** Pipetez **100 µl** de calibreurs prêts à l'emploi, de contrôles positifs et négatifs et d'échantillons patient dilués (**1:101**) aux micro-récipients appropriés selon la feuille de protocole.
- A noter :** inclure un récipient contenant **100 µl** de sérum diluant en tant que réactif vierge. Mettez sur zéro le lecteur ELISA contre le réactif vierge.
- Etape 7** Incubez **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 8** Laver **4x** avec le tampon à lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micro-récipient avec du tampon à lavage reconstitué. Débarrassez-vous du fluide en inversant et en tapotant le contenu de chaque récipient ou bien en aspirant le liquide de chaque récipient. Afin de buvarder à la fin du dernier lavage, inversez les lamelles et tapotez vigoureusement les récipients sur des serviettes de papier absorbantes. Pour les laveuses automatiques, programmez la laveuse selon les instructions du fabricant.
- Etape 9** Pipetez **100 µl** de conjugué dans les micro-récipients.
- Etape 10** Incubez **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Lavez tous les micro-récipients comme lors de l'étape 8.
- Etape 12** Pipetez **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque micro-récipient dans le même ordre et selon le même minutage que pour le conjugué.
- Etape 13** Incubez **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipetez **100 µl** de solution stop dans chaque micro-récipient en utilisant le même ordre et le même minutage que pour l'addition de substrat d'enzyme. Lisez les valeurs d'absorbance dans un délai de **30 minutes** à partir du moment où la solution stop a été ajoutée.
- Etape 15** Lisez l'absorbance de chaque micro-récipient pour **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaque simple ou à double longueur d'onde pour 450/630nm contre le réactif vierge placé sur zéro absorbance.

Contrôle qualité

Les calibreurs, les contrôles positif et négatif et un réactif vierge doivent être utilisé pour chaque analyse afin de vérifier l'intégrité et la précision du test. La lecture d'absorbance du réactif vierge doit être $<0,3$. Le Calibreur A doit avoir une lecture d'absorbance supérieur ou égale à 1,0 sinon le test devra être répété. Le contrôle négatif doit être <10 EU/ml. Si le test est lancé en double, la

FR

moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer EU/ml. Lors de la réalisation de déterminations qualitatives, la densité optique du Calibreur D doit être supérieure à celle du contrôle négatif et inférieure à l'absorbance du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs comprises dans l'éventail mentionné sur la fiole.

RESULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons patient peuvent être déterminées par l'une des deux méthodes suivantes :

1. DÉTERMINATION QUALITATIVE

Abs. Echantillon test

----- X EU/ml du Calibreur D = EU/ml Echantillon test

Abs. du Calibreur D

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux au Calibreur D sont considérés comme positifs.

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Relevez l'absorbance du Calibreur A jusqu'au Calibreur E par rapport à leurs concentrations respectives sur un papier graphique à logarithme linéaire. Relevez les concentrations en EU/ml sur la base X par rapport à l'absorbance sur la base Y et tracez une courbe point par point. Déterminez les concentrations des échantillons patient en se basant sur la courbe en accord avec les valeurs d'absorbance correspondantes. Alternativement, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer la courbe standard.

Il est recommandé que les résultats semi-quantitatifs soient signalés comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec les valeurs unitaires EU/ml. Les résultats indéterminés/limite doivent être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire.

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 64 donneurs de sang normaux. La limite supérieure a été déterminée en utilisant la moyenne des sujets normaux plus 2 SD et une valeur arbitraire de 20 EU/ml lui a été fixée. L'IMMCO suggère l'utilisation de l'éventail de référence ci-dessous. Chaque laboratoire devrait valider les valeurs d'analyse pour leurs propres conditions.

Valeur anti-Jo-1 Ab	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (Limite)
>25 EU/ml	Positif

Calibreurs

Les calibreurs prêts-à-l'emploi sont fournis pour permettre la semi-quantification et doivent être utilisés avec chaque exécution. Les échantillons patient contenant des niveaux d'anticorps élevés peuvent donner des valeurs d'absorbances supérieures à celles du Calibreur A. Afin de déterminer des valeurs semi-quantitatives exactes, de tels spécimens doivent être dilués encore plus afin de rentrer dans l'éventail de la courbe du calibreur lorsqu'ils seront testés de nouveau. Pour déterminer les valeurs EU/ml, multipliez les unités obtenues par le facteur de dilution.

LIMITES DE LA PROCEDURE

L'analyse ne doit pas être menée sur des échantillons largement hémolysés, contaminés de microbes ou lipémiques. Cette méthode ne doit être utilisée que sur des échantillons de sérum humain. Les résultats obtenus ne servent que d'aide au diagnostic. Pris de manière indépendante, les résultats ne doivent pas être interprétés comme un diagnostic. L'analyse n'a pas été validée auprès d'une population pédiatrique.

Les spécimens positifs aux anticorps antiphospholipides (APL) peuvent potentiellement réagir de manière croisée avec l'antigène PM/Scl. Il est recommandé que l'analyse additionnelle des échantillons positifs prenne en compte des analyses à la recherche d'APL.

VALEURS ATTENDUES

Les résultats auprès d'une population normale devraient normalement être négatifs. Si les résultats sont positifs, une analyse additionnelle peut être justifiée afin de corroborer les résultats concernant les anticorps présents dans le sérum.

