



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

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



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

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

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

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

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



Immulisa™

ENA Antibody ELISA

SS-A (Ro) Antibody ELISA

SS-B (La) Antibody ELISA

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

CLIA Complexity: High

PRODUCT INSERT

[REF] 5128 SS-A (Ro) Antibody ELISA 96 Determinations

[REF] 5129 SS-B (La) Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

Immuli

sa Enhanced™ SS-A (Ro) Antibody ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative and semi-quantitative detection of SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) IgG antibodies in human serum as an aid in diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Sjögren's Syndrome in conjunction with clinical findings and other laboratory tests.

Immuli

sa Enhanced™ SS-B (La) Antibody ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) the qualitative and semi-quantitative detection of SS-B (La) IgG antibodies in human serum as an aid in diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Sjögren's Syndrome in conjunction with clinical findings and other laboratory tests.

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.¹⁻¹⁰ Antibodies to SS-A (Ro) and SS-B (La) occur in approximately 30-50% and 10-15% of SLE patients and 60-95% and 40-90% of patients with Sjögren's syndrome respectively. Antibodies to SS-B (La) occur frequently in association with SS-A (Ro) antibodies.¹⁸⁻²¹

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.²²

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with recombinant SS-A (Ro) 52 kD and 60 kD antigen or SS-B (La) 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

EN

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.

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.²³

Stop Solution is a dilute sulfuric acid solution. Sulfuric acid (H₂SO₄) is poisonous and corrosive. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes. Avoid exposure to bases, metals or other compounds that may react with acids.

TMB Enzyme Substrate contains an irritant that may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes.

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.

Caution: United States federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner.

Materials provided

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

EN

ImmuLisa™ SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) Antibody ELISA REF 5128

12 x 8	MICROPLATE SSA	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with recombinant Ro 52 kD and 60 kD antigen. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL + SSA	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) 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 SSA CALIBRATOR B SSA CALIBRATOR C SSA CALIBRATOR D SSA CALIBRATOR E SSA	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 SS-A (Ro) 52kD and 60kD 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	BUF WASH	Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each .
1 x		Protocol Sheets

ImmuLisa™ SS-B (La) Antibody ELISA REF 5129

12 x 8	MICROPLATE SSB	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with recombinant La antigen. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL + SSB	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for SS-B (La) 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 SSB CALIBRATOR B SSB CALIBRATOR C SSB CALIBRATOR D SSB CALIBRATOR E SSB	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 SS-B (La) 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	BUF WASH	Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each .

Optional Components

1 x 60ml

BUF	WASH
-----	------

Liquid concentrated Wash Buffer. **Reconstitute to one liter.**

Symbols used on labels



Lot number



Date of Manufacture



Catalog number



*Danger; Causes severe skin burns and eye damage. Causes severe eye damage.



In vitro diagnostic use

Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection.



Use by

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.



Storage temperature

Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.



Read instructions before use



Number of tests



Manufacturer

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

EN PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- 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

EN

- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500ul** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.
- Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- 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. The optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. The positive control must give values in the range stated on the vial.

EN 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 normal blood donors and disease control sera. The cutoff was established using mean of the normal subjects plus 4.5 SD for the SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) Ab ELISA and 3 SD for the SS-B (La) Ab ELISA. The cutoff was assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. Negative, Indeterminate and Positive assay ranges are provided below.

SS-A (Ro) (52 kD

and 60 kD) Ab value

SS-B (La) 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. The measuring range of these assays are from the EU/ml defined in the Limit of Detection (see below) to Calibrator A (160 EU/ml) for semi-quantitative assays. 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

EN

when retested. For determining EU/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are usually expected to be negative. The prevalence of SS-A (Ro) and SS-B (La) antibodies in various systemic connective tissue diseases is summarized in the following table:

Diagnostic Significance of Antibodies to SS-A (Ro) and SS-B (La) Antigens

Antibody	Disease Association (% Incidence)
SS-A (Ro)	SLE (30-50%) Sjögren's syndrome (60-95%)
SS-B (La)	SLE (10-15%) Sjögren's syndrome (15-60%)

Note: The frequency of each antibody specificity in a disease represents compilation from the literature.^{3,10-17} The prevalence varies depending on the patient population.

Sets of clinical samples were tested on the Immulisa™ SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) and SS-B (La) Antibody ELISAs. Results demonstrating prevalence in the populations for this study are provided below.

Condition	SS-A (Ro) Ab			SS-B (La) Ab		
	n	n pos	% pos	n	n pos	% pos
SLE	160	69	41.3%	137	19	13.9%
SLE with APS	15	3	20.0%	14	3	21.4%
Sjögren's	104	81	77.9%	68	41	60.3%
Myositis	91	31	34.1%	48	0	0.0%
Systemic sclerosis	154	30	19.5%	70	3	4.3%
Healthy subjects	142	4	2.8%	133	3	2.3%

SLE=systemic lupus erythematosus, APS=antiphospholipid syndrome

EN

Clinical sensitivity and specificity for the populations tested are summarized below:

Analyte	Disease	Sensitivity	Specificity
SS-A (Ro) Ab	SLE	39.4%	91.5%
SS-A (Ro) Ab	Sjögren's	77.9%	91.5%
SS-B (La) Ab	SLE	14.6%	97.7%
SS-B (La) Ab	Sjögren's	60.3%	97.7%

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) and SS-B (La) Antibody ELISAs were evaluated by testing specimens from subjects with SLE, Sjögren's, systemic sclerosis, myositis and a variety of autoimmune and infectious disease control populations. 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™ SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) Antibody ELISA vs. other SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) Antibody kit:

IMMCO SS-A (Ro) Ab ELISA		Other SS-A (Ro) Antibody ELISA		
		Positive	Negative	Total
	Positive	138	24	162
	Negative	9	452	461
	Total	147	476	623

Positive Percent Agreement: 93.9% (95% CI 88.4% - 97.0%)

Negative Percent Agreement: 95.0% (95% CI 92.5% - 96.7%)

Total Agreement: 94.7% (95% CI 92.6% - 96.3%)

- B. Method Comparison: Immulisa™ SS-B (La) Antibody ELISA vs. other SS-B (La) Antibody kit:

IMMCO SS-B (La) Ab ELISA		Other SS-B (La) Antibody ELISA		
		Positive	Negative	Total
	Positive	62	8	70
	Negative	5	498	503
	Total	67	506	573

Positive Percent Agreement: 92.5% (95% CI 82.7% - 97.2%)

Negative Percent Agreement: 98.4% (95% CI 96.8% - 99.3%)

Total Agreement: 97.7% (95% CI 96.1% - 98.7%)

EN

C. Cross Reactivity: Numerous potentially cross-reactive autoimmune and infectious disease sera were tested for SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) and SS-B (La) antibodies using the Immulisa™ assays. Studies demonstrated minimal cross-reactivity for these specimens as indicated below.

Condition	SS-A (Ro) Ab		SS-B (La) Ab	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)
IBD ¹	40	0	40	0
Myositis ²			48	0
MCTD	17	0	10	0
Rheumatoid arthritis	33	1	33	1
Other AI controls ³	127	0	123	0
Infectious disease ⁴	110	3	110	3
Other disease controls ⁵	20	1	20	1
Total	347	5 (1.4%)	384	5 (1.3%)

1. Ulcerative colitis (20), Crohn's disease (20)
2. Myositis: polymyositis (34), dermatomyositis (14)
3. Other autoimmune disease controls: celiac disease (26 SS-A, 25 SS-B), dermatitis herpetiformis (10), Wegener's (8), Churg-Strauss (10), Hashimoto's (8), Graves (10), antiphospholipid syndrome (15 SS-A, 12 SS-B), Crohn's disease (20), ulcerative colitis (20)
4. Infectious disease controls: syphilis (30), hepatitis (30), toxoplasmosis (10), cytomegalovirus (10), herpes (20), rubella (10)
5. Other disease controls: osteoarthritis (10), thrombocytopenia (10)

Precision

Precision was tested with positive specimens selected throughout the range of the assay. Assay runs of 6 replicates of each specimen were conducted over multiple days. Repeatability was determined with 12 replicates of each specimen.

Kit	S #	Mean (EU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
SS-A (Ro) Assay	1	9.6	1.2	12.4%	1.2	12.3%	1.2	12.3%
	2	17.2	1.5	8.9%	1.6	9.1%	1.2	7.0%
	3	20.3	1.2	6.1%	1.2	6.0%	1.4	6.6%
	4	23.2	1.8	7.7%	1.8	7.9%	1.6	6.8%
	5	85.2	6.0	7.0%	6.0	7.1%	5.5	6.3%
	6	116.4	7.1	6.1%	7.2	6.2%	5.4	4.5%
	7	137.2	13.2	9.6%	13.4	9.9%	8.2	5.7%

SS-B (La) Assay	1	11.9	1.0	8.1%	0.9	7.9%	0.8	7.1%
	2	15.2	1.2	8.0%	1.2	8.0%	1.1	7.7%
	3	19.8	1.7	8.4%	1.7	8.6%	1.1	5.7%
	4	25.2	1.9	7.6%	1.9	7.4%	1.7	6.9%
	5	51.4	4.7	9.1%	4.8	9.4%	3.6	6.9%
	6	80.4	7.7	9.5%	7.9	9.9%	5.8	7.0%
	7	152.1	10.1	6.7%	10.6	7.0%	6.7	4.4%

Reproducibility

Intra-assay qualitative reproducibility was tested with 90 replicates of samples in the negative range, ~20% below cutoff, at ~cutoff, ~20% above cutoff and in the moderate positive range of the assays. For SS-A/Ro (52 kD and 60 kD) Ab the cutoff +/- 20% specimens produced 97.8% qualitative agreement, the cutoff specimen produced 51.1% negative and 48.9% positive results and other specimens produced 100% qualitative agreement. For SS-B/La Ab the cutoff specimen produced 53.3% negative and 46.7% positive results and other specimens produced 100% qualitative agreement.

Inter-lot reproducibility was tested with positive specimens selected throughout the range of the assay. Each specimen was tested in 3 runs of 3 replicates over 3 days on each of 3 lots. 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 SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) Ab was 2.0 EU/ml. LoD for SS-B (La) was 1.6 EU/ml.

Linearity and Recovery

Linearity and recovery were tested by diluting positive specimens through the assay range in equidistant dilutions and comparing actual vs. expected results. The linear ranges of the assays were determined be 2.0 (LoD) – 160 EU/ml for SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) Ab and 1.6 (LoD) – 160 EU/ml for SS-B (La) Ab. Results are summarized below:

Test Range (EU/ml)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% recovery (obtained/expected)
SS-A (Ro) Ab				
2.6 to 35.8	0.96 (0.89 to 1.03)	0.76 (-0.7 to 2.2)	0.9953	88% to 104%
3.0 to 175.1	0.98 (0.93 to 1.03)	2.91 (2.76 to 3.06)	0.9919	86% to 108%
18.2 to 156.0	0.99 (0.92 to 1.07)	-1.32 (-8.5 to 5.8)	0.9948	94% to 110%
30.3 to 248.5	0.98 (0.81 to 1.14)	-7.7 (-35.1 to -19.7)	0.9724	100% to 121%
1.7 to 21.0	1.02 (0.96 to 1.09)	-0.59 (-1.43 to 0.25)	0.9961	98% to 115%

SS-B (La) Ab				
2.8 to 22.2	0.98 (0.89 to 1.07)	0.26 (-1.0 to 1.6)	0.9914	92% to 106%
8.7 to 81.8	0.88 (0.76 to 1.01)	2.61 (-4.2 to 9.4)	0.981	84% to 116%
8.7 to 159.3	0.90 (0.79 to 1.01)	3.92 (-6.6 to 14.5)	0.9894	94% to 117%
6.4 to 197.4	1.00 (0.90 to 1.11)	-5.80 (-18.64 to 7.05)	0.9894	100% to 119%
1.1 to 13.7	1.07 (0.93 to 1.22)	-0.66 (-1.9 to 0.58)	0.9815	92% to 122%

EN

Interference

Interference was studied by mixing sera with known SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) and SS-B (La) antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 $\mu\text{mol/L}$), and Rheumatoid Factor (100 EU/ml).

ImmuliTM

Αντίσωμα ENA ELISAs

Αντίσωμα SS-A (Ro) ELISA

Αντίσωμα SS-B (La) ELISA

IVD Για *in vitro* διαγνωστική χρήση Χρήση συνταγής όνο
 CLIA Πολυπλοκότητα: Υψηλή

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 5128 Αντίσωμα SS-A (Ro) ELISA 96 Προσδιορισμοί

REF 5129 Αντίσωμα SS-B (La) ELISA 96 Προσδιορισμοί

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ImmuliTM Enhanced ELISA Αντισωμάτων SS-A (Ro): Ενζυμική ανοσοδοκιμασία (ELISA) για την ποιοτική και την ημιποσοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgG SS-A (Ro) (52 kD και 60 kD) στον ανθρώπινο ορό ως βοήθημα στη διάγνωση του Συστηματικού Ερυθηματώδη Λύκου (SLE) και του Συνδρόμου Sjögren σε συνδυασμό με κλινικά ευρήματα και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις.

ImmuliTM Enhanced ELISA Αντισωμάτων SS-B (La): Ενζυμική ανοσοδοκιμασία (ELISA) για την ποιοτική και την ημιποσοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgG SS-B (La) IgG στον ανθρώπινο ορό ως βοήθημα στη διάγνωση του Συστηματικού Ερυθηματώδη Λύκου (SLE) και του Συνδρόμου Sjögren σε συνδυασμό με κλινικά ευρήματα και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Τα ENA είναι διαλυτά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά (snurps) σύμπλοκα. Τα αυτοαντισώματα κατευθύνονται έναντι διαφόρων ENA που έχει αποδειχθεί ότι έχουν αξία στη διάγνωση και παρακολούθηση διαφόρων συστηματικών νόσων συνδετικού ιστού.¹⁻¹⁰ Αντισώματα σε SS-A (Ro) και SS-B (La) εμφανίζονται σε περίπου 30-50% και 10-15% ασθενών με SLE και 60-95% και 40-90% ασθενών με σύνδρομο Sjögren αντίστοιχα. Αντισώματα σε SS-B (La) εμφανίζονται συχνά σε συσχέτισμό με αντισώματα SS-A (Ro)¹⁸⁻²¹.

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 ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται χωρίς τιτλοδότηση ορού, υπάρχει πιθανότητα για αυτοματισμό και τα ELISAs προσφέρουν μεγαλύτερη ευαισθησία.²²

Η δοκιμασία εκτελείται ως στερεά φάση ανοσοβιολογικής δοκιμασίας. Τα βυθίσματα (microwells) επενδύονται με ανασυνδυαζόμενο αντιγόνο SS-A (Ro) 52 kD και 60 kD ή SS-B (La) και ακολουθεί το βήμα μπλοκαρίσματος για τη μείωση μη ειδικής δέσμευσης κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της δοκιμασίας. Έλεγχος, 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 βυθισμάτων. Δεσμευμένα αντισώματα ανιχνεύονται 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 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 kit.

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

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, τα προερχόμενα από τον άνθρωπο, έχουν δοκιμαστεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από δοκιμασίες που απαιτούνται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρώπινου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση αυτών των υλικών.²³

Το διάλυμα παύσης (Stop Solution) είναι αραιό διάλυμα θειικού οξέος. Το θειικό οξύ (H₂SO₄) είναι δηλητηριώδες και διαβρωτικό. Μην το καταπίνετε και

EL

αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Αποφύγετε την έκθεση σε βάσεις, μέταλλα ή άλλες ουσίες που ενδέχεται να αντιδρούν με οξέα.

