



**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](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](http://linkedin.com/company/szaboscandic)





## ImmunoLISA™

# ENA Antibody ELISA

### RNP Antibody ELISA

### Sm Antibody ELISA

**[IVD]** For *in vitro* diagnostic prescription use only

#### PRODUCT INSERT

<b>REF</b>	5126	RNP Antibody ELISA	96 Determinations
<b>REF</b>	5127	Sm Antibody ELISA	96 Determinations

#### INTENDED USE

An enzyme linked immunoassays (ELISA) for the detection and semi-quantitation of Sm or RNP antibodies in human serum as an aid in diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and associated connective tissue disorders in conjunction with other laboratory and clinical findings.

#### SUMMARY AND EXPLANATION

ENA are soluble ribonucleoprotein (snurps) complexes. Autoantibodies directed against various ENA have proven to be of value in the diagnosis and monitoring of various systemic connective tissue diseases. Anti-Sm antibodies are disease specific and thus are a marker for systemic lupus erythematosus (SLE). Antibodies to Sm occur in approximately 30-40% of SLE patients. They are rare in other systemic connective tissue diseases and if present, indicate either overlap of disease or patients that have not yet fulfilled the ARA criteria for SLE.<sup>1-6</sup> Other antibodies such as those directed against SS-A (Ro), SS-B (La) and RNP are not disease specific.

Antibodies to RNP occur in 35-45% of SLE patients and in over 95% of patients with mixed connective tissue disease (MCTD). Occasionally they are also found in scleroderma, rheumatoid arthritis and drug induced LE.<sup>1-6</sup>

Patients with anti-RNP antibodies have a lower incidence of renal disease as compared to patients with anti-Sm antibodies. Antibodies to SS-A (Ro) and SS-B (La) occur in approximately 30-40% and 10-15% of SLE patients and 60-70% and 40-60% of patients with Sjögren's syndrome respectively.

These antibodies can be detected by various methods. ELISA methodology has many advantages over older technologies such as immunodiffusion: assay performance times are reduced, individual subjectivity in reading results is eliminated, quantitation is achieved without serum titration, there is potential for automation and ELISAs offer greater sensitivity.<sup>10</sup>

#### PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with purified Sm or RNP antigen followed by a blocking step to reduce non-specific protein binding during the assay run. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies present in the serum to bind to the antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the microwells. 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 a 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.

## EN

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.

## Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials.<sup>11</sup>

**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

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

ImmunoLISA™ RNP Antibody ELISA

[REF] 5126

12 x 8 [MICROPLATE|RNP]  
Microplate with individual breakaway microwells. Coated with RNP antigens. Ready for use.

1 x 1.75 ml [CONTROL+|RNP]  
Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for RNP 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|RNP]  
[CALIBRATOR|B|RNP]  
[CALIBRATOR|C|RNP]  
[CALIBRATOR|D|RNP]  
[CALIBRATOR|E|RNP]  
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 RNP 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|H2SO4]  
Stop Solution\*. Ready for use.

2 x vials [BUF|WASH]  
Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each.

1 x Protocol Sheets

ImmunoLISA™ Sm Antibody ELISA

[REF] 5127

12 x 8 [MICROPLATE|SM]  
Microplate with individual breakaway microwells. Coated with Sm antigen. Ready for use.

1 x 1.75 ml [CONTROL+|SM]  
Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for Sm 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|SM]  
[CALIBRATOR|B|SM]  
[CALIBRATOR|C|SM]  
[CALIBRATOR|D|SM]  
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 Sm antibodies. Concentrations

EN

	CALIBRATOR ESM	in EU/ml are printed on the labels.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP goat anti-human <b>IgG Conjugate</b> . 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. <b>Protect from light.</b>
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Stop Solution*. Ready for use.
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer. <b>Reconstitute to one liter each.</b>
1 x		Protocol Sheets

### Optional Components

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

### Symbols used on labels

LOT	Lot number
REF	Catalog number
IVD	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Consult instructions for use
	Number of tests
	Manufacturer
	Date of Manufacture

\*Danger; Causes severe skin burns and eye damage. Causes severe eye damage. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Wash exposed skin thoroughly after handling. If in eyes: rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician

### 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.

## EN

- 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.**
- 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

A	Blank	S5	Etc.
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

Semi-Quantitative

A	Blank	S1	Etc.
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

**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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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

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

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 for detection of antibodies to ENA.

### Interpretation

Interpretation values were determined by testing 80 normal blood donors. The cutoff was established using mean of the normal subjects plus 2.5 SD for the RNP Ab ELISA and 3.5 SD for the Sm Ab ELISA. The cutoff was 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.

anti-RNP Ab value	anti-Sm Ab value	Interpretation
<20 EU/ml	<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	>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

EN

diagnosis. Taken alone, these results should not be interpreted as diagnostic. This assay has not been validated in a pediatric population.

## EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are usually expected to be negative. The incidence of ENA antibodies in various systemic connective tissue diseases is summarized in the following table:

### Diagnostic Significance of Antibodies to RNP and Sm Antigens

Antibody	Disease Association (% Incidence)
RNP	SLE (20-30%) MCTD (95-100%)
Sm	SLE (10-40%)

SLE = systemic lupus erythematosus

MCTD = mixed connective tissue disease

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

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the ImmuLisa™ RNP and Sm Antibody ELISAs were evaluated by testing well-characterized ENA antibody positive specimens alongside disease controls and "normal" human sera. These specimens were also tested on commercially available test kits. Only specimens in the linear range of the assay were included in the method comparison. These results are summarized below.

### A. Method Comparison: ImmuLisa™ RNP Antibody ELISA vs. other RNP Antibody kit:

Other RNP Antibody ELISA			
	Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	43	3
RNP	Negative	2	95
Ab ELISA	Total	45	98
			143

Positive Percent Agreement: 95.6% (95% CI 83.6% to 99.2%)

Negative Percent Agreement: 96.9% (95% CI 90.7% to 99.2%)

Relative Agreement: 96.5% (95% CI 91.6% to 98.7%)

### B. Method Comparison: ImmuLisa™ Sm Antibody ELISA vs. other Sm Antibody kit:

Other Sm Ab ELISA			
	Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	53	12
Sm Ab	Negative	2	167
ELISA	Total	55	179
			234

Positive Percent Agreement: 96.4% (95% CI 86.4% to 99.4%)

Negative Percent Agreement: 93.3% (95% CI 88.3% to 96.3%)

Relative Agreement: 94.0% (95% CI 90.0% to 96.6%)

### C. Cross Reactivity: A total of 80 potentially co-incident antibody positive or cross-reactive specimens were selected from individuals positive for other ENA antibodies or suffering from other autoimmune disorders were tested for RNP and Sm antibodies using the ImmuLisa™ assays.

Condition	n	RNP Ab Pos n (%)	Condition	n	Sm Ab Pos n (%)
Associated ENA Ab Pos					
Jo-1	8	0	Jo-1	8	0
La	8	0	La	8	0
Pm-Scl	8	1	Pm-Scl	8	0
Ro	8	0	Ro	8	0
Scl-70	8	4	Scl-70	8	1

EN				RNP		
Sm	8	1			8	3
Total	48	6 (12.5)			48	4 (12)
Potentially cross-reactive autoimmune diseases						
Celiac Disease	8	0	Celiac Disease	8	0	
Hashimoto's	8	0	Hashimoto's	8	0	
Rheumatoid Arthritis	8	0	Rheumatoid Arthritis	8	0	
Vasculitis	8	0	Vasculitis	8	0	
Total	32	0 (0)		32	0 (0)	

## Precision

Precision was tested with positive specimens selected throughout the range of the assay. Assay runs of 4 replicates of each specimen were conducted on 4 days. Repeatability was determined with 8 replicates of each specimen.

Kit	S #	Mean (EU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
			SD		SD		SD	
			(EU/ml)	CV%	(EU/ml)	CV%	(EU/ml)	CV%
RNP Ab Assay	1	8.4	0.419	5.0%	0.353	4.2%	0.553	6.5%
	2	17.7	1.721	9.7%	1.670	9.8%	0.385	2.0%
	3	23.7	2.289	9.7%	2.193	9.5%	2.184	8.9%
	4	61.6	5.103	8.3%	5.431	9.0%	2.581	4.0%
	5	95.6	4.630	4.8%	4.995	5.2%	3.591	3.8%
	6	198.1	8.584	4.3%	7.720	3.8%	7.781	4.0%
Sm Ab Assay	1	2.3	0.235	10.2%	0.273	11.9%	0.150	6.5%
	2	14.1	0.624	4.4%	0.464	3.2%	0.361	2.7%
	3	19.7	1.136	5.8%	1.373	7.0%	0.444	2.2%
	4	30.0	1.644	5.5%	1.844	6.1%	1.043	3.5%
	5	66.7	3.791	5.7%	3.742	5.7%	2.432	3.5%
	6	120.8	6.133	5.1%	6.701	5.6%	4.687	3.8%

## Reproducibility

8 replicates of samples in the negative range, ~20% below cutoff, ~20% above cutoff and in the moderate positive range of the assay were performed to determine intra-assay qualitative reproducibility. 4 replicates of the same samples were tested in 4 runs to determine inter-assay reproducibility. Assay results for these specimens produced 100% qualitative agreement.

## Limit of Detection

The limit of detection (LoD) was determined based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples. LoD for RNP Ab was 3.0 EU/ml. LoD for Sm Ab was 4.2 EU/ml.

## Linearity and Recovery

Studies were performed using equidistant dilution series of positive samples with values throughout the calibrator range to determine linear range of the assay. The linear range of the assays were determined be 3.0 (LoD) – 400 EU/ml for RNP Ab and 4.2 (LoD) – 255 EU/ml for Sm Ab. Results are summarized below.

Test Range (EU/ml)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R <sup>2</sup>	% recovery (obtained/expected)
RNP Ab				
4.4 to 136	0.98 (0.95 to 1.00)	2.1 (1.8 to 3.0)	0.9979	88.9 to 103.3
263 to 611.1	1.27 (1.10 to 1.51)	-15.6 (-16.1 to -14.2)	0.9817	96.1 to 139.8
7.2 to 70.3	0.97 (0.88 to 1.14)	0.5 (0.3 to 0.7)	0.9958	97.3 to 106.9
Sm				
5.2 to 75.8	1.01 (0.93 to 1.51)	-0.5 (-0.8 to 0.1)	0.9987	97.3 to 105.7

**EN**

4.8 to 93.9	1.00 (0.90 to 1.51)	1.1 (0.3 to 1.8)	0.9963	90.9 to 102
5.3 to 317.9	0.72 (0.61 to 1.51)	-2.2 (-4.0 to -0.2)	0.9753	101.9 to 159.6

**Interference**

Interference was studied by mixing sera with known RNP and Sm 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 µmol/L), and Rheumatoid Factor (100 EU/ml).

## ImmunoLisa™

# Αντίσωμα ENA ELISA

## Αντίσωμα RNP ELISA

## Αντίσωμα Sm ELISA

**[IVD]** Για *in vitro* διαγνωστική χρήση Χρήση συνταγής μόνο

### ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

<b>REF</b>	5126	Αντίσωμα RNP ELISA	96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b>	5127	Αντίσωμα Sm ELISA	96 Προσδιορισμοί

### ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-πιοσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων Sm ή RNP στον ανθρώπινο ορό, ως βοήθημα στη διάγνωση του Συστηματικού Ερυθματώδη Λύκου (SLE) και διαταραχές συσχετισμένες με συνδετικό ιστό σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Τα ENA είναι διαλυτά ριβονουκλεοπρωτεΐνικά (snurps) σύμπλοκα. Τα αυτοαντισώματα κατευθύνονται έναντι διαφόρων ENA που έχει αποδειχθεί ότι έχουν αξία στη διάγνωση και παρακολούθηση διαφόρων συστηματικών νόσων συνδετικού ιστού. Τα αντι-Sm αντισώματα είναι ειδικά αναφορικά με την νόσο και έτσι είναι δείκτης για τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE). Αντισώματα σε Sm εμφανίζονται σε περίπου 30-40% ασθενών με SLE. Σπανίζουν σε άλλες συστηματικές νόσους συνδετικού ιστού και, εάν είναι παρόντα, υποδηλώνουν είτε επικάλυψη νόσου είτε ασθενείς που δεν έχουν πληρώσει ακόμη τα κριτήρια ARA για SLE.<sup>1-9</sup> Άλλα αντισώματα, όπως εκείνα που κατευθύνθηκαν έναντι SS-A (Ro), SS-B (La) και RNP δεν είναι ειδικά αναφορικά με τη νόσο.