Incidence des Anticorps PM/Scl⁴

Groupe maladie	n	n positif	% Positifs
Groupe PM/Scl			
Polmyosite/Sclérodémie	40	22	55
Polymyosite	40	3	7,5
Sclérodémie	205	27	13
Contrôles maladie :			
Arthrite rhumatoïde	69	0	0
Lupus érythémateux disséminé	114	3	2,5
Contrôles maladies rhumatismales	452	33	7

CHARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE

L'utilité d'ImmuLisa™ PM/Scl ELISA pour la détection des auto-anticorps a été évaluée en testant des sérums spécimens nucléolaires positifs et négatifs à partir de sujets susceptibles d'être atteints de désordres du tissu conjonctif, ainsi que des contrôles maladie et du sérum humain « normal ». Ces spécimens ont également été testés avec un autre kit test ELISA pour la détection des anticorps PM/Scl. Les résultats sont résumés ci-dessous.

A. Immulisa™ PM/Scl ELISA contre d'autres kits PM/Scl Anticorps:

		Autre PM/Scl ELISA		
IMMCO PM/SCL ELISA		Positif	Négatif	Total
	Positif	20	6	26
	Négatif	3	56	59
	Total	23	62	85
Concordance en pourcentage cas positifs		87,0%		
Concordance en pourcentage cas négatifs		90,3%		
Concordance en pourcentage totale		89,4%		

B. Réactivité croisée Un total de 80 spécimens potentiellement à réactivité-croisée provenant d'individus avec d'autres désordres auto-immunitaires ou positifs à d'autres auto-anticorps ont été testés à la recherche d'anticorps PM/Scl en utilisant l'Immulisa™ PM/Scl Anticorps ELISA.

Condition	n	Positif
ENA positif*	48	5
Maladie coéliquie	8	2
Angéite auto-immune	8	0
Thyroidite d'Hashimoto	8	1
Total	72	8 (11%)

* Anticorps aux Antigènes Nucléaires Solubles

Précision

La précision a été testée avec des spécimens positifs sélectionnés à travers l'échantillon utilisé pour l'analyse. Des exécutions d'analyses ont été conduites sur 3 mesures de chaque spécimen pendant 3 jours. La fidélité a été déterminée avec 6 mesures de chaque spécimen.

S #	Moyenne (EU/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		Au cours de l'exécution Fidélité	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	14	1,01	7,0%	1,03	7,2%	1,40	9,6%
2	29	1,20	4,1%	1,28	4,4%	0,91	3,2%
3	58	2,45	4,2%	3,36	5,8%	0,84	1,4%
4	116	7,30	6,3%	9,07	7,7%	0,19	0,2%
5	231	19,29	8,4%	26,07	11,1%	2,02	0,9%

Linéarité

FR

Des exécutions d'analyse multiples ont été réalisées en utilisant des dilutions doublés d'échantillons au travers de l'éventail linéaire de l'analyse. La valeur r^2 moyenne était de 0,992 pour ces exécutions avec aucune exécution en dessous de 0,985. Les exécutions d'analyse sont considérées comme acceptables si r^2 est supérieur à 0,95.

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant du sérum avec des niveaux d'anticorps PM/Scl connus avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative n'a été démontré pour les substances suivante aux niveaux indiqués : Hemoglobine (2 g/L), Bilirubine (342 $\mu\text{mol/L}$), et facteur rhumatoïde (100 EU/ml).

**ImmuLisa™**

PM/Scl Antibody ELISA

IVD

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF 5101 PM/Scl Antibody ELISA 96 determinazioni

USO PREVISTO

Dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per la determinazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi IgG diretti contro l'antigene nucleolare della PM/Scl nel siero umano, come ausilio nella diagnosi di polimiosite, scleroderma o sovrapposizione polimiosite/scleroderma, in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Gli anticorpi antinucleari (ANA) sono un tratto caratteristico nel siero dei pazienti con disturbi del tessuto connettivo (DTC) come ad esempio lupus eritematoso sistemico (LES), scleroderma (Scl), polimiosite (PM), dermatomiosite e sovrapposizione PM/Scl. Gli ANA vengono visualizzati in base a vari schemi di reazione utilizzando metodi di immunofluorescenza indiretta. Fra questi, i più comuni includono gli schemi omogeneo, punteggiato, centromerico e nucleolare. Ogni schema di reazione rappresenta gli anticorpi associati con un particolare antigene, quindi una malattia o un sottoinsieme di malattie. Per esempio, la reazione centromerica è associata con il sottoinsieme dello scleroderma. Analogamente, lo schema nucleolare è associato con lo scleroderma, la polimiosite, la dermatomiosite e la sovrapposizione di queste condizioni. Gli schemi di reazione nucleolare sono di tre tipi: omogenei, punteggiati grossolani o a grappolo. Ogni schema di reazione rappresenta anticorpi di una particolare specificità. Lo schema di reazione nucleolare omogeneo è associato agli anticorpi anti-PM/Scl. Il complesso PM/Scl, chiamato anche comunemente esosoma umano, è costituito da un insieme di nove proteine e alcune altre proteine associate a tale insieme. Questo complesso core presenta la massima abbondanza nel nucleolo¹⁻⁴ ed è coinvolto nell'elaborazione dell'RNA ribosomale e nella degradazione dell'RNA messaggero. Anticorpi anti-complesso PM/Scl sono presenti in circa il 30% dei pazienti con sovrapposizione PM/Scl, l'8% dei pazienti con PM, l'11% dei pazienti con dermatomiosite e il 2% dei pazienti con scleroderma.