Το Ενζυμικό Υπόστρωμα TMB (TMB Enzyme Substrate) περιέχει μια ερεθιστική ουσία που μπορεί να είναι επιβλαβής αν εισπνευσθεί, καταποθεί ή απορροφηθεί από το δέρμα. Μην το καταπίνετε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

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 αλληλομόλυνση αντιδραστηρίων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείτε στοιχεία του κιτ μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Προσοχή: Η ομοσπονδιακή νομοθεσία των Ηνωμένων Πολιτειών επιτρέπει την πώληση του παρόντος προϊόντος μόνο από ιατρό ή κατόπιν εντολής ιατρού.

Υλικά που παρασχέθηκαν

Το κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

ImmuLisa™ SS-A (Ro) Antibody ELISA [REF] 5128

12 x 8	[MICROPLATE SSA]	Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένη με ανασυνδυαζόμενα αντισώματα SS-A (Ro) 52 kD και 60 kD. Έτοιμη προς χρήση.
1 x 1.75 ml	[CONTROL+ SSA]	Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (Positive Control) (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα SS-A (Ro) 52 kD και 60 kD. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας 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 SSA] [CALIBRATOR B SSA] [CALIBRATOR C SSA] [CALIBRATOR D SSA] [CALIBRATOR E SSA]	Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών . Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής B (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 SS-A (Ro). 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 τετραμεθυλοβενζιδίνης

EL

1 x 15 ml [STOP|H2SO4]

2 x [BUF|WASH]

1 x

ImmuLisa™ SS-B (La) Antibody ELISA [REF] 5129

12 x 8 [MICROPLATE|SSB]

1 x 1.75 ml [CONTROL+|SSB]

1 x 1.75 ml [CONTROL-]

5 x 1.75 ml [CALIBRATORA|SSB]

[CALIBRATORB|SSB]

[CALIBRATORC|SSB]

[CALIBRATORD|SSB]

[CALIBRATORE|SSB]

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]

(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

Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένα με ανασυνδυαζόμενο αντιγόνο La. Έτοιμο προς χρήση.

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

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

Έτοιμο προς χρήση σε 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 SS-B (La). 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


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

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

 Αριθμός Παρτίδας

 Ημερομηνία κατασκευής


 Αριθμός καταλόγου

 *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.

 Διαγνωστική χρήση in vitro

 Χρήση έως

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες πριν τη χρήση

 Αριθμός δοκιμών

 Κατασκευαστής

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

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

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Διαδικαστικές Σημειώσεις

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Όλα τα διαλύματα των δειγμάτων του ασθενούς θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη της δοκιμασίας.

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

Μέθοδος Δοκιμής

- Βήμα 1** Αφήνετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- 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

EL

- Βήμα 4** Προετοιμάζετε διάλυμα **1:101** από τα δείγματα ασθενών αναμειγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500μl** Ορού Αραιώσης.
- 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 Αραιώσης 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 χειροπετσέτες. Για αυτόματες συσκευές πλυσίματος, προγραμματίστε την συσκευή πλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Βάζετε με την πιπέτα **100 μl** της σύζευξης σε βυθίσματα.
- Βήμα 10** Επωάζετε για **30 λεπτά** (\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 σειτ 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 A θα πρέπει να έχει ένδειξη απορροφητικότητας όχι μικρότερη του 1,0, άλλως η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να είναι

EL

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. Η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή Δ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνη του αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Ο θετικός έλεγχος πρέπει να δίνει τιμές στο εύρος που δηλώνεται πάνω στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

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

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας

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

Απορ. Βαθμονομητή Δ

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

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Αποτυπώστε την απορροφητικότητα των Βαθμονομητών Α έως Ε έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε χαρτί γραφημάτων γραμμικού αρχείου καταγραφής (linear-log graph paper). Αποτυπώστε τις συγκεντρώσεις σε EU/ml στον Χ-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Υ-άξονα και σχεδιάστε μια καμπύλη προσαρμογής από σημείο σε σημείο. Καθορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφητικότητας. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση της πρότυπης καμπύλης.

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

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή φυσιολογικών δοτών αίματος και ορών ελέγχου ασθενειών. Το έσχατο όριο της δοκιμασίας καθιερώθηκε με τη χρήση μέσου όρου των συνήθων αντικειμένων συν 4,5 SD για το SS-A (Ro) 52 kD και 60 kD Ab ELISA και 3 SD για το SS-B (La) Ab ELISA. Το έσχατο όριο δοκιμασίας όρισε την αυθαίρετη τιμή των 20 EU/ml. Κατωτέρω παρέχονται τα εύρη ορίων Αρνητικής, Απροσδιόριστης και Θετικής δοκιμής.

τιμή SS-A (Ro) 52 kD και 60 kD Ab	τιμή SS-B (La) 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. Το εύρος μετρήσεων αυτών των δοκιμών προέρχεται από το EU/ml που προσδιορίζεται στο Όριο Ανίχνευσης (βλ. κατωτέρω) στον Βαθμονομητή Α (160 EU/ml) για ημι-ποσοτικές δοκιμές. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορούν να δώσουν τιμές απορροφητικότητας μεγαλύτερες από εκείνη του Βαθμονομητή Α. Για τον προσδιορισμό ακριβών ημι-ποσοτικών τιμών, αυτά τα δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω ώστε να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης του βαθμονομητή όταν επανεξετάζονται. Για τον προσδιορισμό τιμών EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που αποκτήθηκαν με τον διαλύτη.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

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

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Τα αποτελέσματα της δοκιμής σε συνήθη πληθυσμό συνήθως αναμένονται να είναι αρνητικά. Η επίπτωση των αντισωμάτων SS-A (Ro) και SS-B (La) σε διάφορες συστηματικές νόσους συνδετικού ιστού συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα:

Διαγνωστική Σημασία Αντισωμάτων σε Αντιγόνα SS-A (Ro) και SS-B (La)

Αντίσωμα	Συσχετισμός Νόσου (% Επίπτωσης)
SS-A (Ro)	SLE (30-50%) Σύνδρομο Sjögren (60-95%)
SS-B (La)	SLE (10-15%) Σύνδρομο Sjögren (15-60%)

Σημείωση: Η συχνότητα ιδιαιτερότητας κάθε αντισώματος σε μια νόσο αντιπροσωπεύει συλλογή από τη βιβλιογραφία.^{3,10-17} Η επίπτωση ποικίλει ανάλογα με τον πληθυσμό ασθενών.

Σετ κλινικών δειγμάτων δοκιμάστηκαν στα ELISA ImmuLISA™ για αντισώματα SS-A (Ro) (52 kD και 60 kD) και SS-B (La). Τα αποτελέσματα που δείχνουν τον επιπολασμό στους πληθυσμούς για αυτή τη μελέτη παρέχονται κατωτέρω.

Νόσος	SS-A (Ro) Ab			SS-B (La) Ab		
	n	n pos	% pos	n	n pos	% pos
SLE	160	69	41,3%	137	19	13,9%
SLE με APS	15	3	20,0%	14	3	21,4%
Σύνδρομο Sjögren	104	81	77,9%	68	41	60,3%
Μυοσίτιδα	91	31	34,1%	48	0	0,0%
Συστηματική σκλήρυνση	154	30	19,5%	70	3	4,3%
Υγιή υποκείμενα	142	4	2,8%	133	3	2,3%

SLE = συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, APS= αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο.

Η κλινική ευαισθησία και η ιδιαιτερότητα για τους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν συνοψίζονται κατωτέρω:

Αντίσωμα	Νόσος	Ευαισθησία	Ιδιαιτερότητα
SS-A (Ro) Ab	SLE	39,4%	91,5%
SS-A (Ro) Ab	Sjögren	77,9%	91,5%
SS-B (La) Ab	SLE	14,6%	97,7%
SS-B (La) Ab	Sjögren	60,3%	97,7%

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα των ImmuLISA™ SS-A (Ro) 52kD και 60kD και SS-B (La) Antibody ELISAs αξιολογήθηκαν με έλεγχο δειγμάτων από υποκείμενα με SLE, σύνδρομο Sjögren, συστηματική σκλήρυνση, μυοσίτιδα και μια ποικιλία πληθυσμών ελέγχου αυτοάνοσων και μολυσματικών ασθενειών. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα κιτ. Μόνο δείγματα στο γραμμικό φάσμα της δοκιμασίας συμπεριελήφθησαν στην σύγκριση της μεθόδου. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. Σύγκριση Μεθόδου: ImmuLISA™ SS-A (Ro) 52kD και 60kD ELISA έναντι άλλου κιτ SS-A (Ro) 52kD και 60kD ELISA:

Άλλο SS-A (Ro) Αντίσωμα ELISA

IMMCO	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
SS-A (Ro)	Θετικό	138	24	162
Ab ELISA	Αρνητικό	9	452	461
	Σύνολο	147	476	623

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 93,9% (95% CI 88,4% έως 97,0%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 95,0% (95% CI 92,5% έως 96,7%)

Σχετική Συμφωνία: 94,7% (95% CI 92,6% έως 96,3%)

B. Σύγκριση Μεθόδου: ImmuLISA™ SS-B (La) Antibody ELISA έναντι άλλου κιτ SS-B (La) Antibody:

Άλλο SS-B (La) Αντίσωμα ELISA

		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	62	8	70
SS-B (La)	Αρνητικό	5	498	503
Ab ELISA	Σύνολο	67	506	573

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 92,5% (95% CI 82,7% έως 97,2%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 98,4% (95% CI 96,8% έως 99,3%)

Σχετική Συμφωνία: 97,7% (95% CI 96,1% έως 98,7%)

C. Διασταυρωτή αντιδραστικότητα: Πολυάριθμα δείγματα ορών πιθανής διασταυρούμενης αντίδρασης αυτοάνοσων και μολυσματικών ασθενειών ελέγχθηκαν για αντισώματα SS-A (Ro) (52 kD και 60 kD) και SS-B (La) με χρήση των δοκιμών ImmuLisa™. Οι μελέτες έδειξαν ελάχιστη διασταυρωτή αντιδραστικότητα για αυτά τα δείγματα όπως φαίνεται κατωτέρω.

Νόσος	SS-A (Ro) Ab		SS-B (La) Ab	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)
IBD ¹	40	0	40	0
Μυοσίτιδα ²			48	0
MCTD	17	0	10	0
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	33	1	33	1
Έλεγχοι άλλων ΑΑ ³	127	0	123	0
Μολυσματικές νόσοι ⁴	110	3	110	3
Έλεγχοι άλλων νόσων ⁵	20	1	20	1
Σύνολο	347	5 (1.4%)	384	5 (1.3%)

1. Ελκωτική κολίτιδα (20), νόσος Crohn (20)

2. Μυοσίτιδα: πολυμυοσίτιδα (34), δερματομυοσίτιδα (14)

3. Έλεγχοι άλλων αυτοάνοσων ασθενειών: κοιλιοκάκη (26 SS-A, 25 SS-B), ερπητοειδής δερματίτιδα (10), νόσος Wegener (8), νόσος Churg-Strauss (10), νόσος Hashimoto (8), νόσος Graves (10), αντιφωσφολιτιδικό σύνδρομο (15 SS-A, 12 SS-B), νόσος Crohn (20), ελκωτική κολίτιδα (20)

4. Έλεγχοι μολυσματικών νόσων: σύφιλη (30), ηπατίτιδα (30), τοξοπλάσμωση (10), κυτταρομεγαλοϊός (10), έρπης (20), ερυθρά (10)

5. Έλεγχοι άλλων νόσων: οστεοαρθρίτιδα (10), θρομβοκυτταροπενία (10)

Ακρίβεια

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. Σειρές δοκιμασιών 6 επαναλήψεων πειράματος (replicates) διεξήχθησαν σε κάθε δείγμα σε διάστημα 14 ημερών. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 12 επαναλήψεις πειράματος κάθε δείγματος.

Κιτ	S #	Μέσος όρος (EU/ml)	Ολική ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Δοκιμασία SS-A (Ro)	1	9,6	1,2	12,4%	1,2	12,3%	1,2	12,3%
	2	17,2	1,5	8,9%	1,6	9,1%	1,2	7,0%
	3	20,3	1,2	6,1%	1,2	6,0%	1,4	6,6%
	4	23,2	1,8	7,7%	1,8	7,9%	1,6	6,8%
	5	85,2	6,0	7,0%	6,0	7,1%	5,5	6,3%
	6	116,4	7,1	6,1%	7,2	6,2%	5,4	4,5%
	7	137,2	13,2	9,6%	13,4	9,9%	8,2	5,7%
Δοκιμασία SS-B (La)	1	11,9	1,0	8,1%	0,9	7,9%	0,8	7,1%
	2	15,2	1,2	8,0%	1,2	8,0%	1,1	7,7%
	3	19,8	1,7	8,4%	1,7	8,6%	1,1	5,7%
	4	25,2	1,9	7,6%	1,9	7,4%	1,7	6,9%
	5	51,4	4,7	9,1%	4,8	9,4%	3,6	6,9%
	6	80,4	7,7	9,5%	7,9	9,9%	5,8	7,0%
	7	152,1	10,1	6,7%	10,6	7,0%	6,7	4,4%

Αναπαραγωγιμότητα

Η ποιοτική αναπαραγωγιμότητα στο ίδιο δείγμα (intra-assay) δοκιμάστηκε με 90 επαναλήψεις δειγμάτων στο αρνητικό εύρος, ~20% κάτω του ορίου διαχωρισμού, ~ στο όριο διαχωρισμού, ~20% πάνω από το όριο διαχωρισμού και στο μετρίως θετικό εύρος της δοκιμασίας. Για τα SS-A/Ro (52 kD και 60 kD) Ab τα δείγματα του ορίου διαχωρισμού +/- 20% παρήγαγαν 97,8% ποιοτική συμφωνία, το δείγμα ορίου διαχωρισμού παρήγαγε 51,1% αρνητικά και 48,9% θετικά αποτελέσματα και άλλα δείγματα παρήγαγαν 100% ποιοτική συμφωνία. Για το SS-B/La Ab το δείγμα του ορίου διαχωρισμού παρήγαγε 53,3% αρνητικά και 46,7% θετικά αποτελέσματα και άλλα δείγματα παρήγαγαν 100% ποιοτική συμφωνία.

Η αναπαραγωγιμότητα στην παρτίδα δειγμάτων (inter-lot) δοκιμάστηκε με θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν μέσα από όλο το φάσμα της δοκιμής. Κάθε δείγμα δοκιμάστηκε σε 3 σειρές από 3 επαναλήψεις επί 3 ημέρες σε καθεμία από 3 παρτίδες. Τα αποτελέσματα της δοκιμής για αυτά τα δείγματα παρήγαγαν 100% ποιοτική συμφωνία

Όριο Ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LoD) καθορίστηκε επί τη βάση 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS). Το LoD για SS-A (Ro) Ab ήταν 2,0 EU/ml. Το LoD για SS-B (La) ήταν 1,6 EU/ml.