Αντισώματα σε RNP εμφανίζονται στο 35-45% ασθενών με SLE και σε πιοσοστό μεγαλύτερο του 95% ασθενών με μικτή νόσο συνδετικού ιστού (MCTD). Περιστασιακά μπορούν επίσης να βρεθούν σε σκληροδερμία, ρευματοειδή αρθρίτιδα και LE προκληθείσα από φάρμακο.<sup>1-6</sup>

Ασθενείς με αντι-RNP αντισώματα παρουσιάζουν χαμηλότερη επίπτωση νεφρικής νόσου σε σύγκριση με ασθενείς με αντι-Sm αντισώματα. Αντισώματα σε SS-A (Ro) και SS-B (La) εμφανίζονται σε περίπου 30-40% και 10-15% ασθενών με SLE (συστηματικό ερυθματώδη λύκο) και 60-70% και 40-60% ασθενών με σύνδρομο Sjögren αντίστοιχα.

Τα αντισώματα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες μεθόδους. Η μεθοδολογία ELISA έχει πολλά πλεονεκτήματα επί παλαιότερων τεχνολογιών όπως ανοσοδιάχυση: οι χρόνοι εκτέλεσης της δοκιμασίας μειώθηκαν, η ατομική υποκειμενικότητα στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων εξαλείφεται, ο πιοσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται χωρίς τιλοδότηση ορού, υπάρχει πιθανότητα για αυτοματισμό και τα ELISAs προσφέρουν μεγαλύτερη ευαισθησία.<sup>10</sup>

### ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία εκτελείται ως στερεά φάση ανοσοβιολογικής δοκιμασίας. Τα βυθίσματα (microwells) επενδύονται με καθαρό αντιγόνο Sm ή RNP και ακολουθεί το βήμα μπλοκαρίσματος για τη μείωση μη ειδικής δέσμευσης κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της δοκιμασίας. Έλεγχοι, βαθμονομητές και οροί ασθενών επωάζονται στα επενδεδυμένα βυθίσματα αντιγόνου για να επιτραπεί σε συγκεκριμένα αντισώματα παρόντα στον ορό για να δεσμεύουν το αντιγόνο. Αδέσμευτα αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες ορού αφαιρούνται με την πλύση των βυθίσμάτων. Δεσμευμένα αντισώματα ανιχνέυονται προσθέτοντας σύζευξη ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης με ενζυμική σήμανση (enzyme labeled anti-human IgG conjugate) στα βυθίσματα. 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

EL

φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε Μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) και αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### Αποθήκευση και Προετοιμασία

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 κιτ.

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 υγροποίηση 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.<sup>11</sup>

**Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος κιτ για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα.**

Μην εναλλάσσετε στοιχεία του κιτ με εκείνα από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε μικροβιακή και αλληλο-μόλυνση αντιδραστήρων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείται στοιχεία του κιτ μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

### Υλικά που παρασχέθηκαν

Το κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

ImmunoLisa™ RNP Antibody ELISA

REF 5126

12 x 8 MICROPLATE|RNP

Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένη με αντιγόνα RNP. Έτοιμη προς χρήση.

1 x 1.75 ml CONTROL+|RNP

Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (Positive Control) (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα RNP. Το εύρος αναμενόμενης πικνότητας σε EU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.

1 x 1.75 ml CONTROL-

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

5 x 1.75 ml CALIBRATOR[A|RNP]  
CALIBRATOR[B|RNP]  
CALIBRATOR[C|RNP]  
CALIBRATOR[D|RNP]  
CALIBRATOR[E|RNP]

Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών. Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής Β (μωβ πώμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 20 EU/ml και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα RNP. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.

1 x 15 ml IgG-CONJ|HRP

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

1 x 60 ml DIL

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

1 x 15 ml SUBSTRATE|TMB

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

1 x 15 ml STOP|H2SO4

Διάλυμα παύσης (Stop Solution)\*. Έτοιμο προς

EL

2 x BUF|WASH

1 x

ImmunoLISA™ Sm Antibody ELISA

12 x 8 MICROPLATE|SM

1 x 1.75 ml CONTROL+|SM

1 x 1.75 ml CONTROL-|

5 x 1.75 ml CALIBRATOR|A|SM  
CALIBRATOR|B|SM  
CALIBRATOR|C|SM  
CALIBRATOR|D|SM  
CALIBRATOR|E|SM

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

χρήση.

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

Φύλλα Πρωτοκόλλου

REF 5127

**Μικροπλάκα** με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένα με αντιγόνο Sm. Έτοιμο προς χρήση.

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

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

Έτοιμο προς χρήση σετ 5 **Βαθμονομητών**. Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής Β (μωβ πώμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 20 EU/ml και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα Sm. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.

**Σύζευξη** ορού ανθρώπινης **αντι-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

#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

LOT Αριθμός Παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

IVD Διαγνωστική χρήση in vitro

 Χρήση έως

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης

 Αριθμός δοκιμών

 Κατασκευαστής

 Ημερομηνία κατασκευής

\*Κίνδυνος. Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Πλύνετε σχολαστικά μετά το χειρισμό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/

προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): Βγάλτε αμέσως όλα τα μολυσμένα ρούχα. Ξεπλύνετε την επιδερμίδα με νερό/στο ντους. Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό

### **Υλικά Που Απαιτούνται Άλλα Δεν Παρέχονται**

- Απιοντισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτο πλαστικό μπουκάλι για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 5 μl έως 1000 μl
- Ρύγχη πιπετών (ρίρεττε tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρης
- Απορροφητικές χάρτινες χειροπετεσέτες
- Αναγνώστης μικροπλάκας ικανός για την αναγνώση 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, λιπαίμικά 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 εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας δοκιμασίας. Προτείνεται τα αντιδραστήρια να παραμείνουν στον πάγκο έως 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 υγροποίηση 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 εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

EL

**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 **500μl** 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 αντιδραστηρίου.

**Βήμα 7** Επωάζετε για **30 λεπτά** ( $\pm 5$  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 χειροπετεσέτες. 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** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

**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** ( $\pm 5$  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 αντιδραστηρίου 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 αντιδραστηρίου 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 πτυκνότητα του Βαθμονομητή Δ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνη του

EL

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 X-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Y-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 για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ENA.

### Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή 80 απλών δοτών αίματος. Το έσχατο όριο της δοκιμασίας καθιερώθηκε με τη χρήση μέσου όρου των συνήθων αντικειμένων συν 2,5 SD για το RNP Ab ELISA και 3,5 SD για το Sm Ab ELISA. Το έσχατο όριο δοκιμασίας όρισε 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 αντι-RNP Ab	τιμή αντι-Sm Ab	Ερμηνεία
<20 EU/ml	<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>25 EU/ml	>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 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 λιπαριμικά 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.

### ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής σε συνήθη πληθυσμό συνήθως αναμένονται να είναι αρνητικά. Η επίπτωση των αντισωμάτων ENA σε διάφορες συστηματικές νόσους συνδετικού ιστού συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα:

Διαγνωστική Σημασία Αντισωμάτων σε Αντιγόνα RNP και Sm

Αντίσωμα	Συσχετισμός Νόσου (% Επίπτωσης)
----------	---------------------------------

EL	SLE (20-30%)
RNP	MCTD (95-100%)
Sm	SLE (10-40%)

SLE = συστηματικός ερυθηματώδης λύκος  
MCTD = mixed connective tissue disease

Σημείωση: Η συχνότητα ιδιαιτερότητας κάθε αντισώματος σε μια νόσο αντιπροσωπεύει συλλογή από τη βιβλιογραφία.<sup>3</sup> Η επίπτωση ποικίλει ανάλογα με τον πληθυσμό ασθενών.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα του Immulisa™ RNP και Sm Antibody ELISAs αξιολογήθηκαν με δοκιμή καλώς χαρακτηρισμένων δειγμάτων αντισώματος θετικού σε ENA μαζί με ελέγχους νόσων και “φυσιολογικούς” ανθρώπινους ορούς. Αυτά τα δειγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα κιτ. Μόνον δειγματα στο γραμμικό φάσμα της δοκιμασίας συμπεριελήφθησαν στην σύγκριση της μεθόδου. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. Σύγκριση Μεθόδου: Immulisa™ RNP Antibody ELISA έναντι άλλου κιτ RNP Antibody:

### Άλλο RNP Αντίσωμα ELISA

	Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	43	3
RNP	Αρνητικό	2	95
Ab ELISA	Σύνολο	45	98
Συμφωνία Θετικού Ποσοστού:		95,6% (95% CI 83,6% έως 99,2%)	
Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού:		96,9% (95% CI 90,7% έως 99,2%)	
Σχετική Συμφωνία:		96,5% (95% CI 91,6% έως 98,7%)	

B. Σύγκριση Μεθόδου: Immulisa™ Sm Antibody ELISA έναντι άλλου κιτ Sm Antibody:

### Άλλο Sm Ab ELISA

	Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	53	12
Sm Ab	Αρνητικό	2	167
ELISA	Σύνολο	55	179

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 96,4% (95% CI 86,4% έως 99,4%)  
 Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 93,3% (95% CI 88,3% έως 96,3%)  
 Σχετική Συμφωνία: 94,0% (95% CI 90,0% έως 96,6%)

C. Διασταυρωτή Αντιδραστικότητα: Ένα σύνολο από 80 δείγματα με πιθανό συνυπάρχον θετικό αντίσωμα ή δείγματα διασταυρούμενης αντίδρασης επελέγησαν από άτομα θετικά για άλλα αντισώματα ENA ή που έπασχαν από άλλες αυτάνοσες διαταραχές εξετάστηκαν για αντισώματα RNP και Sm χρησιμοποιώντας τις δοκιμασίες Immulisa™.

Πάθηση	n	RNP Ab Θετ. n (%)	Πάθηση	n	Sm Ab Θετ. n (%)
<b>Συσχετισμένο ENA Ab Θετ</b>					
Jo-1	8	0	Jo-1	8	0
La	8	0	La	8	0
Pm-Scl	8	1	Pm-Scl	8	0
Ro	8	0	Ro	8	0
Scl-70	8	4	Scl-70	8	1
Sm	8	1	RNP	8	3
Σύνολο	48	6 (12,5)		48	4 (12)
<b>Αυτοάνοσες νόσοι με πιθανώς διασταυρούμενη αντίδραση</b>					
Κοιλιοκάκη	8	0	Κοιλιοκάκη	8	0
Νόσος του Hashimoto	8	0	Νόσος του Hashimoto	8	0
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	8	0	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	8	0
Αγγειίτιδα	8	0	Αγγειίτιδα	8	0

**Ακρίβεια**

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. Σειρές δοκιμασιών 4 επαναλήψεων πειράματος (replicates) διεξήχθησαν σε κάθε δείγμα σε διάστημα 4 ημερών. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 8 επαναλήψεις πειράματος κάθε δείγματος.

Κητ	S #	Μέσος όρος (EU/ml)	Ολική ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα)	
			SD (EU/ml)		SD (EU/ml)		SD (EU/ml)	
			CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
Δοκιμασία RNP Ab	1	8,4	0,419	5,0%	0,353	4,2%	0,553	6,5%
	2	17,7	1,721	9,7%	1,670	9,8%	0,385	2,0%
	3	23,7	2,289	9,7%	2,193	9,5%	2,184	8,9%
	4	61,6	5,103	8,3%	5,431	9,0%	2,581	4,0%
	5	95,6	4,630	4,8%	4,995	5,2%	3,591	3,8%
	6	198,1	8,584	4,3%	7,720	3,8%	7,781	4,0%
Δοκιμασία Sm Ab	1	2,3	0,235	10,2%	0,273	11,9%	0,150	6,5%
	2	14,1	0,624	4,4%	0,464	3,2%	0,361	2,7%
	3	19,7	1,136	5,8%	1,373	7,0%	0,444	2,2%
	4	30,0	1,644	5,5%	1,844	6,1%	1,043	3,5%
	5	66,7	3,791	5,7%	3,742	5,7%	2,432	3,5%
	6	120,8	6,133	5,1%	6,701	5,6%	4,687	3,8%

**Αναπαραγωγιμότητα**

8 δοκιμασίες δειγμάτων στο αρνητικό εύρος, ~20% κάτω του σημείου διαχωρισμού, ~20% άνω του σημείου διαχωρισμού και στο μέτρια θετικό εύρος της δοκιμασίας εκτελέστηκαν για να προσδιορίσουν την ποιοτική αναπαραγωγιμότητα στο ίδιο δείγμα (intra-assay). 4 επαναλήψεις των ίδιων δειγμάτων δοκιμάστηκαν σε 4 εκτελέσεις για να προσδιορίσουν την αναπαραγωγιμότητα στο ίδιο δείγμα (inter-assay). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας γι' αυτά τα δείγματα παρήγαν 100% ποιοτική συμφωνία.

**Όριο Ανίχνευσης**

Το όριο ανίχνευσης (LoD) καθορίστηκε επί τη βάσει 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS). Το LoD για RNP Ab ήταν 3,0 EU/ml. Το LoD για Sm Ab ήταν 4,2 EU/ml.