La polimiosite è un sottoinsieme di miopatie infiammatorie idiopatiche (MII) caratterizzate da debolezza muscolare cronica e infiammazione dei muscoli scheletrici. Altri sottoinsiemi della miopatia infiammatoria idiopatica sono la dermatomiosite e la miosite da corpi inclusi. La MII è un disturbo raro con

IT

incidenza documentata di 0,5-1 casi su 100 000. PM e dermatomiosite compaiono nell'infanzia o all'età di 30-50 anni, con una prevalenza per la femmina (F:M, 2,5:1). Analogamente a molte altre malattie autoimmuni, la polimiosite ha un collegamento genetico ed è correlata a DRB1.

Gli autoanticorpi sono importanti nella diagnosi e nella comprensione delle miopatie infiammatorie. Gli anticorpi anti-PM/Scl sono associati alla sovrapposizione PM/Scl e, in parte, ai pazienti con PM, dermatomiosite o Scl; raramente al LES.

Gli anticorpi anti-PM/Scl possono essere rilevati mediante immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2 con uno specifico schema di reazione, per immunodiffusione utilizzando estratto timico di coniglio, mediante immunoprecipitazione ed ELISA. Gli antigeni con cui reagiscono gli anticorpi anti-PM/Scl sono PM/Scl-75, una delle nove proteine core del complesso dell'esosoma umano, oltre a una proteina associata, PM/Scl-100. Recentemente, è stato identificato un epitopo specifico con cui reagiscono gli anticorpi anti-PM/Scl. L'uso di un peptide piuttosto che dell'intera molecola può fornire livelli maggiori di sensibilità e specificità rispetto alle molecole complete, a causa della reattività crociata, dell'esposizione dell'epitopo antigenico e della densità dell'epitopo. Questo dosaggio trae vantaggio da questi risultati e include una molecola antigenica idonea che presenta la discriminazione migliore nel rilevamento degli anticorpi anti-PM/Scl.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test viene eseguito come dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) in fase solida. Singoli micropozzetti sono rivestiti con l'antigene PM/Scl cui segue il blocco dei siti che non hanno reagito per ridurre il legame non specifico. Controllo, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene. L'anticorpo non legato e le altre proteine seriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. A ogni micropozzetto viene quindi aggiunto un coniugato anti-IgG umane marcato con HRP. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto ai pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e viene rilevata la presenza degli anticorpi tramite una variazione di colore prodotta dalla conversione del substrato TMB in un prodotto di reazione colorato. La reazione viene arrestata e l'intensità della variazione di colore, che è proporzionale alla concentrazione anticorpale, viene letta con uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA per millilitro (UE/ml) e refertati come positivi o negativi.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

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

IT

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Le strisce di micropozzetti rivestiti sono monouso. Le strisce di micropozzetti non utilizzate devono essere risigillate accuratamente in buste contenenti essiccanti per impedire la formazione di condensa e conservati a 2-8 °C.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I, risultando negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.⁵

Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

Materiali forniti

ImmuLISA™ PM/Scl Antibody ELISA

[REF] 5101

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

12 x 8 **[MICROPLATE|PM/SCL]**

Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene PM/Scl. Pronta per l'uso.

1 x 1.75 ml **[CONTROL+|PM/SCL]**

Controllo positivo (tappo rosso), pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi anti-PM/Scl. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.

1 x 1.75 ml **[CONTROL-]**

Controllo negativo (tappo bianco), pronto per l'uso. Contiene siero umano.

5 x 1.75 ml **[CALIBRATOR|A|PM/SCL]**

[CALIBRATOR|B|PM/SCL]

[CALIBRATOR|C|PM/SCL]

[CALIBRATOR|D|PM/SCL]

[CALIBRATOR|E|PM/SCL]

Serie di 5 **calibratori** pronti per l'uso. Calibratore A (tappo verde) 160 UE/ml, calibratore B (tappo viola) 80 UE/ml, calibratore C (tappo blu) 40 UE/ml, calibratore D (tappo giallo) 20 UE/ml, e calibratore E (tappo arancione) 1 UE/ml. Derivati da siero umano contenente anticorpi anti-PM/Scl. Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.

1 x 15 ml **[IgG-CONJ|HRP]**

Coniugato HRP di montone anti-**IgG** umane. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.

1 x 60 ml **[DIL]**

Diluente per siero. Pronto per l'uso. Colore codificato porpora.

1 x 15 ml **[SUBSTRATE|TMB]**

Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. **Proteggere dalla luce.**

1 x 15 ml **[STOP|H2SO4]**

Soluzione di arresto. Pronta per l'uso.