Γραμμικότητα και Ανάκαμψη

Η γραμμικότητα και η ανάκαμψη δοκιμάστηκαν αραιώνοντας θετικά δείγματα σε όλο το εύρος της δοκιμασίας σε ισαπέχουσες αραιώσεις και συγκρίνοντας πραγματικές έναντι αναμενόμενων τιμών. Το γραμμικό εύρος των δοκιμασιών καθορίστηκε να είναι 2,0 (LoD) – 160 EU/ml για SS-A (Ro) Ab και 1,6 (LoD) – 160 EU/ml για SS-B (La) Ab. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω:

Εύρος Δοκιμής (EU/ml)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R ²	% ανάκαμψης (επιτευχθείσα/αναμενόμενη)
SS-A (Ro) Ab				
2,6 έως 35,8	0,96 (0,89 έως 1,03)	0,76 (-0,7 έως 2,2)	0,9953	88 έως 104
3,0 to 175,1	0,98 (0,93 έως 1,03)	2,91 (2,76 έως 3,06)	0,9919	86 έως 108
18,2 έως 156,0	0,99 (0,92 έως 1,07)	-1,32 (-8,5 έως 5,8)	0,9948	94 έως 110
30,3 έως 248,5	0,98 (0,81 έως 1,14)	-7,7 (-35,1 έως -19,7)	0,9724	100 έως 121
1,7 έως 21,0	1,02 (0,96 έως 1,09)	-0,59 (-1,43 έως 0,25)	0,9961	98 έως 115
SS-B (La) Ab				
2,8 έως 22,2	0,98 (0,89 έως 1,07)	0,26 (-1,0 έως 1,6)	0,9914	92 έως 106
8,7 έως 81,8	0,88 (0,76 έως 1,01)	2,61 (-4,2 έως 9,4)	0,981	84 έως 116
8,7 έως 159,3	0,90 (0,79 έως 1,01)	3,92 (-6,6 έως 14,5)	0,9894	94 έως 117
6,4 έως 197,4	1,00 (0,90 έως 1,11)	-5,80 (-18,64 έως 7,05)	0,9894	100 έως 119
1,1 to 13,7	1,07 (0,93 έως 1,22)	-0,66 (-1,9 έως 0,58)	0,9815	92 έως 122

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα SS-A (Ro) 52 kD και 60 kD και SS-B (La) 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 μmol/L), και Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml).

ImmuliTM

ELISA Anticuerpos ENA

ELISA Anticuerpos SS-A (Ro)

ELISA Anticuerpos SS-B (La)

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

Complejidad de enmiendas sobre mejoras de laboratorios clínicos (CLIA, por sus siglas en inglés): alta

ETIQUETA DEL PRODUCTO

[REF] 5128	ELISA Anticuerpos SS-A (Ro)	96 Determinaciones
[REF] 5129	ELISA Anticuerpos SS-B (La)	96 Determinaciones

UTILIZACIÓN N PREVISTA

ImmuliTM Enhanced ELISA anticuerpos SS-A (Ro): Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos SS-A (Ro) (52 kD y 60 kD) IgG en el suero humano como una ayuda en el diagnóstico del Lupus Eritematoso Sistémico (SLE, por sus siglas en inglés) y Síndrome de Sjögren en conjunción con hallazgos clínicos y otras pruebas de laboratorio.

ImmuliTM Enhanced SS-B (La) ELISA anticuerpos: Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos SS-B (La) IgG en el suero humano como una ayuda en el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y Síndrome de Sjögren en conjunción con hallazgos clínicos y otras pruebas de laboratorio

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los ENA son complejos de ribonucleoproteínas solubles (RNPnp). Los autoanticuerpos dirigidos contra varios ENA han demostrado ser valiosos para el diagnóstico y el control de varias afecciones sistémicas de los tejidos conectivos.¹⁻¹⁰ Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) y SS-B (La) están presentes en aproximadamente un 30-50% y 10-15% de los pacientes de LES y en un 60-95% y 40-90% de los pacientes de síndrome de Sjögren respectivamente. Los anticuerpos anti-SS-B (La) aparecen frecuentemente en asociación con los anticuerpos anti-SS-A (Ro).¹⁸⁻²¹

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.²²

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis es realizado como un inmunoensayo de fase sólida. Los micropocillos son recubiertos con antígeno recombinante S S-A (Ro) 52kD y 60kD o SS-B (La) 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 sustrato de enzima específica (TMB) y se detecta la presencia de anticuerpos gracias a un cambio de color producido por la conversión del sustrato de TMB en un producto de reacción de color. Se detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 250 nm. Los resultados son expresados en unidades de ELISA por milímetro (EU/ml) y consignados como positivos o negativos.

REACTIVOS

Almacenamiento y preparación

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.²³

La Solución de Parada es una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico (H₂SO₄) es venenoso y corrosivo. No ingerir y evitar el contacto con la piel y los ojos. Evitar la exposición a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con ácidos.

ES

El Sustrato de Enzimas TMB contiene un irritante que puede ser dañino si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. No ingerir y evitar el contacto con la piel y los ojos

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.

Precaución: La ley federal de los Estados Unidos exige que este artículo sea vendido a, o bajo la orden de un médico certificado

Materiales proporcionados

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

ELISA ImmuLISA™ Anticuerpos SS-A (Ro)

REF 5128

12 x 8 **MICROPLATE|SSA**

Microplaca con micropocillos individuales escindibles. Revestida de antígeno SS-A (Ro) 52kD y 60kD recombinante. Lista para su utilización n.

1 x 1.75 ml **CONTROL+|SSA**

Control Positivo listo para su utilización (*tapón rojo*). Contiene suero humano positivo en anticuerpos SS-A (Ro) 52kD y 60kD. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml **CONTROL-|**

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

5 x 1.75 ml **CALIBRATOR|A|SSA**

CALIBRATOR|B|SSA

CALIBRATOR|C|SSA

CALIBRATOR|D|SSA

CALIBRATOR|E|SSA

Juego de 5 calibradores listos para su utilización. Calibrador A (tapón verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tapón violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tapón azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tapón amarillo) 20 EU/ml, y Calibrador E (tapón naranja) 1 EU/ml. Derivados de suero humano que contiene anticuerpos SS-A (Ro). Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.

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

Conjugado IgG antihumano de cabra HRP. Listo para su utilización n. De color rosa.

1 x 60 ml **DIL**

Diluyente de suero. Listo para su utilización n. De color púrpura.

1 x 15 ml **SUBSTRATE|TMB**

Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización n. **Proteger de la luz.**

1 x 15 ml **STOP|H2SO4**

Solución de parada*. Lista para su utilización n.

2 x **BUF|WASH**

Tampón de lavado en polvo. **Reconstituir a un litro cada uno.**

1 x

Hojas de protocolo

ELISA ImmuLISA™ Anticuerpos SS-B (La)

REF 5129

12 x 8 **MICROPLATE|SSB**

Microplaca con micropocillos individuales escindibles. Revestida de antígeno La recombinante. Lista para su utilización n.

1 x 1.75 ml **CONTROL+|SSB**

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

ES

1 x 1.75 ml 

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

5 x 1.75 ml 


Juego de 5 calibradores listos para su utilización. Calibrador A (tapó n verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tapó n violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tapó n azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tapó n amarillo) 20 EU/ml, y Calibrador E (tapó n naranja) 1 EU/ml. Derivados de suero humano que contiene anticuerpos SS-B (La). Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.










1 x 15 ml 


Conjugado IgG antihumano de cabra HRP. Listo para su utilización. De color rosa.

1 x 60 ml 

Diluyente de suero. Listo para su utilización. De color púrpura.

1 x 15 ml 

Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. **Proteger de la luz.**

1 x 15 ml 

Solución de parada*. Lista para su utilización.

2 x 

Tampó n de lavado en polvo. **Reconstituir a un litro cada uno.**

1 x

Hojas de protocolo


Componentes opcionales

1 x 60ml 


Tampó n de lavado líquido concentrado. **Reconstituir a un litro.**


Símbolos utilizados en las etiquetas

 Número de lote


 Fecha de fabricación


 Número de catologo


 *Peligro. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Provoca lesiones oculares graves. Lavarse concienzudamente tras la manipulación. Llevar guantes/ prendas/gafas/mscara de proteccion. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fcil. Seguir aclarando. Si persiste la irritacin ocular: Consultar a un médico.

 Utilización diagnóstica in vitro

 Utilizar antes de

 Temperatura de almacenamiento Leer

 las instrucciones antes de utilizar

 Número de análisis

 Fabricante

Materiales necesarios pero no suministrados

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

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

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

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

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

Método de análisis

- Paso 1** Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.
- Paso 2** Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).

O

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

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

- Paso 4** Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **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** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.
- Paso 10** Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.
- Paso 12** Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.

ES

Paso 13 Incúbelo **30 minutos** (\pm 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 14 Vierta **100 μ l** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.

Paso 15 Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a 450/630nm si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

Control de Calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y el reactivo base deben comprobarse en cada ensayo para verificar la integridad y la precisión del análisis. La medición de absorbencia del reactivo base debería ser $<0,3$. El Calibrador A debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser <10 EU/ml. La densidad óptica del calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbancia del control positivo. El control positivo debe dar valores en la gama indicada en el vial..

RESULTADOS

Cálculos

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

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. muestra de análisis

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

Abs. de Calibrador D

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

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

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

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son "positivos", "negativos" o "indeterminados" con valores en unidades EU/ml. Los resultados indeterminados/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 se determinaron mediante pruebas de donantes de sangre normales y sueros de control de la enfermedad. El límite se estableció utilizando la media de los sujetos normales más 4,5 SD para el ELISA Anticuerpos SS-A (Ro) y 3 SD para el ELISA Anticuerpos SS-B (La). Al límite se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. Los rangos negativos, indeterminados y positivos se proporcionan a continuación:

Valor Anticuerpos SS-A (Ro) 52kD y 60kD	Valor Anticuerpos SS-B (La)	Interpretación
<20 EU/ml	<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	20-25 EU/ml	Indeterminado (Límite)
>25 EU/ml	>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

Los calibradores listos para utilizar vienen incluidos para proporcionar una determinación semi-cuantitativa y deben ser utilizados en cada análisis. El rango de medición de estos ensayos es desde el EU/ml definidos en el Límite de Detección (ver más abajo) al Calibrador A (160 EU/ml) para los ensayos semi-cuantitativos. Las muestras de pacientes que contienen niveles altos de anticuerpos pueden arrojar unos valores de absorbencia superiores que los del Calibrador A. Para determinar unos valores semi-cuantitativos precisos, esos especímenes deberían diluirse más para que entren en el registro de la curva del calibrador al volver a analizarlos. Para determinar los valores en EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

VALORES ESPERADOS

Normalmente se espera que los resultados de los análisis en la población normal sean negativos. La incidencia de los anticuerpos anti-SS-A (Ro) y SS-B (La) en varias enfermedades sistémicas de los tejidos conectivos se resume en la tabla siguiente:

ES

Importancia diagnóstica de los antígenos anticuerpos anti-SS-A (Ro) y SS-B (La)

Anticuerpos	Asociación con enfermedades (% Incidencia)
SS-A (Ro)	LES (30-50%) Síndrome de Sjögren (60-95%)
SS-B (La)	LES (10-15%) Síndrome de Sjögren (15-60%)

Nota: La frecuencia de cada especificidad de anticuerpos en una enfermedad representa una compilación de documentación.^{3,10-17} La incidencia varía en función de cada paciente.

El conjunto de muestras clínicas fueron probadas en el Immulisa™ los anticuerpos ELISAs SS-A (Ro) (52 kD y 60 kD) y SS-B (La). Los resultados que demuestran la prevalencia en las poblaciones para este estudio se proporcionan a continuación.

Condición	SS-A (Ro) Ab			SS-B (La) Ab		
	n	n pos	% pos	n	n pos	% pos
LES	160	69	41,3%	137	19	13,9%
LES con APS	15	3	20,0%	14	3	21,4%
Sjögren's	104	81	77,9%	68	41	60,3%
Miositis	91	31	34,1%	48	0	0,0%
Esclerosis sistémica	154	30	19,5%	70	3	4,3%
Sujetos sanos	142	4	2,8%	133	3	2,3%

LES = lupus eritematoso sistémico, SAF= síndrome antifosfolípido

La sensibilidad y especificidad clínicas para las poblaciones analizadas se resumen a continuación:

Análito	Enfermedad	Sensibilidad	Especificidad
SS-A (Ro) Ab	LES	39,4%	91,5%
SS-A (Ro) Ab	Sjögren's	77,9%	91,5%
SS-B (La) Ab	LES	14,6%	97,7%
SS-B (La) Ab	Sjögren's	60,3%	97,7%

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad del Immulisa™ Anticuerpos ELISAs SS-A (Ro) (52 kD y 60 kD) y SS-B (La) fueron evaluados mediante el análisis de muestras de sujetos con SLE, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, miositis y una variedad de enfermedades autoinmunes y de poblaciones de control de enfermedades infecciosas. 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 SS-A (Ro) 52kD y 60kD vs. otros equipos para anticuerpos SS-A (Ro) 52kD y 60kD:

Otros ELISA Anticuerpos SS-A (Ro)

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	138	24	162
SS-A (Ro)	Negativo	9	452	461
ELISA Anticuerpos	Total	147	476	623

Concordancia de porcentaje positivo: 93,9% (95% CI 88,4% - 97,0%)

Concordancia de porcentaje negativo: 95,0% (95% CI 92,5% - 96,7%)

Concordancia relativa: 94,7% (95% CI 92,6% - 96,3%)

B, Comparación de métodos: ELISA ImmuLISA™ Anticuerpos SS-B (La) vs, otros equipos para anticuerpos SS -B (La):

Otros ELISA Anticuerpos SS-B (La)

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	62	8	70
SS-B (La)	Negativo	5	498	503
ELISA Anticuerpos	Total	67	506	573

Concordancia de porcentaje positivo: 92,5% (95% CI 82,7% - 97,2%)

Concordancia de porcentaje negativo: 98,4% (95% CI 96,8% - 99,3%)

Concordancia relativa: 97,7% (95% CI 96,1% - 98,7%)

C. Reactividad Cruzada: Numerosos sueros de enfermedades potencialmente autoinmunes e infecciosas de reacción cruzada fueron probados para anticuerpos SS-A (Ro) (52 kD y 60 kD) y SS-B (La) usando los ensayos ImmuLISA™. Los estudios demostraron una mínima reactividad cruzada de estos especímenes como se indica a continuación:

Condición	SS-A (Ro) Ab		SS-B (La) Ab	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)
IBD ¹	40	0	40	0
Miositis ²			48	0
EMTC	17	0	10	0
Artritis reumatoide	33	1	33	1
Otros controles AI ³	127	0	123	0
Enfermedad infecciosa ⁴	110	3	110	3
Otros controles de la enfermedad ⁵	20	1	20	1
Total	347	5 (1.4%)	384	5 (1.3%)

1. (20), enfermedad de Crohn (20)

2. Miositis: polimiositis (34), dermatomiositis (14)

3. Otros controles de enfermedades autoinmunes: enfermedad celíaca (26 SS-A, 25 SS-B), dermatitis herpetiforme (10), enfermedad de Wegener (8), enfermedad de Churg-Strauss (10), enfermedad de Hashimoto (8), Graves (10), síndrome antifosfolípido (15 SS-A, 12 SS-B) enfermedad de Crohn (20), colitis ulcerosa (20)

4. Controles de enfermedades infecciosas: sífilis (30), hepatitis (30), toxoplasmosis (10), citomegalovirus (10), herpes (20), rubéola (10)

5. Otros controles de la enfermedad: osteoartritis (10), trombocitopenia (10)

Precisión

La precisión fue analizada con especímenes positivos seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron análisis de 6 muestras duplicadas de cada espécimen durante 14 días. La repetibilidad fue determinada con 12 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 SS-A (Ro)	1	9,6	1,2	12,4%	1,2	12,3%	1,2	12,3%
	2	17,2	1,5	8,9%	1,6	9,1%	1,2	7,0%
	3	20,3	1,2	6,1%	1,2	6,0%	1,4	6,6%
	4	23,2	1,8	7,7%	1,8	7,9%	1,6	6,8%
	5	85,2	6,0	7,0%	6,0	7,1%	5,5	6,3%
	6	116,4	7,1	6,1%	7,2	6,2%	5,4	4,5%
	7	137,2	13,2	9,6%	13,4	9,9%	8,2	5,7%
Ensayo SS-B (La)	1	11,9	1,0	8,1%	0,9	7,9%	0,8	7,1%
	2	15,2	1,2	8,0%	1,2	8,0%	1,1	7,7%
	3	19,8	1,7	8,4%	1,7	8,6%	1,1	5,7%
	4	25,2	1,9	7,6%	1,9	7,4%	1,7	6,9%
	5	51,4	4,7	9,1%	4,8	9,4%	3,6	6,9%
	6	80,4	7,7	9,5%	7,9	9,9%	5,8	7,0%
	7	152,1	10,1	6,7%	10,6	7,0%	6,7	4,4%

Reproducibilidad

El intra-ensayo de reproducibilidad cualitativa fue probado con 90 réplicas de muestras en el rango negativo, ~ 20% por debajo del límite, en ~ del límite, ~ 20% por encima del límite y en el rango positivo moderado de los ensayos. Para SS-A/Ro (52 kD y 60 kD) Ab el punto límite fue de +/- 20% de los especímenes producidos en una concordancia cualitativa del 97,8%, la muestra límite produjo un 51,1% negativo y un 48,9% de resultados positivos y otros especímenes produjeron una concordancia cualitativa del 100%. Para SS-B / La Ab la muestra límite produjo un 53,3% negativo y un 46,7% de resultados positivos y otros especímenes produjeron 100% de concordancia cualitativa.