**Γραμμικότητα και Ανάκαμψη**

Εκτελέστηκαν μελέτες με τη χρήση ισαπέχουσας αραίωσης σειράς θετικών δειγμάτων με τιμές σε όλο το εύρος του βαθμονομητή για να προσδιορίσει το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας. Το γραμμικό εύρος των δοκιμασιών προσδιορίστηκε να είναι 3,0 (LoD) – 400 EU/ml για RNP Ab και 4,2 (LoD) – 255 EU/ml για Sm Ab. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω.

Εύρος Δοκιμής (EU/ml)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R <sup>2</sup>	% ανάκαμψης (επιτευχθείσα/αναμενόμενη)
RNP Ab				
4,4 έως 136	0,98 (0,95 έως 1,00)	2,1 (1,8 έως 3,0)	0,9979	88,9 έως 103,3
263 έως 611,1	1,27 (1,10 έως 1,51)	-15,6 (-16,1 έως -14,2)	0,9817	96,1 έως 139,8
7,2 έως 70,3	0,97 (0,88 έως 1,14)	0,5 (0,3 έως 0,7)	0,9958	97,3 έως 106,9
Sm				
5,2 έως 75,8	1,01 (0,93 έως 1,51)	-0,5 (-0,8 έως 0,1)	0,9987	97,3 έως 105,7

4,8 έως 93,9	1,00 (0,90 έως 1,51)	1,1 (0,3 έως 1,8)	0,9963	90,9 έως 102
5,3 έως 317,9	0,72 (0,61 έως 1,51)	-2,2 (-4,0 έως -0,2)	0,9753	101,9 έως 159,6

### Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα RNP και Sm 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 μμολ/L), και Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml).



## ImmunoLISA™

# ELISA Anticuerpos ENA

**ELISA Anticuerpos RNP**

**ELISA Anticuerpos Sm**

**[IVD]** Para utilización de diagnóstico *in vitro* Solo uso con receta

### ETIQUETA DEL PRODUCTO

<b>REF</b>	5126	ELISA Anticuerpos RNP	96 Determinaciones
<b>REF</b>	5127	ELISA Anticuerpos Sm	96 Determinaciones

### UTILIZACIÓN Y PREVISTA

Inmunoensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti-Sm o RNO en el suero humano para ayudar en el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y afecciones asociadas de los tejidos conectivos junto con otras pruebas clínicas y de laboratorio.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los ENA son complejos de ribonucleoproteínas solubles (RNPNp). Los autoanticuerpos dirigidos contra varios ENA han demostrado ser útiles para el diagnóstico y el control de varias afecciones sistémicas de los tejidos conectivos. Los anticuerpos anti-Sm son específicos para enfermedades y por ello son un marcador para el lupus eritematoso sistémico (LES). Los anticuerpos anti-Sm se presentan en aproximadamente el 30-40% de los pacientes. Son poco frecuentes en otras afecciones sistémicas de los tejidos conectivos y, en caso de estar presentes, indican una coincidencia de varias enfermedades o que los pacientes todavía no han cumplido los criterios de la ARA para el LES.<sup>1-9</sup> Otros anticuerpos como los anti-SS-A (Ro), SS-B (La) y RNP no son específicos para enfermedades.

Los anticuerpos anti-RNP están presentes en un 35-45% de los pacientes de LES y en más del 95% de los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC). Ocasionalmente también están presentes en la escleroderma, la artritis reumatoide y LE inducido por fármacos.<sup>1-6</sup>

Los pacientes con anticuerpos anti-RNP tienen una menor incidencia de enfermedades renales en comparación con los pacientes con anticuerpos anti-Sm. Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) y SS-B (La) están presentes en aproximadamente un 30-40% y 10-15% de los pacientes de LES y en un 60-70% y 40-60% de los pacientes con síndrome de Sjögren respectivamente.

Estos anticuerpos pueden ser detectados por varios métodos. La metodología ELISA tiene muchas ventajas sobre tecnologías más antiguas como la inmunodifusión: se reducen los tiempos de funcionamiento del ensayo, se elimina la subjetividad individual al leer los resultados, la cuantificación es conseguida sin titulación del suero, existe potencial para la automatización y los ELISA ofrecen más sensibilidad.<sup>10</sup>

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis es realizado como un inmunoensayo de fase sólida. Los micropocillos son recubiertos con antígeno Sm o RNP purificado y a continuación se realiza una fase de bloqueo para reducir los vínculos no específicos durante el ensayo. Se incuban en los pozos recubiertos con el antígeno controles, calibradores y el 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 detectan los anticuerpos unidos añadiendo a los micropocillos una enzima etiquetada conjugado anti-humano IgG. El conjugado no unido es eliminado lavándolo. A continuación se añade a los pocillos substrato 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

ES

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

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.<sup>11</sup>

**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

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

ELISA ImmuLis™ Anticuerpos RNP REF 5126

12 x 8	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MICROPLATE RNP</span>	<b>Microplaca</b> con micropocillos individuales escindibles. Revestida con antígenos RNP. Lista para su utilización.
1 x 1.75 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL+ RNP</span>	<b>Control Positivo</b> listo para su utilización ( <i>tapón rojo</i> ). Contiene suero humano positivo en anticuerpos RNP. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.
1 x 1.75 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL-</span>	<b>Control Negativo</b> listo para su utilización ( <i>tapón blanco</i> ). Contiene suero humano.
5 x 1.75 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR A RNP</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR B RNP</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR C RNP</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR D RNP</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR E RNP</span>	<b>Juego de 5 calibradores</b> listos para su utilización. Calibrador A ( <i>tapón verde</i> ) 160 EU/ml, Calibrador B ( <i>tapón violeta</i> ) 80 EU/ml, Calibrador C ( <i>tapón azul</i> ) 40 EU/ml, Calibrador D ( <i>tapón amarillo</i> ) 20 EU/ml, y Calibrador E ( <i>tapón naranja</i> ) 1 EU/ml. Provenientes de suero humano con anticuerpos RNP. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.
1 x 15 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">IgG-CONJ HRP</span>	<b>Conjugado IgG</b> antihumano de cabra HRP. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 60 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DIL</span>	Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color púrpura.
1 x 15 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SUBSTRATE TMB</span>	Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. <b>Proteger de la luz.</b>
1 x 15 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">STOP H2SO4</span>	Solución de parada*. Lista para su utilización.
2 x	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BUF WASH</span>	Tampón de lavado en polvo. <b>Reconstituir a un litro cada uno.</b>
1 x		Hojas de protocolo

ELISA ImmuLis™ Anticuerpos Sm

REF 5127

ES 12 x 8	<b>MICROPLATE SM</b>	<b>Microplaca</b> con micropocillos individuales escindibles. Revestida con antígeno Sm. Lista para su utilización.
1 x 1.75 ml	<b>CONTROL+ SM</b>	<b>Control Positivo</b> listo para su utilización ( <i>tapón rojo</i> ). Contiene suero humano positivo en anticuerpos Sm. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.
1 x 1.75 ml	<b>CONTROL- </b>	<b>Control Negativo</b> listo para su utilización ( <i>tapón blanco</i> ). Contiene suero humano.
5 x 1.75 ml	<b>CALIBRATOR A SM</b> <b>CALIBRATOR B SM</b> <b>CALIBRATOR C SM</b> <b>CALIBRATOR D SM</b> <b>CALIBRATOR E SM</b>	<b>Juego de 5 calibradores</b> 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 Sm. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.
1 x 15 ml	<b>IgG-CONJ HRP</b>	<b>Conjugado IgG</b> antihumano de cabra HRP. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b>	Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color púrpura.
1 x 15 ml	<b>SUBSTRATE TMB</b>	Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. <b>Proteger de la luz</b> .
1 x 15 ml	<b>STOP H2SO4</b>	Solución de parada*. Lista para su utilización.
2 x	<b>BUF WASH</b>	Tampón de lavado en polvo. <b>Reconstituir a un litro cada uno</b> .
1 x		Hojas de protocolo

### Componentes opcionales

1 x 60ml	<b>BUF WASH</b>	Tampón de lavado líquido concentrado. <b>Reconstituir a un litro</b> .
----------	-----------------	---

### Símbolos utilizados en las etiquetas

<b>LOT</b>	Número de lote
<b>REF</b>	Número de catálogo
<b>IVD</b>	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Consulte las instrucciones de uso
	Número de análisis
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	*Peligro. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Provoca lesiones oculares graves. Lavarse concienzudamente tras la manipulación. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

### 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

## ES

- 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 se deberían utilizar 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 períodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras 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 períodos 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			
	Base	S5	Etc.	A	Base	S1	Etc.
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 n **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500µl** 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** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lávolo **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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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 absorbancia 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, deberá 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

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/en el límite deberían ser reanalizados y evaluados junto con otros métodos de laboratorio para la detección de anticuerpos anti-ENA.

### **Interpretación**

Los valores de interpretación fueron determinados analizando las muestras de sangre de 80 donantes normales. El límite se estableció utilizando la media de los sujetos normales más 2,5 SD para el ELISA Anticuerpos RNP y 3,5 SD para el ELISA Anticuerpos Sm. Al límite se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. IMMCO recomienda la utilización del registro de referencia siguiente. Cada laboratorio debería validar los valores del ensayo para sus propias condiciones.

<b>Valor anticuerpos anti-RNP</b>	<b>Valor anticuerpos anti-Sm</b>	<b>Interpretación</b>
<20 EU/ml	<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	20-25 EU/ml	Indeterminado (Límite)
>25 EU/ml	>25 EU/ml	Positivo

### **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.

### **VALORES ESPERADOS**

Normalmente se espera que los resultados de los análisis en la población normal sean negativos. La incidencia de los anticuerpos ENA en varias enfermedades sistémicas de los tejidos conectivos se resume en la tabla siguiente:

#### Importancia diagnóstica de los antígenos de anticuerpos anti-RNP y Sm

Asociación	Asociación con enfermedades (% Incidencia)
RNP	LES (20-30%) EMTC (95-100%)
Sm	LES (10-40%)

LES = lupus eritematoso sistémico

EMTC = enfermedad mixta tejido conectivo

Nota: La frecuencia de cada especificidad de anticuerpos en una enfermedad representa una compilación de documentación.<sup>3</sup> La incidencia varía en función de cada paciente.

ES

## CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA ImmuLisa™ para anticuerpos RNP y Sm fue evaluada analizando especímenes de suero positivos en anticuerpos ENA característicos junto con controles de enfermedades y sueros humanos "normales". Estos especímenes también fueron analizados con equipos de análisis de disponibles comercialmente. Sólo se incluyeron en la comparación los especímenes del registro lineal del ensayo. Los resultados se resumen a continuación.

A. Comparación de métodos: ELISA ImmuLisa™ anticuerpos RNP vs. otros equipos para anticuerpos RNP:

### Otros ELISA Anticuerpos RNP

		Positivo	Negativo	Total
<b>IMMCO</b>	Positivo	43	3	46
<b>RNP</b>	Negativo	2	95	97
<b>ELISA Anticuerpos</b>	Total		45	98 143

Concordancia de porcentaje positivo: 95,6% (95% CI 83,6% a 99,2%)

Concordancia de porcentaje negativo: 96,9% (95% CI 90,7% a 99,2%)

Concordancia relativa: 96,5% (95% CI 91,6% a 98,7%)

B. Comparación de métodos: ELISA ImmuLisa™ anticuerpos Sm vs. otros equipos para anticuerpos Sm:

### Otro ELISA Anticuerpos Sm

		Positivo	Negativo	Total
<b>IMMCO</b>	Positivo	53	12	65
<b>Anticuerpos Sm</b>	Negativo	2	167	169
<b>ELISA</b>	Total	55	179	234

Concordancia de porcentaje positivo: 96,4% (95% CI 86,4% a 99,4%)

Concordancia de porcentaje negativo: 93,3% (95% CI 88,3% a 96,3%)

Concordancia relativa: 94,0% (95% CI 90,0% a 96,6%)

C. Reactividad cruzada: Se seleccionaron un total de 80 especímenes potencialmente positivos en anticuerpos coincidentes o con reactividad cruzada de individuos que daban positivo en otros anticuerpos ENA o que padecían otras en enfermedades autoinmunes y a continuación fueron analizados para detección de anticuerpos RNP y Sm utilizando los ensayos ImmuLisa™.