IT

2 x

BUF|WASH

Tampone di lavaggio in polvere. **Ricostituire a un litro ciascuno.**

1 x

Schede del protocollo

Componenti facoltativi

1 x 60 ml

BUF|WASH

Tampone di lavaggio concentrato liquido. **Ricostituire a un litro.**

Simboli utilizzati sulle etichette

LOT

Codice del lotto

REF

Numero di catalogo

IVD

Per uso diagnostico *in vitro*



Utilizzare entro



Temperatura di conservazione



Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso



Numero di test



Fabbricante

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua deionizzata o distillata.
- Boccetta comprimibile per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di erogazione da 5 µl a 1000 µl.
- Puntali monouso per pipette.
- Provette pulite 12 x 75 mm e rastrelliera per provette.
- Contaminuti.
- Salviette di carta assorbente.
- Lettore per micropiastre capace di leggere valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 µl.

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno.

PROCEDURA

Note sulla procedura

IT

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Tutte le diluizioni dei campioni del paziente vanno preparate prima di iniziare il dosaggio.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del paziente e i reagenti del test raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente. Prima dell'uso, si consiglia di lasciare i reagenti sul piano di lavoro e fuori dalla scatola per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso, rimettere nel frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Rimuovere le strisce di micropozzetti necessarie dalla busta e risigillare accuratamente quest'ultima per evitare la formazione di condensa nei pozzetti non utilizzati. Rimettere immediatamente la busta nel frigorifero.
- ***È fondamentale una tecnica di lavaggio valida.*** Se il lavaggio viene effettuato manualmente, è adeguato se viene eseguito dirigendo un energico getto di tampone di lavaggio con una boccetta di lavaggio a bocca larga sull'intera micropiastra. ***Si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica per micropiastre.***
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di riempire 8 o 12 pozzetti allo stesso tempo. Questo strumento accelera il lavoro e fornisce tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutti i passaggi è importante controllare accuratamente i tempi. L'inizio di tutti i periodi di incubazione corrisponde al completamento dell'aggiunta del reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e dei reagenti deve avvenire alla stessa velocità e con la stessa sequenza.

Metodo del test

Passaggio 1 Lasciar equilibrare a temperatura ambiente tutti i reagenti e i campioni.

Passaggio 2 Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede di analizzare i campioni in duplicato.

Passaggio 3 Per una **determinazione qualitativa** utilizzare unicamente il calibratore D (*flaconcino con tappo giallo*).

oppure

Per una **determinazione semiquantitativa** utilizzare i calibratori da A fino a E come illustrato nel seguente schema esemplificativo.

Qualitativa				Semiquantitativa			
A	Bianco	S5	Ecc.	A	Bianco	S1	Ecc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Passaggio 4 Preparare una diluizione **1:101** dei campioni del paziente miscelando **5 µl** dei sieri del paziente con **500 µl** di diluente per siero.

Passaggio 5 Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere in frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.

Passaggio 6 Pipettare **100 µl** di calibratori pronti all'uso, controllo positivo, controllo negativo e campioni diluiti del paziente (**1:101**) nei micropozzetti appropriati in base alla scheda del protocollo.

Nota: includere un pozzetto contenente **100 µl** del diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.

Passaggio 7 Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.

Passaggio 8 Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti capovolgendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per asciugare al termine dell'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su salviette di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del produttore.

Passaggio 9 Pipettare **100 µl** di coniugato nei micropozzetti.

Passaggio 10 Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.

Passaggio 11 Lavare tutti i micropozzetti come al Passaggio 8.

Passaggio 12 Pipettare **100 µl** di substrato enzimatico in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per il coniugato.

Passaggio 13 Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.

IT

Passaggio 14 Pipettare **100 µl** di soluzione di arresto in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere valori di assorbanza entro **30 minuti** dell'aggiunta della soluzione di arresto.

Passaggio 15 Leggere l'assorbanza di ogni micropozzetto a **450 nm** utilizzando un lettore per micropiastre a lunghezza d'onda singola (450/630 nm se si utilizza un lettore a lunghezza d'onda doppia), contro il reagente bianco impostato ad assorbanza zero.

Controllo di qualità

Inserire in ogni dosaggio i calibratori, il controllo positivo, quello negativo e un reagente bianco per verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza per il reagente bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1,0 altrimenti il test deve essere ripetuto. Il controllo negativo deve essere <10 UE/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, calcolare la media di due letture per determinare il valore in UE/ml. Durante l'esecuzione delle determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere superiore a quella del controllo negativo e inferiore all'assorbanza del controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitative, il controllo positivo deve fornire valori compresi nell'intervallo dichiarato sul flaconcino.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere stabilite con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Ass. campione test

----- X UE/ml del calibratore D = UE/ml del campione test

Ass. calibratore D

Si raccomanda di refertare i risultati qualitativi come "positivi" o "negativi". Risultati del campione superiori o pari al calibratore D sono considerati positivi.

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare su carta illimitata lineare-logaritmica l'assorbanza dal calibratore A fino al calibratore E rispetto alle loro concentrazioni. Tracciare le concentrazioni in UE/ml sull'asse X rispetto all'assorbanza sull'asse Y e disegnare una curva interpolante punto per punto. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva in base ai valori di assorbanza corrispondenti. In alternativa, è possibile utilizzare una curva a quattro parametri per tracciare la curva standard.