La reproducibilidad Inter-Lot se probó con muestras positivas seleccionadas en todo el rango del ensayo. Cada muestra se probó en 3 series de 3 repeticiones por más de 3 días en cada uno de 3 lotes. Los resultados del ensayo de estos ejemplares produjo un 100% de concordancia cualitativa.

Límite de detección

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 SS-A (Ro) era de 2,0 EU/ml. El LD para anticuerpos SS-B (La) era de 1,6 EU/ml.

Linealidad y recuperación

La linealidad y la recuperación fueron analizadas diluyendo especímenes positivos en el registro de ensayo en diluciones equidistantes y comparando los

ES

resultados reales frente a los esperados. El registro lineal de los ensayos se fijó en 2,0 (LD) – 160 EU/ml para anticuerpos SS-A (Ro) y 1,6 (LD) – 160 EU/ml para anticuerpos SS-B (La). Los resultados se resumen a continuación:

Registro de análisis (EU/ml)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R ²	% recuperación (obtenido/esperado)
Ant SS-A (Ro)				
2,6 a 35,8	0,96 (0,89 a 1,03)	0,76 (-0,7 a 2,2)	0,9953	88 a 104
3,0 a 175,1	0,98 (0,93 a 1,03)	2,91 (2,76 a 3,06)	0,9919	86 a 108
18,2 a 156,0	0,99 (0,92 a 1,07)	-1,32 (-8,5 a 5,8)	0,9948	94 a 110
30,3 a 248,5	0,98 (0,81 a 1,14)	-7,7 (-35,1 a -19,7)	0,9724	100 a 121
1,7 a 21,0	1,02 (0,96 a 1,09)	-0,59 (-1,43 a 0,25)	0,9961	98 a 115
Ant SS-B (La)				
2,8 a 22,2	0,98 (0,89 a 1,07)	0,26 (-1,0 a 1,6)	0,9914	92 a 106
8,7 a 81,8	0,88 (0,76 a 1,01)	2,61 (-4,2 a 9,4)	0,981	84 a 116
8,7 a 159,3	0,90 (0,79 a 1,01)	3,92 (-6,6 a 14,5)	0,9894	94 a 117
6,4 a 197,4	1,00 (0,90 to 1,11)	-5,80 (-18,64 a 7,05)	0,9894	100 a 119
1,1 a 13,7	1,07 (0,93 to 1,22)	-0,66 (-1,9 to 0,58)	0,9815	92 a 122

Interferencia

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de anticuerpos SS-A (Ro) 52kD y 60kD y SS-B (La) 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).

ImmuliTM

ENA-Antikörper-ELISAs

SS-A (Ro) Antikörper-ELISA
SS-B (La) Antikörper-ELISA

[IVD] Für *in vitro* diagnostischen Gebrauch Voorgescreven gebruik alleen
 CLIA-Komplexität: Hoch

PRODUKTBEILAGE

[REF] 5128 SS-A (Ro) Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

[REF] 5129 SS-B (La) Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

ImmuliTM EnhancedTM SS-A (Ro) Antibody ELISA: Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA) für die qualitative und semi-quantitative Erkennung von SS-A (Ro) (52 kD and 60 kD) IgG Antikörpern in Humanserum als Arbeitshilfe in der Diagnose systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und Sjögren-Syndrom in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen Labortests.

ImmuliTM EnhancedTM SS-B (La) Antibody ELISA: Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA) für die qualitative und semi-quantitative Erkennung von SS-B (La) IgG Antikörpern in Humanserum als Arbeitshilfe in der Diagnose systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und Sjögren-Syndrom in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen Labortests.

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.¹⁻¹⁰ Antikörper zu SS-A (Ro) und SS-B (La) treten bei etwa 30-50 % und 10-15 % von SLE-Patienten und 60-95 % und 40-90 % von Patienten mit dem Sjögren-Syndrom auf. Antikörper zu SS-B (La) treten oft in Verbindung mit SS-A (Ro) Antikörpern auf.¹⁸⁻²¹

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.^{22~}

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Der Test wird als ein Festphasenimmunoassay ausgeführt. Mikrovertiefungen werden mit rekombinantem SS-A (Ro) 52kD und 60kD oder SS-B (La) beschichtet. Dem folgt ein Blockierungsschritt, um eine nichtspezifische Proteinbindung während des Prüfungsablaufs zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und Patientenserum 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 Serumproteine 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

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.²³

Stop Solution ist eine verdünnte Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure (H₂SO₄) ist giftig und korrosiv. Nicht einnehmen und Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Keinen Basen, Metallen oder anderen Stoffen aussetzen, die mit Säure reagieren können.

DE

TMB Enzyme Substrat enthält einen Reizstoff, der bei Einatmen, Einnehmen oder Absorption durch die Haut gesundheitsschädigend sein kann. Nicht einnehmen und Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.

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

Achtung: Das US-Bundesgesetz beschränkt den Kauf dieses Geräts an und auf Rezept eines Arztes.

Bereitgestellte Materialien

Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

ImmuLisa™ SS-A (Ro) Antikörper-ELISA [REF] 5128

12 x 8	[MICROPLATE SSA]	Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit rekombinantem SS-A(Ro) 52kD und 60kD Antigen. Gebrauchsfertig.
1 x 1.75 ml	[CONTROL + SSA]	Einsatzbereite Positivkontrolle (roter Verschlussdeckel). Enthält Humanserum positiv für SS-A (Ro) 52kD und 60kD Antikörper. 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 SSA] [CALIBRATOR B SSA] [CALIBRATOR C SSA] [CALIBRATOR D SSA] [CALIBRATOR E SSA]	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 (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 EU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das SS-A (Ro) 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. Farbcode rosa.
1 x 60 ml	[DIL]	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbcode 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

DE







ImmuLisa™ SS-B (La) Antikörper-ELISA REF 5129


12 x 8	MICROPLATE SSB	Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen. Beschichtet mit rekombinantem La-Antigen. Gebrauchsfertig.
1 x 1.75 ml	CONTROL + SSB	Einsatzbereite Positivkontrolle (roter Verschlussdeckel) Enthält Humanserum positiv für SS-B (La) Antikörper. 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 SSB CALIBRATOR B SSB CALIBRATOR C SSB CALIBRATOR D SSB CALIBRATOR E SSB	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 (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 EU/ml. Abgeleitet aus Humanserum, das SS-B (La) 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. Farbcode rosa.
1 x 60 ml	DIL	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbcode 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.
-----------	----------	---

Symbole auf den Etiketten

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
- Zeitmesser
- Saugfähige Papierhandtücher
- Mikroplattenleser, fähig Absorptionswerte bei 450 nm abzulesen. Wenn ein Zweiwellenlängen-Mikroplattenleser verfügbar ist, sollte der Referenzfilter bei 600-650 nm eingestellt werden
- Automatischer Mikroplattenwascher, fähig 200 µl zu dispensieren

PROBENENTNAHME UND HANDLING

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

VERFAHREN

Verfahrenshinweise

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

DE

- 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	S1	usw.
B	-Kontrolle	S6		B	-Kontrolle	S2	
C	+ Kontrolle	S7		C	+ Kontrolle	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	

Schritt 4 **1:101** Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von **5 µl** der Patientenserum 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** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.

- Schritt 8** **4x** mit dem Waschpuffer waschen. Um manuell zu waschen, füllen Sie jede Mikrovertiefung mit dem wiederhergestellten Waschpuffer. Die Flüssigkeit durch Umkehren und Ausklopfen des Inhalts jeder Vertiefung oder durch Ansaugen der Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entsorgen. Die Streifen umkehren und die Vertiefungen kräftig auf saugfähigen Papierhandtüchern ausklopfen, um am Ende des letzten Waschens zu blotten. Bei einer automatischen Wascheinrichtung programmieren Sie diese gemäß den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Mit der Pipette **100 µl** des Konjugats in die Mikrovertiefungen geben.
- Schritt 10** **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 11** Alle Mikrovertiefungen wie in Schritt 8 waschen.
- Schritt 12** Mit der Pipette **100 µl** des Enzymsubstrats in jede Mikrovertiefung in der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für das Konjugat zugeben.
- Schritt 13** **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubieren.
- Schritt 14** Mit der Pipette **100 µl** der Stopp-Lösung in jede Mikrovertiefung unter Verwendung der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für die Zugabe des Enzymsubstrats zugeben. Die Absorptionswerte innerhalb von **30 Minuten** nach Hinzufügen der Stopp-Lösung ablesen.
- Schritt 15** Die Absorption jeder Mikrovertiefung bei **450 nm** unter Verwendung eines Ein- oder bei 450/630nm unter Verwendung eines Zweiwellenlängen-Mikroplattenlesers gegen die auf Null-Absorption gesetzte Reagenz-Leerprobe ablesen.

Qualitätskontrolle

Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und eine Reagenz-Leerprobe müssen mit jeder Prüfung eingesetzt werden, um die Vollständigkeit und Genauigkeit des Tests zu verifizieren. Die Absorptionsanzeige der Reagenz-Leerprobe sollte $<0,3$ sein. Der Kalibrator A sollte eine Absorptionsanzeige von nicht weniger als 1,0 haben, andernfalls muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss <10 EU/ml sein. Die optische Dichte von Kalibrator D muss größer sein als die der Negativkontrolle und kleiner als die Absorption der Positivkontrolle. Die Positivkontrolle muss Werte im angegebenen Bereich der Phiole ergeben.

DE RESULTATE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können durch zwei Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Abs. des Prüfmusters

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

Abs. von Kalibrator D

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

2. SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG

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

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

Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen von normalen Blutspendern und Seren zur Seuchenkontrolle bestimmt. Der Cutoff wurde unter Verwendung des Mittelwerts von normalen Probanden plus 4,5 SD für SS-A (Ro) Ab ELISA und 3 SD für SS-B (La) Ab ELISA bestimmt. Der Cutoff wurde einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugeordnet. Negative, unbestimmte und positive Assaybereiche werden nachstehend bereitgestellt..

SS-A (Ro) 52kD und 60kD Ab Wert

SS-B (La) 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. Der Messbereich dieser Assays reicht von EU/ml, wie in der Nachweisgrenze definiert (s.u.), bis Kalibrator A (160 EU/ml) für semi-quantitative Assays. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Absorptionswerte ergeben als die von

DE

Kalibrator A. Um genaue semiquantitative Werte festzulegen, sollte man solche Proben weiter verdünnen, damit sie sich innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve befinden, wenn erneut getestet wird. Um EU/ml-Werte zu bestimmen, multiplizieren Sie die durch den Verdünnungsfaktor erhaltenen Einheiten.

BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS

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

ERWARTETE WERTE

Bei einer normalen Population sind die Testresultate gewöhnlich als negativ zu erwarten. Die Inzidenz von Antikörpern zu SS-A (Ro) und SS-B (La) Antigenen bei verschiedenen systemischen Bindegewebserkrankungen ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Diagnostische Bedeutung von Antikörpern zu SS-A (Ro) und SS-B (La) Antigenen

Antikörper	Erkrankungsassoz. (%-Inzidenz)
SS-A (Ro)	SLE (30-50 %) Sjögren-Syndrom (60-95 %)
SS-B (La)	SLE (10-15 %) Sjögren-Syndrom (15-60 %)

Hinweis: Die Häufigkeit jeder Antikörper-Spezifität bei einer Erkrankung repräsentiert die Zusammenstellung aus der Literatur.^{3,10-17} Die Inzidenz variiert abhängig von der Patientenpopulation.

Sätze klinischer Proben wurden im ImmuLISA™ SS-A (Ro) (52 kD und 60 kD) und SS-B (La) Antibody ELISAs getestet. Die Ergebnisse, die die Prävalenz in den Beständen für diese Studie angeben, werden nachstehend bereitgestellt. Die Ergebnisse, die eine Prävalenz der Bestände für diese Studie zeigen, werden nachstehend angegeben.

Erkrankung	SS-A (Ro) Ab			SS-B (La) Ab		
	n	n pos	% pos	n	n pos	% pos
SLE	160	69	41,3%	137	19	13,9%
SLE mit APS	15	3	20,0%	14	3	21,4%
Sjögren	104	81	77,9%	68	41	60,3%
Myositis	91	31	34,1%	48	0	0,0%
Systemische Sklerosis	154	30	19,5%	70	3	4,3%
Gesunde Probanden	142	4	2,8%	133	3	2,3%

SLE = systemischer Lupus erythematoses, APS=Antiphospholipid Syndrom

DE

Klinische Sensitivität und Genauigkeit für die getesteten Bestände werden nachstehend zusammengefasst:

Analyt	Krankheit	Sensitivität	Genauigkeit
SS-A (Ro) Ab	SLE	39,4%	91,5%
SS-A (Ro) Ab	Sjögren	77,9%	91,5%
SS-B (La) Ab	SLE	14,6%	97,7%
SS-B (La) Ab	Sjögren	60,3%	97,7%

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Nützlichkeit des ImmuLisa™ SS-A (Ro) 52kD und 60kD und SS-B (La) Antikörper-ELISAs wurde durch Prüfen der Proben von Probanden mit SLE, Sjögren, systemischer Sklerosis, Myositis und verschiedenen Beständen von Autoimmun- und Infektionskrankheiten 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.