Enfermedad	n	Pos Ant RNP		Enfermedad	n	Pos Ant Sm	
		n	n (%)			n	n (%)
<b>Pos Ant asociado ENA</b>							
Jo-1	8	0		Jo-1	8	0	
La	8	0		La	8	0	
Pm-Scl	8	1		Pm-Scl	8	0	
Ro	8	0		Ro	8	0	
Scl-70	8	4		Scl-70	8	1	
Sm	8	1		RNP	8	3	
Total	48	6 (12,5)			48	4 (12)	
<b>Enfermedades autoinmunes con potencial reactividad cruzada</b>							
Enfermedad celíaca	8	0		Enfermedad celíaca	8	0	
Hashimoto	8	0		Hashimoto	8	0	
Artritis reumatoide	8	0		Artritis reumatoide	8	0	
Vasculitis	8	0		Vasculitis	8	0	
Total	32	0 (0)			32	0 (0)	

### Precisión

La precisión fue analizada con especímenes positivos seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron análisis de 4 muestras duplicadas de cada espécimen durante 4 días. La repetibilidad fue determinada con 8 muestras duplicadas de cada espécimen.

Equipo	N o S	Media (EU/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
	Ensayo	1	8,4	0,419	5,0%	0,353	4,2%	0,553

**ES**

Ant RNP	2	17,7	1,721	9,7%	1,670	9,8%	0,385	2,0%
	3	23,7	2,289	9,7%	2,193	9,5%	2,184	8,9%
	4	61,6	5,103	8,3%	5,431	9,0%	2,581	4,0%
	5	95,6	4,630	4,8%	4,995	5,2%	3,591	3,8%
	6	198,1	8,584	4,3%	7,720	3,8%	7,781	4,0%
	1	2,3	0,235	10,2%	0,273	11,9%	0,150	6,5%
Ensayo Ant Sm	2	14,1	0,624	4,4%	0,464	3,2%	0,361	2,7%
	3	19,7	1,136	5,8%	1,373	7,0%	0,444	2,2%
	4	30,0	1,644	5,5%	1,844	6,1%	1,043	3,5%
	5	66,7	3,791	5,7%	3,742	5,7%	2,432	3,5%
	6	120,8	6,133	5,1%	6,701	5,6%	4,687	3,8%

**Reproducibilidad**

Se realizaron ocho muestras duplicadas en el registro negativo, ~20% por debajo del límite, ~20% por encima del límite y en el registro positivo moderado del ensayo para determinar la reproducibilidad cualitativa dentro del ensayo. Se analizaron 4 muestras duplicadas de las mismas muestras en 4 series para determinar la reproducibilidad dentro del ensayo. Los resultados de los análisis de estos especímenes dieron una concordancia cualitativa 100%.

**Límite de detección n**

El límite de detección (LD) fue determinado en base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS). El LD para anticuerpos RNP era de 3,0 EU/ml. El LD para anticuerpos Sm era de 4,2 EU/ml.

**Linealidad y recuperación**

Se realizaron estudios utilizando series de dilución equidistantes de muestras positivas con valores de todo el ámbito del calibrador para determinar el ámbito lineal del ensayo. El registro lineal de los ensayos se fijó en 3,0 (LD) – 400 EU/ml para anticuerpos RNP y 4,2 (LD) – 255 EU/ml para anticuerpos Sm. Los resultados se resumen a continuación n.

Registro de análisis (EU/ml)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R <sup>2</sup>	% recuperación (obtenido/esperado)
<b>Anticuerpos RNP</b>				
4,4 a 136	0,98 (0,95 a 1,00)	2,1 (1,8 a 3,0)	0,9979	88,9 a 103,3
263 a 611,1	1,27 (1,10 a 1,51)	-15,6 (-16,1 a -14,2)	0,9817	96,1 a 139,8
7,2 a 70,3	0,97 (0,88 a 1,14)	0,5 (0,3 a 0,7)	0,9958	97,3 a 106,9
<b>Sm</b>				
5,2 a 75,8	1,01 (0,93 a 1,51)	-0,5 (-0,8 a 0,1)	0,9987	97,3 a 105,7
4,8 a 93,9	1,00 (0,90 a 1,51)	1,1 (0,3 a 1,8)	0,9963	90,9 a 102
5,3 a 317,9	0,72 (0,61 a 1,51)	-2,2 (-4,0 a -0,2)	0,9753	101,9 a 159,6

**Interferencia**

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de anticuerpos RNP y Sm 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 µmol/L), y Factor Reumatoide (100 EU/ml).

## ImmunoLISA™

# ENA-Antikörper-ELISA

**RNP-Antikörper-ELISA**  
**Sm-Antikörper-ELISA**

**[IVD]** Für *in vitro* diagnostischen Gebrauch Voorgeschreven gebruik alleen

### PRODUKTBEILAGE

<b>REF</b>	5126	RNP-Antikörper-ELISA 96Bestimmungen
<b>REF</b>	5127	SM-Antikörper-ELISA 96Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Ein enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA) für die Erfassung und Halbquantifizierung von Sm- oder RNP-Antikörpern im Humanserum als eine Arbeitshilfe in der Diagnose des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und assoziierter Bindegewebserkrankungen in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

ENA sind lösliche Ribonukleoprotein-(Snurps)-Komplexe. Gegen verschiedene ENA gerichtete Autoantikörper haben sich in der Diagnose und Überwachung von verschiedenen systemischen Bindegewebserkrankungen als von Wert erwiesen. Anti-Sm-Antikörper sind krankheitsspezifisch und sind daher ein Marker für den systemischen Lupus erythematoses (SLE). Antikörper zu Sm treten bei etwa 30-40 % von SLE-Patienten auf. Sie sind bei anderen systemischen Bindegewebserkrankungen selten und wenn vorhanden, zeigen sie entweder Krankheitsüberlagerung oder Patienten, die die ARA-Kriterien für SLE noch nicht erfüllt haben an.<sup>1-9</sup> Andere Antikörper wie z. B. gegen SS-A (Ro), SS-B (La) und RNP gerichteten, sind nicht krankheitsspezifisch.

Antikörper zu RNP treten in 35-45 % von SLE-Patienten und in mehr als 95 % von Patienten mit gemischter Bindegewebserkrankung (MCTD) auf. Gelegentlich sind sie auch bei Sklerodermie, Rheumatoïdarthritis und drogeninduziertem LE zu finden.<sup>1-6</sup>

Patienten mit Anti-RNP-Antikörpern haben eine niedrigere Inzidenz von Nierenerkrankung verglichen mit Patienten mit Anti-Sm-Antikörpern. Antikörper zu SS-A (Ro) und SS-B (La) treten bei etwa 30-40 % und 10-15 % von SLE-Patienten und 60-70 % und 40-60 % von Patienten mit dem Sjögren-Syndrom auf.

Diese Antikörper können durch verschiedene Methoden erkannt werden. ELISA-Methodik ist im Vorteil gegenüber älteren Technologien wie z. B. Immundiffusion: Ausführungszeiten der Prüfung sind reduziert, die individuelle Subjektivität im Lesen von Resultaten ist eliminiert, Quantifizierung wird ohne Serumtitration erreicht, es gibt Potenzial für die Automatisierung und ELISAs bieten eine höhere Sensitivität<sup>10</sup>.

### GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Der Test wird als ein Festphasenimmunoassay ausgeführt. Mikrovertiefungen werden mit gereinigtem Sm- oder RNP-Antigen beschichtet. Dem folgt ein Blockierungsschritt, um eine nichtspezifische Proteinbindung während des Prüfungssablaufs zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und Patientenserien werden in den mit Antigen beschichteten Vertiefungen inkubiert, um im Serum vorhandenen spezifischen Antikörpern zu ermöglichen, sich an das Antigen zu binden. Ungebundene Antikörper und andere Serum-Proteine werden durch Waschen der Mikrovertiefungen entfernt. Bestimmte Antikörper werden durch Hinzufügen von einem enzymmarkierten anti-menschlichen IgG-Konjugat zu den Mikrovertiefungen erkannt. Ungebundenes 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

DE

## Lagerung und Vorbereitung

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.<sup>11</sup>

**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 mikrobielle und Querkontamination von Reagenzien beim Handling zu minimieren. Verwenden Sie die Kit-Komponenten nicht über das auf den Etiketten angegebene Ablaufdatum hinaus.

## Bereitgestellte Materialien

Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

ImmuLisa™ RNP Antikörper-ELISA	[REF] 5126
12 x 8 [MICROPLATE RNP]	Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit RNP-Antigenen. Gebrauchsfertig.
1 x 1.75 ml [CONTROL+ RNP]	Einsatzbereite <b>Positivkontrolle</b> (roter Verschlussdeckel). Enthält für RNP-Antikörper positives Humanserum. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1.75 ml [CONTROL-]	Einsatzbereite <b>Negativkontrolle</b> (weißer Verschlussdeckel). Enthält Humanserum.
5 x 1.75 ml [CALIBRATOR A RNP] [CALIBRATOR B RNP] [CALIBRATOR C RNP] [CALIBRATOR D RNP] [CALIBRATOR E RNP]	Einsatzbereiter Satz von 5 <b>Kalibratoren</b> . 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 (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 EU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das RNP-Antikörper enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.
1 x 15 ml [IgG-CONJ HRP]	HRP-Ziege anti-menschliches <b>IgG-Konjugat</b> . Gebrauchsfertig. Farocode rosa.
1 x 60 ml [DIL]	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farocode lila.
1 x 15 ml [SUBSTRATE TMB]	TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. <b>Vor Licht schützen</b> .
1 x 15 ml [STOP H2SO4]	Stopp-Lösung*. Gebrauchsfertig.
2 x [BUF WASH]	Pulver Waschpuffer. Zu je einem Liter <b>wiederherstellen</b> .
1 x	Protokollblätter

## ImmuLisa™ Sm-Antikörper-ELISA

12 x 8 [MICROPLATE SM]	[REF] 5127
	Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit Sm-Antigen.

## DE

1 x 1,75 ml **CONTROL+SM**

Gebrauchsfertig.

Einsatzbereite **Positivkontrolle** (roter Verschlussdeckel) Enthält für Sm-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|SM**

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 (oranger Verschlussdeckel) 1 EU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das Sm-Antikörper enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.

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

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

1 x 60 ml **DIL**

Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farocode lila.

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

**LOT** Chargennummer

**REF** Katalognummer

**IVD** In vitro diagnostischer Gebrauch

Verwenden bis

Lagertemperatur

Finden Sie Anweisungen für die Verwendung

Anzahl an Tests

Hersteller

Herstellungsdatum

\* Gefahr. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

### 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

## DE

- 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 mikrobiisch 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			Semiquantitativ		
A	Leerprobe	S5	usw.	A	Leerprobe
B	-Kontrolle	S6		B	-Kontrolle
C	+ Kontrolle	S7		C	+ Kontrolle
D	Cal D	S8		D	Cal A
E	S1	S9		E	Cal B
F	S2	S10		F	Cal C
G	S3	S11		G	Cal D
H	S4	S12		H	Cal E

1            2            3            1            2            3

DE

- Schritt 4** 1:101 Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von **5 µl** der Patientenserien mit **500µl** 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** ( $\pm$  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 blöten. 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** ( $\pm$  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** ( $\pm$  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

## DE

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 für die Erfassung von Antikörpern zu ENA bewertet werden.

### Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen von 80 normalen Blutspendern bestimmt. Der Cutoff wurde unter Verwendung des Mittelwerts der normalen Probanden plus 2,5 SD für RNP Ab ELISA und 3,5 SD für Sm Ab ELISA bestimmt. Der Cutoff wurde einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugeordnet. IMMCO empfiehlt den Gebrauch des nachstehenden Referenzbereichs. Jedes Labor sollte Prüfungswerte für seine eigenen Bedingungen validieren.

anti-RNP Ab Wert	anti-Sm Ab Wert	Ausdeutung
<20 EU/ml	<20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	20-25 EU/ml	Unbestimmt (Grenze)
>25 EU/ml	>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, mikrobiisch 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.

## ERWARTETE WERTE

Bei einer normalen Population sind die Testresultate gewöhnlich als negativ zu erwarten. Die Inzidenz von ENA Antikörpern bei verschiedenen systemischen Bindegewebserkrankungen ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

### Diagnostische Bedeutung von Antikörpern zu RNP- und Sm-Antigenen

Antikörper	Erkrankungsassoziation (%-Inzidenz)
RNP	SLE (20-30%) MCTD (95-100%)
Sm	SLE (10-40%)

SLE = systemischer Lupus erythematoses

MCTD = gemischte Bindegewebserkrankung

Hinweis: Die Häufigkeit jeder Antikörper-Spezifität bei einer Erkrankung repräsentiert die Zusammenstellung aus der Literatur.<sup>3</sup> Die Inzidenz variiert abhängig von der Patientenpopulation.

## LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Nützlichkeit von Immulisa™ RNP- und Sm-Antikörper-ELISA wurde durch Prüfen gut charakterisierter ENA-Antikörper Positiverumproben neben Krankheitsbekämpfungen und "normalen" Humanseren bewertet. Diese Proben wurden auch bei handelsüblichen Test-Kits geprüft. Nur Proben im linearen Bereich der Prüfung wurden in den Methodenvergleich eingeschlossen. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

DE

A. Methodenvergleich: ImmuLisa™ RNP-Antikörper-ELISA gegenüber anderen RNP-Antikörper-Kits:

**Andere RNP-Antikörper-ELISA**

		Positiv	Negativ	Gesamt
<b>IMMCO</b>	Positiv	43	3	46
<b>RNP</b>	Negativ	2	95	97
<b>Ab ELISA</b>	Total	45	98	143

Positive Prozent-Übereinstimmung: 95,6% (95% CI 83,6% bis 99,2%)

Negative Prozent-Übereinstimmung: 96,9% (95% CI 90,7% bis 99,2%)

Relative Übereinstimmung: 96,5% (95% CI 91,6% bis 98,7%)

B. Methodenvergleich: ImmuLisa™ Sm-Antikörper-ELISA gegenüber anderen Sm-Antikörper-Kits:

**Andere Sm-Antikörper-ELISA**

		Positiv	Negativ	Gesamt
<b>IMMCO</b>	Positiv	53	12	65
<b>Sm Ab</b>	Negativ	2	167	169
<b>ELISA</b>	Gesamt	55	179	234

Positive Prozent-Übereinstimmung: 96,4% (95% CI 86,4% bis 99,4%)

Negative Prozent-Übereinstimmung: 93,3% (95% CI 88,3% bis 96,3%)

Relative Übereinstimmung: 94,0% (95% CI 90,0% bis 96,6%)

C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 80 potenziell koinzidente Antikörper positive oder kreuzreaktive Proben wurden von Personen positiv für andere Antikörper von ENA oder die unter anderen Autoimmunerkrankungen leiden ausgewählt und auf RNP- und Sm-Antikörper unter Verwendung von ImmuLisa™ geprüft.

Zustand	RNP Ab Pos		Zustand	Sm Ab Pos	
	n	n (%)		n	n (%)
<b>Assoziierte ENA Ab Pos</b>					
Jo-1	8	0	Jo-1	8	0
La	8	0	La	8	0
Pm-Scl	8	1	Pm-Scl	8	0
Ro	8	0	Ro	8	0
Scl-70	8	4	Scl-70	8	1
Sm	8	1	RNP	8	3
Gesamt	48	6 (12,5)		48	4 (12)
<b>Potenziell kreuzreaktive Autoimmunerkrankungen</b>					
Zöliakie	8	0	Zöliakie	8	0
Hashimoto	8	0	Hashimoto	8	0
Rheumatoïdarthritis	8	0	Rheumatoïdarthritis	8	0
Vaskulitis	8	0	Vaskulitis	8	0
Gesamt	32	0 (0)		32	0 (0)

**Präzision**

Die Präzision wurde mit aus dem gesamten Bereich der Prüfung ausgewählten positiven Proben geprüft. Prüfungsabläufe von 4 Replikaten jeder Probe wurden in 4 Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 8 Replikaten jeder Probe bestimmt.

Kit	S #	Mittel- wert EU/ml	Gesamt- ungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
			EU/ml	CV %	EU/ml	CV %	EU/ml	CV %
RNP Ab Assay	1	8,4	0,419	5,0 %	0,353	4,2 %	0,553	6,5 %
	2	17,7	1,721	9,7 %	1,670	9,8 %	0,385	2,0 %
	3	23,7	2,289	9,7 %	2,193	9,5 %	2,184	8,9 %
	4	61,6	5,103	8,3 %	5,431	9,0 %	2,581	4,0 %
	5	95,6	4,630	4,8 %	4,995	5,2 %	3,591	3,8 %
	6	198,1	8,584	4,3 %	7,720	3,8 %	7,781	4,0 %

	1	2,3	0,235	10,2 %	0,273	11,9 %	0,150	6,5 %
	2	14,1	0,624	4,4 %	0,464	3,2 %	0,361	2,7 %
Sm Ab Assay	3	19,7	1,136	5,8 %	1,373	7,0 %	0,444	2,2 %
	4	30,0	1,644	5,5 %	1,844	6,1 %	1,043	3,5 %
	5	66,7	3,791	5,7 %	3,742	5,7 %	2,432	3,5 %
	6	120,8	6,133	5,1 %	6,701	5,6 %	4,687	3,8 %

### Reproduzierbarkeit

8 Replikate von Proben im negativen Bereich, ~20 % unter dem Cutoff, ~20 % über dem Cutoff und im mittelmäßigen positiven Bereich der Prüfung wurden ausgeführt, um qualitative Intra-Assay-Reproduzierbarkeit zu bestimmen. 4 Replikate der gleichen Proben wurden in 4 Durchgängen geprüft, um die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Resultate der Prüfung für diese Proben erzeugten qualitative Übereinstimmung von 100 %.

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde bestimmt basierend auf 60 Replikaten der Leerprobe und 10 Replikaten von je 6 Proben auf niedriger Stufe (NHS). LoD für RNP Ab war 3,0 EU/ml. LoD für Sm Ab war 4,2 EU/ml.

### Linearität und Rückgewinnung

Studien wurden unter Verwendung von abstandsgleichen Verdünnungsreihen von positiven Proben mit Werten überall im Bereich des Kalibrators ausgeführt, um den linearen Bereich der Prüfung zu bestimmen. Der lineare Bereich der Prüfungen wurde bestimmt zu 3,0 (LoD) - 400 EU/ml für RNP Ab und 4,2 (LoD) - 255 EU/ml für Sm Ab. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

Prüfbereich EU/ml	Anstieg (95 % CI)	Y-Achsenabschnitt (95 % CI)	R <sup>2</sup>	% Rückgewinnung (Erhalten/Erwartet)
RNP Ab				
4,4 bis 136	0,98 (0,95 bis 1,00)	2,1 (1,8 bis 3,0)	0,9979	88,9 bis 103,3
263 bis 611,1	1,27 (1,10 bis 1,51)	15,6 (-16,1 bis 14,2)	0,9817	96,1 bis 139,8
7,2 bis 70,3	0,97 (0,88 bis 1,14)	0,5 (0,3 bis 0,7)	0,9958	97,3 bis 106,9
Sm				
5,2 bis 75,8	1,01 (0,93 bis 1,51)	-0,5 (-0,8 bis 0,1)	0,9987	97,3 bis 105,7
4,8 bis 93,9	1,00 (0,90 bis 1,51)	1,1 (0,3 bis 1,8)	0,9963	90,9 bis 102
5,3 bis 317,9	0,72 (0,61 bis 1,51)	2,2 (-4,0 bis 0,2)	0,9753	101,9 bis 159,6

### Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten RNP- und Sm-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 µmol/L) und Rheumafaktor (100 EU/ml).

## ImmunoLisa™

# ANS Anticorps ELISA

**RNP Anticorps ELISA**  
**Sm Anticorps ELISA**

**[IVD]** Pour utilisation à diagnostic *in vitro* Utilisation de prescription uniquement

### ENCART PRODUIT

<b>REF</b>	5126	RNP Anticorps ELISA	96 Déterminations
<b>REF</b>	5127	Sm Anticorps ELISA	96 Déterminations

### UTILISATION VISEE

L'immunoanalyse par liaison enzymique (ELISA) pour la détection et la semi-quantification des anticorps Sm et RNP dans le sérum humain, en tant qu'outil d'aide au diagnostic du Lupus Erythémateux Disséminé (LED) et des désordres de tissu conjonctif associés en conjonction avec d'autres résultats de laboratoires et cliniques.

### RESUME ET EXPLICATION

Les ANS sont des ribonucléoprotéines (snurps) complexes. Les auto-anticorps dirigés contre les divers ANS ont prouvé être de valeur dans le diagnostic et le suivi des différentes maladies du tissu conjonctif. Les anticorps anti-Sm sont maladie spécifiques et ainsi sont des marqueurs du Lupus Erythémateux Disséminé (LED). Les anticorps au Sm se trouvent chez environ 30 à 40% des patients atteints de LED. Ils sont rares dans les autres maladies systémiques du tissu conjonctif et s'ils sont présents, alors ils indiquent soit une superposition de la maladie soit des patients qui n'ont pas encore remplis les critères ARA pour le LED<sup>1-9</sup>. D'autres anticorps tels que ceux dirigés contre les SS-A (Ro), les SS-B (La) et les RNP ne sont pas propres à la maladie.

Les anticorps au RNP se trouvent chez 35 à 45% des patients atteints de LED et chez plus de 95% des patients avec une connectivité mixte (MCTD). Ils se rencontrent également parfois dans la sclérodermie, l'arthrite rhumatoïde et la LE provoqué par les médicaments<sup>1-6</sup>.

Les patients avec des anticorps anti-RNP ont une importance moindre sur la maladie rénale comparée aux patients avec des anticorps anti-Sm. Les anticorps au SS-A (Ro) et au SS-B (La) se trouvent chez environ 30 à 40% et de 10 à 15% des patients atteints de LED et chez respectivement 60 à 70% et 40 à 60% des patients atteints du syndrome de Sjögren.

Ces anticorps peuvent être détectés par divers méthodes. La méthodologie ELISA a beaucoup d'avantages par rapport aux technologies plus anciennes telle que l'immunodiffusion : les temps d'analyse sont réduits, la subjectivité individuelle de lecture des résultats est éliminée, la quantification est atteinte sans un tirage du sérum, il y a un potentiel pour l'automatisme et les analyses ELISA proposent une sensibilité plus grande<sup>10</sup>.

### PRINCIPES DE LA PROCEDURE

Le test est réalisé en tant que immunoessai en phase solide. Les micro-récepteurs sont couverts d'antigènes purifiés Sm et RNP suivi d'une mesure de blocage pour réduire l'union non-spécifique durant la phase d'essai. Les contrôles, les calibrages et le sérum patient sont incubés dans les récepteurs 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-récepteurs. Les anticorps reliés sont détectés en ajoutant un conjugué d'enzyme étiquetée anti-humain IgG aux micro-récepteurs. Le conjugué non-relié est enlevé par lavage. Un substrat d'enzyme spécifique (TMB) est alors ajouté aux récepteurs et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur produit par la conversion du substrat TMB en un produit à réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont donnés en ELISA Units par millilitre (EU/ml) et signalés comme positifs ou négatifs.

FR

## 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.

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-récepteurs sont pour un usage unique. Les lamelles de micro-récepteurs non utilisées doivent être réapposées 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 matériaux.<sup>11</sup>

**Les instructions doivent être suivies à la lettre 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

Les kits contiennent assez de réactifs pour réaliser 96 déterminations.

ImmuLisa™ RNP Anticorps ELISA

[REF] 5126

12 x 8 [MICROPLATE|RNP]

**Microplaqué** avec des micro-récepteurs individuels séparés. Couverte avec un antigène RNP. Prête à l'emploi.

1 x 1.75 ml [CONTROL+RNP]

**Contrôle positif** (capsule rouge) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain positif aux anticorps RNP. 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|RNP]  
[CALIBRATOR|B|RNP]  
[CALIBRATOR|C|RNP]  
[CALIBRATOR|D|RNP]  
[CALIBRATOR|E|RNP]

Série de **5 Calibrateurs** prêts à l'emploi. Calibreur A (capsule verte) 160 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 RNP. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.

1 x 15 ml [IgG-CONJ|HRP]

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

1 x 60 ml [DIL]

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

1 x 15 ml [SUBSTRATE|TMB]

Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi. **A protéger de la lumière.**

1 x 15 ml [STOP|H2SO4]

Solution stop\*. Prêt à l'emploi.