Si raccomanda di refertare i risultati semiquantitativi come "positivi", "negativi" o "indeterminati" con i valori delle unità in UE/ml. In presenza di risultati indeterminati/borderline, ripetere il test e valutare unitamente ad altri metodi di laboratorio.

Interpretazione

I valori di interpretazione sono stati determinati testando 64 donatori di sangue normali. Il cut-off è stato stabilito utilizzando la media dei soggetti normali più 2 DS ed è stato assegnato un valore arbitrario di 20 UE/ml. IMMCO suggerisce l'uso dell'intervallo di riferimento riportato di seguito. Ogni laboratorio deve convalidare i valori del dosaggio in base alle proprie condizioni.

Valore antic. anti-PM/Scl	Interpretazione
<20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminato (borderline)
>25 UE/ml	Positivo

Calibratore

Il kit include calibratori pronti all'uso per fornire in ogni sessione una determinazione semiquantitativa. Campioni del paziente contenenti livelli anticorpali elevati possono fornire valori di assorbanza superiori a quello del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, questi campioni devono essere ulteriormente diluiti in modo da rientrare nell'intervallo della curva del calibratore alla ripetizione del test. Per determinare i valori UE/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Non eseguire il dosaggio su campioni che presentano emolisi macroscopica, contaminazione microbica o lipemia. Questo metodo deve essere utilizzato solo per testare campioni di siero umano. I risultati ottenuti servono solo come ausilio nella diagnosi. Considerati da soli, questi risultati non devono essere interpretati come diagnostici. Questo dosaggio non è stato convalidato nella popolazione pediatrica.

I campioni positivi per gli anticorpi antifosfolipidi (APL) possono presentare una reazione crociata con l'antigene PM/Scl. Si raccomanda di includere i dosaggi per gli APL tra i test di laboratorio aggiuntivi per i campioni positivi.

VALORI PREVISTI

I risultati del test previsti in una popolazione normale sono solitamente negativi. Se i risultati sono positivi, possono essere giustificati altri test per suffragare i riscontri anticorpali serici.

Incidenza degli anticorpi anti-PM/Scl⁴

Gruppo malattia	n	n positivi	% positivi
Gruppo PM/Scl			
Polimiosite/scleroderma	40	22	55
Polimiosite	40	3	7,5
Scleroderma	205	27	13
Controlli di malattia			
Artrite reumatoide	69	0	0
Lupus eritematoso sistemico	114	3	2,5
Controlli di malattia reumatica	452	33	7

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità del dosaggio Immulisa™ PM/Scl ELISA per il rilevamento degli autoanticorpi è stata valutata testando campioni di siero positivi e negativi per la reazione nucleolare, da soggetti con sospetto disturbo del tessuto connettivo, accanto a controlli di malattia e sieri umani "normali". Questi campioni sono anche stati testati su un altro kit ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-PM/Scl. Questi risultati sono riepilogati nella seguente tabella.

A. Immulisa™ PM/Scl ELISA vs. altro kit per il rilevamento degli anticorpi anti-PM/Scl.

		Altro ELISA PM/Scl		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	20	6	26
PM/SCL	Negativo	3	56	59
ELISA	Totale	23	62	85

Concordanza percentuale positiva: 87%

Concordanza percentuale negativa: 90,3%

Concordanza percentuale totale: 89,4%

B. Reattività crociata: 80 campioni totali con reattività crociata potenziale, provenienti da soggetti con altri disturbi autoimmuni o positivi per altri autoanticorpi, sono stati testati per gli anticorpi anti-PM/Scl utilizzando il dosaggio Immulisa™ PM/Scl ELISA.

Condizione	n	Positivo
ENA positivi*	48	5
Malattia celiaca	8	2
Vasculite autoimmune	8	0
Malattia di Hashimoto	8	1
Totale	72	8 (11%)

* Anticorpi per gli antigeni nucleari estraibili (ENA)

Precisione

La precisione è stata testata con campioni positivi selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. In 3 giorni sono state condotte sessioni di dosaggio di 3 replicati di ogni campione. La ripetibilità è stata determinata con 6 replicati di ogni campione.

N. c	Media (UE/ml)	Imprecisione totale		Tra i giorni		Tra le sessioni (Ripetibilità)	
		DS (UE/ml)	CV %	DS (UE/ml)	CV %	DS (UE/ml)	CV %
1	14	1,01	7%	1,03	7,2%	1,4	9,6%
2	29	1,2	4,1%	1,28	4,4%	0,91	3,2%
3	58	2,45	4,2%	3,36	5,8%	0,84	1,4%
4	116	7,3	6,3%	9,07	7,7%	0,19	0,2%
5	231	19,29	8,4%	26,07	11,1%	2,02	0,9%

Linearità

Sono state eseguite sessioni di dosaggio multiple raddoppiando le diluizioni dei campioni attraverso l'intervallo lineare del dosaggio. Il valore r^2 medio per queste sessioni era di 0,992 e nessun valore era inferiore a 0,985. Le sessioni di dosaggio sono ritenute accettabili se r^2 supera 0,95.

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di anticorpi anti-PM/Scl con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 μ mol/l) e fattore reumatoide (100 UE/ml).



ImmuLisa™ Anticorpos anti-PM/Scl ELISA

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

[REF] 5101 Anticorpos anti-PM/Scl ELISA 96 Determinações

ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a detecção qualitativa e semi-quantificação de anticorpos IgG ao antígeno nucleolar PM/Scl presente no soro humano, com o objectivo de ajudar no diagnóstico da polimiosite e esclerodermia, ou da sobreposição da polimiosite e da esclerodermia, em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos antinucleares (ANA) são uma característica marcante no soro de pacientes com distúrbios do tecido conjuntivo (CTD), como o lúpus eritematoso sistémico (LES), a esclerodermia (Scl), a polimiosite (PM), a dermatomiosite (DM) ou a sobreposição de PM/Scl. Os ANA são visualizados através de diversos padrões de reacção, utilizando métodos de imunofluorescência indirecta. Destes, os mais comuns incluem padrões homogéneos, pontilhados, centrómeros e nucleolares. Cada padrão de reacção representa anticorpos associados a antígeno(s) particular(es) e, assim, uma doença ou um sub-conjunto de doenças. Por exemplo, a reacção centrómera está associada a um sub-conjunto de esclerodermia. Da mesma forma, a nucleolar está associada à esclerodermia, à polimiosite, à dermatomiosite e à sobreposição destas doenças. Os padrões de reacção nucleolar são de três tipos: homogéneos, irregularmente salpicados ou grumosos. Cada padrão de reacção representa anticorpos de especificidades particulares. A reacção nucleolar homogénea está associada aos anticorpos anti PM/Scl. O complexo PM/Scl, também conhecido como exosoma humano, consiste num complexo de nove proteínas e de algumas outras proteínas que se associam a este complexo. Este complexo principal é mais abundante no nucléolo.¹⁻⁴ Este complexo está envolvido no processamento ribossómico do RNA e na degradação do RNA mensageiro. Os anticorpos anti complexo PM/Scl estão presentes em cerca de 30% dos pacientes com sobreposição de PM/Scl, 8% dos pacientes com PM, 11% dos pacientes com DM e 2% dos pacientes com esclerodermia.

A polimiosite é um sub-conjunto de miopatias inflamatórias idiopáticas (IBM), caracterizadas pelo enfraquecimento muscular crónico e pela inflamação músculo-esquelética. Outros sub-conjuntos da miopatia inflamatória idiopática são a dermatomiosite e a miosite por corpos de inclusão. A IBM é um distúrbio

PT

raro com uma incidência relatada de 0,5-1 por 100 000. A PM e a DM podem ocorrer quer durante a infância, quer entre os 30-50 anos. com preponderância feminina (F:M 2,5:1). Conforme acontece com diversas doenças auto-imunes, a polimiosite possui uma ligação genética e está relacionada com o DRB1.

Os autoanticorpos são importantes para o diagnóstico e conhecimento das miopatias inflamatórias. Os anticorpos anti-PM/Scl estão associados à sobreposição PM/Scl e, em certa medida, a pacientes com PM, DM ou Scl, e raramente ao LES.

Os anticorpos anti-PM/Scl podem ser detectados através da imunofluorescência indirecta sobre as células HEp-2, com um padrão de reacção específico, através da imunodifusão, utilizando extracto de timo de coelho, por imunoprecipitação e por ELISA. Os antigénicos aos quais os anticorpos anti-PM/Scl reagem são os PM/Scl-75, uma das nove principais proteínas complexas do exossoma humano, bem como a uma proteína associada, PM/Scl-100. Foi recentemente identificado um epitopo específico ao qual os anticorpos da PM/Scl reagem. A utilização do peptídeo em vez da molécula inteira pode fornecer níveis de sensibilidade e de especificidade mais elevados, quando comparados com as moléculas de corpo inteiro, devido à reactividade cruzada, à exposição do epitopo antigénico e à densidade do epitopo. Este ensaio beneficia destas descobertas e incorpora uma adequada molécula de antígeno que apresenta a melhor discriminação na detecção de anticorpos anti-PM/Scl.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é realizado como um imunoensaio enzimático de base sólida (ELISA). Os micropoços individuais são revestidos com antígeno de PM/Scl, seguido pelo bloqueamento de locais não reagentes, para reduzir a ligação não-específica. O controlo, o calibrador e o soro do paciente são incubados em poços revestidos com antígenos, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao antígeno. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. É adicionado a cada poço conjugado HRP de cabra IgG anti humano. O conjugado não ligado é eliminado através de lavagem. Posteriormente, é adicionado aos poços um substrato de uma enzima específica (TMB) e a presença de anticorpos é detectada através de uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB para um produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em Unidades ELISA por mililitro (EU/ml) e comunicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

Armazenamento e Preparação

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Os reagentes são estáveis até à data de expiração, quando são armazenados e manuseados conforme as orientações.

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.

PT

Reconstituir o tampão de lavagem a 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando armazenado a 2-8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit.

As tiras de revestimento dos micropoços destinam-se a uma única utilização. As tiras dos micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente selados na bolsa com dessecantes, a fim de prevenir a condensação e ser armazenadas a 2-8°C.

Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA. No entanto, os derivados do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.⁵

As instruções devem ser seguidas exactamente conforme constam no presente folheto deste kit, a fim de assegurar resultados válidos. Não trocar os componentes do kit com componentes provenientes de outras fontes. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais, a fim de minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes aquando do seu manuseamento. Não utilizar os componentes do kit para além da data de validade impressa nas etiquetas.

Material fornecido

ImmuliSera™ Anticorpos anti-PM/ScI ELISA [REF] 5101

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

12 x 8 [MICROPLATE|PM/ScI]

Microplaca com micropoços individuais separados. Revestidos com antígeno PM/ScI. Pronto a utilizar,

1 x 1.75 ml [CONTROL+|PM/ScI]

Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para anticorpos PM/ScI. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.

1 x 1.75 ml [CONTROL-]

Controlo Negativo pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.

5 x 1.75 ml [CALIBRATOR|A|PM/ScI]

Conjunto de 5 **Calibradores** pronto a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tampa azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 20 EU/ml e Calibrador E (tampa laranja) 1 EU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos PM/ScI. As concentrações em EU/ml estão impressas na etiqueta.

[CALIBRATOR|B|PM/ScI]

[CALIBRATOR|C|PM/ScI]

[CALIBRATOR|D|PM/ScI]

[CALIBRATOR|E|PM/ScI]

1 x 15 ml [IgG-CONJ|HRP]

Conjugado HRP de cabra IgG anti humano. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.

1 x 60 ml [DIL]

Diluinte de Soro. Pronto a utilizar, Código de cor púrpura.

1 x 15 ml [SUBSTRATE|TMB]

Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar, **Proteger da luz.**

PT

1 x 15 ml

STOP|H₂SO₄

Solução de Paragem. Pronta a utilizar,

2 x

BUF|WASH

Tampão de lavagem de pó. **Reconstituir para um litro cada.**

1 x

Folhas de Protocolo

Componentes Opcionais

1 x 60ml

BUF|WASH

Tampão de Lavagem Líquido concentrado.
Reconstituir para um litro.

Símbolos utilizados nas etiquetas



Número de lote



Número de catálogo



Para utilização diagnóstica in vitro



Utilização por



Temperatura de armazenamento



Ler as instruções antes de utilizar



Número de testes



Fabricante

Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorventes
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2ºa 8ºC durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano.

PROCEDIMENTO

Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio.
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Permitir que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste se equilibrem a uma temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Sugere-se que os reagentes sejam deixados em cima da bancada, no exterior da caixa, durante 30 minutos antes da sua utilização. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- Eliminar as tiras necessárias dos micropoços da embalagem, voltando a fechá-la cuidadosamente, a fim de prevenir a condensação nos poços não utilizados. Voltar a colocar a embalagem de imediato no frigorífico.
- ***Uma boa técnica de lavagem é fundamental*** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direccionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca, através de um frasco de lavagem de ponta larga. ***Recomenda-se a utilização de uma lavadora automática de microplacas.***
- Utilizar uma pipeta multicanal capaz de libertar 8 ou 12 poços em simultâneo. Este procedimento acelera o processo, fornecendo tempos de incubação mais uniformes.
- É importante o controlo cuidadoso do tempo para todos os passos. O início de todos os períodos de incubação começa com a conclusão da adição do reagente.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser realizada na mesma proporção e na mesma sequência.

Método de Teste

- 1º Passo** Permitir que todos os reagentes e amostras se equilibrem a uma temperatura ambiente
- 2º Passo** Etiquetar folha de protocolo indicando a colocação da amostra nos poços. A execução das amostras em duplicado constitui uma boa prática laboratorial.
- 3º Passo** Utilizar apenas o Calibrador D (*ampola com tampa amarela*) para obter uma **determinação qualitativa**.
- ou**
- Utilizar os Calibradores A até E para uma **determinação semi-quantitativa**, conforme se descreve no esquema de amostras seguinte.

Qualitativa				Semi-Quantitativa			
A	Branca	S5	Etc.	A	Branca	S1	Etc.
B	-Control	S6		B	-Control	S2	
C	+ Control	S7		C	+ Control	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- 4º Passo** Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500ul** de Diluente de Soro.
- 5º Passo** Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.
- 6º Passo** Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, controlos Positivo e Negativo e amostras de pacientes diluídas (**1:101**) nos micropoços apropriados, conforme a folha de protocolo.
- Nota:** Incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.
- 7º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- 8º Passo** Lavar **4x** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão retirando os conteúdos de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.
- 9º Passo** Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- 10º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.
- 11º Passo** Lavar todos os micropoços conforme descrito no 8º Passo.
- 12º Passo** Pipetar **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempo utilizados para o Conjugado.
- 13º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a uma temperatura ambiente.
- 14º Passo** Pipetar **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados na adição do Substrato Enzimático. Ler os valores de absorvância, no espaço de **30 minutos**, da adição da solução de paragem.

PT

15º Passo Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou, a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e um reagente branco devem ser executados em cada ensaio, a fim de verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser <0,3. O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser <10 EU/ml. Se o teste for realizado em duplicado, deve ser retirada a média das duas leituras, a fim de determinar EU/ml. Quando se realizam determinações Qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para as determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve apresentar valores na faixa indicada na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do paciente podem ser determinadas por qualquer um dos seguintes métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

----- X EU/ml do Calibrador D = EU/ml Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como “positivos” ou “negativos.” Amostras com resultados superiores ou iguais ao Calibrador D são consideradas positivas.

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Traçar a absorvância do Calibrador A até E, consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em IU/ml no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários EU/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados testando 64 doadores de sangue normal. A média dos indivíduos normais mais 2 SD foi estabelecida como o corte do ensaio e foi atribuído um valor arbitrário de 20 EU/ml. A IMMCO sugere a utilização da série de referência abaixo. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

Valor Ab PM/Scl	Interpretação
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado (Linha Divisória)
>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

São incluídos Calibradores Prontos a Utilizar para fornecer a semi-quantificação, devendo ser utilizados em cada ensaio. As amostras de pacientes que contenham elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos rigorosos, essas amostras devem ser ainda diluídas de modo a recaírem na série da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para determinar valores EU/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo factor de diluição.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ensaio não deve ser realizado em amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem exclusivamente como ajuda ao diagnóstico. Caso sejam considerados isoladamente, estes resultados não devem ser interpretados como um diagnóstico. Este ensaio não foi validado numa população pediátrica.

As amostras positivas para anticorpos antifosfolípide (APL) têm potencial de reacção cruzada com o antígeno do PM/Scl. Recomenda-se que os testes laboratoriais adicionais a amostras positivas incluam ensaios para o APL.

PT

VALORES ESPERADOS

Espera-se que os resultados do teste numa população normal sejam negativos. Caso os resultados sejam positivos, pode ser justificados testes adicionais para fundamentar as descobertas de anticorpos no soro.

Incidência de Anticorpos anti-PM/Scl⁴

Grupo de Doenças	n	n Positivo	% Positivo
Grupo PM/Scl			
Polimiosite/Esclerodermia	40	22	55
Polimiosite	40	3	7,5
Esclerodermia	205	27	13
Controlos de Doenças			
Artrite Reumatóide	69	0	0
Lúpus Eritematoso Sistémico	114	3	2,5
Controlos de doença reumática	452	33	7

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da ImmuLISA™ PM/Scl ELISA para a detecção de autoanticorpos foi avaliada, através de testes a amostras de soro nucleolar positivo e negativo de indivíduos suspeitos de distúrbio do tecido conjuntivo, bem como a par de controlos de doenças e de soro humano “normal”. Estas amostras foram igualmente testadas noutros kits de teste ELISA, para a detecção de anticorpos anti-PM/Scl. Estes resultados são seguidamente resumidos.

A. ImmuLISA™ PM/Scl ELISA vs. outro kit de Anticorpos anti-PM/Scl:

		Outro PM/Scl ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	20	6	26
PM/SCL	Negativo	3	56	59
ELISA	Total	23	62	85
Acordo percentual positivo:		87,0%		
Acordo percentual negativo:		90,3%		
Acordo percentual global:		89,4%		

PT

B. Reactividade Cruzada: Foram testadas um total de 80 amostras com potencial de reatividade cruzada de indivíduos com outros distúrbios auto-imunes ou positivas para outros autoanticorpos para anticorpos anti-PM/Scl, utilizando o Immulisa™ PM/Scl ELISA.

Condição	n	Positivo
ENA positivo*	48	5
Doença celíaca	8	2
Vasculite Auto-Imune	8	0
Doença de Hashimoto	8	1
Total	72	8 (11%)

* Anticorpos contra Antígenos Nucleares Extraíveis

Precisão

A precisão foi testada com amostras positivas seleccionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram conduzidos ensaios a 3 réplicas de cada amostra em 3 dias. A repetitibilidade foi determinada com 6 réplicas de cada amostra.

S #	Média (EU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na Experiência (Repetitibilidade)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	14	1,01	7,0%	1,03	7,2%	1,40	9,6%
2	29	1,20	4,1%	1,28	4,4%	0,91	3,2%
3	58	2,45	4,2%	3,36	5,8%	0,84	1,4%
4	116	7,30	6,3%	9,07	7,7%	0,19	0,2%
5	231	19,29	8,4%	26,07	11,1%	2,02	0,9%

Linearidade

Foram realizados múltiplos ensaios utilizando diluições duplas das amostras ao longo de todo o intervalo linear de ensaio. O valor médio r^2 foi de 0,992 para estes ensaios, com nenhum inferior a 0,985. Os ensaios são considerados aceitáveis no caso de excederem 0,95.

Interferência

A interferência foi estudada, através da mistura do soro com os níveis conhecidos de anticorpos anti-PM/Scl com amostras de soro potencialmente interferentes, e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 μ mol/L), e Factor Reumatóide (100 EU/ml).

REFERENCES

1. Limaye VS, Blumbergs P, Roberts-Thomson PJ. Idiopathic inflammatory myopathies. *Intern Med J* 39:179-190; 2009.
2. Mahler M, Fritzler MJ. PM1-Alpha ELISA: The assay of choice for the detection of anti-PM/Scl autoantibodies? *Autoimmunity Rev* 8:373-378; 2009.
3. Mahler M, Raijmakers R. Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: Clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmunity Rev*. 6:432-437; 2007.
4. Mahler M, Raijmakers R, Dahnrich C et al Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther* 7:R704-R713, 2005
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

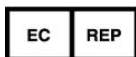
Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

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

E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com

NOV2011

Document No. PI5101