- A. Methodenvergleich: ImmuLisa™ SS-A (Ro) 52kD und 60kD Antikörper-ELISA gegenüber anderen SS-A (Ro) 52kD und 60kD Antikörper-Kits:

Andere SS-A (Ro) Antikörper-ELISA

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	138	24	162
SS-A (Ro)	Negativ	9	452	461
Ab ELISA	Gesamt	147	476	623
Positive Prozent-Übereinstimmung:		93,9% (95% CI 88,4% - 97,0%)		
Negative Prozent-Übereinstimmung:		95,0% (95% CI 92,5% - 96,7%)		
Relative Übereinstimmung:		94,7% (95% CI 92,6% - 96,3%)		

- B. Methodenvergleich: ImmuLisa™ SS-B (La) Antikörper-ELISA gegenüber anderen SS-B (La) Antikörper-Kits:

Andere SS-B (La) Antikörper-ELISA

		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	62	8	70
SS-B (La)	Negativ	5	498	503
Ab ELISA	Gesamt	67	506	573
Positive Prozent-Übereinstimmung:		92,5% (95% CI 82,7% - 97,2%)		
Negative Prozent-Übereinstimmung:		98,4% (95% CI 96,8% - 99,3%)		
Relative Übereinstimmung:		97,7% (95% CI 96,1% - 98,7%)		

DE

C. Kreuzreaktivität: Es wurden mehrere potentiell kreuzreaktive Seren für Autoimmun- und Infektionskrankheiten für SS-A (Ro) (52 kD und 60 kD) und SS-B (La) Antikörper unter Verwendung von ImmuLisa™ Assays geprüft. Die Studien zeigten minimale Kreuzreaktivität für diese Proben, wie nachstehend angegeben.

Krankheit	SS-A (Ro) Ab		SS-B (La) Ab	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)
IBD ¹	40	0	40	0
Myositis ²			48	0
MCTD	17	0	10	0
Rheumatoide Arthritis	33	1	33	1
Andere AI Kontrollen ³	127	0	123	0
Infektionskrankheit ⁴	110	3	110	3
Andere Seuchenkontrollen ⁵	20	1	20	1
Gesamt	347	5 (1.4%)	384	5 (1.3%)

1. Ulcerative Kolitis (20), Crohn'sche Krankheit (20)
2. Myositis: Polymyositis (34), Dermatomyositis (14)
3. Andere Kontrollen für Autoimmunkrankheiten: Zöliose (26 SS-A, 25 SS-B), Dermatitis Herpetiformis (10), Wegener (8), Churg-Strauss (10), Hashimoto (8), Graves (10), Antiphospholipid-Syndrom (15 SS-A, 12 SS-B), Crohn'sche Krankheit (20), ulcerative Kolitis (20)
4. Kontrollen für Infektionskrankheiten: Syphilis (30), Hepatitis (30), Toxoplasmose (10), Zytomegalievirus (10), Herpes (20), Röteln (10)
5. Andere Krankheitskontrollen: Osteoarthritis (10), Thrombocytopenie (10)

Präzision

Die Präzision wurde mit aus dem gesamten Bereich der Prüfung ausgewählten positiven Proben geprüft. Prüfungsabläufe von 6 Replikaten jeder Probe wurden in 14 Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 12 Replikaten jeder Probe bestimmt.

Kit	S #	Mittelwert EU/ml	Gesamt- ungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
			SD EU/ml	CV %	SD EU/ml	CV %	SD EU/ml	CV %
SS-A (Ro) Prüfung	1	9,6	1,2	12,4%	1,2	12,3%	1,2	12,3%
	2	17,2	1,5	8,9%	1,6	9,1%	1,2	7,0%
	3	20,3	1,2	6,1%	1,2	6,0%	1,4	6,6%
	4	23,2	1,8	7,7%	1,8	7,9%	1,6	6,8%
	5	85,2	6,0	7,0%	6,0	7,1%	5,5	6,3%
	6	116,4	7,1	6,1%	7,2	6,2%	5,4	4,5%
	7	137,2	13,2	9,6%	13,4	9,9%	8,2	5,7%
SS-B (La) Prüfung	1	11,9	1,0	8,1%	0,9	7,9%	0,8	7,1%
	2	15,2	1,2	8,0%	1,2	8,0%	1,1	7,7%
	3	19,8	1,7	8,4%	1,7	8,6%	1,1	5,7%
	4	25,2	1,9	7,6%	1,9	7,4%	1,7	6,9%
	5	51,4	4,7	9,1%	4,8	9,4%	3,6	6,9%
	6	80,4	7,7	9,5%	7,9	9,9%	5,8	7,0%
	7	152,1	10,1	6,7%	10,6	7,0%	6,7	4,4%

Reproduzierbarkeit

Qualitative Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde mit 90 Probenreplikaten im negative Bereich getestet, ~20% unter dem Cutoff, zum ~Cutoff, ~20% über dem Cutoff und im mittleren, positiven Bereich der Assays. Für SS-A/Ro (52 kD und 60 kD) Ab produzierte der Cutoff +/- 20% Proben 97,8% qualitative Übereinstimmung, die Cutoff Probe produzierte 51,1% negative und 48,9% positive Ergebnisse und andere Proben ergaben 100% qualitative Übereinstimmung. Für SS-B/La Ab produzierte die Cutoff Probe 53,3% negative und 46,7% positive Ergebnisse und andere Proben ergaben 100% qualitative Übereinstimmung.

Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit wurden mit positiven Proben getestet, die über einen Assaybereich ausgewählt wurden. Jede Probe wurde in 3 Durchgängen mit 3 Replikaten über 3 Tage für jede der drei Chargen getestet. Die Assayergebnisse dieser Muster erbrachten 100% qualitative Übereinstimmung.

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 SS-A (Ro) Ab war 2,0 EU/ml. LoD für den SS-B (La) war 1,6 EU/ml.

Linearität und Rückgewinnung

Linearität und Rückgewinnung wurde geprüft durch Verdünnen positiver Proben durch den Prüfungsbereich in abstandsgleichen Verdünnungen und dem Vergleichen tatsächlicher Resultate gegenüber erwarteter Resultate. Der lineare Bereich der Prüfungen wurde bestimmt zu 2,0 (LoD) - 160 EU/ml für SS-A (Ro) Ab und 1,6 (LoD) - 160 EU/ml für SS-B (La). Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

Prüf-bereich EU/ml	Anstieg (95 % CI)	Y-Achsen-abschnitt (95 % CI)	R ²	% Rückgewinnung (Erhalten/Erwartet)
SS-A (Ro) Ab				
2,6 bis 35,8	0,96 (0,89 bis 1,03)	0,76 (-0,7 bis 2,2)	0,9953	88 bis 104
3,0 bis 175,1	0,98 (0,93 bis 1,03)	2,91 (2,76 bis 3,06)	0,9919	86 bis 108
18,2 bis 156,0	0,99 (0,92 bis 1,07)	-1,32 (-8,5 bis 5,8)	0,9948	94 bis 110
30,3 bis 248,5	0,98 (0,81 bis 1,14)	-7,7 (-35,1 bis -19,7)	0,9724	100 bis 121
1,7 bis 21,0	1,02 (0,96 bis 1,09)	-0,59 (-1,43 bis 0,25)	0,9961	98 bis 115
SS-B (La) Ab				
2,8 bis 22,2	0,98 (0,89 bis 1,07)	0,26 (-1,0 bis 1,6)	0,9914	92 bis 106
8,7 bis 81,8	0,88 (0,76 bis 1,01)	2,61 (-4,2 bis 9,4)	0,981	84 bis 116
8,7 bis 159,3	0,90 (0,79 bis 1,01)	3,92 (-6,6 bis 14,5)	0,9894	94 bis 117
6,4 bis 197,4	1,00 (0,90 bis 1,11)	-5,80 (-18,64 bis 7,05)	0,9894	100 bis 119
1,1 bis 13,7	1,07 (0,93 bis 1,22)	-0,66 (-1,9 bis 0,58)	0,9815	92 bis 122

Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten SS-A (Ro) 52kD und 60kD und SS-B (La) Antikörperspiegeln mit potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und dem Studieren 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 $\mu\text{mol/L}$) und Rheumafaktor (100 EU/ml).

ImmuliSa™

ANS Anticorps ELISAs

SS-A (Ro) Anticorps ELISA
SS-B (La) Anticorps ELISA

[IVD] Pour utilisation à diagnostic *in vitro* Utilisation de prescription uniquement
Complexité CLIA : Élevée

ENCART PRODUIT

[REF] 5128 SS-A (Ro) Anticorps ELISA 96 Déterminations

[REF] 5129 SS-B (La) Anticorps ELISA 96 Déterminations

UTILISATION VISEE

ImmuliSa Enhanced™ SS-A (Ro) Anticorps ELISA : Immunoessais associés aux enzymes pour une détection qualitative et semi-quantitative des anticorps SS-A (Ro) (52 kD et 60 kD) IgG dans le sang humain pour aider le diagnostic du Lupus érythémateux systémique (LES) et le syndrome de Sjögren en conjonction avec les autres résultats cliniques et de laboratoire.

ImmuliSa Enhanced™ SS-B (La) Anticorps ELISA : Immunoessais associés aux enzymes pour une détection qualitative et semi-quantitative des anticorps SS-B (La) dans le sang humain pour aider le diagnostic du Lupus érythémateux systémique (LES) et le syndrome de Sjögren en conjonction avec les autres résultats cliniques et de laboratoire.

RESUME ET EXPLICATION

Les ANS sont des ribonucléoprotéines (snurps) complexes. Les auto-anticorps dirigés contre divers ANS ont prouvé être de valeur dans le diagnostic et le suivi de différentes maladies du tissu conjonctif¹⁻¹⁰. Les anticorps au SS-A (Ro) et au SS-B (La) ont lieu chez environ 30 à 50% et de 10 à 15% des patients atteints de LED et chez respectivement 60 à 95% et 40 à 90% des patients atteints du syndrome de Sjögren. Les anticorps au SS-B (La) se trouvent souvent en association avec les anticorps SS-A (Ro).¹⁸⁻²¹

Ces anticorps peuvent être détectés par diverses 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 titrage du sérum, il y a un potentiel pour l'automatisme et les analyses ELISA proposent une sensibilité plus grande.²²

PRINCIPE DE LA PROCEDURE

Le test est réalisé en tant que immunoessai en phase solide. Les micro-réceptacles sont couverts d'antigènes recombinés SS-A (Ro) 52kD et 60kD ou SS-B (La) suivi d'une mesure de blocage pour réduire l'union non-spécifique durant la phase d'essai. Les contrôles, les calibreurs et le sérum patient sont incubés dans les réceptacles couverts d'antigènes pour permettre aux anticorps spécifiques présents dans le sérum de se lier à l'antigène. Les anticorps non-reliés et les autres protéines de sérum sont enlevés en lavant les micro-réceptacles. Les anticorps reliés sont détectés en ajoutant un conjugué d'enzyme étiquetée associée anti-humain IgG aux micro-réceptacles. Le conjugué non-relié est enlevé par lavage. Un substrat d'enzyme spécifique (TMB) est alors ajouté aux réceptacles 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.

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-réceptacles sont pour un usage unique. Les lamelles de micro-réceptacles 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 matériaux²³.

L'acide sulfurique (H₂SO₄) est toxique et corrosif. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux. Éviter l'exposition aux bases, aux métaux ou à d'autres composés qui peuvent réagir avec des acides.

Le substrat d'enzyme TMB contient un irritant qui peut être néfaste si inhalé, ingéré ou absorbé par la peau. pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux.

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

Précaution : la loi fédérale des États-Unis limite la vente de ce dispositif par ou sur ordonnance d'un médecin qualifié.

Les matériaux fournis

Les kits contiennent assez de réactifs pour réaliser 96 déterminations.

ImmuLisa™ SS-A (Ro) Anticorps ELISA

REF 5128

12 x 8 **MICROPLATE|SSA**

Microplaque avec des micro-réipients individuels séparés. Couverte d'antigène recombiné SS-A (Ro) 52kD et 60kD. Prête à l'emploi.

1 x 1.75 ml **CONTROL+|SSA**

Contrôle positif (capsule rouge) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain positif aux anticorps SS-A (Ro) 52kD et 60kD. 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|SSA**

CALIBRATOR|B|SSA

CALIBRATOR|C|SSA

CALIBRATOR|D|SSA

CALIBRATOR|E|SSA

Série de **5 Calibreurs** 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. Dérivées de sérum humain contenant des anticorps SS-A (Ro). 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*. Prête à l'emploi.

2 x **BUF|WASH**

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

1 x

Feuilles de protocole

ImmuLisa™ SS-B (La) Anticorps ELISA

REF 5129

12 x 8 **MICROPLATE|SSB**

Microplaque avec des micro-réipients individuels séparés. Couverte avec de l'antigène La recombiné. Prête à l'emploi.

1 x 1,75 ml **CONTROL+|SSB**

Contrôle positif (capsule rouge) prêt à l'emploi. Contient du sérum humain positif aux anticorps SS-B (La). 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 SSB	Série de 5 Calibreurs 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. Dérivées de sérum humain contenant des anticorps SS-B (La). Les concentrations en EU/ml sont imprimées sur les étiquettes.
	CALIBRATOR B SSB	
	CALIBRATOR C SSB	
	CALIBRATOR D SSB	
	CALIBRATOR E SSB	
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*. Prête à l'emploi.
2 x	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Réhydratez jusqu'à un litre chacun.
1 x		Feuilles de protocole

Composants optionnels

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

Symboles utilisés sur les étiquettes

LOT	Numéro de lot
REF	Numéro Catalogue
IVD	Utilisation pour un diagnostic in vitro
	Utiliser avant
	Température de stockage
	Consulter les instructions d'emploi
	Nombre de tests
	Fabriquant
	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

FR

- Un lecteur de microplaques capable de lire des valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaques à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm
- Un laveur de microplaques automatique capable de distribuer 200 µl

COLLECTE ET MANIUPULATION DES SPECIMENS

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

PROCEDURE

Notes concernant la procédure

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

Méthode de test

- Etape 1** Laissez tous les réactifs et tous les spécimens s'adapter à la température ambiante.
- Etape 2** Etiquetez les feuilles de protocole pour indiquer l'emplacement des échantillons dans les récipients. Une bonne pratique de laboratoire est de réaliser les échantillons en double.
- Etape 3** Pour une **détermination qualitative** utilisez uniquement le Calibreur D (fiolle avec la capsule jaune).

ou

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

Qualitative				Semi-quantitative			
A	Vierge	S5	Etc.	A	Vierge	S1	Etc.
B	-Contrôle	S6		B	-Contrôle	S2	
C	+ Contrôle	S7		C	+ Contrôle	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

- Etape 4** Préparez une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **500µl** de diluant sérum.
- Etape 5** Enlevez les micro-récipients requis du sachet et remplacez les lamelles non utilisées dans le sachet refermé dans le réfrigérateur. Placez fermement les micro-récipients dans le support supplémentaire fournis.
- Etape 6** Pipetez **100 µl** de calibreurs prêts à l'emploi, de contrôle les positifs et négatifs et d'échantillons patient dilués (**1:101**) aux micro-récipients appropriés selon la feuille de protocole.

A noter : Inclure un récipient contenant **100 µl** de sérum diluant en tant que réactif vierge. Mettez sur zéro le lecteur ELISA contre le réactif vierge.

- Etape 7** Incubez **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 8** Laver **4x** avec le tampon à lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micro-récipient avec du tampon à lavage reconstitué. Débarrassez-vous du fluide en inversant et en tapotant le contenu de chaque récipient ou bien en aspirant le liquide de chaque récipient. Afin de buvarder à la fin du dernier lavage, inversez les lamelles et tapotez vigoureusement les récipients sur des serviettes de papier absorbantes. Pour les laveuses automatiques, programmez la laveuse selon les instructions du fabricant.

FR

Etape 9 Pipetez **100 µl** de conjugué dans les micro-réipients.