2 x [BUF|WASH]

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

1 x

Feuilles de protocole

ImmuLisa™ Sm Anticorps ELISA

[REF] 5127

12 x 8 [MICROPLATE|SM]

**Microplaqué** avec des micro-récepteurs individuels séparés. Couverte avec un antigène Sm. Prête à l'emploi.

1 x 1.75 ml [CONTROL+|SM]

**Contrôle positif** (capsule rouge) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain positif aux anticorps

## FR

1 x 1.75 ml	<b>CONTROL[-]</b>	Sm. L'éventail de concentration espéré en EU/ml est imprimé sur l'étiquette.
5 x 1.75 ml	<b>CALIBRATOR ASM</b> <b>CALIBRATOR BSM</b> <b>CALIBRATOR CSM</b> <b>CALIBRATOR DSM</b> <b>CALIBRATOR ESM</b>	<b>Contrôle négatif</b> (capsule blanche) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain.
		Série de <b>5 Calibreurs</b> prêts à l'emploi. Calibreur A (capsule verte) 160 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 Sm. Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
1 x 15 ml	<b>IgG-CONJ HRP</b>	<b>Conjugué IgG</b> de HRP goat antihumain. Prêt à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b>	Diluant sérum. Prêt à l'emploi. Code couleur violet.
1 x 15 ml	<b>SUBSTRATE TMB</b>	Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi. <b>A protéger de la lumière.</b>
1 x 15 ml	<b>STOP H2SO4</b>	Solution stop*. Prêt à l'emploi.
2 x	<b>BUF WASH</b>	Tampon de lavage en poudre. <b>Réhydratez jusqu'à un litre chacun.</b>
1 x		Feuilles de protocole

### Composants optionnels

1 x 60ml	<b>BUF WASH</b>	Tampon de lavage en liquide concentré. <b>Réhydratez jusqu'à un litre.</b>
----------	-----------------	---

### Symboles utilisés sur les étiquettes.

<b>LOT</b>	Numéro de Lot
<b>REF</b>	Numéro catalogue
<b>IVD</b>	Utilisation à diagnostic in vitro
	A utiliser avant :
	Température de stockage
	Consulter les instructions d'emploi
	Nombre de tests
	Fabricant
	Date de fabrication
	*Danger. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

### 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

FR

- 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 préparés 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 boite pendant 30 minutes avant utilisation. Replacez 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 microplaqué. **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 contrôlé 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 réalisé 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 (fiole 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			Semi-quantitative		
A	Vierge	S5	Etc.	A	Vierge
B	-Contrôle	S6		B	-Contrôle
C	+ Contrôle	S7		C	+ Contrôle
D	Cal D	S8		D	Cal A
E	S1	S9		E	Cal B
F	S2	S10		F	Cal C
G	S3	S11		G	Cal D
H	S4	S12		H	Cal E

**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.

FR

- 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-récepteurs appropriés selon la feuille de protocole.
- A noter :** Inclure un récepteur 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 ( $\pm$  5 min) à température ambiante.
- Etape 8** Laver **4x** avec le tampon à lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micro-récepteur avec du tampon à lavage reconstitué. Débarrassez-vous du fluide en inversant et en tapotant le contenu de chaque récepteur ou bien en aspirant le liquide de chaque récepteur. Afin de buvarder à la fin du dernier lavage, inversez les lamelles et tapotez vigoureusement les récepteurs 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-récepteurs.
- Etape 10** Incubez **30 minutes** ( $\pm$  5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Lavez tous les micro-récepteurs comme lors de l'étape 8.
- Etape 12** Pipetez **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque micro-récepteur dans le même ordre et selon le même minutage que pour le conjugué.
- Etape 13** Incubez **30 minutes** ( $\pm$  5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipetez **100 µl** de solution stop dans chaque micro-récepteur 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-récepteur pour **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaques 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 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 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 pour la détection des anticorps ANS.

### Interprétation

## FR

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 80 donneurs de sang normaux. La limite supérieure a été établie en utilisant la moyenne des sujets normaux plus 2,5 SD pour le RNP Ab ELISA et 3,5 SD pour le Sm Ab ELISA. La limite supérieure a été fixée à une valeur arbitraire de 20 EU/ml. 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-RNP Ab	valeur anti-Sm Ab	Interprétation
<20 EU/ml	<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	20-25 EU/ml	Indéterminé (Limite)
>25 EU/ml	>25 EU/ml	Positif

### Calibreur

Les calibreurs prêts-à-l'emploi sont fournis pour permettre la semi-quantitation 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 réalisée sur des échantillons extrêmement hemolisés, contaminés de microbes ou lipémiques. Cette méthode ne doit être utilisée que pour le test 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. Cette analyse n'a pas été validée auprès d'une population pédiatrique.

## VALEURS ATTENDUES

Les résultats test auprès d'une population normale devraient normalement être négatifs. L'incidence des anticorps ANS dans différentes maladies du tissu conjonctif est résumée dans le tableau ci-dessous.

### Importance diagnostic des anticorps aux antigènes RNP et Sm

Anticorps	Association maladie (% d'incidence)
RNP	LED (20 à 30%) MCTD (95 à 100%)
Sm	LED (10 à 40%)

LED = lupus érythémateux disséminé

MCTD = connectivite mixte

A noter : la fréquence de chaque spécificité d'anticorps dans une maladie représente une compilation tirée de la bibliographie<sup>3</sup>. L'incidence varie en fonction de la population patient.

## CHARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE

L'utilité des solutions ImmuLisa™ RNP et Sm Anticorps ELISA a été évaluée en testant des spécimens de sérum bien-caractérisés positifs à l'anticorps ANS avec des contrôles de maladie et du sérum humain « normal ». Ces spécimens ont également été testés avec des kits disponibles dans le commerce. Seuls les spécimens dans l'éventail linéaire de l'analyse ont été utilisés dans la méthode de comparaison. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

### A. Comparaison de méthodes : ImmuLisa™ RNP Anticorps ELISA contre d'autres kits anticorps RNP :

Autres RNP Anticorps ELISA			
	Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	43	3
RNP	Négatif	2	95
Ab ELISA	Total	45	98
			143

Concordance en pourcentage cas positifs: 95,6% (95% CI 83,6% à 99,2%)

Concordance en pourcentage cas négatifs: 96,9% (95% CI 90,7% à 99,2%)

Concordance relative: 96,5% (95% CI 91,6% à 98,7%)

FR

## B. Comparaison de méthodes : ImmuLisa™ Sm Anticorps ELISA contre d'autres kits anticorps Sm :

### Autre Sm Ab ELISA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	53	12	65
Sm Ab	Négatif	2	167	169
ELISA	Total	55	179	234

Concordance en pourcentage cas positifs 96,4% (95% CI 86,4% à 99,4%)

Concordance en pourcentage cas négatifs 93,3% (95% CI 88,3% à 96,3%)

Concordance relative 94,0% (95% CI 90,0% à 96,6%)

C. Réactivité croisée : un total de 80 spécimens potentiellement positifs anticorps simultanés ou à réactivité croisée, sélectionnés à partir d'individus positifs aux autres anticorps ANS ou souffrant d'autres désordres auto-immunitaires, ont été testés à la recherche d'anticorps RNP et Sm en utilisant les analyses ImmuLisa™.

Condition	RNP Ab Pos		Condition	Sm Ab Pos	
	n	n (%)		n	n (%)
<b>ANS Ab Pos associée</b>					
Jo-1	8	0	Jo-1	8	0
La	8	0	La	8	0
Pm-Scl	8	1	Pm-Scl	8	0
Ro	8	0	Ro	8	0
Scl-70	8	4	Scl-70	8	1
Sm	8	1	RNP	8	3
Total	48	6 (12,5)		48	4 (12)
<b>Maladies potentiellement à réactivité croisée</b>					
Maladie cœliaque	8	0	Maladie cœliaque	8	0
Hashimoto's	8	0	Hashimoto's	8	0
Arthrite Rhumatoïde	8	0	Arthrite Rhumatoïde	8	0
Angéite	8	0	Angéite	8	0
Total	32	0 (0)		32	0 (0)

### 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 quatre mesures de chaque spécimen pendant quatre jours. La fidélité des résultats a été déterminée avec 8 mesures de chaque spécimen.

Kit	S #	Moyen ne (EU/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		En cours d'exécution Fidélité	
			SD		SD		SD	
			(EU/ml)	CV%	(EU/ml)	CV%	(EU/ml)	CV%
Analyse RNP Ab	1	8,4	0,419	5,0%	0,353	4,2%	0,553	6,5%
	2	17,7	1,721	9,7%	1,670	9,8%	0,385	2,0%
	3	23,7	2,289	9,7%	2,193	9,5%	2,184	8,9%
	4	61,6	5,103	8,3%	5,431	9,0%	2,581	4,0%
	5	95,6	4,630	4,8%	4,995	5,2%	3,591	3,8%
	6	198,1	8,584	4,3%	7,720	3,8%	7,781	4,0%
Analyse Sm Ab	1	2,3	0,235	10,2%	0,273	11,9%	0,150	6,5%
	2	14,1	0,624	4,4%	0,464	3,2%	0,361	2,7%
	3	19,7	1,136	5,8%	1,373	7,0%	0,444	2,2%
	4	30,0	1,644	5,5%	1,844	6,1%	1,043	3,5%
	5	66,7	3,791	5,7%	3,742	5,7%	2,432	3,5%
	6	120,8	6,133	5,1%	6,701	5,6%	4,687	3,8%

### Reproductibilité

8 mesures d'échantillons dans l'éventail négatif, ~20% sous la limite, ~20% au-dessus de la limite et dans l'éventail des résultats positifs modérés dans le cadre de l'analyse, ont été réalisés pour déterminer la reproductibilité qualitative intra-analyse. 4 mesures des mêmes échantillons ont été testées lors de 4 exécutions afin de déterminer la reproductibilité inter-analyse. Les résultats des analyses sur ces spécimens ont donné une concordance qualitative de 100%.

### **Limite de détection**

La limite de détection (LoD) pour cette analyse a été déterminée à partir de 60 mesures d'échantillons vierges et 10 mesures de chacun des 6 échantillons avec des niveaux-bas (NHS). LoD pour RNP Ab était de 3,0 EU/ml. LoD pour Sm Ab était de 4,2 EU/ml.

### **Linéarité et rétablissement**

Des études ont été menées en utilisant des séries de dilution équidistantes d'échantillons positifs avec des valeurs comprises tout au long de l'éventail des calibreurs afin de déterminer l'étendue linéaire de l'analyse. L'étendue linéaire des analyses a été déterminée à 3,0 (LoD) – 400 EU/ml pour RNP Ab et 4,2 (LoD) – 255 EU/ml pour Sm Ab. Les résultats sont résumés ci-dessous.

Test Etendue (EU/ml)	Pente (95% CI)	Segment sur l'axe Y (95% CI)	R <sup>2</sup>	% de rétablissement (Obtenu/Attendu)
RNP Ab				
4,4 à 136	0,98 (0,95 à 1,00)	2,1 (1,8 à 3,0)	0,9979	88,9 à 103,3
263 à 611,1	1,27 (1,10 à 1,51)	-15,6 (-16,1 à -14,2)	0,9817	96,1 à 139,8
7,2 à 70,3	0,97 (0,88 à 1,14)	0,5 (0,3 à 0,7)	0,9958	97,3 à 106,9
Sm				
5,2 à 75,8	1,01 (0,93 à 1,51)	-0,5 (-0,8 à 0,1)	0,9987	97,3 à 105,7
4,8 à 93,9	1,00 (0,90 à 1,51)	1,1 (0,3 to 1,8)	0,9963	90,9 à 102
5,3 à 317,9	0,72 (0,61 à 1,51)	-2,2 (-4,0 à -0,2)	0,9753	101,9 à 159,6

### **Interférence**

L'interférence a été étudiée en mélangeant du sérum avec des niveaux d'anticorps RNP et Sm connus avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (2 g/L), Bilirubine (342 µmol/L), et facteur rhumatoïde (100 EU/ml).



## ImmuLisa™

# ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-ENA

**RNP Antibody ELISA**  
**Sm Antibody ELISA**

**[IVD]** Per uso diagnostico *in vitro* Solo uso di prescrizione

### FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

<b>REF</b>	5126	RNP Antibody ELISA	96 determinazioni
<b>REF</b>	5127	Sm Antibody ELISA	96 determinazioni

### USO PREVISTO

Dosaggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il rilevamento e la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-Sm o anti-RNP nel siero umano, come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistematico (LES) e dei disturbi del tessuto connettivo associati, in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

### RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Gli ENA sono complessi della ribonucleoproteina solubile (*snurps*). Gli autoanticorpi diretti contro vari ENA si sono dimostrati utili nella diagnosi e nel monitoraggio di varie malattie sistemiche del tessuto connettivo. Gli anticorpi anti-Sm sono specifici per malattia e costituiscono quindi un marcatore per il lupus eritematoso sistematico (LES). Anticorpi anti-Sm sono presenti in circa il 30-40% dei pazienti con LES. Sono rari in altre malattie sistemiche del tessuto connettivo e, se presenti, indicano sovrapposizione di più malattie oppure il fatto che i pazienti non hanno ancora soddisfatto i criteri ARA per il LES.<sup>1-9</sup> Altri anticorpi come ad esempio quelli diretti contro SS-A (Ro), SS-B (La) e RNP non sono specifici per malattia.

Anticorpi anti-RNP sono presenti nel 35-45% dei pazienti con LES e oltre il 95% dei pazienti con malattia mista del tessuto connettivo (MMTC). Raramente, sono anche presenti in condizioni come scleroderma, artrite reumatoide e LE iatrogeno.<sup>1-6</sup>

I pazienti con anticorpi anti-RNP hanno un'incidenza inferiore di nefropatia rispetto ai pazienti con anticorpi anti-Sm. Anticorpi anti-SS-A (Ro) e anti-SS-B (La) sono presenti in circa il 30-40% e il 10-15% dei pazienti con LES e, rispettivamente, nel 60-70% e il 40-60% dei pazienti con sindrome di Sjögren.