Etape 10 Incubez **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Etape 11 Lavez tous les micro-réipients comme lors de l'étape 8.

Etape 12 Pipetez **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque micro-réipient dans le même ordre et selon le même minutage que pour le conjugué.

Etape 13 Incubez **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Etape 14 Pipetez **100 µl** de solution stop dans chaque micro-réipient 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-réipient pour **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaque simple ou à double longueur d'onde pour 450/630nm contre le réactif vierge placé sur zéro absorbance.

Contrôle qualité

Les calibreurs, les contrôles positif et négatif et un réactif vierge doivent être utilisés 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 supérieure ou égale à 1,0 sinon le test devra être répété. Le contrôle négatif doit être <10 EU/ml. La densité optique du Calibreur D doit être supérieure à celle du contrôle négatif et inférieure à l'absorbance du contrôle positif. 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. DÉTERMINATION 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 devraient être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire pour la détection des anticorps ANS.

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées par le test d'échantillons sanguins normaux et contenant des contrôles de la maladie. La limite supérieure a été déterminée en utilisant la moyenne des sujets normaux plus 4,5 SD pour les SS-A (Ro) Ab ELISA et 3 SD pour les SS-B (La) Ab ELISA. La limite supérieure a été fixée à une valeur arbitraire de 20 EU/ml. Les 3 gammes de résultats (négatif, indéterminé et positif) de l'analyse sont fournies ci-dessous.

SS-A (Ro) Ab

52kD et 60 kD valeur	SS-B (La) Ab valeur	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-quantification et doivent être utilisés avec chaque exécution. Les gammes de mesure de ces analyses proviennent de l'EU/ml défini dans la Limite de détection (voir ci-dessous) du Calibreur A (160 EU/ml) pour les analyses semi-quantitatives. 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 hémolisés, contaminés de microbes ou lipémiques. Cette méthode ne doit être utilisée que pour le test d'échantillons de sérum humain. Les résultats obtenus ne servent que d'aide au diagnostic. Pris de manière indépendante, les résultats ne doivent pas être interprétés comme un diagnostic. 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 aux antigènes SS-A (Ro) et SS-B (La) dans différentes maladies du tissu conjonctif est résumée dans le tableau ci-dessous.

Importance du diagnostic des anticorps aux antigènes SS-A (Ro) et SS-B (La)

Anticorps	Association maladie (% d'incidence)
SS-A (Ro)	LED (30 à 50%) Syndrome de Sjögren (60-95%)
SS-B (La)	LED (10 à 15%) Syndrome de Sjögren (15-60%)

A noter : la fréquence de chaque spécificité d'anticorps dans une maladie représente une compilation tirée de la bibliographie^{3,10-17}. L'incidence varie en fonction de la population patient.

Des jeux d'échantillons cliniques ont été testés sur les ImmuLisa™ SS-A (Ro) (52 kD et 60 kD) et SS-B (La) Anticorps ELISA. Les résultats démontrant une prévalence sur les populations de cette étude sont fournis ci-dessous.

Maladie	SS-A (Ro) Ab			SS-B (La) Ab		
	n	n pos	% pos	n	n pos	% pos
LED	160	69	41,3 %	137	19	13,9 %
LED avec SAPL	15	3	20,0 %	14	3	21,4 %
Syndrome de Sjögren	104	81	77,9 %	68	41	60,3 %
Myosite	91	31	34,1 %	48	0	0,0 %
Sclérose systémique	154	30	19,5 %	70	3	4,3 %
Sujets en bonne santé	142	4	2,8 %	133	3	2,3 %

LED = lupus érythémateux disséminé, SAPL = syndrome antiphospholipide

La sensibilité et la spécificité cliniques des populations testées sont résumées ci-dessous :

Anticorps	Maladie	Sensibilité	Spécificité
SS-A (Ro) Ab	LED	39,4 %	91,5 %
SS-A (Ro) Ab	Syndromede Sjögren	77,9 %	91,5 %
SS-B (La) Ab	LED	14,6 %	97,7 %
SS-B (La) Ab	Syndrome de Sjögren	60,3 %	97,7 %

CHARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE

L'utilité des solutions ImmuLisa™ SS-A (Ro) (52kD et 60kD) et SS-B (La) Anticorps ELISA a été évaluée en testant des spécimens de patients souffrant de LES, syndrome de Sjögren, sclérose systémique, myosite et d'une variété de maladies auto-immunitaires et bien caractérisées avec des contrôles de maladie. 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.

FR

A. Comparaison de méthodes : Immulisa™ SS-A (Ro) 52kD et 60kD Anticorps ELISA contre d'autres kits SS-A (Ro) 52kD et 60kD Anticorps:

Autre SS-A (Ro) Anticorps ELISA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	138	24	162
SS-A (Ro)	Négatif	9	452	461
Ab ELISA	Total	147	476	623

Concordance en pourcentage cas positifs: 93.9% (95% CI 88.4% à 97.0%)
 Concordance en pourcentage cas négatifs: 95.0% (95% CI 92.5% à 96.7%)
 Concordance relative: 94.7% (95% CI 92.6% à 96.3%)

B. Comparaison de méthodes : Immulisa™ SS-B (La) Anticorps ELISA contre d'autres kits SS-B (La) Anticorps:

Autre SS-B (La) Anticorps ELISA

		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	62	8	70
SS-B (La)	Négatif	5	498	503
Ab ELISA	Total	67	506	573

Concordance en pourcentage cas positifs: 92.5% (95% CI 82.7% à 97.2%)
 Concordance en pourcentage cas négatifs: 98.4% (95% CI 96.8% à 99.3%)
 Concordance relative: 97.7% (95% CI 96.1% à 98.7%)

C. Réactivité croisée : de nombreux échantillons sanguins ayant une réactivité croisée potentielle aux maladies auto-immunitaires et infectieuses ont été testés pour les anticorps SS-A (Ro) (52 kD et 60 kD) et SS-B (La) avec la méthodologie Immulisa™. Les études ont démontré une réactivité croisée minimale des échantillons comme indiqué ci-dessous :

Maladie	SS-A (Ro) Ab		SS-B (La) Ab	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)
MGI ¹	40	0	40	0
Myosite ²			48	0
MCTD	17	0	10	0
Arthrite rhumatoïdale	33	1	33	1
Autres contrôles auto-immunitaires ³	127	0	123	0
Maladies infectieuses ⁴	110	3	110	3
Autres contrôles de maladie ⁵	20	1	20	1
Total	347	5 (1,4 %)	384	5 (1,3 %)

1. Rectocolite hémorragique (20), maladie de Crohn (20)
2. Myosite : polymyosite (34), dermatomyosite (14)
3. Autres résolutions des maladies auto-immunitaires : maladie cœliaque (26 SS-A, 25 SS-B), dermatite herpétiforme (10), granulomateuse de Wegener (8), syndrome Churg-Strauss (10), thyroïdite de Hashimoto (8), maladie de Graves (10), syndrome antiphospholipide (15 SS-A, 12 SS-B), maladie de Crohn (20), rectocolite hémorragique (20)
4. Résolutions des maladies infectieuses : syphilis (30), hépatite (30), toxoplasmose (10), cytomégalovirus (10), herpès (20), rubéole (10)
5. Autres contrôles de maladie: ostéo-arthrite (10), thrombopénie (10)

Précision

La précision a été testée avec des spécimens positifs sélectionnés au travers de l'éventail des échantillons utilisés pour l'analyse. Des exécutions d'analyses ont été conduites sur -6 mesures de chaque spécimen pendant 14 jours. La fidélité des résultats a été déterminée avec 12 mesures de chaque spécimen.

Kit	S #	Moyenne (EU/ml)	Imprécision totale		Entre les jours		En cours d'exécution Fidélité	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Analyse SS-A (Ro)	1	9,6	1,2	12,4%	1,2	12,3%	1,2	12,3%
	2	17,2	1,5	8,9%	1,6	9,1%	1,2	7,0%
	3	20,3	1,2	6,1%	1,2	6,0%	1,4	6,6%
	4	23,2	1,8	7,7%	1,8	7,9%	1,6	6,8%
	5	85,2	6,0	7,0%	6,0	7,1%	5,5	6,3%
	6	116,4	7,1	6,1%	7,2	6,2%	5,4	4,5%
	7	137,2	13,2	9,6%	13,4	9,9%	8,2	5,7%
Analyse SS-B (La)	1	11,9	1,0	8,1%	0,9	7,9%	0,8	7,1%
	2	15,2	1,2	8,0%	1,2	8,0%	1,1	7,7%
	3	19,8	1,7	8,4%	1,7	8,6%	1,1	5,7%
	4	25,2	1,9	7,6%	1,9	7,4%	1,7	6,9%
	5	51,4	4,7	9,1%	4,8	9,4%	3,6	6,9%
	6	80,4	7,7	9,5%	7,9	9,9%	5,8	7,0%
	7	152,1	10,1	6,7%	10,6	7,0%	6,7	4,4%

Reproductibilité

La reproductibilité qualitative intra-analyse a été testée avec 90 tests d'échantillons dans la gamme négative, env. 20 % en dessous de la limite supérieure, env. à la limite supérieure, env. 20 % au-dessus de la limite supérieure et dans la gamme positive modérée de l'analyse. Pour les anticorps SS-A/Ro (52 kD et 60 kD), la limite supérieure de ± 20 % des échantillons a produit 97,8 % d'accord qualitatif. L'échantillon de référence a produit 51,1 % de résultats négatifs et 48,9 % de résultats positifs et les autres échantillons ont produit 100 % d'accord qualitatif. Pour les anticorps SS-B/La, l'échantillon de référence a produit 53,3 % de résultats négatifs et 46,7 % de résultats positifs et les autres échantillons ont produit 100 % d'accord qualitatif.

La reproductibilité entre les lots a été testée avec des échantillons positifs sélectionnés dans la gamme de tests. Chaque échantillon a été testé sur 3 tests de 3 mesures sur 3 jours sur chacun des 3 lots. Les résultats des essais pour les échantillons ont produit 100 % d'accord qualitatif.

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 SS-A (Ro) Ab était de 2,0 EU/ml. LoD pour SS-B (La) était de 1,6EU/ml.

Linéarité et rétablissement

La linéarité et le rétablissement ont été testés en diluant des spécimens au travers de l'éventail de l'analyse dans des dilutions équidistantes et en comparant les résultats réels avec les résultats attendus. L'étendue linéaire des analyses a été fixée à 2,0 (LoD) – 160 EU/ml pour SS-A (Ro) Ab et à 1,6 (LoD) – 160 EU/ml pour SS-B (La) Ab. Les résultats sont résumés ci-dessous.

Test Etendue (EU/ml)	Pente (95% CI)	Segment sur l'axe Y (95% CI)	R ²	% de rétablissement (Obtenu/Attendu)
SS-A (Ro) Ab				
2,6 à 35,8	0,96 (0,89 à 1,03)	0,76 (-0,7 à 2,2)	0,9953	88 à 104
3,0 à 175,1	0,98 (0,93 à 1,03)	2,91 (2,76 à 3,06)	0,9919	86 à 108
18,2 à 156,0	0,99 (0,92 à 1,07)	-1,32 (-8,5 à 5,8)	0,9948	94 à 110
30,3 à 248,5	0,98 (0,81 à 1,14)	-7,7 (-35,1 à -19,7)	0,9724	100 à 121
1,7 à 21,0	1,02 (0,96 à 1,09)	-0,59 (-1,43 à 0,25)	0,9961	98 à 115
SS-B (La) Ab				
2,8 à 22,2	0,98 (0,89 à 1,07)	0,26 (-1,0 à 1,6)	0,9914	92 à 106
8,7 à 81,8	0,88 (0,76 à 1,01)	2,61 (-4,2 à 9,4)	0,981	84 à 116
8,7 à 159,3	0,90 (0,79 à 1,01)	3,92 (-6,6 à 14,5)	0,9894	94 à 117
6,4 à 197,4	1,00 (0,90 à 1,11)	-5,80 (-18,64 à 7,05)	0,9894	100 à 119
1,1 à 13,7	1,07 (0,93 à 1,22)	-0,66 (-1,9 à 0,58)	0,9815	92 à 122

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant du sérum avec des niveaux d'anticorps SS-A (Ro) 52kD et 60kD et SS-B (La) 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).

ImmuliTM

ELISA per il rilevamento degli anticorpi anti-ENA

SS-A (Ro) Antibody ELISA

SS-B (La) Antibody ELISA

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

Complessità CLIA: Elevata

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF 5128 SS-A (Ro) Antibody ELISA 96 determinazioni

REF 5129 SS-B (La) Antibody ELISA 96 determinazioni

USO PREVISTO

ImmuliTM Enhanced SS-A (Ro) Antibody ELISA: dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il rilevamento qualitativo e semiquantitativo degli anticorpi SS-A (Ro) (52 kD e 60 kD) IgG nel siero umano come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico (SLE) e sindrome di Sjögren, in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

ImmuliTM Enhanced SS-B (La) Antibody ELISA: dosaggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per il rilevamento qualitative e semiquantitativo degli anticorpi SS-B (La) IgG nel siero umano come ausilio nella diagnosi del lupus eritematoso sistemico (SLE) e e sindrome di Sjögren, 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 preziosi nella diagnosi e nel monitoraggio di varie malattie sistemiche del tessuto connettivo.¹⁻¹⁰ Anticorpi anti-SS-A (Ro) e anti-SS-B (La) sono presenti in circa il 30-50% e il 10-15% dei pazienti con LES e, rispettivamente, nel 60-95% e nel 40-90% dei pazienti con sindrome di Sjögren. Gli anticorpi anti-SS-B (La) sono spesso associati agli anticorpi anti-SS-A (Ro).¹⁸⁻²¹

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.²²

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test viene eseguito come dosaggio immunoenzimatico in fase solida. I micropozzetti sono rivestiti con antigene SS-A (Ro) 52kD e 60kD o SS-B (La) ricombinante, 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 pozzetti rivestiti con l'antigene per consentire agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene. Gli anticorpi non legati e le altre proteine sieriche vengono rimossi tramite lavaggio dei micropozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati aggiungendo ai micropozzetti un coniugato anti-IgG umana marcato enzimaticamente. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto ai pozzetti 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.²³

Stop Solution è una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico (H₂SO₄) è nocivo e corrosivo. Non ingerire e evitare il contatto con occhi e pelle. Evitare l'esposizione a basi, metallici o altri composti che potrebbero reagire con acidi.

Il substrato enzimatico TMB contiene un irritante che potrebbe essere nocivo se inalato, ingerito o assorbito dalla pelle. Non ingerire e evitare il contatto con pelle e occhi.

IT

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.

Attenzione: La legge federale degli Stati Uniti limita la vendita di tale dispositivo ad un medico abilitato.

Materiali forniti

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

ImmuLisa™ SS-A (Ro) Antibody ELISA

REF 5128

12 x 8 **MICROPLATE|SSA**

Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene SS-A (Ro) 52kD e 60kD ricombinante. Pronta per l'uso.

1 x 1.75 ml **CONTROL|+SSA**

Controllo positivo (tappo rosso), pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi anti-SS-A (Ro) 52kD e 60kD. 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|SSA**

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-SS-A (Ro). Le concentrazioni in UE/ml sono stampate sulle etichette.

CALIBRATOR|B|SSA

CALIBRATOR|C|SSA

CALIBRATOR|D|SSA

CALIBRATOR|E|SSA

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**

Diluyente 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

ImmuLisa™ SS-B (La) Antibody ELISA

REF 5129

12 x 8 **MICROPLATE|SSB**

Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene La ricombinante. Pronta per l'uso.

1 x 1,75 ml **CONTROL|+SSB**

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

IT

1 x 1,75 ml **CONTROL-**

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

5 x 1,75 ml **CALIBRATOR|A|SSB**

CALIBRATOR|B|SSB

CALIBRATOR|C|SSB

CALIBRATOR|D|SSB

CALIBRATOR|E|SSB

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- SS-B (La). 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

Componenti facoltativi

1 x 60 ml **BUF|WASH**

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

Simboli utilizzati sulle etichette



Numero di lotto



Numero di catalogo



Uso diagnostico in vitro



Utilizzare entro



Limiti di temperatura



Consultare le istruzioni per l'uso



Sufficiente per



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 micropiastre capace di leggere valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 µl.

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

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

PROCEDURA

Note sulla procedura

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

Metodo del test

- Passaggio 1** Lasciar equilibrare a temperatura ambiente tutti i reagenti e i campioni.
- Passaggio 2** Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede di analizzare i campioni in duplicato.
- Passaggio 3** Per una **determinazione qualitativa** utilizzare unicamente il calibratore D (*flaconcino con tappo giallo*).

oppure

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

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

- Passaggio 4** Preparare una diluizione **1:101** dei campioni del paziente miscelando **5 µl** dei sieri del paziente con **500 µl** di diluente per siero.
- Passaggio 5** Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere in frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.
- Passaggio 6** Pipettare **100 µl** di calibratori pronti all'uso, controllo positivo, controllo negativo e campioni diluiti del paziente (**1:101**) nei micropozzetti appropriati in base alla scheda del protocollo.
Nota: includere un pozzetto contenente **100 µl** del diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.
- Passaggio 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.
- Passaggio 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti capovolgendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per asciugare al termine dell'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su salviette di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del produttore.
- Passaggio 9** Pipettare **100 µl** di coniugato nei micropozzetti.
- Passaggio 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.
- Passaggio 11** Lavare tutti i micropozzetti come al Passaggio 8.
- Passaggio 12** Pipettare **100 µl** di substrato enzimatico in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi adottati per il coniugato.
- Passaggio 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.

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. La densità ottica del calibratore D deve essere superiore a quella del controllo negativo e inferiore all'assorbanza del controllo positivo. 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 donatori di sangue normali e siero per controllo malattie. Il cut-off è stato stabilito utilizzando la media dei soggetti normali più 4,5 DS per SS-A (Ro) Ab ELISA e più 3 DS per SS-B (La) Ab ELISA. Al cut-off è stato assegnato un valore arbitrario di 20 UE/ml. Gli intervalli di dosaggio sono riportati di seguito.

Valore antic. anti-SS-A (Ro) 52kD e 60kD	Valore antic. anti-SS-B (La)	Interpretazione
<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. L'intervallo di misurazione di questi dosaggi è definito in UE/ml nel Limite di rilevamento (vedi di seguito) del Calibratore A (160 UE/ml) per i dosaggi semiquantitativi. 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 contro gli antigeni SS-A (Ro) e SS-B (La) in varie malattie sistemiche del tessuto connettivo.

Significato diagnostico degli anticorpi contro gli antigeni SS-A (Ro) e SS-B (La)

Anticorpo	Associazione patologica (incidenza %)
SS-A (Ro)	LES (30-50%) Sindrome di Sjögren (60-95%)
SS-B (La)	LES (10-15%) Sindrome di Sjögren (15-60%)

Nota: la frequenza di ogni specificità anticorpale in una malattia rappresenta una raccolta di dati dalla letteratura.^{3,10-17} L'incidenza varia a seconda della popolazione di pazienti.

Serie di campioni clinici sono stati analizzati su ImmuLisa™ SS-A (Ro) (52 kD e 60 kD) e SS-B (La) Antibody ELISA. I risultati che hanno dimostrato una prevalenza nelle popolazioni per questo studio sono forniti di seguito.

Condizione	SS-A (Ro) Ab			SS-B (La) Ab		
	n	n pos	% pos	n	n pos	% pos
LES	160	69	41,3%	137	19	13,9%
LES con APS	15	3	20,0%	14	3	21,4%
Sjögren	104	81	77,9%	68	41	60,3%
Miosite	91	31	34,1%	48	0	0,0%
Sclerosi sistemica	154	30	19,5%	70	3	4,3%
Soggetti sani	142	4	2,8%	133	3	2,3%

LES = lupus eritematoso sistemico, APS=antiphospholipid syndrome

La sensibilità e specificità clinica per le popolazioni testate è riassunta di seguito:

Analisi	Malattia	Sensibilità	Specificità
SS-A (Ro) Ab	LES	39,4%	91,5%
SS-A (Ro) Ab	Sjögren	77,9%	91,5%
SS-B (La) Ab	LES	14,6%	97,7%
SS-B (La) Ab	Sjögren	60,3%	97,7%

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità dei dosaggi ImmuLisa™ SS-A (Ro) (52 kD e 60 kD) e SS-B (La) Antibody ELISA è stata valutata analizzando campioni di soggetti con SLE, Sjögren, sclerosi sistemica, miosite e una varietà di popolazioni con controllo di malattia autoimmune o infettiva. 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™ SS-A (Ro) 52kD e 60kD vs. altro kit per il rilevamento degli anticorpi anti-SS-A (Ro) 52kD e 60kD.

Altro ELISA antic. anti-SS-A (Ro)

IMMCO		Positivo	Negativo	Totale
SS-A (Ro)	Positivo	138	24	162
	Negativo	9	452	461
ELISA antic. anti-	Totale	147	476	623

Concordanza percentuale positiva: 93,9% (IC al 95%: da 88,4% a 97,0%)

Concordanza percentuale negativa: 95,0% (IC al 95%: da 92,5% a 96,7%)

Concordanza relativa: 94,7% (IC al 95%: da 92,6% a 96,3%)

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

Altro ELISA antic. anti-SS-B (La)

IT

		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	62	8	70
anti-SS-B (La)	Negativo	5	498	503
ELISA antic.	Totale	67	506	573

Concordanza percentuale positiva: 92,5% (IC al 95%: da 82,7% a 97,2%)

Concordanza percentuale negativa: 98,4% (IC al 95%: da 96,8% a 99,3%)

Concordanza relativa: 97,7% (IC al 95%: da 96,1% a 98,7%)

- B. Reattività crociata: sono stati analizzati numerosi sieri di malattie infettive e autoimmuni con reattività crociata per anticorpi SS-A (Ro) (52 kD e 60 kD) e SS-B (La) usando i dosaggi Immulisa™. Gli studi hanno dimostrato reattività crociata minima per questi campini come indicato di seguito.

Condizione	SS-A (Ro) Ab		SS-B (La) Ab	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)
IBD ¹	40	0	40	0
Miosite ²			48	0
MCTD	17	0	10	0
Artrite reumatoide	33	1	33	1
Altri controlli Al ³	127	0	123	0
Malattia infettiva ⁴	110	3	110	3
Altri controlli della malattia ⁵	20	1	20	1
Totale	347	5 (1,4%)	384	5 (1,3%)

1. Colite ulcerosa (20), morbo di Crohn (20)

2. Miosite: polimiosite (34), dermatomiosite (14)

3. Altri controlli di malattie autoimmuni: malattia celiaca (26 SS-A, 25 SS-B), dermatite erpetiforme (10), Wegener (8), Churg-Strauss (10), Hashimoto (8), Graves (10), sindrome antifosfolipide (15 SS-A, 12 SS-B), morbo di Crohn (20), colite ulcerosa (20)

4. Controlli per malattie infettive: sifilide (30), epatite (30), toxoplasmosi (10), citomegalovirus (10), herpes (20), rubella (10)

5. Controlli di alter malattie: osteoartrite (10), trombocitopenia (10)

Precisione

La precisione è stata testata con campioni positivi selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. In 14 giorni sono state condotte sessioni di dosaggio di 6 replicati di ogni campione. La ripetibilità è stata determinata con 12 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 SS-A (Ro)	1	9,6	1,2	12,4%	1,2	12,3%	1,2	12,3%
	2	17,2	1,5	8,9%	1,6	9,1%	1,2	7,0%
	3	20,3	1,2	6,1%	1,2	6,0%	1,4	6,6%
	4	23,2	1,8	7,7%	1,8	7,9%	1,6	6,8%
	5	85,2	6,0	7,0%	6,0	7,1%	5,5	6,3%
	6	116,4	7,1	6,1%	7,2	6,2%	5,4	4,5%
	7	137,2	13,2	9,6%	13,4	9,9%	8,2	5,7%
Dosaggi o SS-B (La)	1	11,9	1,0	8,1%	0,9	7,9%	0,8	7,1%
	2	15,2	1,2	8,0%	1,2	8,0%	1,1	7,7%
	3	19,8	1,7	8,4%	1,7	8,6%	1,1	5,7%
	4	25,2	1,9	7,6%	1,9	7,4%	1,7	6,9%
	5	51,4	4,7	9,1%	4,8	9,4%	3,6	6,9%
	6	80,4	7,7	9,5%	7,9	9,9%	5,8	7,0%
	7	152,1	10,1	6,7%	10,6	7,0%	6,7	4,4%

Riproducibilità

La riproducibilità qualitativa intra-dosaggio è stata testata con 90 replicati dei campioni nell'intervallo negativo, ~20% sotto il cut-off, al ~cut-off, ~20% sopra il cut-off e nell'intervallo positivo moderato del dosaggio. Per SS-A/Ro (52 kD e 60 kD) Ab I campioni con cutoff +/- 20% hanno dimostrato una concordanza qualitative del 97,8%, i campioni di cutoff hanno dimostrato risultati negativi del 51,1% e risultati positivi del 48,9% e altri campioni hanno dimostrato una concordanza qualitativa del 100%. Per SS-B/La Ab i campioni di cutoff hanno dimostrato risultati positivi del 53,3% e risultati positivi del 46,7% e altri campioni hanno dimostrato una concordanza qualitativa del 100%.

La riproducibilità inter-dosaggio è stata testata con campioni positivi selezionati tramite l'intervallo del dosaggio. Ogni campione è stato analizzato in 3 sessioni di 3 replicati in 3 giorni su 3 lotti ognuno 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-SS-A (Ro) era di 2 UE/ml. Il Lod per gli anticorpi anti-SS-B (La) era di 1,6 UE/ml.

Linearità e recupero

La linearità e il recupero sono stati testati diluendo i campioni positivi attraverso l'intervallo del dosaggio in soluzioni equidistanti e confrontando i risultati reali con quelli previsti. L'intervallo lineare determinato del dosaggio è stato di 2 (LoD), 160 UE/ml per gli anticorpi anti-SS-A (Ro) e di 1,6 (LoD), 160 UE/ml per gli anticorpi anti-SS-B (La). I risultati sono riepilogati di seguito:

Test Intervallo (UE/ml)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R ²	% recupero (ottenuto/previsto)
Antic. anti-SS-A (Ro)				
da 2,6 a 35,8	0,96 (da 0,89 a 1,03)	0,76 (da -0,7 a 2,2)	0,9953	da 88 a 104
da 3,0 a 175,1	0,98 (da 0,93 a 1,03)	2,91 (da 2,76 a 3,06)	0,9919	da 86 a 108
da 18,2 a 156,0	0,99 (da 0,92 a 1,07)	-1,32 (da -8,5 a 5,8)	0,9948	da 94 a 110
da 30,3 a 248,5	0,98 (da 0,81 a 1,14)	-7,7 (da -35,1 a -19,7)	0,9724	da 100 a 121
da 1,7 a 21,0	1,02 (da 0,96 a 1,09)	-0,59 (da -1,43 a 0,25)	0,9961	da 98 a 115
Antic. anti-SS-B (La)				
da 2,8 a 22,2	0,98 (da 0,89 a 1,07)	0,26 (da -1,0 a 1,6)	0,9914	da 92 a 106
da 8,7 a 81,8	0,88 (da 0,76 a 1,01)	2,61 (da -4,2 a 9,4)	0,981	da 84 a 116
da 8,7 a 159,3	0,90 (da 0,79 a 1,01)	3,92 (da -6,6 a 14,5)	0,9894	da 94 a 117
da 6,4 a 197,4	1,00 (da 0,90 a 1,11)	-5,80 (da -18,64 a 7,05)	0,9894	da 100 a 119
da 1,1 a 13,7	1,07 (da 0,93 a 1,22)	-0,66 (da -1,9 a 0,58)	0,9815	da 92 a 122

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di anticorpi anti-SS-A (Ro) 52kD e 60kD e anti-SS-B (La) 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).



ImmuliSa™ Anticorpos anti-ENA ELISAs

Anticorpos anti-SS-A (Ro) ELISA Anticorpos anti-SS-B (La) ELISA

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

Complexidade CLIA: Elevada

FOLHETO DO PRODUTO

REF 5128	Anticorpos anti-SS-A (Ro) ELISA	96 Determinações
REF 5129	Anticorpos anti-SS-B (La) ELISA	96 Determinações

ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Ensaio imunoenzimático ImmuliSa Enhanced™ SS-A (Ro): Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a deteção qualitativa e semi quantitativa de anticorpos IgG SS-A (Ro) (52 kD e 60 kD) em soro humano para ajuda no diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e Síndrome de Sjögren em conjunto com descobertas clínicas e outros testes laboratoriais.

Ensaio imunoenzimático ImmuliSa Enhanced™ SS-B (La): Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a deteção qualitativa e semi quantitativa de anticorpos IgG SS-B (La) em soro humano para ajuda no diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e Síndrome de Sjögren em conjunto com descobertas clínicas e outros testes laboratoriais.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os ENA são complexos de ribonucleoproteínas solúveis (snurps). Os autoanticorpos direcionados contra diversos ENA provaram ser valiosos no diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças sistémicas do tecido conjuntivo.¹⁻¹⁰ Os anticorpos anti-SS-A (Ro) e SS-B (La) ocorrem em cerca de 30-50% e 10-15% dos pacientes com LES e 60-95% e 40-90% dos pacientes com o Síndrome de Sjögren, respetivamente. Os anticorpos anti-SS-B (La) ocorrem frequentemente em associação com os anticorpos anti-SS-A (Ro).¹⁸⁻²¹

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 subjetividade 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.²²

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é realizado como um imunoensaio de base só lida. Os micropoços são revestidos de antígenos recombinantes de SS-A (Ro) 52kD e 60 kD ou SS-B (La), 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 antígenos, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao antígeno. Os anticorpos não ligados e as outras proteínas do soro são eliminados através da lavagem dos micropoços. 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 detetada através de uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB para um produto de reação colorido. A reação é interrompida e a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em Unidades ELISA por mililitro (EU/ml) e comunicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

Armazenamento e Preparação

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

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a 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 seladas 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.²³

A Solução de Paragem é uma solução diluída de ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico (H₂SO₄) é venenoso e corrosivo. Não ingerir e evitar contacto com a pele e os olhos. Evitar contacto com bases, metais ou outros compostos que podem reagir com ácidos.

PT

O Substrato Enzimático TMB contém um irritante que pode ser nocivo em caso de inalação, ingestão ou absorção através da pele. Não ingerir e evitar contacto com a pele e os olhos.

As instruções devem ser seguidas exatamente 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.

Atenção: A lei federal dos Estados Unidos limita a venda deste dispositivo por ou mediante a prescrição de um médico licenciado.