Questi anticorpi possono essere rilevati con vari metodi. La metodologia ELISA ha numerosi vantaggi rispetto alle tecnologie più datate come ad esempio l'immunodiffusione: tempi di esecuzione del dosaggio ridotti, soggettività individuale nei risultati di lettura eliminata, quantificazione senza titolazione del siero, possibilità di automazione e maggiore sensibilità dei test ELISA.<sup>10</sup>

### PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test viene eseguito come dosaggio immunoenzimatico in fase solida. I micropozzetti sono rivestiti con antigene Sm o RNP purificato, cui segue un passaggio di arresto per ridurre il legame proteico non specifico durante l'esecuzione del dosaggio. Controlli, calibratori e sieri del paziente vengono incubati nei pozetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene. Gli anticorpi non legati e le altre proteine seriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati aggiungendo ai micropozzetti un coniugato anti-IgG umane marcato enzimaticamente. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto ai pozetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e la presenza degli anticorpi viene rilevata 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 riportati 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.

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.<sup>11</sup>

**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

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

ImmunoLisa™ RNP Antibody ELISA

[REF] 5126

12 x 8 [MICROPLATE|RNP]

**Micripiastre** con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigeni RNP. Pronta per l'uso.

1 x 1.75 ml [CONTROL+|RNP]

**Controllo positivo** (tappo rosso), pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi anti-RNP. 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|RNP]

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-RNP. 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.

2 x [BUF|WASH]

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

1 x

Schede del protocollo

ImmunoLisa™ Sm Antibody ELISA

[REF] 5127

12 x 8 [MICROPLATE|SM]

**Micripiastre** con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene Sm. Pronta per l'uso.

IT

1 x 1.75 ml CONTROL+SM

1 x 1.75 ml CONTROL-

5 x 1.75 ml CALIBRATOR|A|SM  
CALIBRATOR|B|SM  
CALIBRATOR|C|SM  
CALIBRATOR|D|SM  
CALIBRATOR|E|SM

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

#### Componenti facoltativi

1 x 60 ml BUF|WASH Tampone di lavaggio concentrato liquido.  
**Ricostituire a un litro.**

#### Simboli utilizzati sulle etichette

 **Codice del lotto**

 **Numero di catalogo**

 Per uso diagnostico *in vitro*

 Utilizzare entro

 Temperatura di conservazione

 Consultare le istruzioni per l'uso

 Numero di test

 Fabbricante

 Data di fabbricazione

 \*Pericolo. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

#### 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 micripiastre capace di leggere valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micripiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.

IT

- 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

- 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 duplice.

**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
B	Controllo -	S6		B	Controllo -
C	Controllo +	S7		C	Controllo +
D	Cal D	S8		D	Cal A
E	S1	S9		E	Cal B
F	S2	S10		F	Cal C
G	S3	S11		G	Cal D
H	S4	S12		H	Cal E

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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  minuti) a temperatura ambiente.
- 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, 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

$$\frac{\text{Ass. campione test}}{\text{Ass. calibratore D}} \times \text{UE/ml del calibratore D} = \text{UE/ml del campione test}$$

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 per il rilevamento degli anticorpi anti-ENA.

### **Interpretazione**

I valori di interpretazione sono stati determinati testando 80 donatori di sangue normali. Il cut-off è stato stabilito utilizzando la media dei soggetti normali più 2,5 DS per RNP Antibody ELISA e più 3,5 DS per Sm Antibody ELISA. Al cut-off 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.

<b>Valore antic. anti-RNP</b>	<b>Valore antic. anti-Sm</b>	<b>Interpretazione</b>
<20 UE/ml	<20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	20-25 UE/ml	Indeterminato (borderline)
>25 UE/ml	>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.

### **VALORI PREVISTI**

I risultati del test previsti in una popolazione normale sono solitamente negativi. La tabella seguente riepiloga l'incidenza degli anticorpi anti-ENA in varie malattie sistemiche del tessuto connettivo.

Significato diagnostico degli anticorpi diretti contro gli antigeni RNP e Sm

Anticorpo	Associazione patologica (incidenza %)
RNP	LES (20-30%) MMTC (95-100%)
Sm	LES (10-40%)

LES = lupus eritematoso sistemico

MMTC = malattia mista del tessuto connettivo

Nota: la frequenza di ogni specificità anticorpale in una malattia rappresenta una raccolta di dati dalla letteratura.<sup>3</sup> L'incidenza varia a seconda della popolazione di pazienti.

### **CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI**

L'utilità dei dosaggi ImmuLisa™ RNP Antibody ELISA e Sm Antibody ELISA è stata valutata analizzando campioni positivi per gli anticorpi anti-ENA ben caratterizzati, accanto a controlli di malattia e sieri umani "normali". Questi campioni sono anche stati testati su kit di test commercialmente disponibili. Il confronto dei metodi ha incluso solo i campioni nell'intervallo lineare del dosaggio. Questi risultati sono riepilogati nella seguente tabella.

- A. Confronto dei metodi: ImmuLisa™ RNP Antibody ELISA vs. altro kit per il rilevamento degli anticorpi anti-RNP.

### Altro ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-RNP

		Positivo	Negativo	Totale
<b>IMMCO anti-RPN ELISA antic.</b>	Positivo	43	3	46
	Negativo	2	95	97
	Totale	45	98	143

Concordanza percentuale positiva: 95,6% (IC al 95%: da 83,6% a 99,2%)

Concordanza percentuale negativa: 96,9% (IC al 95%: da 90,7% a 99,2%)

Concordanza relativa: 96,5% (IC al 95%: da 91,6% a 98,7%)

B. Confronto dei metodi: ImmuLisa™ Sm Antibody ELISA vs. altro kit per il rilevamento degli anticorpi anti-Sm.

### Altro ELISA antic. anti-Sm

		Positivo	Negativo	Totale
<b>IMMCO antic. anti-Sm ELISA</b>	Positivo	53	12	65
	Negativo	2	167	169
	Totale	55	179	234

Concordanza percentuale positiva: 96,4% (IC al 95%: da 86,4% a 99,4%)

Concordanza percentuale negativa: 93,3% (IC al 95%: da 88,3% a 96,3%)

Concordanza relativa: 94,0% (IC al 95%: da 90,0% a 96,6%)

C. Reattività crociata: sono stati selezionati 80 campioni totali con positività antincorpale coincidente o con reattività crociata potenziali da soggetti positivi per altri anticorpi anti-ENA o affetti da altri disturbi autoimmuni e sono stati testati per gli anticorpi anti-RNP e anti-Sm utilizzando i dosaggi ImmuLisa™.

Condizione	Pos. antic. anti-RNP		Condizione	Pos. antic. anti-Sm	
	n	n (%)		n	n (%)
<b>Pos. antic. anti-ENA associata</b>					
Jo-1	8	0	Jo-1	8	0
La	8	0	La	8	0
Pm-Scl	8	1	Pm-Scl	8	0
Ro	8	0	Ro	8	0
Scl-70	8	4	Scl-70	8	1
Sm	8	1	RNP	8	3
Totali	48	6 (12,5)		48	4 (12)
<b>Malattie autoimmuni con reattività crociata potenziale</b>					
Malattia celiaca	8	0	Malattia celiaca	8	0
Tiroidite di Hashimoto	8	0	Tiroidite di Hashimoto	8	0
Artrite reumatoide	8	0	Artrite reumatoide	8	0
Vasculite	8	0	Vasculite	8	0
Totali	32	0 (0)		32	0 (0)

### Precisione

La precisione è stata testata con campioni positivi selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. In 4 giorni sono state condotte sessioni di dosaggio di 4 replicati di ogni campione. La ripetibilità è stata determinata con 8 replicati di ogni campione.

Kit	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 %
Dosaggi o antic. anti-RNP	1	8,4	0,419	5%	0,353	4,2%	0,553	6,5%
	2	17,7	1,721	9,7%	1,67	9,8%	0,385	2%
	3	23,7	2,289	9,7%	2,193	9,5%	2,184	8,9%
	4	61,6	5,103	8,3%	5,431	9%	2,581	4%
	5	95,6	4,63	4,8%	4,995	5,2%	3,591	3,8%
	6	198,1	8,584	4,3%	7,72	3,8%	7,781	4%
Dosaggi o antic. anti-Sm	1	2,3	0,235	10,2%	0,273	11,9%	0,15	6,5%
	2	14,1	0,624	4,4%	0,464	3,2%	0,361	2,7%
	3	19,7	1,136	5,8%	1,373	7%	0,444	2,2%
	4	30	1,644	5,5%	1,844	6,1%	1,043	3,5%
	5	66,7	3,791	5,7%	3,742	5,7%	2,432	3,5%

	6	120,8	6,133	5,1%	6,701	5,6%	4,687	3,8%
--	---	-------	-------	------	-------	------	-------	------

## Riproducibilità

Per determinare la riproducibilità qualitativa intra-dosaggio, sono stati eseguiti 8 replicati dei campioni nell'intervallo negativo, ~20% sotto il cut-off, ~20% sopra il cut-off e nell'intervallo positivo moderato del dosaggio. Per determinare la riproducibilità inter-dosaggio, sono stati analizzati in 4 sessioni analitiche 4 replicati degli stessi campioni. I risultati del dosaggio per questi campioni hanno prodotto una concordanza qualitativa del 100%.

## Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LoD) è stato determinato in base a 60 replicati del bianco e 10 replicati ciascuno dei 6 campioni a basso livello (NHS). Il Lod per gli anticorpi anti-RNP era di 3 UE/ml. Il Lod per gli anticorpi anti-Sm era di 4,2 UE/ml.

## Linearità e recupero

Per determinare l'intervallo lineare del dosaggio, sono stati effettuati studi utilizzando serie di diluizioni equidistanti dei campioni positivi con i valori attraverso l'intervallo del calibratore. L'intervallo lineare determinato del dosaggio è stato di 3 (LoD), 400 UE/ml per gli anticorpi anti-RNP e di 4,2 (LoD), 255 UE/ml per gli anticorpi anti-Sm. I risultati sono riepilogati di seguito.

Test Intervallo (UE/ml)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R <sup>2</sup>	% recupero (ottenuto/previsto)
<b>Antic. anti-RNP</b>				
da 4,4 a 136	0,98 (da 0,95 a 1)	2,1 (da 1,8 a 3)	0,9979	da 88,9 a 103,3
da 263 a 611,1	1,27 (da 1,10 a 1,51)	-15,6 (da -16,1 a -14,2)	0,9817	da 96,1 a 139,8
da 7,2 a 70,3	0,97 (da 0,88 a 1,14)	0,5 (da 0,3 a 0,7)	0,9958	da 97,3 a 106,9
<b>Sm</b>				
da 5,2 a 75,8	1,01 (da 0,93 a 1,51)	-0,5 (da -0,8 a 0,1)	0,9987	da 97,3 a 105,7
da 4,8 a 93,9	1 (da 0,90 a 1,51)	1,1 (da 0,3 a 1,8)	0,9963	da 90,9 a 102
da 5,3 a 317,9	0,72 (da 0,61 a 1,51)	-2,2 (da -4 a -0,2)	0,9753	da 101,9 a 159,6

## Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di anticorpi anti-RNP e anti-Sm 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 µmol/l) e fattore reumatoide (100 UE/ml).

# ImmunoLISA™ Anticorpos ENA ELISA

## Anticorpos RNP ELISA

## Anticorpos Sm ELISA

**[IVD]** Para utilização diagnóstica *in vitro* Somente uso de prescrição

### FOLHETO DO PRODUTO

<b>REF</b>	5126	Anticorpos RNP ELISA	96 Determinações
<b>REF</b>	5127	Anticorpos Sm ELISA	96 Determinações

### ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de anticorpos Sm ou RNP presente no soro humano, com o objectivo de ajudar no diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e distúrbios do tecido conjuntivo associados, em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas.

### RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os ENA são complexos de ribonucleoproteínas solúveis (snurps). Os anticorpos anti-Sm são específicos de doenças e um marcador para o LES. Os anticorpos anti-Sm ocorrem em cerca de 30-40% dos pacientes com LES. São raros noutras doenças sistémicas do tecido conjuntivo, e caso estejam presentes, indicam quer a sobreposição de doenças ou pacientes que ainda não cumpriram os critérios ARA para o LES.<sup>1-9</sup> Outros anticorpos, como os direcionados contra SS-A (Ro), SS-B (La) e RNP não são específicos de doenças.

Os anticorpos anti-RNP ocorrem em 35-45% dos pacientes de LES e em mais de 95% dos pacientes com doença mista do tecido conjuntivo (DMTC). Ocasionalmente, são igualmente encontrados na esclerodermia, na artrite reumatóide e no LE induzido por drogas.<sup>1-6</sup>

Pacientes com anticorpos anti-RNP têm uma menor incidência de doenças renais, comparado com pacientes com anticorpos anti-Sm. Os anticorpos anti-SS-A (Ro) e SS-B (La) ocorrem em cerca de 30-40% e 10-15% dos pacientes com LES e 60-70% e 40-60% dos pacientes com o Síndrome de Sjögren, respectivamente.

Estes anticorpos podem ser detectados através de vários métodos. A metodologia ELISA possui grandes vantagens em relação a metodologias anteriores, como a imunodifusão: os tempos de performance dos ensaios são reduzidos, a subjectividade individual nos resultados das leituras é eliminada, a quantificação é alcançada sem a titragem do soro, existe o potencial de mecanização e os ELISA oferecem maior sensibilidade.<sup>10</sup>

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é realizado como um imunoensaio de base sólida. Os micropoços são revestidos de抗原os purificados de Sm ou RNP, seguido por um passo bloqueador para reduzir a ligação não-específica durante a realização do ensaio. Os controlos, os calibradores e o soro do paciente são incubados em poços revestidos com抗原os, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao抗原o. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados são detectados pela adição de uma enzima conhecida como conjugado IgG aos micropoços. 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.

PT

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

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 infecciosos. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.<sup>11</sup>

**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

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

ImmunoLISA™ Anticorpos anti-RNP ELISA      REF 5126

12 x 8	MICROPLATE RNP	<b>Microplaca com micropoços individuais separados.</b> Revestidos com antígeno RNP. Pronto a utilizar,
1 x 1.75 ml	CONTROL+ RNP	<b>Control Positivo</b> (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para anticorpos anti-RNP. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	<b>Control Negativo</b> pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A RNP CALIBRATOR B RNP CALIBRATOR C RNP CALIBRATOR D RNP CALIBRATOR E RNP	Conjunto de <b>5 Calibradores</b> 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 anti-RNP. As concentrações em EU/ml estão impressas na etiqueta.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	<b>Conjugado HRP de cabra IgG anti humano.</b> Pronto a utilizar, Código de cor rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluente de Soro. Pronto a utilizar, Código de cor roxo.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar, <b>Proteger da luz.</b>
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solução de Paragem*. Pronta a utilizar,
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem de pó. <b>Reconstituir para um litro cada.</b>
1 x		Folhas de Protocolo

ImmunoLISA™ Anticorpos anti-Sm ELISA      REF 5127

12 x 8	MICROPLATE SM	<b>Microplaca com micropoços individuais separados.</b> Revestidos com antígeno Sm. Pronto a utilizar,
1 x 1.75 ml	CONTROL+ SM	<b>Control Positivo</b> (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para anticorpos anti-Sm. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	<b>Control Negativo</b> pronto a utilizar (tampa

PT

5 x 1.75 ml    **CALIBRATOR|ASM**  
                **CALIBRATOR|BSM**  
                **CALIBRATOR|CSM**  
                **CALIBRATOR|DSM**  
                **CALIBRATOR|ESM**

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

#### Componentes Opcionais

1 x 60 ml    **BUF|WASH**              Tampão de Lavagem Líquido concentrado.  
**Reconstituir para um litro.**

#### Símbolos utilizados nas etiquetas

**LOT**    Número de lote

**REF**    Número de catálogo

**IVD**    Utilização diagnóstica *in vitro*

Utilização por

Temperatura de armazenamento

Consulte as instruções de utilização

Número de testes

Fabricante

Data de fabricação

\*Perigo. Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Provoca lesões oculares graves.

Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

#### Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de liberação 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 absorbância 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

## PT

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 8°C 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.

## PROCEDURE

### 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 direcionando 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		
B	-Control	S6		B	-Control		
C	+ Control	S7		C	+ Control		
D	Cal D	S8		D	Cal A		
E	S1	S9		E	Cal B		
F	S2	S10		F	Cal C		
G	S3	S11		G	Cal D		
H	S4	S12		H	Cal E		
	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.

PT

- 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 pouco 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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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 absorbância, no espaço de **30 minutos**, da adição da solução de paragem.
- 15º Passo** Ler a absorbância 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 absorbância 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 absorbância do reagente branco deve ser  $<0,3$ . O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorbância 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 absorbância 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

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

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 absorbância do Calibrador A até E, consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em EU/ml no eixo X, consoante a absorbância 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 absorbância 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 para a detecção de anticorpos anti-ENA.

## Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados testando 80 dadores de sangue normal. A média dos indivíduos normais mais 2,5 SD foi estabelecida como o corte do ensaio para a Ab RNP ELISA e 3,5 para a Ab Sm ELISA. Foi atribuído um corte com um valor arbitrário de 20EU/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 anti-RNP	Valor Ab anti-RNP	Interpretação
<20 EU/ml	<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	20-25 EU/ml	Indeterminado (Linha Divisória)
>25 EU/ml	>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 absorbância 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.

## VALORES ESPERADOS

Normalmente, espera-se que os resultados do teste numa população normal sejam negativos. A incidência dos anticorpos anti-ENA em diversas doenças sistémicas do tecido conjuntivo é resumida na tabela seguinte:

A importância do diagnóstico de Anticorpos contra os抗énios anti-RNP e anti-SM.

Anticorpos	Associação de Doenças (% de Incidência)
RNP	SLE (20-30%) MCTD (95-100%)
Sm	SLE (10-40%)

LES = lúpus eritematoso sistémico

DMTC = doença mista do tecido conjuntivo

Nota: A frequência de cada especificidade de anticorpos numa doença representa compilações retiradas da literatura.<sup>3</sup> A incidência varia dependendo da população de pacientes.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da Immulisa™ Anticorpos anti RNP e Sm foi avaliada ao testar amostras de soro ENA positivas bem caracterizadas, e através de testes aos controlos de doenças e soro humano «normal». Estas amostras foram igualmente testadas em kits de teste comercialmente disponíveis. Só foram incluídas no método comparativo as amostras no intervalo linear do ensaio. Estes resultados são seguidamente resumidos.

A. Método Comparativo: Immulisa™ Anticorpos anti-RNP ELISA vs. outro kit de Anticorpos anti-RNP:

### Outros Anticorpos anti-RNP ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	43	3	46
RNP	Negativo	2	95	97
Ab ELISA	Total	45	98	143

Acordo percentual positivo: 95,6% (95% CI 83,6% a 99,2%)

Acordo percentual negativo: 96,9% (95% CI 90,7% a 99,2%)

PT

Concordância Relativa: 96,5% (95% CI 91,6% a 98,7%)

B. Método Comparativo: ImmuLISA™ Anticorpos anti-Sm ELISA vs. outro kit de anticorpos anti-Sm:

#### Outra AB Sm ELISA

		Positivo	Negativo	Total
<b>IMMCO</b>	Positivo	53	12	65
<b>Ab Sm</b>	Negativo	2	167	169
<b>ELISA</b>	Total	55	179	234

Acordo percentual positivo: 96,4% (95% CI 86,4% a 99,4%)

Acordo percentual negativo: 93,3% (95% CI 88,3% a 96,3%)

Concordância Relativa: 94,0% (95% CI 90,0% a 96,6%)

C. Reactividade Cruzada: Foram seleccionadas 80 amostras com potencial de co-incidência de anticorpos ou de reactividade cruzada de indivíduos positivos noutros anticorpos anti- ENA ou que padecem de outros distúrbios autoimunes para teste aos anticorpos anti-RNP e anti-Sm, utilizando os ensaios ImmuLISA™.

Condição	Ab RNP Pos		Condição	Ab Sm Pos	
	n	n (%)		n	n (%)
<b>Ab ENA Pos Associada</b>					
Jo-1	8	0	Jo-1	8	0
La	8	0	La	8	0
Pm-Scl	8	1	Pm-Scl	8	0
Ro	8	0	Ro	8	0
Scl-70	8	4	Scl-70	8	1
Sm	8	1	RNP	8	3
Total	48	6 (12,5)		48	4 (12)
<b>Doenças autoimunes com potencial de reactividade cruzada</b>					
Doença celíaca	8	0	Doença celíaca	8	0
Doença de Hashimoto	8	0	Doença de Hashimoto	8	0
Artrite Reumatóide	8	0	Artrite Reumatóide	8	0
Vasculite	8	0	Vasculite	8	0
Total	32	0 (0)		32	0 (0)

#### Precisão

A precisão foi testada com amostras positivas seleccionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram conduzidos ensaios a 4 réplicas de cada amostra em 4 dias. A repetitibilidade foi determinada com 8 réplicas de cada amostra.

Kit	S #	Média (EU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na Experiência (Repetitibilidade)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
RNP Ab Assay	1	8,4	0,419	5,0%	0,353	4,2%	0,553	6,5%
	2	17,7	1,721	9,7%	1,670	9,8%	0,385	2,0%
	3	23,7	2,289	9,7%	2,193	9,5%	2,184	8,9%
	4	61,6	5,103	8,3%	5,431	9,0%	2,581	4,0%
	5	95,6	4,630	4,8%	4,995	5,2%	3,591	3,8%
	6	198,1	8,584	4,3%	7,720	3,8%	7,781	4,0%
Sm Ab Assay	1	2,3	0,235	10,2%	0,273	11,9%	0,150	6,5%
	2	14,1	0,624	4,4%	0,464	3,2%	0,361	2,7%
	3	19,7	1,136	5,8%	1,373	7,0%	0,444	2,2%
	4	30,0	1,644	5,5%	1,844	6,1%	1,043	3,5%
	5	66,7	3,791	5,7%	3,742	5,7%	2,432	3,5%
	6	120,8	6,133	5,1%	6,701	5,6%	4,687	3,8%

#### Reproducibilidade

Foram realizadas 8 réplicas de amostras na série negativa, ~20% abaixo do corte, ~20% acima do corte e na série positiva moderada do ensaio, para determinar a reproducibilidade qualitativa intra-ensaio. Foram testadas 4 réplicas das mesmas amostras em 4 ensaios para determinar a reproducibilidade inter-ensaio. Os resultados dos ensaios para estas amostras produziram 100% de concordância qualitativa.

## Límite de Detecção

O limite de detecção (LoD) para este ensaio foi determinado com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 10 réplicas de cada uma das amostras de baixo nível (NHS). O LoD da Ab do RNP foi de 3,0 EU/ml. O LoD da Ab do Sm foi de 4,2 EU/ml.

## Linearidade e Recuperação

Foram realizados estudos que utilizaram séries de diluições equidistantes de amostras positivas com valores por toda a série do calibrador para determinar a série linear do ensaio. A série linear dos ensaios foi determinada como 3,0 (LoD) – 400 EU/ml para a Ab RNP e 4,2 (LoD) – 225 EU/ml para a Ab Sm. Estes resultados são seguidamente resumidos.

Teste Série (EU/ml)	Inclinação (95% CI)	Y-intercepção (95% CI)	R <sup>2</sup>	% de Recuperação (esperada/prevista)
Ab RNP				
4,4 a 136	0,98 (0,95 a 1,00)	2,1 (1,8 a 3,0)	0,9979	88,9 a 103,3
263 a 611,1	1,27 (1,10 a 1,51)	-15,6 (-16,1 a -14,2)	0,9817	96,1 a 139,8
7,2 a 70,3	0,97 (0,88 a 1,14)	0,5 (0,3 a 0,7)	0,9958	97,3 a 106,9
Sm				
5,2 a 75,8	1,01 (0,93 a 1,51)	-0,5 (-0,8 a 0,1)	0,9987	97,3 a 105,7
4,8 a 93,9	1,00 (0,90 a 1,51)	1,1 (0,3 a 1,8)	0,9963	90,9 a 102
5,3 a 317,9	0,72 (0,61 a 1,51)	-2,2 (-4,0 a -0,2)	0,9753	101,9 a 159,6

## Interferência

A interferência foi estudada, misturando o soro com os níveis conhecidos de anticorpos anti-RNP e SM 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 µmol/L), e Factor Reumatóide (100 EU/ml).

## REFERENCES

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Tan EM. Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 25: 753-756, 1982.
3. Tan EM, Chan E, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
4. Reichlin M. Current perspectives on serological reactions in SLE patients. *Clin Exp Immunol* 44: 1-10, 1981.
5. Reichlin M and Harley JB. Antibodies to extractable nuclear antigens: clinical significance. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 555-563, 1987.
6. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity and the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
7. McCarty GA. Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Medical Clinics of North America* 70: 237-261, 1986.
8. Hardin JA. The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 29: 457-460, 1986.
9. Williamson GG and Boyle JA. Antigenic relatedness of small ribonucleoprotein particles. *Biochem Biophys Acta* 798:149-155, 1984.
10. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennan DM and Hough D. Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 62: 337- 245, 1985.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, (HHS Pub No [CDC] 88-8395), 1988.



*For technical assistance please contact:*



**■ IMMCO Diagnostics, Inc.**  
60 Pineview Drive  
Buffalo, NY 14228-2120 USA  
Telephone: (716) 691-0091  
Fax: (716) 691-0466  
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST  
E-Mail: [info@immco.com](mailto:info@immco.com)

*or your local product distributor*



EMERGO EUROPE  
Prinsessegracht 20  
2514 AP The Hague  
The Netherlands