Material fornecido

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

ImmuLISA™ Anticorpos anti-SS-A (Ro) ELISA	[REF] 5128
12 x 8 [MICROPLATE SSA]	Microplaca com micropoços individuais separados. Revestidos com antigénio recombinante SS-A (Ro) 52kD e 60kD. Pronta a utilizar.
1 x 1.75 ml [CONTROL + SSA]	Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para anticorpos anti-SS-A (Ro) 52kD e 60kD. A faixa de concentração esperada em EU/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1.75 ml [CONTROL -]	Controlo Negativo pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.
5 x 1.75 ml [CALIBRATOR A SSA] [CALIBRATOR B SSA] [CALIBRATOR C SSA] [CALIBRATOR D SSA] [CALIBRATOR E SSA]	Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tampa azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 20 EU/ml e Calibrador E (tampa laranja) 1 EU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos anti-SS-A (Ro). As concentrações em EU/ml estão impressas na etiqueta.
1 x 15 ml [IgG-CONJ HRP]	Conjugado HRP de cabra IgG anti humano. Pronta a utilizar, Código de cor rosa.
1 x 60 ml [DIL]	Diluinte de Soro. Pronta a utilizar, Código de cor roxo.
1 x 15 ml [SUBSTRATE TMB]	Substrato enzimático TMB. Pronta a utilizar, Proteger da luz.
1 x 15 ml [STOP H2SO4]	Solução de Paragem*. Pronta a utilizar,
2 x [BUF WASH]	Tampão de lavagem de pó. Reconstituir para um litro cada.
1 x	Folhas de Protocolo

ImmuLISA™ Anticorpos anti-SS-B (La) ELISA **[REF]** 5129

12 x 8 [MICROPLATE SSB]	Microplaca com micropoços individuais separados. Revestidos com antigénio recombinante La. Pronta a utilizar,
--------------------------------	--

PT

1 x 1.75 ml CONTROL+SSB

1 x 1.75 ml CONTROL-

5 x 1.75 ml CALIBRATOR|A|SSB

CALIBRATOR|B|SSB

CALIBRATOR|C|SSB

CALIBRATOR|D|SSB

CALIBRATOR|E|SSB

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

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

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

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

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

Diluinte de Soro. Pronta a utilizar, Código de cor roxo.

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

Solução de Paragem*. Pronta a utilizar,

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










Folhas de Protocolo


Componentes Opcionais

1 x 60 ml BUF|WASH

Tampão de Lavagem Líquido concentrado. **Reconstituir para um litro.**

Símbolos utilizados nas etiquetas

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
	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 libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador

- Toalhetes de papel absorventes
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente, podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2ª a 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.

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

- 4º Passo** Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500ul** de Diluente de Soro.
- 5º Passo** Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.
- 6º Passo** Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, controlos Positivo e Negativo e amostras de pacientes diluídas (**1:101**) nos micropoços apropriados, conforme a folha de protocolo.
Nota: Incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.
- 7º Passo** Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

- 8º Passo** Lavar **4x** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão retirando os conteúdos de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.
- 9º Passo** Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- 10º Passo** Incubar durante **30 minutos** (\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 absorvância, no espaço de **30 minutos**, da adição da solução de paragem.
- 15º Passo** Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou, a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e um reagente branco devem ser executados em cada ensaio, a fim de verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser <0.3 . O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 1.0, caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser <10 EU/ml. A densidade ótica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. O controlo positivo deve apresentar valores na faixa indicada na ampola.

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 absorvância do Calibrador A até E, consoante as respetivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em eU/ml no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão. Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários EU/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais para a deteção de anticorpos anti-ENA.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados testando dadores de sangue normal e soro de controlo de doenças. A média dos indivíduos normais mais 4,5 SD foi estabelecida como o corte do ensaio para a Ab S-A (Ro) ELISA e 3 SD para a Ab SS-B (La) ELISA. Foi atribuído um corte com um valor arbitrário de 20EU/ml. Os intervalos do ensaio negativo, indeterminado e positivo são apresentados a seguir.

Valor Ab SS-A (Ro)

52kD e 60 kD	Valor Ab SS-B (La)	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. O intervalo de medição destes ensaios é proveniente das UE/ml definidas no Limite de

Deteção (ver abaixo) para o Calibrador A (160 UE/ml) para ensaios semi quantitativos. As amostras de pacientes que contenham elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos rigorosos, essas amostras devem ser ainda diluídas de modo a recaírem na série da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para determinar valores EU/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo fator de diluição.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ensaio não deve ser realizado em amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipêmicas. 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 contra os antígenos anti-SS-A (Ro) e SS-B (La) em diversas doenças sistêmicas do tecido conjuntivo é resumida na tabela seguinte:

A importância do diagnóstico de Anticorpos contra os antígenos anti-SS-A (Ro) e SS-B (La).

Anticorpos	Associação de Doenças (% de Incidência)
SS-A (Ro)	LES (30-50%) Síndrome de Sjögren (60-95%)
SS-B (La)	SLE (10-15%) Síndrome de Sjögren (15-60%)

Nota: A frequência de cada especificidade de anticorpos numa doença representa compilação e retiradas da literatura.^{3,10-17} A incidência varia dependendo da população de pacientes.

PT

Foram testados conjuntos de amostras clínicas com os ensaios imunoenzimáticos ImmuLISA™ SS-A (Ro) (52 kD e 60 kD) e SS-B (La). Seguidamente são apresentados os resultados que demonstram a prevalência nas populações para este estudo.

Doença	SS-A (Ro) Ab			SS-B (La) Ab		
	n	n	% pos	n	n	% pos
LES	160	69	41,3%	137	19	13,9%
LES com APS	15	3	20,0%	14	3	21,4%
Sjögren	104	81	77,9%	68	41	60,3%
Miosite	91	31	34,1%	48	0	0,0%
Esclerose sistémica	154	30	19,5%	70	3	4,3%
Indivíduos saudáveis	142	4	2,8%	133	3	2,3%

LES = lúpus eritematoso sistémico, SAF=síndrome antifosfolípide

Seguidamente são resumidas a sensibilidade e a especificidade clínicas para as populações testadas:

Analito	Doença	Sensibilidade	Especificidade
SS-A (Ro) Ab	LES	39,4%	91,5%
SS-A (Ro) Ab	Sjögren's	77,9%	91,5%
SS-B (La) Ab	LES	14,6%	97,7%
SS-B (La) Ab	Sjögren's	60,3%	97,7%

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da ImmuLISA™ Anticorpos anti SS-A (Ro) (52kD e 60kD) e SS-B (La) ELISAs foi avaliada ao testar amostras de indivíduos com LES, Síndrome de Sjögren, esclerose sistémica, miosite e uma série de populações de controlo de doenças autoimunes e infecciosas. 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-SS-A (Ro) 52kD e 60kD ELISA vs. outro kit de anticorpos anti-SS-A (Ro) 52kD e 60kD:

Outro Anticorpos anti-SS-A (Ro) ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	138	24	162
SS-A (Ro)	Negativo	9	452	461
Ab ELISA	Total	147	476	623

Acordo percentual positivo: 93.9% (95% CI 88.4% a 97.0%)

Acordo percentual negativo: 95.0% (95% CI 92.5% a 96.7%)

Concordância Relativa: 94.7% (95% CI 92.6% a 96.3%)

- B. Método Comparativo: ImmuLISA™ Anticorpos anti-SS-B (La) ELISA vs. outro kit de Anticorpos anti-SS-B (La):

Outros Anticorpos SS-B (La) ELISA

		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	62	8	70
SS-B (La)	Negativo	5	498	503
Ab ELISA	Total	67	506	573

Acordo percentual positivo: 92.5% (95% CI 82.7% a 97.2%)

Acordo percentual negativo: 98.4% (95% CI 96.8% a 99.3%)

Concordância Relativa: 97.7% (95% CI 96.1% a 98.7%)

C. Reatividade Cruzada: Foram testados numerosos soros de doenças autoimunes e infecciosas com potencial de reatividade cruzada para anticorpos SS-A (Ro) (52 kD e 60 kD) e SS-B (La) através dos ensaios ImmuLISA™.

Estudos demonstraram reatividade cruzada mínima para estas amostras, conforme abaixo indicado.

Doença	SS-A (Ro) Ab		SS-B (La) Ab	
	n	n pos (%)	n	n pos (%)
DII (Doenças Inflamatórias Intestinais) ¹	40	0	40	0
Miosite ²			48	0
DMTC	17	0	10	0
Artrite reumatoide	33	1	33	1
Outros controlos AI ³	127	0	123	0
Doença infecciosa ⁴	110	3	110	3
Outros controlos de doenças ⁵	20	1	20	1
Total	347	5 (1.4%)	384	5 (1.3%)

1. Colite ulcerativa (20), Doença de Crohn (20)
2. Miosite: polimiosite (34), dermatomiosite (14)
3. Outros controlos de doenças autoimunes: doença celíaca (26 SS -A, 25 SS-B), dermatite herpetiforme (10), Wegener (8), Churg-Strauss (10), Hashimoto (8), Graves (10), síndrome antifosfolipídico (15 SS -A, 12 SS-B), doença de Crohn (20), colite ulcerativa (20)
4. Controlos de doenças infecciosas: sífilis (30), hepatite (30), toxoplasmose (10), citomegalovírus (10), herpes (20), rubéola (10)
5. Outros controlos de doenças: osteoartrite (10), trombocitopenia (10)

PT

A precisão foi testada com amostras positivas selecionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram conduzidos ensaios a 6 réplicas de cada amostra em 14 dias. A repetibilidade foi determinada com 12 réplicas de cada amostra.

Kit	S #	Média (EU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		Na Experiência (Repetibilidade)	
			SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
Ensaio SS-A (Ro)	1	9,6	1,2	12,4%	1,2	12,3%	1,2	12,3%
	2	17,2	1,5	8,9%	1,6	9,1%	1,2	7,0%
	3	20,3	1,2	6,1%	1,2	6,0%	1,4	6,6%
	4	23,2	1,8	7,7%	1,8	7,9%	1,6	6,8%
	5	85,2	6,0	7,0%	6,0	7,1%	5,5	6,3%
	6	116,4	7,1	6,1%	7,2	6,2%	5,4	4,5%
	7	137,2	13,2	9,6%	13,4	9,9%	8,2	5,7%
Ensaio SS-B (La)	1	11,9	1,0	8,1%	0,9	7,9%	0,8	7,1%
	2	15,2	1,2	8,0%	1,2	8,0%	1,1	7,7%
	3	19,8	1,7	8,4%	1,7	8,6%	1,1	5,7%
	4	25,2	1,9	7,6%	1,9	7,4%	1,7	6,9%
	5	51,4	4,7	9,1%	4,8	9,4%	3,6	6,9%
	6	80,4	7,7	9,5%	7,9	9,9%	5,8	7,0%
	7	152,1	10,1	6,7%	10,6	7,0%	6,7	4,4%

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade qualitativa intra-ensaio foi testada com 90 repetições de amostras na série negativa, ~20% abaixo do corte, ~20% acima do corte e na série positiva moderada dos ensaios. Para o SS-A/Ro (52 kD e 60 kD) Ab, o corte +/- 20% das amostras produziu 97,8% de acordo qualitativo, a amostra de corte produziu resultados negativos de 51,1% e positivos de 48,9% e outras amostras produziram 100% de acordo qualitativo. Para o SS-B/La Ab, a amostra de corte produziu resultados negativos de 53,3% e positivos de 46,7% e outras amostras produziram 100% de acordo qualitativo.

A reprodutibilidade entre lotes foi testada com amostras positivas selecionadas ao longo de todo o intervalo do ensaio. Cada amostra foi testada em 3 ensaios de 3 réplicas em 3 dias para cada um dos 3 lotes. Os resultados do ensaio para estas amostras produziram 100% de acordo qualitativo.

Limite 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 SS-B (La) foi de 1,6 EU/ml.

Linearidade e Recuperação

A linearidade e a recuperação foram testadas através da diluição de amostras positivas ao longo de todo o intervalo do ensaio em diluições equidistantes e comparando os valores atuais vs os valores esperados. A série linear dos ensaios foi determinada como 2,0 (LoD) – 307 EU/ml para a Ab SS-A (Ro) e 1,6 (LoD) – 160 EU/ml para a Ab SS-B (La). Estes resultados são seguidamente resumidos.

Teste Série (EU/ml)	Inclinação (95% CI)	Y-interceção (95% CI)	R²	% de Recuperação (esperada/prevista)
Ab SS-A (Ro)				
2,6 a 35,8	0,96 (0,89 a 1,03)	0,76 (-0,7 a 2,2)	0,9953	88 a 104
3,0 a 175,1	0,98 (0,93 a 1,03)	2,91 (2,76 a 3,06)	0,9919	86 a 108
18,2 a 156,0	0,99 (0,92 a 1,07)	-1,32 (-8,5 a 5,8)	0,9948	94 a 110
30,3 a 248,5	0,98 (0,81 a 1,14)	-7,7 (-35,1 a -19,7)	0,9724	100 a 121
1,7 a 21,0	1,02 (0,96 a 1,09)	-0,59 (-1,43 a 0,25)	0,9961	98 a 115
Ab SS-B (La)				
2,8 a 22,2	0,98 (0,89 a 1,07)	0,26 (-1,0 a 1,6)	0,9914	92 a 106
8,7 a 81,8	0,88 (0,76 a 1,01)	2,61 (-4,2 a 9,4)	0,981	84 a 116
8,7 a 159,3	0,90 (0,79 a 1,01)	3,92 (-6,6 a 14,5)	0,9894	94 a 117
6,4 a 197,4	1,00 (0,90 a 1,11)	-5,80 (-18,64 a 7,05)	0,9894	100 a 119
1,1 a 13,7	1,07 (0,93 a 1,22)	-0,66 (-1,9 a 0,58)	0,9815	92 a 122

Interferência

A interferência foi estudada, misturando o soro com os níveis conhecidos de anticorpos anti-SS-A (Ro) 52kD e 60kD e SS-B (La) 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 Fator Reumatoide (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. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol.* 1989;44:93-151.
11. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995;24:323-58.
12. Meilof JF, Smeenk RJ. Autoantibodies and their target antigens in Sjögren's syndrome. *Neth J Med.* 1992;40:140-7.
13. Scofield RH, Farris AD, Horsfall AC, Harley JB. Fine specificity of the autoimmune response to the Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* 1999;42:199-209.
14. Meyer O. [Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new?]. *Ann Med Interne (Paris).* 2002;153:520-9.
15. Parker JC, Burlingame RW, Bunn CC. Prevalence of antibodies to Ro-52 in a serologically defined population of patients with systemic sclerosis. *Journal of Autoimmune Diseases* 2009, Mar 6; 6:2
16. Schulte-Pelkum J, Fritzier M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev.* 2009;8:632-7. Epub 2009 Feb 12.
17. Routsias JG, Tzioufas AG. Sjögren's syndrome--study of autoantigens and autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007;32:238-51.
18. Clark G, Reichlin M and Tomasi TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*1102:117-124, 1969.
19. Alspaugh MA and Maddison P. Resolution of the identity of certain antigen antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arth Rheum* 22: 796-798, 1979.
20. Sontheimer RD, Thomas JR and Gilliam JN. Subacute cutaneous lupus erythematosus subset. *Arch Dermatol* 115: 1409-1415, 1979.
21. Sontheimer RD, Maddison PJ and Reichlin M. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 97:664-671, 1982.
22. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennard DM and Hough D. Antibodies to nRNP, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 62: 337- 245, 1985.
23. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).

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

or your local product distributor



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands