



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™ Enhanced Antinuclear Antibody (ANA) Screen ELISA

PRODUCT INSERT

IVD For *in vitro* diagnostic use

REF 5175 ANA Screen ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

The ImmuLisa™ Enhanced Antinuclear Antibody (ANA) Screen ELISA is a qualitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) intended to screen for the presence of antinuclear antibodies (ANAs) in human serum as an aid in the diagnosis of certain systemic rheumatic diseases. This assay collectively detects, in one well, total ANAs against double stranded DNA (dsDNA, nDNA), histones, SS-A(Ro), SS-B(La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, and centrometric antigens, along with sera positive for Immunofluorescent (IFA) HEp-2 ANAs. **For *in vitro* diagnostic use. High complexity test.**

INTRODUCTION

Antinuclear antibodies (ANAs) directed against a variety of macromolecules occur in extraordinarily high frequency in systemic rheumatic diseases.¹ Although these antibodies were first associated with systemic lupus erythematosus (SLE), the list of implicated diseases has expanded and many rheumatic diseases are characterized by the presence of one or more of these ANAs. For instance, anti-SS-A(Ro) and anti-SS-B(La) antibodies are associated with SLE and Sjogren's Syndrome (SS), anti-dsDNA and anti-Sm antibodies with SLE, anti-histone antibodies with SLE and Drug Induced Lupus, anti-RNP antibodies with mixed connective tissue disease, (MCTD) and SLE, anti-Scl-70 antibodies with scleroderma (progressive systemic sclerosis [PSS]), anti-Jo-1 antibodies with polymyositis and dermatomyositis and anti-centromere antibodies with CREST

EN

syndrome.^{2,3,4}

The immunofluorescence assay (IFA) has been used as the standard method in the detection of ANAs.⁵ Although IFA is a sensitive test, it is laborious when testing large numbers of patient samples and is subject to errors from human interpretation and from variability in fluorescent microscopes.¹ The IFA HEp-2 ANA test is also subject to the following concerns: it is sometimes insensitive to certain sera containing antibodies to SS-A, SS-B, Sm, or dsDNA⁶ and it tends to find sera positive in a large number of patients who do not develop systemic rheumatic diseases within a follow-up two year period.⁷ The ELISA test system is an excellent alternative to the IFA test system for screening patient's serum for the presence of ANA's of clinical significance. The ELISA test system efficiently screens large numbers of patient samples and reduces human error.

The Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA collectively detects, in one well, total ANAs against double stranded DNA (dsDNA, nDNA) histones, SS-A(Ro), SS-B(La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 and centromeric antigens, along with sera positive for IFA HEp-2 ANAs. Sera positive on the Immulisa™ Enhanced Biotech ANA Screen ELISA should be tested for the specific autoantibodies indicative of various systemic rheumatic diseases.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

Purified antigens (dsDNA, histones, SS-A(Ro), SS-B(La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromere and other antigens extracted from the HEp-2 nucleus) are bound to microwells. Antibodies to these antigens, if present in diluted serum, bind in the microwells. Washing of the microwells removes unbound serum antibodies. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human IgG immunologically binds to the bound patient antibodies forming a "conjugate – antibody – antigen" sandwich. Washing of the microwells removes unbound conjugate. An enzyme substrate in the presence of bound conjugate hydrolyzes to form a blue color. The addition of an acid stops the reaction forming a yellow end product. The intensity of the color is measured photometrically at 450 nm.

KIT PRESENTATION

MATERIALS SUPPLIED

Each kit contains the following components in sufficient quantities to perform the number of tests indicated on the package label.

12 x 8

MICROPLATE|ANA

ANA Antigen Coated Microassay Plate: 96 wells, configured twelve 1x8 strips, stored in a foil pouch with desiccant. (96 one plate)

EN

1 x

2 x 30 mL

DIL

1 x 0.4 mL

CONTROL+ANA

1 x 0.4 mL

CONTROL-

1 x 0.4 mL

CALIBRATORANA

1 x 15 mL

IgG-CONJHRP

1 x 15 mL

SUBSTRATETMB

1 x 15 mL

STOP

1 x 60 mL

BUFWASH

ELISA Frame: Use to hold antigen-coated wells. Retain the frame for future use.

Serum Diluent: Ready to use. Use to dilute Positive Control, Cutoff Calibrator, Negative Control, and patient samples 1:41. Use for Reagent Blank. Avoid unnecessary contamination. Contains < 0.1% sodium azide as a preservative. (96T: two bottles, 30 mL each)

Positive Control: Stabilized human serum. Dilute 1:41 in Diluent at same time and in same manner as samples; gives an ANA number greater than 1.0. (96T: one vial, 0.4 mL) *

Negative Control: Stabilized human serum. Dilute 1:41 in Diluent at same time and in same manner as samples; gives an ANA number less than 1.0 (96T: one vial, 0.4 mL) *

Cutoff Control (Calibrator): Stabilized human serum. Dilute 1:41 in Diluent at same time and in same manner as samples. Use to calculate sample's ANA number. (96T: one vial, 0.4 mL) *

Horseradish-peroxidase (HRP) Conjugate, goat anti-human IgG. Ready to use (96T: one bottle, 15 mL)

Chromogen/Substrate Solution: Tetramethylbenzidine (TMB) ready to use. If allowed to evaporate, a precipitate may form in the reagent wells. (96T: one bottle, 15 mL)

Stop Solution: Ready to use, to stop color development. Contains sulfuric and hydrochloric acids. (96T: one bottle, 15 mL)

Wash Buffer (concentrate): add 60 mL concentrate + 940 mL deionized or distilled water. Mix thoroughly. (96T: one bottle, 15 mL)

*** Note: serum vials may contain excess volume.**

Stop Solution, TMB Chromogen/Substrate, Wash Buffer (concentrate), and Serum Diluent are not kit lot number dependent, but may only be used for ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA assay. Please check that the appropriate reagent is used for the assay.

Symbols used on labels

LOT

Lot number

REF

Catalog number

EN



In vitro diagnostic use



Use by



Storage temperature



Read instructions before use



Read instructions before use



Number of tests



Manufacturer



Danger. Causes severe skin burns and eye damage. Do not breathe mist, vapors, or spray. Wash exposed skin thoroughly after handling. IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. If in eyes: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or Doctor. Store locked up. Dispose of contents/container to comply with local, state and federal regulations.

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- Wash bottle, automated or semi-automated microwell plate washing system.
- Micropipettes, including multichannel, capable of accurately delivering 10-200 μ L volumes (less than 3% CV).
- One liter graduated cylinder.
- Paper towels.
- Test tube for serum dilution.
- Distilled or deionized water (dH_2O), CAP (College of American Pathology) Type 1 or equivalent.
- Timer capable of measuring to an accuracy of +/- 1 second (0 to 60 minutes).
- Single or dual wavelength microplate reader with 450 nm filter. If dual wavelength is used, set the reference filter to 600-650 nm. Read the Operator's Manual or contact the instrument manufacturer to establish linearity performance specifications of the reader.

STORAGE AND STABILITY

The kit is stabilized for ambient shipment. All kit components should be stored between 2° and 8°C and can be used until the expiration date printed on the

EN

labels. Once the antigen-coated plate's foil pouch has been opened, the wells are stable for 30 days.

PRECAUTIONS

SAFETY

1. For *in vitro* diagnostic use only.
2. Do not pipette by mouth.
3. Components containing human serum have tested negative for HBsAg and HIV antigens. This does not assure the absence of these antigens; sera should be considered potentially hazardous. These materials should be handled as recommended in the CDC-NIH Manual In: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2009.¹⁰
4. Sodium azide is a toxic substance and is used in some reagents. In case of contact with eyes and skin, flush immediately with copious amounts of water. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal of reagents flush with a large volume of water to help prevent azide build-up.
5. The Stop Solution contains a dilute acid solution. Use with care to avoid contact with skin and eyes. Avoid exposure to bases, metals, or other compounds which may react with acids. Spills should be cleaned up immediately.
6. Dispose of all wastes in accordance with applicable national and/or local regulations.
7. Waste material containing patient samples or biological products should be considered biohazardous when disposing or treating.
8. Chemical reagents should be handled in accordance with Good Laboratory Practices.
9. Clean up all spills immediately and thoroughly. Disinfect the area for any spills involving biohazardous materials. Dispose of all contaminated materials appropriately.
10. Do not use kit beyond its expiration date. The date is printed on kit boxes.

PROCEDURAL

1. All materials must be at room temperature (21 to 25°C).
2. Do not use Controls or Calibrator from different kit lots. Do not use expired reagents.
3. Avoid contamination of reagents, dispensing pipettes, and microtiter wells. Use new dispensing pipettes for all samples. Do not interchange caps. Always keep bottle capped when not in use. Do not reuse the microtiter wells or pipettes. Avoid pipettes contaminated with peroxidase.

EN

4. All wells should be handled in the same sequence and the same manner throughout the test. The test should be performed without interruptions.
5. Gently and completely swirl each bottle of liquid reagent and sample before use.
6. Make accurate 1:41 dilutions.
7. Make all dilutions in uncontaminated Diluent. Prepare all dilutions before starting test. Always use fresh sample dilutions.
8. Always run a Positive Control, a Calibrator and a Negative Control. Always blank against Diluent.
9. Humidity affects the antigen-coated wells; do not open pouch until it reaches room temperature. Calculate the number of wells required for the current assay; remove them from the room temperature foil pouch. Align them on the Frame, then add samples immediately. Unused wells should be returned immediately to the resealed foil pouch with desiccant.
10. Incubation times affect ELISA results. Do not allow any of the controls, samples or HRP Conjugate to incubate in the strip wells for more than 40 minutes. For best results, use 1mL mini-tubes to prepare sample dilutions. Transfer all solutions into wells with an 8-channel Micropipettor or equivalent.
11. After each incubation, thoroughly wash the microtiter wells with 200 to 300 μ L Wash Solution per well. Be sure to remove all liquid before proceeding to next step. Fill wells, then invert and rapidly flick away the liquid. After complete washing, blot the plate on a paper towel.
12. Allow for 1 mL of Conjugate for each strip to be run. Transfer amount to an appropriate container. Discard excess transferred Conjugate.
13. Allow for 1 mL of Substrate for each strip to be run. Transfer amount to an appropriate container. Discard excess transferred Substrate.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

1. Aseptically collect blood samples in untreated tubes by venipuncture and prepare serum using accepted technique.¹¹
2. Allow blood to clot; separate serum immediately. Serum containing visible particulate matter can be spun down utilizing slow speed centrifugation.
3. Sera may be stored up to five days at 2 to 8 °C. If a further delay in testing is needed, store frozen at -20 to -70 °C in a non-defrosting freezer. Avoid multiple freeze/thaw of patient samples.
4. Avoid using hemolyzed, lipemic, or bacterially contaminated sera.
5. **Caution: Do not heat inactivate sera as this may cause false positive results.**

METHODS FOR USE

EN

PREPARATION FOR THE ASSAY

1. Collect all reagents, samples and dilutions necessary before starting assay.
2. Wash Solution
 - Because the Wash Concentrate contains salt, crystals may form in the concentrated solution. For proper preparation of the Wash Solution, complete the following steps:
 - Empty contents of Wash Concentrate bottle, including any crystals, into a 1 L bottle.
 - If any crystals remain in the Wash Concentrate bottle, remove them by adding some deionized water to the bottle; mix and pour all contents into the 1 L bottle.
 - Add deionized water to the 1 L bottle to bring the final volume of the solution to 1 liter.
 - Place a stir bar in the 1 L bottle and place on a stir plate. Stir the diluted Wash Solution for a few minutes until all crystals are dissolved. If no stir plate is available, cover the top of the Wash Solution and gently invert back and forth until the crystals are dissolved. Avoid excessive bubbles.
 - Diluted Wash Solution is stable for 14 days at 2 - 8°C.
 - Retain for future use.
3. Allow Diluent to come to room temperature before use. Mix thoroughly. Use Diluent to make all dilutions. Avoid unnecessary contamination.
4. Assign and record wells for controls and samples.
5. Make 1:41 dilutions of the Controls, Calibrator and specimens (e.g., 10 μ L sample + 400 μ L Diluent).
6. Do not use any reagents that show signs of leakage.

ASSAY PROCEDURE

1. Place the desired number of strips into a microwell frame. Allow five (5) Control/Calibrator determinations (one Negative Control, three Calibrators and one Positive Control) per run. A reagent blank (RB) should be run on each assay. Check software and reader requirements for the correct Calibrator/Control configuration. Return unused strips to the sealable bag with desiccant, seal and immediately refrigerate.

Example Configuration:

Plate Location	Sample Description	Plate Location	Sample Description
1A	RB	2A	Patient #3
1B	NC	2B	Patient #4
1C	Cal	2C	Patient #5
1D	Cal	2D	Patient #6
1E	Cal	2E	Patient #7
1F	PC	2F	Patient #8
1G	Patient #1	2G	Patient #9
1H	Patient #2	2H	Patient #10

RB = Reagent Blank - Well without serum addition run with all reagents. Utilized to blank reader.

NC = Negative Control

Cal = Calibrator

PC = Positive Control

2. Dilute test sera, Calibrator, Positive and Negative Controls sera 1:41 (e.g., 10 μL + 400 μL) in Serum Diluent. (For manual dilutions, dispense the sample diluent into the test tube first and then add the patient serum.)
3. To individual wells, add 100 μL of the appropriate diluted Calibrator, Controls and patient sera.
4. Incubate each well at room temperature (21 to 25°C) for **thirty (30) minutes**. (Do not incubate diluted sera in wells for more than 40 minutes.)
5. Aspirate or shake out liquid from all wells. Using semi-automated or automated washing equipment, add 200 μL - 300 μL of diluted Wash Buffer to each well. Aspirate or shake out to remove all liquid. Repeat the wash procedure four (4) times (for a total of five (5) washes). After the final wash, blot the plate on paper toweling to remove all liquid from the wells.

****IMPORTANT NOTE:** Regarding steps 5 and 8, insufficient or excessive washing will result in assay variation and will affect validity of results. Therefore, for best results the use of semi-automated or automated equipment set to deliver a volume to completely fill each well (200 to 300 μL) is recommended. Please contact Trinity Biotech with any questions regarding appropriate wash equipment. A total of up to five (5) washes may be necessary with automated equipment. **The complete removal of the wash buffer after the last wash is critical for the accurate performance of the test. Also, visually ensure that no bubbles remain in the wells.**

EN

6. Add 100 μ L Conjugate to each well, including reagent blank. Avoid bubbles upon addition as they may yield erroneous results.
7. Shake plate gently. Incubate each well at room temperature (21 to 25°C) for **thirty (30) minutes**. (Do not incubate Conjugate in wells for more than 40 minutes.)
8. Repeat wash as described in Step 5.
9. Add 100 μ L Chromogen/Substrate Solution to each well, including reagent blank, maintaining a constant rate of addition across the plate.
10. Shake or tap plate gently to disperse color. Incubate each well at room temperature (21 to 25 °C) for **thirty (30) minutes**.
11. Stop reaction by addition of 100 μ L of Stop Solution following the same order of addition used to add the Substrate, including reagent blank well. Tap the plate gently along the outsides, to mix contents of the wells.
12. The developed color should be read within 30 minutes on an ELISA plate reader equipped with a 450 nm filter. If dual wavelength is used, set the reference filter to 600-650 nm. Zero the reader on the reagent blank well, then read the color of the controls and patient wells. The Positive Control well should show yellow color. The calibrator well should show moderate color. The Negative Control well should show little color. The reagent blank well should show little color or be clear.

QUALITY CONTROL

In order for a test to be valid, all of the following criteria must be met:

1. A Positive Control, Calibrator, Negative Control and reagent blank must be included with each test run.
2. The values for each Control and Calibrator must be within the specified range printed on the component list included with each kit lot number.
3. The reagent blank must be ≤ 0.200 when zeroed against air.
4. Refer to CLSI C24-A3 for guidance on appropriate Quality Control practices.¹²
5. **If above criteria are not met on repeat, contact Trinity Biotech Technical Services.**

INTERPRETATION

CALCULATIONS

Determine the ANA number* for each patient specimen (or control) using the following

*ANA numbers are qualitative.

EN

OD of Test Sample

----- = ANA# of Test Sample

Mean OD of Calibrator

ANALYSIS

The following is intended as a guide to interpretation of Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA results. Each laboratory is encouraged to establish its own criteria for test interpretation based on sample populations encountered.

ANA#

Interpret

ation

< 1.0

Negative

≥ 1.0

Positive

Microplate wells must be read with an ELISA reader set to 450 nm. Results should be read after adding the Stop Solution (Step 11) and reported as follows:

Positive: A positive response is indicated by a yellow color; the calculated ANA numbers are greater than or equal to 1.0.

Negative: A negative response is indicated by a colorless, or less intense yellow color; the calculated ANA numbers are less than 1.0.

EXPECTED VALUES

The Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA test expected values and positive distribution for the various sera positive for antibodies of clinical significance are summarized below:⁹

Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA

Antibody Specificity	Number of Samples	Low ANA #	High ANA #
SS-A	18	3.6	8.1
SS-B	2	1.3	8.8
SS-A/B	9	2.1	11.2
Sm	18	3.5	12
RNP	13	2.3	9.2
Scl-70	16	7.7	15.1
Jo-I	13	1.4	7.8
dsDNA	13	1.4	7.8
Histones	7	9	17.1

EN			
Centromere	13	1.3	4.8

LIMITATIONS OF USE

As with other ANA diagnostic tests, the results are to be used as an aid in diagnosis. Confirmation testing for specific antibodies should be run if a positive assay is obtained. A positive result suggests certain diseases and should be confirmed by clinical findings.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

Sensitivity can be defined as the ability of the test to give a positive result for serum samples that should be positive. The sensitivity performance of the ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen ELISA was established in the following manner:

Fifty-nine (59) sera obtained from a variety of clinical sources with monospecific antibodies of clinical significance were tested on the ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen ELISA. All of these ANA monospecific sera were positive on the ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen ELISA. The results are summarized below:⁹

ELISA ANA Screening Test - Antibody Specificity

Antibody specificity	# of positives (%)	SS-A	SS-B	Sm	SmRNP	Scl-70	Jo-1	dsDNA	Histones	Centromere
SS-A/Ro	9 of 9 (100%)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SS-B/La	1 of 1 (100%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SS-A/B	7 of 7 (100%)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sm	9 of 9 (100%)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RNP	6 of 6 (100%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Scl-70	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Jo-1	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
dsDNA	8 of 8 (100%)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Histones	3 of 3 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Centromere	6 of 6 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Three hundred seventy-one IFA HEp-2 ANA positive sera obtained from a variety of clinical sources were tested on the ImmuLISA™ Enhanced ELISA ANA Screening test. The results are summarized below:⁹

EN

IFA HEp-2 ANA Titer	ANA ELISA Screen Results	Samples	%
$\geq 1:160$	Positive	220	91
$\geq 1:160$	Negative	22	9
1:40 – 1:80	Positive	72	56
1:40 – 1:80	Negative	57	44 ⁸

Thirty-eight Lupus patient sera obtained from a variety of clinical sources were tested on the Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA. All of the Lupus patient sera were positive on the Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA.⁹

SPECIFICITY

Specificity can be defined as the ability of the test to give a negative result for “normal” sera. The specificity performance of the Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA was established using 70 “normal” sera obtained from a volunteer blood donor testing facility. One donor had antibodies to dsDNA and was thus not considered to be “normal”. Sixty-four of the remaining 69 were negative on the Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA test, thus yielding a 92.8% specificity.⁹

COMPARATIVE PERFORMANCE

One hundred eighty sera obtained from a variety of clinical sources were tested on four different predicate devices and the Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA for comparison purposes. The predicate devices were: 1) ELISA ENA Plus Screening test (for the detection of antibodies to SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 or Jo-1), 2) ELISA anti-dsDNA, 3) ELISA anti-Histones, and 4) IFA HEp-2 ANA used for the purpose of detecting anti-centromeric antibodies. One hundred and ten (110) of the sera were positive on one or more of these predicate assays, while 70 were “normal” sera negative on all four of the predicate assays.⁹

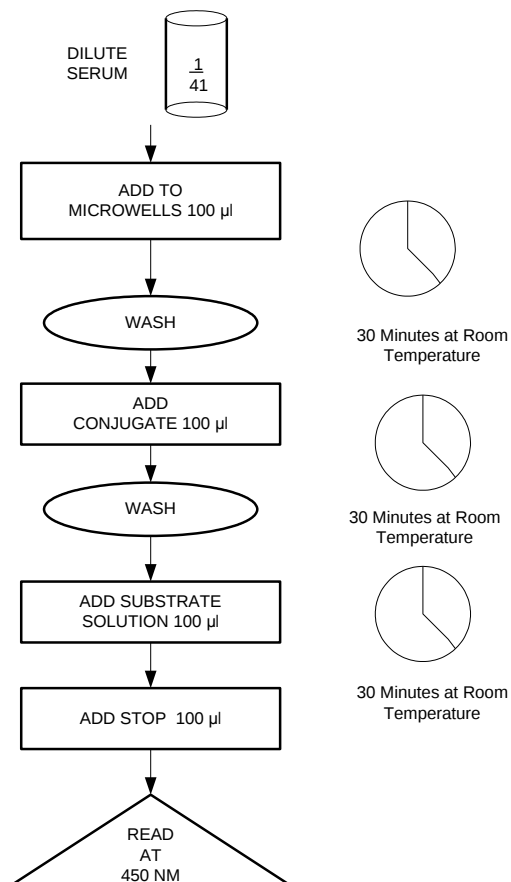
Four hundred and sixty-nine sera obtained from a variety of clinical sources were tested on the IFA HEp-2 ANA and the Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA test for comparison purposes. The overall agreement was 86.1%.⁹

PRECISION

Intra-assay precision was determined by testing a strong positive control and a weak positive control with a replication of 18. The CV's were 6.6 and 9.5%, respectively. Inter-assay precision was determined by testing a strong positive control and a weak positive control in a total of 24 assays. The CV's were 6.8 and 8.3%, respectively.⁹

ANA SCREEN SUMMARY OF ASSAY PROCEDURE

EN



ImmuLisa™ Enhanced

Antinuclear Antibody (ANA) Screen ELISA

PROSPECTO DEL PRODUCTO

IVD Para uso de diagnóstico *in vitro*.

REF 5175 ANA Screen ELISA

96 Pruebas

USO PREVISTO

El ensayo ELISA ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen es un enzimoimmunoanálisis (EIA) cualitativo indicado para detectar la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en suero humano a fin de facilitar el diagnóstico de ciertas enfermedades reumáticas generalizadas. Este análisis detecta colectivamente, en un pocillo, los ANA totales contra ADN bicatenario (ADNbc y ADNn), histonas, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 y antígenos centroméricos, junto con sueros positivos a ANA por inmunofluorescencia indirecta (IFI) de células epiteliales humanas HEp-2.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

En las enfermedades reumáticas generalizadas se observa una frecuencia extraordinariamente alta de anticuerpos antinucleares (ANA) dirigidos contra diversas macromoléculas.¹ Aunque estos anticuerpos se asociaron en primer lugar con el lupus eritematoso sistémico (LES), la lista de enfermedades implicadas ha aumentado, y muchas enfermedades reumáticas se caracterizan por la presencia de uno o más de estos ANA. Por ejemplo, los anticuerpos anti-SS-A/Ro y anti-SS-B/La se asocian al LES y al síndrome de Sjögren (SS); los anticuerpos anti-ADNbc y anti-Sm, al LES; los anticuerpos antihistonas, al LES y al lupus medicamentoso; los anticuerpos anti-RNP, a la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y al LES; los anticuerpos anti-Scl-70, a la esclerodermia (esclerosis múltiple progresiva [EMP]); los anticuerpos anti-Jo-1, a la polimiositis y a la dermatomiositis; y los anticuerpos anticentrómero, al síndrome de CREST (esclerodermia sistémica).^{2,3,4}

El análisis de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se ha empleado como método estándar para la detección de ANA.⁵ Aunque la IFI es una prueba sensible, es muy laborioso cuando se tienen que analizar grandes cantidades de muestras de pacientes, y es susceptible a errores debidos a la interpretación humana y a la variabilidad de los microscopios de fluorescencia.¹ La prueba de detección de ANA de HEp-2 por IFI también puede plantear lo siguiente: algunas veces no es sensible a ciertos sueros que contienen anticuerpos anti-SS-A, anti-SS-B, anti-Sm o anti-ADNbc,⁶ y tiende a dar positivo con sueros de un gran número de pacientes que no padecen enfermedades reumáticas generalizadas en un período de seguimiento de dos años.⁷ El sistema de

ES

enzimoinmunoanálisis (EIA) es una excelente alternativa al sistema de IFI para detectar la presencia de ANA de relevancia clínica en sueros de pacientes. El sistema de EIA permite analizar eficazmente grandes cantidades de muestras de pacientes y reduce el error humano.

El ensayo ELISA Immulisa™ Enhanced ANA Screen detecta colectivamente, en un pocillo, los ANA totales contra: ADN bicatenario (ADNbc y ADNn), histonas, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 y antígenos centroméricos, así como los sueros positivos a ANA por IFI en HEp-2. Los sueros positivos en la prueba de detección de ANA por EIA deben analizarse para comprobar la presencia de autoanticuerpos específicos indicativos de varias enfermedades reumáticas generalizadas.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los antígenos purificados (antígenos de ADNbc, histonas, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 y centrómeros, así como otros antígenos extraídos del núcleo de células HEp-2) están unidos a los micropocillos. Los anticuerpos contra estos antígenos, si están presentes en el suero diluido, se unen en los micropocillos. Los anticuerpos no unidos del suero se eliminan al lavar los micropocillos. Los anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) se unen inmunológicamente a los anticuerpos del paciente, y forman un sándwich de conjugado, anticuerpo y antígeno. El conjugado no unido se elimina al lavar los micropocillos. En la presencia del conjugado unido, el sustrato enzimático se hidroliza y produce un color azul. Al añadir un ácido, la reacción se detiene y produce un producto final amarillo. La intensidad del color se mide mediante fotometría a 450 nm.

COMPONENTES DEL KIT DESCRIPCIÓN

El kit de la prueba de detección de ANA por EIA contiene suministros para 96 pruebas

12 x 8	MICROPLATE ANA	Microplaca para prueba de detección de ANA: 96 micropocillos, recubiertos de antígenos nucleares, en formato de doce (12) tiras de 8 micropocillos cada una, sellados en una bolsa de papel metalizado con cierre y desecante. (1 microplaca)
1 x		Gradilla del ensayo EIA: Guárdela para utilizarla en el futuro.
2 x 30 mL	DIL	Diluyente para muestras: tampón fosfato, pH 7,3 +/-0,2, con azida sódica a < 0,1% como conservante. Utilícelo para diluir las muestras de pacientes, el control discriminador (calibrador) y los controles positivos y negativos. Utilícelo también como blanco de reactivo (RB) (2 X 30 mL)
1 x 0.4 mL	CONTROL+ ANA	Control positivo: suero humano positivo a ANA. Diluir 1:41 con diluyente para muestras de la misma forma que las muestras de pacientes; da un número de ANA mayor a 1,0. (1 X 0,40 mL)*
1 x 0.4 mL	CONTROL-	Control negativo: suero humano negativo a ANA. Diluir 1:41 con diluyente para muestras de la misma forma que las muestras de pacientes; da un número de ANA menor a 1,0. (1 X 0,40 mL)*
1 x 0.4 mL	CALIBRATOR ANA	Control discriminador (calibrador): suero humano con ANA. Diluir 1:41 con diluyente para muestras de la misma forma que las muestras de pacientes. Utilícelo para calcular el número de

ES

ANA. (1 X 0,40 mL) *

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

Conjugado: anticuerpos anti-IgG humana de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón, pH 6,2-6,7. Listo para su utilización (1 X 15 mL)

1 x 15 mL **SUBSTRATE|TMB**

Solución de cromógeno/sustrato: tetrametilbenzidina (TMB) en tampón de agua oxigenada diluida. Listo para su utilización. Si se permite su evaporación, formará un precipitado en los micropocillos. (1 X 15 mL)

1 x 15 mL **STOP**

Solución de parada: Listo para su utilización. Contiene ácido sulfúrico (1,5%) y ácido clorhídrico (1,5%), pH < 3,0. Utilícela para detener el revelado del color. (1 X 15 mL)

1 x 60 mL **BUF|WASH**

Tampón concentrado de lavado: agregue 60 mL de concentrado + 940 mL de agua desionizada o destilada. Mezclar bien. Utilícela para lavar los micropocillos. (1 X 60 mL)

*** Nota: Los frascos de suero pueden contener exceso de volumen.**

La solución de parada, solución de cromógeno/sustrato, tampón concentrado de lavado y el diluyente para muestras son independientes del número de lote del kit pero pueden usarse únicamente con el ensayo ELISA ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen. Por favor compruebe que está utilizando los reactivos adecuados para el ensayo.

Símbolos utilizados



Lote



Número de catalogo



Para uso de diagnóstico *in vitro*



Fecha de caducidad



Temperatura de conservación



Atención: Véanse los documentos adjuntos



Atención: Véanse los documentos adjuntos



Número de pruebas



Fabricante



Peligro. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos aprobado.

ELEMENTOS ADICIONALES NECESARIOS

- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido o equipo de lavado semiautomático o automático de microplacas
- Micropipeta multicanal de 8 canales, (10 μ L a 200 μ L)
- Probeta graduada (1 L)
- Toallas de papel
- Tubos de ensayo (4 mL y 15 mL)
- Agua desionizada (DI)
- Cronómetro de cuenta atrás
- Lector de EIA (ajustado a 450 nm)

ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

El kit está estabilizado para su transporte a temperatura ambiente. Todos los componentes del kit deben conservarse entre 2 y 8°C, y pueden emplearse hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. Tras abrir la bolsa de papel metalizado, los micropocillos no utilizados son estables durante 30 días si se vuelven a introducir inmediatamente en la bolsa de papel metalizado con desecante y ésta se vuelve a cerrar.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SEGURIDAD

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. No pipetee con la boca.
3. Este producto utiliza suero humano en la fabricación de los controles positivos y negativos y el calibrador. Todas las unidades se han analizado con métodos aceptados por la FDA, y se ha comprobado que no son reactivas a los virus VIH-1 y VIH-2, ni a los de la hepatitis B (HBV), la hepatitis C (HCV) y la sífilis. Ningún método analítico puede garantizar con toda seguridad la ausencia de éstos y de otros agentes infecciosos en productos que contengan material de origen humano. De acuerdo con las prácticas correctas de laboratorio, todo el material de origen humano debe considerarse potencialmente infeccioso; por lo tanto, manipule los controles positivos y negativos y el calibrador con las mismas precauciones empleadas con las muestras de pacientes.
4. Algunos reactivos contienen azida sódica (NaN_3), que puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas explosivas. Tenga cuidado al desechar estos reactivos. Si se desechan en un desagüe, deje correr una gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azidas.
5. La solución de parada contiene una solución de ácido diluido. Tenga cuidado para evitar el contacto con la piel y los ojos. Evite la exposición a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con los ácidos. Si se derrama, debe limpiarse inmediatamente.
6. Utilice equipo de protección personal al manipular todos los reactivos y las muestras, y al emplear el lavador y el lector.
7. Deseche todos los residuos de acuerdo con las normativas nacionales y locales aplicables.
8. El material de desecho que contenga muestras de pacientes o productos biológicos debe considerarse biopeligroso al desecharse o tratarse.

ES

9. Los reactivos químicos deben manipularse según las prácticas correctas de laboratorio.
10. Los líquidos derramados deben limpiarse bien inmediatamente. Desinfecte las zonas en las que se hayan derramado materiales biopeligrosos. Deseche apropiadamente todo el material contaminado.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Todo el material debe estar a temperatura ambiente (21 - 25 °C) antes de comenzar el análisis.
2. No utilice controles positivos o negativos o el calibrador de diferentes lotes. No utilice reactivos caducados.
3. Evite la contaminación de los reactivos, las pipetas de transferencia y los pocillos de microvaloración. Utilice pipetas de transferencia nuevas para todas las muestras. No intercambie las tapas. Mantenga siempre los frascos tapados cuando no los esté utilizando. No reutilice los pocillos de microvaloración ni las pipetas. No utilice pipetas contaminadas con peroxidasa.
4. Todos los pocillos deben manipularse en la misma secuencia y de la misma manera durante la prueba. La prueba debe realizarse sin interrupciones.
5. Mezcle completamente, con cuidado, todos los frascos de los reactivos líquidos y de las muestras antes de utilizarlos.
6. Haga diluciones 1:41 fiables.
7. Haga todas las diluciones con diluyente para muestras no contaminado. Prepare todas las diluciones antes de comenzar la prueba. Utilice siempre diluciones de muestras frescas.
8. Procese siempre un control positivo de ANA, un calibrador y un control negativo. Utilice siempre diluyente para muestras como blanco.
9. La humedad afecta a los pocillos recubiertos de antígeno; abra la bolsa una vez que esté a temperatura ambiente. Calcule el número de pocillos necesarios para el análisis que vaya a realizar, extráigalos de la bolsa de papel metalizado a temperatura ambiente, alinéelos en la gradilla del ensayo de EIA y, a continuación, añada las muestras inmediatamente. Los pocillos no utilizados deben volverse a guardar de inmediato en la bolsa de papel metalizado con desecante, tras lo cual la bolsa debe volverse a cerrar y refrigerar.
10. Los tiempos de incubación afectan a los resultados del EIA. No permita que ninguno de los controles, las muestras o los conjugados se incuben en los pocillos de la tira durante más de 40 minutos. Para obtener resultados óptimos, utilice minitubos de 1 mL para preparar las diluciones de las muestras. Transfiera todas las soluciones a pocillos con una micropipeta de 8 canales.
11. Tras cada incubación, lave bien los pocillos de microvaloración con unos 200 µL de solución de lavado por pocillo. Asegúrese de extraer todo el líquido antes de proceder con el paso siguiente. Llene los pocillos y, a continuación, inviértalos y agítelos rápidamente para que salga el líquido. Tras finalizar el lavado, seque la placa sobre una toalla de papel.
12. Transfiera a un tubo de ensayo graduado 1 mL de conjugado por cada tira que se vaya a procesar. Deseche el conjugado transferido sobrante.
13. Transfiera a un tubo de ensayo graduado 1 mL de sustrato por cada tira que se vaya a procesar. Deseche el sustrato transferido sobrante.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

ES

1. Tome la muestra de sangre asépticamente en tubos no tratados.¹¹
2. Deje que la sangre se coagule. Separe el suero inmediatamente.
3. Conserve los sueros a entre 2 y 8 °C. Si los sueros no se van a analizar en las 24 horas posteriores a su toma, congélelos a -20°C, pero evite congelarlos y descongelarlos varias veces.
4. Evite el uso de sueros lipémicos, hemolizados o contaminados.
5. **PRECAUCIÓN: Las muestras de suero no deben inactivarse con calor, ya que esto puede producir resultados positivos falsos.**

MÉTODOS DE USO

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. Prepare todos los reactivos, las muestras y las diluciones necesarios antes de comenzar el análisis.
2. Solución de lavado
 - Como el concentrado de lavado contiene sal, en la solución concentrada pueden formarse cristales. Para preparar correctamente la solución de lavado, realice los siguientes pasos:
 - Vacíe el contenido del frasco de concentrado de lavado, incluidos los cristales que pueda haber, en una botella de 1 L.
 - Si quedan cristales en el frasco de concentrado de lavado, retírelos añadiendo un poco de agua desionizada al frasco; mezcle y vierta todo el contenido en la botella de 1 L.
 - Añada agua desionizada a la botella de 1 L para obtener un volumen final de solución de 1 litro.
 - Coloque una barra agitadora en la botella de 1 L y ponga todo sobre una placa agitadora. Agite la solución de lavado diluida durante unos minutos hasta que se disuelvan todos los cristales. Si no se dispone de una placa agitadora, cubra la parte superior de la solución de lavado e invierta con cuidado varias veces hasta que se disuelvan los cristales. No deje que se formen demasiadas burbujas.
 - La solución de lavado diluida es estable durante 14 días a entre 2 y 8 °C.
 - Guárdela para utilizarla en el futuro
3. Deje que el diluyente para muestras alcance la temperatura ambiente antes de utilizarlo. Mézclelo bien. Utilícelo para diluir las muestras de pacientes, el calibrador y los controles positivos y negativos. Utilícelo como control blanco de reactivo. Evite la contaminación innecesaria.
4. Asigne y registre los micropocillos de los controles y las muestras.
5. Prepárelas de la forma siguiente:
 - Diluya 10 µL de sueros de pacientes en 0,4 mL de diluyente para muestras.
 - Diluya 10 µL de control positivo de ANA en 0,4 mL de diluyente para muestras.
 - Diluya 10 µL de control discriminador de ANA en 0,4 mL de diluyente para muestras.
 - Diluya 10 µL de control negativo en 0,4 mL de diluyente para muestras.
 - Deseche las soluciones de trabajo restantes después del uso.
6. No utilice reactivos que muestren señales de fugas.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar el número deseado de tiras en la gradilla de micropocillos. Realizar cinco (5) determinaciones del control/calibrador (un control negativo, tres calibradores y un

ES

control positivo) por ciclo. Deberá utilizarse un blanco de reactivo (RB) en cada ensayo. Ajustar el software y el lector a la configuración correcta del control/calibrador. Volver a introducir las tiras no utilizadas en la bolsa con cierre con desecante, cerrar e introducir en el refrigerador inmediatamente.

Ejemplo de configuración:

Posición de la placa	Descripción de la muestra	Posición de la placa	Descripción de la muestra
1A	RB	2A	Paciente nº 3
1B	NC	2B	Paciente nº 4
1C	Cal	2C	Paciente nº 5
1D	Cal	2D	Paciente nº 6
1E	Cal	2E	Paciente nº 7
1F	PC	2F	Paciente nº 8
1G	Paciente nº 1	2G	Paciente nº 9
1H	Paciente nº 2	2H	Paciente nº 10

RB = Blanco de reactivo – Pocillo sin adición de suero ejecutado con todos los reactivos. Utilizado para hacer el blanco del lector.

NC = Control negativo

Cal = Calibrador

PC = Control positivo

- Diluir los sueros de pacientes (muestras), el calibrador y los sueros de control 1:41 (p.ej., 10 µl + 400 µl) en el diluyente para muestras. Mezclar bien. (Para las diluciones manuales se sugiere verter en primer lugar el diluyente para muestras en el tubo de ensayo y a continuación añadir el suero de paciente).
- Añadir a cada pocillo 100 µl del calibrador diluido, los controles y los sueros de paciente. Añadir 100 µl del diluyente para muestras al pocillo del blanco de reactivo. Comprobar si el software y los requisitos del lector se ajustan a la configuración del pocillo del blanco de reactivo.
- Incubar cada pocillo a temperatura ambiente (21 – 25 °C) durante **30 minutos** (No incuba los sueros diluidos en los pocillos durante más de 40 minutos.)
- Aspirar o expulsar el líquido de todos los pocillos. Si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, añadir a cada pocillo 200-300 µl de tampón de lavado diluido. Aspirar o verter para eliminar el líquido. Repetir el procedimiento de lavado cuatro veces (en total cinco (5) lavados). Tras el lavado final, secar la placa sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido de los pocillos.

****NOTA IMPORTANTE:** Relativa a los puntos 5 y 8 – Un lavado insuficiente o un lavado excesivo pueden ser causa de variaciones que afectarán a la validez de los resultados. Por tanto, para obtener unos resultados óptimos se recomienda utilizar un equipo de lavado semiautomático o automático ajustado de forma que suministre un volumen que llene totalmente cada pocillo (200-300 µL). Cuando se utiliza un equipo automático puede ser necesario realizar hasta cinco (5) lavados. **La eliminación total del tampón de lavado tras el último lavado es decisiva para la precisión del ensayo. Asimismo deberá comprobarse visualmente la ausencia de burbujas en los pocillos.**

- Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo, incluido el pocillo del blanco de reactivo. Evitar la formación de burbujas durante la adición dado que pueden dar lugar a

ES

resultados erróneos.

7. Incubar cada pocillo a temperatura ambiente (21 - 25 °C) durante **30 minutos** (No incube el conjugado en los pocillos durante más de 40 minutos.)
8. Repetir el lavado como se ha descrito en el punto 5.
9. Añadir 100 µl de solución de cromógeno/sustrato (TMB) a cada pocillo, incluido el pocillo del blanco de reactivo, manteniendo una velocidad constante de adición en toda la placa.
10. Incubar cada pocillo a temperatura ambiente (21 - 25 °C) durante **30 minutos**.
11. Detener la reacción añadiendo 100 µl de solución de parada (H₂SO₄ 1N) siguiendo el mismo orden que en la adición de cromógeno/sustrato, incluido el pocillo del blanco de reactivo. Golpear suavemente la placa por los bordes para mezclar el contenido de los pocillos. La placa puede leerse hasta 1 hora después de haber añadido la solución de parada.
12. Lea los pocillos en los 30 minutos posteriores con un lector de EIA ajustado a 450 nm. Ponga a cero el lector en el pocillo del control blanco con diluyente para muestras y, a continuación, lea el color de los pocillos de los controles y los pacientes. El pocillo del control positivo debe mostrar un color amarillo. El pocillo del calibrador debe mostrar un color amarillo. El pocillo del control negativo debe mostrar un color moderado. El pocillo del control blanco con diluyente para muestras debe mostrar poco o ningún color.

CONTROL DE CALIDAD

Para que una prueba sea válida, deben cumplirse todos los siguientes criterios:

1. Cada vez que se realice la prueba deberán incluirse un control positivo, un calibrador, un control negativo y diluyente para muestras como blanco de reactivo.
2. Los valores de cada control deben estar dentro del rango especificado impreso en la tarjeta del control de calidad incluida con cada número de lote del kit.
3. La densidad óptica (DO) del diluyente para muestras debe ser $\leq 0,200$ cuando el lector se haya puesto a cero con aire.
4. **Si no se cumple alguno de estos criterios, los resultados no serán válidos y deberá repetirse la prueba.**

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Determine el número de ANA* de cada muestra de paciente (o control) mediante la siguiente fórmula:

**Los números de ANA son cualitativos.*

$$\frac{\text{DO de la muestra del analisis}}{\text{DO del control discriminador}} = \# \text{ de ANA de la muestra}$$

ANÁLISIS

A continuación se ofrece una guía para la interpretación de los resultados de la prueba de detección de ANA por EIA; se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios criterios de interpretación de la prueba, basándose en las poblaciones de muestras

ES

encontradas.

<u># de ANA</u>	<u>Interpretación</u>
< 1,0	Negativa
≥ 1,0	Positiva

Los pocillos de la tira de microvaloración deben leerse con un lector de EIA ajustado a 450 nm. Los resultados deben leerse después de añadir la solución de parada (paso 11 del análisis) y clasificarse de la forma siguiente:

Positivo: un color amarillo indica una respuesta positiva; los números de ANA calculados son $\geq 1,0$.

Negativo: la falta de color o un color amarillo menos intenso indican una respuesta negativa; los números de ANA calculados son $< 1,0$.

VALORES ESPERADOS

Los valores esperados del ensayo ELISA Immulisa™ Enhanced ANA Screen y la distribución positiva de los resultados obtenidos utilizando varios sueros positivos con anticuerpos de relevancia clínica se resumen a continuación⁹:

Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA

Especificidad del anticuerpo	Número de muestras	# bajo de ANA	# alto de ANA
SS-A	18	3.6	8.1
SS-B	2	1.3	8.8
SS-A/B	9	2.1	11.2
Sm	18	3.5	12
RNP	13	2.3	9.2
Scl-70	16	7.7	15.1
Jo-I	13	1.4	7.8
dsDNA	13	1.4	7.8
Histones	7	9	17.1
Centromere	13	1.3	4.8

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Como en otras pruebas diagnósticas de ANA, los resultados deben utilizarse como ayuda para el diagnóstico. Si el análisis arroja un resultado positivo, debe realizarse una prueba confirmatoria de anticuerpos específicos. Un resultado positivo es indicativo de ciertas enfermedades, y debe confirmarse comprobando los signos clínicos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

La sensibilidad puede definirse como la capacidad de la prueba para obtener un resultado positivo en muestras de suero que deban ser positivas. El rendimiento del ensayo ELISA Immulisa™ Enhanced ANA Screen, en cuanto a sensibilidad, se estableció de la siguiente manera:

Se utilizó la prueba ELISA Immulisa™ Enhanced ANA Screen para analizar sueros con anticuerpos mono-específicos de relevancia clínica (n=59) obtenidos de diversas fuentes

ES

clínicas. El 100% de estos sueros con ANA monoespecíficos dieron positivo en la prueba de detección de ANA por EIA.⁹

ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen ELISA-Especificidad del anticuerpo

Especificidad del anticuerpo	Número de muestras positivas (%)	SS-A	SS-B	Sm	SmRNP	Scl-70	Jo-1	dsDNA	Histonas	Centro
SS-A/Ro	9 of 9 (100%)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SS-B/La	1 of 1 (100%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SS-A/B	7 of 7 (100%)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sm	9 of 9 (100%)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RNP	6 of 6 (100%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Scl-70	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Jo-1	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
dsDNA	8 of 8 (100%)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Histonas	3 of 3 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Centromero	6 of 6 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Se utilizó la prueba ELISA ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen para analizar sueros positivos a ANA por IFI de HEp-2 (n=371) obtenidos de diversas fuentes clínicas. Los resultados se resumen a continuación.⁹

Título de ANA de HEp-2 por IFA	Resultado de la prueba de detección de ANA por EIA	Número de muestras	%
≥ 1:160	Positiva	220	91
≥ 1:160	Negativa	22	9
1:40 – 1:80	Positiva	72	56
1:40 – 1:80	Negativa	57	44 ⁸

Se utilizó la prueba ELISA ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen para analizar sueros de pacientes con lupus (n=38) obtenidos de diversas fuentes clínicas. El 100% de estos sueros de pacientes con lupus dieron positivo en la prueba ELISA ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen.⁹

ESPECIFICIDAD

La especificidad puede definirse como la capacidad de la prueba para obtener un resultado negativo en muestras de sueros “normales”. El rendimiento de la prueba ELISA ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen en cuanto a especificidad se estableció utilizando 70 sueros “normales” obtenidos de un centro de análisis de sangre de donantes voluntarios. Un donante tenía anticuerpos anti-ADN bicatenario, por lo que no se consideró “normal”. De los 69 sueros restantes, 64 fueron negativos en la prueba de detección de ANA mediante EIA, lo que supone una especificidad del 92,8%.⁹

EXACTITUD

Se realizaron comparaciones de los resultados de sueros (n=180) obtenidos de diversas fuentes clínicas y analizados con cuatro dispositivos confirmatorios diferentes y con la prueba ELISA ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen. Los dispositivos confirmatorios fueron: 1) Prueba de detección de ENA Plus por EIA (para la detección de anticuerpos anti-SS-A, anti-SS-B, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Scl-70 o anti-Jo-1), 2) EIA de anticuerpos anti-ADN bicatenario, 3) EIA de anticuerpos-antihistonas, y 4) prueba de detección de ANA en HEp-2 por IFI, empleada para detectar anticuerpos anticentrómero. De los sueros analizados, 110 dieron positivo en uno o más de los análisis confirmatorios, y 70 fueron sueros “normales” negativos según todos los análisis confirmatorios.⁹

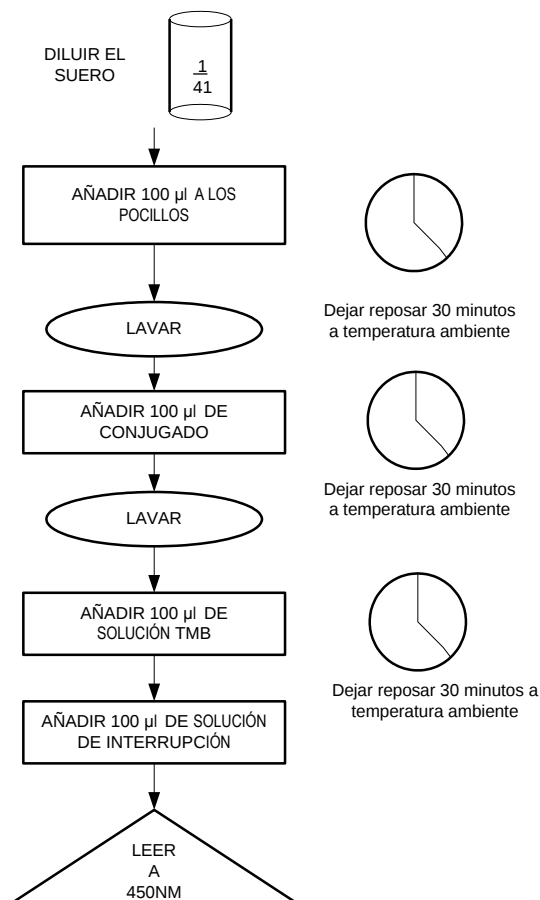
ES

Se realizaron comparaciones de los resultados de sueros (n=469) obtenidos de diversas fuentes clínicas y analizados con la prueba de detección de ANA en HEP-2 por IFI y con la prueba ELISA Immulisa™ Enhanced ANA Screen. El acuerdo global fue del 86,1%.⁹

PRECISIÓN

La precisión intraanálisis se determinó analizando un control altamente positivo y un control positivo débil con 18 repeticiones; los CV fueron del 6,6% y del 9,5%, respectivamente. La precisión interanálisis se determinó analizando un control altamente positivo y un control positivo débil en 24 análisis; los CV fueron del 6,8% y del 8,3%, respectivamente.⁹

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO ENSAYO ELISA IMMULISA™ ENHANCED ANA SCREEN



ImmuLisa™ Enhanced Antinuclear Antibody (ANA) Screen ELISA

PRODUKTBEILAGE

IVD	Zu diagnostischen Zwecken <i>in vitro</i>	
REF	5175	ANA-Test ELISA 96 Nachweise

VERWENDUNGSZWECK

Der ImmuLisa™ Enhanced Antinuclear Antibody (ANA)-Screen ELISA ist ein qualitatives, antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay = ELISA), mit dem die Präsenz von antinuklearen Antikörpern (ANA) in Humanserum nachgewiesen werden kann, um bei der Diagnose bestimmter systemischer, rheumatischer Erkrankungen zu helfen. Dieser Nachweis erkennt kollektiv - in einer Kavität - die Summe der ANA im Vergleich zu Doppelstrang-DNA (dsDNA, nDNA), Histonen, SS-A(Ro), SS-B(La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 und zentrometrische Antigenen sowie Seren, die positiv für Immunofluorescent (IFA) HEP-2 ANA testen. **Zu diagnostischen Zwecken *in vitro*. Test mit hoher Komplexität.**

EINFÜHRUNG

Antinukleare Antikörper (ANA), die gegen verschiedene Makromoleküle gerichtet sind, kommen außergewöhnlich häufig bei systemischen, rheumatischen Erkrankungen vor.¹ Obwohl diese Antikörper zunächst mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) in Verbindung gebracht wurden, wurde die Liste der betroffenen Erkrankungen erweitert und die Anwesenheit von mind. einem ANA kann auf viele rheumatische Erkrankungen hinweisen. So sind beispielsweise SS-A (Ro)- und SS-B (La)-Antikörper mit SLE und dem Sjögren-Syndrom (SS) assoziiert, anti-dsDNA Antikörper und anti-Sm Antikörper mit SLE, Antikörper gegen Histone mit SLE und medikamenteninduziertem Lupus, anti-RNP-Antikörper mit Mischkollagenosen und SLE, anti-Scl-70 Antikörper mit Sklerodermie (progressive systemische Sklerose, PSS), anti-Jo-1 Antikörper mit Polymyositis und Dermatomyositis und Antikörper gegen Centromer-Proteine mit dem CREST-Syndrom.^{2,3,4}

Der Immunofluoreszenz-Nachweis (IFA) wurde als Standardmethode bei der Erkennung von ANA verwendet.⁵ Obwohl IFA ein empfindlicher Test ist, ist er beim Testen von zahlreichen Patientenproben umständlich und kann durch menschliche Fehler oder unterschiedliche Fluoreszenzmikroskope flach ausgelegt werden.¹ Der IFA HEP-2 ANA-Test hat außerdem folgende Nachteile: in manchen Seren, die Antikörper gegen SS-A, SS-B, Sm oder dsDNA⁶ enthalten, ist er unempfindlich und hat eine Tendenz, die Seren vieler Patienten als positiv zu bewerten, die in den folgenden zwei Jahren jedoch keine systemischen, rheumatischen Erkrankungen entwickeln.⁷ Das ELISA-Testsystem ist eine ausgezeichnete Alternative zum IFA-Testsystem zum Screening von Patientenseren auf die Anwesenheit von ANA mit klinischer Bedeutung. Das ELISA-Testsystem dient zur effektiven Prüfung einer großen Anzahl von Patientenproben und reduziert menschliche

DE

Fehler.

Der ImmuLISA™ Enhanced ANA-Screen ELISA erkennt kollektiv - in einer Kavität - die Summe der ANA im Vergleich zu Doppelstrang-DNA (dsDNA, nDNA), Histone, SS-A(Ro), SS-B(La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 und zentrometrische Antigene sowie Seren, die positiv für IFA HEP-2 ANA testen. Seren, die im ImmuLISA™ Enhanced Biotech ANA-Screen ELISA positiv testen, sollten auf die speziellen Antikörper untersucht werden, die auf die verschiedenen systemischen, rheumatischen Erkrankungen hinweisen.

PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Gereinigte Antigene (dsDNA, Histone, SS-A(Ro), SS-B(La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, Zentromere und andere Antigene, die vom HEP-2-Nucleus extrahiert wurden) sind an Mikrotiter gebunden. Antikörper zu diesen Antigenen binden die Mikrotiter, sofern im verdünnten Serum vorhanden. Das Waschen der Mikrotiter entfernt ungebundene Serumantikörper. Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertes Anti-Human IgG bindet sich immunologisch an die gebundenen Patientenantikörper und formt ein "Konjugat-Antikörper-Antigen"-Sandwich. Das Waschen der Mikrotiter entfernt ungebundenes Konjugat. Ein Enzymsubstrat in Anwesenheit von gebundenem Konjugat hydrolysiert zu blauer Färbung. Wird eine Säure hinzugefügt, dann wird die Reaktion beendet und ergibt ein gelbes Endprodukt. Die Intensität der Farbe wird fotometrisch bei 450 nm gemessen.

KIT PRÄSENTATION

BEREITGESTELLTES MATERIAL

Jedes Kit enthält die folgenden Inhalte in ausreichender Quantität, um die auf der Verpackung angegebene Anzahl von Tests durchzuführen.

12 x 8	MICROPLATE ANA	Mit ANA-Antigen beschichtete Mikrotiterplatte: 96 Kavitäten, konfiguriert in zwölf Streifen zu 1x8, in einer Plastiktüte mit Trockenmittel. (96T: eine Platte)
1 x		ELISA-Rahmen: Zum Halten der Antigen-beschichteten Kavitäten. Bewahren Sie den Rahmen zur späteren Verwendung auf
2 x 30 mL	DIL	Serumverdünnungsmittel: Gebrauchsfertig Zur Verdünnung von positiver Kontrolle, Cutoff-Kalibrator, negativer Kontrolle und Patientenproben 1:41. Für Reagenzleerwert. Vermeiden Sie unnötige Kontaminierung. Enthält < 0,1% Natriumazid als ein Konservierungsmittel. (96T: zwei Flaschen mit je 30 ml)
1 x 0.4 mL	CONTROL +ANA	Positive Kontrolle: Stabilisiertes Humanserum. Verdünnen 1:41 in Verdünnungsmittel zur gleichen Zeit und auf dieselbe Art wie Proben. Ergibt eine ANA-Anzahl größer als 1. (96T: eine Phiole, 0,4 ml) *
1 x 0.4 mL	CONTROL -	Negative Kontrolle: Stabilisiertes Humanserum. Verdünnen 1:41 in Verdünnungsmittel zur gleichen Zeit und auf dieselbe Art wie Proben. Ergibt eine ANA-Anzahl größer als 1 (96T: eine Phiole, 0,4 ml)*
1 x 0.4 mL	CALIBRATOR ANA	Cutoff-Kontrolle (Kalibrator): Stabilisiertes Humanserum. Verdünnen 1:41 in Verdünnungsmittel zur gleichen Zeit und auf dieselbe Art wie Proben. Verwendet zur Berechnung der ANA-

DE

Anzahl in der Probe. (96T: eine Phiole, 0,4 ml) *

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

Meerrettichperoxidase (HRP) Konjugat, Ziegen-Anti-Human IgG: Gebrauchsfertig (96T: eine Flasche, 15 mL)

1 x 15 mL **SUBSTRATE**|**TMB**

Chromogen-/Substratlösung: Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig. Bei Verdunstung kann sich Niederschlag an den Reagenzvertiefungen bilden. (96T: eine Flasche, 15 ml)

1 x 15 mL **STOP**|**III**

Stopplösung: gebrauchsfertig, zum Beenden der Farbentwicklung. Enthält Schwefel- und Salzsäure. (96T: eine Flasche, 15 ml)

1 x 60 mL **BUF**|**WASH**

Waschpuffer (Konzentrat): 60 ml Konzentrat + 940 ml entionisiertes oder destilliertes Wasser hinzufügen. Gründlich vermengen. (96T: eine Flasche, 60 ml)

*** Hinweis: Serumphiole können Überschuss enthalten.**

Stopplösung, TMB Chromogen/Substrat, Waschpuffer (Konzentrat) und Serumverdünner sind nicht von der Kit-Chargennummer abhängig, dürfen jedoch nur für den ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA-Assay verwendet werden. Bitte prüfen Sie, dass das entsprechende Reagenz für den Nachweis verwendet wird.

Verwendete Symbole



Ch.-B.:



Die Produktnummer



Zur *In-vitro* Diagnostik



Verw. bis



Lagertemperatur



Achtung! Siehe beigefügte



Achtung! Siehe beigefügte



Anzahl der Tests



Fabrizieren bei



Gefahr. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.

Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI

BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten

Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. BEI

KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser

ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen.

Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. Unter

Verschluss aufbewahren. Inhalt/Behälter im genehmigten Abfallbeseitigung entsorgen.

ZUSÄTZLICHE ANFORDERUNGEN

- Spritzflasche, automatisches oder halbautomatisches Waschsystem für Mikrotiterplatte.
- Mikropipetten, einschließlich Multikanal, zur akkuraten Lieferung von 10-200 µl Volumen (weniger als 3% CV).
- Ein Liter Messzylinder.
- Papiertücher.
- Reagenzglas für Serumverdünnung.
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser (dH₂O), CAP (College of American Pathology) Typ 1 oder entsprechend.
- Messuhr zur Messung mit Genauigkeit von +/- 1 Sekunde (0-60 Minuten).
- Einzel- und Dual-Wellenlängen-Mikroplattenleser mit 450 nm Filter. Wenn Sie Dual-Wellenlänge verwenden, stellen Sie den Referenzfilter auf 600-650 nm ein. Lesen Sie sich die Gebrauchsanleitung durch oder kontaktieren Sie den Instrumentenhersteller, um die Leistungsspezifikationen der Linearität des Lesegeräts zu bestimmen.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Das Kit ist für den Versand stabilisiert. Alle Bestandteile des Kits sollten zwischen 2°C und 8°C gelagert werden und können bis zum Verfalldatum auf der Verpackung verwendet werden. Nach Öffnen der Plastikverpackung der Antigen-beschichteten Platte sind die Kavitäten noch 30 Tage lang stabil.

VORSICHT

SICHERHEIT

1. Nur zu diagnostischen Zwecken *in vitro*.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. Bestandteile mit Humanserum wurden für HBsAg- und HIV-Antigene negativ getestet. Das ist keine Gewähr für die Abwesenheit dieser Antigene. Seren sollten als potentiell gefährlich angesehen werden. Diese Materialien sollten gemäß der Empfehlungen im CDC/NIH Handbuch, Biosicherheit in Mikrobiologischen und Biomedizinischen Laboratorien, 2009 behandelt werden.¹⁰
4. Natriumazid ist eine giftige Substanz, die in manchen Reagenzien verwendet wird. Bei Augen- oder Hautkontakt umgehend mit reichlich Wasser abspülen. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und explosive Metallazide formen. Beim Entsorgen von Reagenzien mit reichlicher Menge Wasser spülen, um Azidablagerungen zu vermeiden.
5. Die Stopplösung enthält eine verdünnte Säurelösung. Vorsichtig verwenden und Augen- und Hautkontakt vermeiden. Vermeiden Sie Kontakt mit Basen, Metallen oder anderen Verbundstoffen, die mit Säure reagieren können. Bei Verschütten umgehend aufwischen.
6. Entsorgen Sie sämtliche Abfälle gemäß den entsprechenden staatlichen und/oder örtlichen Bestimmungen.
7. Abfälle, die Patientenproben oder biologische Produkte enthalten, sollten bei der Handhabung und Entsorgung als potenziell biologisch gefährliches Material betrachtet werden.
8. Chemische Reagenzien sollten gemäß guter Laborpraxis behandelt werden.

DE

9. Bei Verschütten umgehend und gründlich reinigen. Bei Verschütten von biologisch gefährlichem Material muss der Bereich desinfiziert werden. Entsorgen Sie alle kontaminierten Materialien angemessen.
10. Das Kit darf nicht nach dem Verfalldatum verwendet werden. Das Datum ist auf der Verpackung aufgedruckt.

VERFAHREN

1. Alle Materialien müssen Raumtemperatur (21 bis 25°C) haben.
2. Keine Kontrollen oder Kalibratoren mit anderen Kit-Chargennummern verwenden. Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
3. Vermeiden Sie die Kontaminierung der Reagenzien, Dosierpipetten und Mikrotitervertiefungen. Verwenden Sie für alle Proben neue Dosierpipetten. Tauschen Sie die Deckel nicht aus. Bei Nichtgebrauch Flasche stets verschlossen halten. Mikrotitervertiefungen und Pipetten dürfen nicht wiederverwendet werden. Vermeiden Sie Pipetten, die mit Peroxidase kontaminiert sind.
4. Alle Kavitäten sollten während des Tests in derselben Reihenfolge und auf dieselbe Weise behandelt werden. Der Test sollte ohne Unterbrechungen durchgeführt werden.
5. Jedes flüssige Reagenz und jede Probe sollten vor der Verwendung vorsichtig und vollständig kreisend vermengt werden.
6. 1:41 Verdünnungen herstellen.
7. Alle Verdünnungen in nicht kontaminiertem Verdünnungsmittel herstellen. Bereiten Sie alle Verdünnungen vor Beginn des Tests vor. Verwenden Sie stets frische Probenverdünnungen.
8. Führen Sie stets eine positive, negative und Kalibratorkontrolle durch. Verdünnungsmittel stets als Blindversuch mitlaufen lassen.
9. Feuchtigkeit beeinträchtigt die Antigen-beschichteten Kavitäten. Öffnen Sie die Verpackung nicht, bevor sie Raumtemperatur erreicht haben. Berechnen Sie, wie viele Kavitäten für den aktuellen Nachweis erforderlich sind und entfernen Sie diese bei Zimmertemperatur von der Plastikfolie. Legen Sie sie auf den Rahmen und fügen dann umgehend die Proben hinzu. Ungenutzte Kavitäten sollten sofort mit Trockenmittel in die wiederverschließbare Plastiktüte zurückgegeben werden.
10. Inkubationszeiten beeinflussen die ELISA-Ergebnisse. Lassen Sie die Kontrollen, Proben oder HRP-Konjugat nicht mehr als 40 Minuten in den Mikrotiterstreifen inkubieren. Für beste Ergebnisse verwenden Sie 1 ml Minireagenzgläser zur Vorbereitung der Probeverdünnungen. Übertragen Sie alle Lösungen mit einer 8-Kanal-Mikropipette o.ä. in die Kavitäten.
11. Waschen Sie die Mikrotiterkavitäten nach jeder Inkubation gründlich mit 200 bis 300 µl Waschlösung pro Kavität aus. Achten Sie darauf, dass Sie vor dem nächsten Schritt alle Flüssigkeit entfernen. Befüllen Sie die Kavitäten, dann invertieren und Flüssigkeit schnell ausschleudern. Platte nach vollständiger Wäsche mit einem Papiertuch ablöschen.
12. Lassen Sie jeden Streifen mit 1 ml Konjugat durchlaufen. Übertragen Sie eine Menge auf einen angemessenen Behälter. Entsorgen Sie überschüssiges, übertragenes Konjugat.
13. Lassen Sie jeden Streifen mit 1 ml Substrat durchlaufen. Übertragen Sie eine Menge auf einen angemessenen Behälter. Entsorgen Sie überschüssiges, übertragenes Substrat.

PROBENSAMMLUNG UND LAGERUNG

1. Sammeln Sie Blutproben keimfrei in unbehandelten Reagenzgläsern durch Blutentnahme und bereiten das Serum gemäß einer anerkannten Methode zu.
2. Lassen Sie das Blut gerinnen - Serum umgehend separieren. Serum, das sichtbare Partikel enthält, kann mit geringer Geschwindigkeit zentrifugiert werden.
3. Seren können bis zu fünf Tage bei 2 bis 8°C gelagert werden. Ist beim Testen eine zusätzliche Verzögerung erforderlich, lagern Sie sie gefroren bei -20 bis -70°C in einem Gefrierschrank ohne Abtauautomatik. Vermeiden Sie mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Patientenproben.
4. Vermeiden Sie hämolysierte, lipemische oder bakteriell kontaminierte Seren.
5. **Achtung: Inaktive Seren sollten nicht erhitzt werden, da dies zu falschen positiven Ergebnissen führen kann.**

GEBRAUCHSVERFAHREN

VORBEREITUNG FÜR DEN ASSAY

1. Sammeln Sie alle erforderlichen Reagenzien, Proben und Verdünnungen vor Beginn des Nachweises.
2. Waschlösung
 - Da das Waschkonzentrat salzhaltig ist, können sich in der konzentrierten Lösung Kristalle formen. Bereiten Sie die Waschlösung daher in zwei Schritten vor:
 - Entleeren Sie den Inhalt der Waschkonzentratflasche mit Kristallen in eine 1 l Flasche.
 - Sollten Kristalle in der Waschkonzentratflasche verbleiben, entfernen Sie sie, indem Sie etwas entionisiertes Wasser hinzufügen, vermischen und den gesamten Inhalt in die 1 l Flasche geben.
 - Fügen Sie der 1 l Flasche entionisiertes Wasser hinzu, bis die Lösung 1 l ergibt.
 - Geben Sie einen Rührstab in die 1 l Flasche und stellen sie auf einen Rührteiler. Rühren Sie die verdünnte Waschlösung einige Minuten durch, bis alle Kristalle gelöst sind. Ist kein Rührteiler vorhanden, bedecken Sie die Waschlösung und schütteln Sie vorsichtig bis sich die Kristalle auflösen. Vermeiden Sie übermäßige Blasenbildung.
 - Die verdünnte Waschlösung ist bei 2-8°C 14 Tage haltbar.
 - Zur zukünftigen Verwendung aufbewahren.
3. Lassen Sie das Verdünnungsmittel vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmen. Gründlich vermengen. Verwenden Sie Verdünnungsmittel für alle Verdünnungen. Vermeiden Sie unnötige Kontamination.
4. Erfassen und weisen Sie die Kavitäten für Kontrollen und Proben zu.
5. Machen Sie 1:41 Verdünnungen der Kontrollen, Kalibratoren und Proben (z.B. 10 µl Probe + 400 µl Verdünnungsmittel).
6. Verwenden Sie keine Reagenzien, die Anzeichen von Undichtheit aufweisen.

NACHWEISVERFAHREN

1. Geben Sie die gewünschte Anzahl von Teststreifen auf einen Mikrotiterrahmen. Lassen Sie fünf (5) Kontrollen/Kalibratoren pro Durchlauf zu (je eine negative und positive Kontrolle und drei Kalibratoren). Für jeden Nachweis sollte ein Reagenzblindwert (RB) ausgeführt werden. Prüfen Sie die Anforderungen für

DE

Software und Lesegerät für die korrekte Konfiguration von Kalibrator/Kontrolle. Geben Sie ungenutzte Streifen mit Trockenmittel in die wiederverschließbare Tüte, versiegeln sie und legen sie in den Kühlschrank.

Beispielskonfiguration:

Platte Ort	Probe Beschreibung	Platte Ort	Probe Beschreibung
1A	RB	2A	Patient 3
1B	NC	2B	Patient 4
1C	Cal	2C	Patient 5
1D	Cal	2D	Patient 6
1E	Cal	2E	Patient 7
1F	PC	2F	Patient 8
1G	Patient 1	2G	Patient 9
1H	Patient 2	2H	Patient 10

RB = Reagenzblindwert - Kavität ohne Serum für alle Reagenzien. Als Blindwert für Lesegerät.

NC = Negative Kontrolle

Cal = Kalibrator

PC = Positive Kontrolle.

- Verdünnen Sie die Testseren, Kalibrator, positive und negative Kontrollseren 1:41 (z.B. 10 µl + 400 µl) in Serumverdünnungsmittel. (Geben Sie bei der Verdünnung von Hand zuerst den Probenverdünner in das Reagenzglas und fügen dann das Patientenserum hinzu.)
- Geben Sie zu den einzelnen Kavitäten 100 µl der entsprechenden verdünnten Kalibratoren, Kontrollen und Patientenseren hinzu.
- Inkubieren Sie jede Kavität **dreißig (30) Minuten lang** bei Zimmertemperatur (21 bis 25°C). (Verdünnte Seren in den Kavitäten nicht länger als 40 Minuten inkubieren.)
- Aspirieren oder schütten Sie die Flüssigkeit aus allen Kavitäten. Fügen Sie jeder Kavität mithilfe einer halb- oder vollautomatischen Waschanlage 200 µl - 300 µl verdünnten Waschpuffer hinzu. Aspirieren oder schütten Sie die Flüssigkeit aus. Wiederholen Sie den Waschvorgang vier (4) mal (insgesamt fünf (5) Wäschen). Platte nach der letzten Wäsche mit einem Papiertuch ablöschen, um alle Flüssigkeit aus den Kavitäten zu entfernen.

****WICHTIGER HINWEIS:** In Bezug auf Schritte 5 und 8: unzureichendes oder übermäßiges Waschen führt zu Abweichungen beim Nachweis und beeinträchtigt die Validität der Ergebnisse. Wir empfehlen daher, dass Sie die halb- oder vollautomatische Anlage so einstellen, dass sie ein Volumen liefert, das jede Kavität vollständig auffllt (200 bis 300 µl). Bitte kontaktieren Sie Trinity Biotech, wenn Sie Fragen zur entsprechenden Waschanlage haben. Bei automatischen Anlagen können insgesamt fünf (5) Wäschen erforderlich sein. **Für die genaue Ausführung des Tests ist das vollständige Entfernen des Waschpuffers nach der letzten Wäsche unerlässlich. Bestätigen Sie auch optisch, dass in den Kavitäten keine Blasen zurückbleiben.**

- Fügen Sie jeder Kavität 100 µl Konjugat hinzu, einschließlich dem Reagenzblind. Vermeiden Sie beim Hinzufügen Blasenbildung, da diese zu falschen Ergebnissen führen können.

DE

7. Platte vorsichtig schütteln. Inkubieren Sie jede Kavität **dreißeig (30) Minuten lang** bei Zimmertemperatur (21 bis 25°C). (Verdünnte Seren in den Kavitäten nicht länger als 40 Minuten inkubieren.)
8. Wiederholen Sie die Wäsche wie in Schritt 5 beschrieben.
9. Fügen Sie jeder Kavität 100 µl Chromogen-/Substratlösung, einschließlich Reagenzblindwert, wobei eine konstante Zugaberate über die Platte beizuhalten ist.
10. Platte vorsichtig schütteln oder antippen, damit sich die Farbe gleichmäßig verteilt. Inkubieren Sie jede Kavität **dreißeig (30) Minuten lang** bei Zimmertemperatur (21 bis 25 °C).
11. Stoppen Sie die Reaktion durch Hinzufügen von 100 µl Stopplösung in derselben Reihenfolge wie beim Hinzufügen von Substrat, einschließlich Reagenzblindwertkavität. Tippen Sie die Platte vorsichtig außen an, damit sich die Inhalte der Kavitäten gut vermischen.
12. Die entwickelte Farbe sollte innerhalb von 30 Minuten auf dem mit 450nm Filter ausgestatteten ELISA-Plattenlesegerät ablesbar sein. Wenn Sie Dual-Wellenlänge verwenden, stellen Sie den Referenzfilter auf 600-650 nm ein. Stellen Sie das Lesegerät mit Hilfe der Reagenzblindwertkavität auf Null und lesen die Farbe der Kontrollen und Patientenkavitäten ab. Die positive Kontrolle sollte gelb sein. Die Kalibratorkavität sollte eine milde Farbveränderung aufweisen. Die negative Kontrolle sollte wenig Farbe haben. Die Reagenzblindwertkavität sollte wenig oder gar keine Farbe haben.

QUALITÄTSKONTROLLE

Damit der Test gültig ist, müssen alle der folgenden Kriterien erfüllt sein:

1. Bei jedem Durchlauf müssen eine positive und negative Kontrolle, ein Kalibrator und ein Reagenzblindwert mitlaufen.
2. Die Werte für jede Kontrolle und Kalibrator müssen sich innerhalb des angegebenen Bereichs auf der Komponentenliste befinden, die jeder Kit-Chargennummer beigelegt ist.
3. Der Reagenzblindwert muss bei Nullstellung an der Luft $\leq 0,200$ sein.
4. Siehe CLSI C24-A3 für Anleitung für entsprechende Qualitätskontrollverfahren.¹²
5. **Wenn die o.g. Kriterien nicht erfüllt sind, kontaktieren Sie den technischen Dienst von Trinity Biotech.**

INTERPRETATION

BERECHNUNGEN

Bestimmen Sie die ANA-Anzahl* für jede Patientenprobe (oder Kontrolle) folgendermaßen:

*ANA-Zahlen sind qualitativ

$$\frac{\text{OD der Testprobe}}{\text{OD-Mittelwert des Kalibrators}} = \text{ANA-Anz. der Testprobe}$$

ANALYSE

Folgendes dient als Anleitung zur Interpretation der Ergebnisse des ImmuLisa™ Enhanced ANA ELISA-Tests. Wir fordern jedes Labor auf, je nach Stichprobenmenge

DE

seine eigenen Kriterien für die Testinterpretation aufzustellen.

ANA-Anzahl	Interpretation
< 1,0	Negativ
≥ 1,0	Positiv

Die Mikrotiterkavitäten müssen mit einem ELISA-Lesegerät abgelesen werden, das auf 450 nm eingestellt ist. Die Ergebnisse sollten nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 11) abgelesen und wie folgt berichtet werden:

Positiv: Eine positive Reaktion wird durch gelbe Färbung angezeigt. Die berechneten ANA-Zahlen sind größer/gleich 1,0.

Negativ: Eine negative Reaktion wird ist farblos oder blass gelb. Die berechneten ANA-Zahlen sind weniger als 1,0.

ERWARTETE WERTE

Die erwarteten Werte und die positive Verteilung der verschiedenen Seren mit positiven Antikörpern von klinischer Bedeutung im ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA-Test werden nachstehend zusammengefasst:⁹

ImmuLisa™ Enhanced ANA Test ELISA			
Antikörper Spezifität	Anzahl der Proben	Niedrige ANA-Anzahl	Hohe ANA-Anzahl
SS-A	18	3,6	8,1
SS-B	2	1,3	8,8
SS-A/B	9	2,1	11,2
Sm	18	3,5	12,0
RNP	13	2,3	9,2
Scl-70	16	7,7	15,1
Jo-I	13	1,4	7,8
dsDNA	13	1,4	7,8
Histone	7	9,0	17,1
Zentromer	13	1,3	4,8

NUTZUNGSBESCHRÄNKUNGEN

Wie bei anderen ANA-Diagnostiktests werden die Ergebnisse als Hilfestellung bei der Diagnose verwendet. Es sollten Bestätigungstests für spezifische Antikörper durchgeführt werden, wenn ein positiver Nachweis erhalten wurde. Ein positives Ergebnis weist auf gewisse Erkrankungen hin und sollte durch klinische Befunde bestätigt werden.

LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die Empfindlichkeit kann als die Fähigkeit eines Tests definiert werden, ein positives Ergebnis für Serumproben zu liefern, die positiv sein sollten. Die Empfindlichkeitsleistung des ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA wurde folgendermaßen ermittelt:

Neunundfünfzig (59) Seren von verschiedenen klinischen Quellen mit monospezifischen

DE

Antikörpern von klinischer Bedeutung wurden mit dem Immulisa™ Enhanced ANA-Screen ELISA getestet. Alle dieser ANA-monospezifischen Seren waren im Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA positiv. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst:⁹

ELISA ANA Screening Test - Antikörperspezifität

Antikörperspezifität	Anzahl positiver Ergebnisse (%)	SS-A	SS-B	Sm	SmRNP	Scl-70	Jo-1	dsDNA	Histone	Centro
SS-A/Ro	9 von 9 (100%)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SS-B/La	1 von 1 (100%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SS-A/B	7 von 7 (100%)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sm	9 von 9 (100%)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RNP	6 von 6 (100%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Scl-70	5 von 5 (100%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Jo-1	5 von 5 (100%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
dsDNA	8 von 8 (100%)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Histone	3 von 3 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Zentromer	6 von 6 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Dreihunderteinundsiebzig (371) IFA HEp-2 ANA-positive Seren von verschiedenen klinischen Quellen wurden mit dem Immulisa™ Enhanced ELISA ANA Screening-Test getestet. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst:⁹

IFA HEp-2 ANA Titer	ANA ELISA Testergebnisse	Proben	%
≥ 1:160	Positiv	220	91
≥ 1:160	Negativ	22	9
1:40 – 1:80	Positiv	72	56
1:40 – 1:80	Negativ	57	44 ⁸

Achtunddreißig (38) Lupus-Patientenseren von verschiedenen klinischen Quellen wurden mit dem Immulisa™ Enhanced ANA-Screen ELISA getestet. Alle dieser Lupus-Patientenseren waren im Immulisa™ Enhanced Biotech ANA Screen ELISA positiv.

SPEZIFITÄT

Die Empfindlichkeit kann als die Fähigkeit eines Tests definiert werden, ein negatives Ergebnis für "normale" Seren zu liefern. Die Spezifitätsleistung des Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA wurde bestimmt mithilfe von 70 "normalen" Seren von einer freiwilligen Blutspender-Testeinrichtung. Ein Spender hatte Antikörper für dsDNA und wurde daher nicht als "normal" angesehen. Vierundsechzig (64) der übrigen 69 waren im Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA Test negativ und ergaben daher eine Spezifität von 92,8%.⁹

VERGLEICHBARE LEISTUNG

Einhundertundachzig (180) Seren von verschiedenen klinischen Quellen wurden zum Vergleich mit vier verschiedenen Geräten und dem Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA getestet. Ähnliche Geräte waren: 1) ELISA ENA Plus Screening-Test (zur Erkennung von Antikörpern gegen SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 oder Jo-1), 2) ELISA Anti-dsDNA, 3) ELISA Anti-Histone und 4) IFA HEp-2 ANA zur Erkennung von anti-zentromerischen Antikörpern. Einhundertundzehn (110) der Seren waren auf mind. einem dieser ähnlichen Nachweise positiv, während 70 in allen vier Nachweisen "normale" Seren waren.⁹

Vierhundertundneunundsechzig (469) Seren von verschiedenen klinischen Quellen

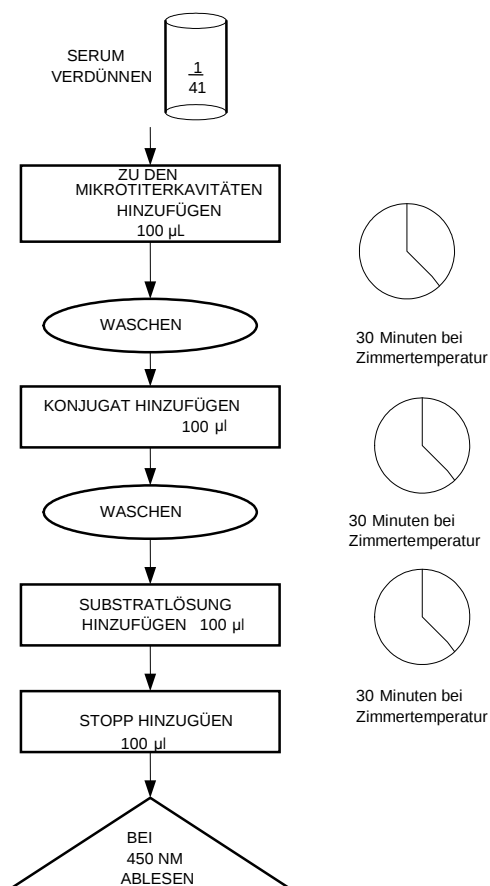
DE

wurden zum Vergleich mit dem IFA HEp-2 ANA und dem Immulisa™ Enhanced ANA Screen ELISA-Test getestet. Die allgemeine Übereinstimmung betrug 86,1%.⁹

PRÄZISION

Die Intra-Assay-Präzision wurde ermittelt durch das Testen einer starken, positiven Kontrolle und einer schwachen, positiven Kontrolle mit einer Replikation von 18. Die CVs waren 6,6% bzw. 9,5%. Die Inter-Assay-Präzision wurde ermittelt durch das Testen einer starken, positiven Kontrolle und einer schwachen, positiven Kontrolle mit einer Replikation von 24 Assays. Die CVs waren 6,8% bzw. 8,3%.⁹

ANA-TESTZUSAMMENFASSUNG DES NACHWEISVERFAHRENS



ImmuLisa™ Enhanced Antinuclear Antibody (ANA) Screen ELISA

ENCART DE PRODUIT

IVD Pour utilisation avec diagnostic *in vitro*

REF 5175 ANA Screen ELISA

96 Determinations

UTILISATION

Le Test ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen est un test immunoenzymatique (EIA) qualitatif destiné à dépister la présence d'anticorps antinucléaires (ANA) dans du sérum humain pour aider au diagnostic de certaines maladies rhumatismales systémiques. Ce test détecte collectivement, dans un seul puit, tous les ANA anti-ADN bicaténaire (ADNdb, ADNn), histones, SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 et centromères, ainsi que des sérums ANA positifs sur cellules HEP-2 par immunofluorescence (IFA).
Dispositif médical de diagnostic *in vitro*.

INTRODUCTION DE TEST

Des anticorps antinucléaires (ANA) dirigés contre diverses macromolécules sont souvent présents dans des maladies rhumatismales systémiques.¹ Initialement, ces anticorps étaient associés à un lupus érythémateux systémique (LES), mais la liste des maladies impliquées s'est allongée et on sait maintenant que de nombreuses maladies rhumatismales sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs de ces ANA. Par exemple, les anticorps anti-SS-A (Ro) et anti-SS-B (La) sont associés au LES et au syndrome de Sjögren (SS), les anticorps anti-ADNdb et anti-Sm au LES, les anticorps anti-histones au LES et au lupus médicamenteux, les anticorps anti-RNP à une connectivité mixte (syndrome de Sharp/MCTD) et au LES, les anticorps anti-Scl-70 à une sclérodémie (sclérose systémique progressive/SSP), les anticorps anti-Jo-1 à une polymyosite et une dermatomyosite et les anticorps anti-centromères au syndrome de Crest.^{2,3,4}

Le dosage par immunofluorescence (IFA) a été utilisé comme la méthode standard de détection des ANA.⁵ Bien que cette méthode soit un test sensible, elle est laborieuse lorsqu'elle est appliquée à un grand nombre d'échantillons et sujette à des erreurs d'interprétation ainsi qu'à la variabilité des microscopes à fluorescence.¹ Le test de dépistage d'ANA-IFA sur HEP-2 est également sujet aux problèmes suivants: il est parfois insensible à certains sérums contenant des anticorps anti-SS-A, SS-B, Sm ou ADNdb⁶ et il a tendance à trouver des sérums positifs chez un grand nombre de patients qui ne développent pas de maladies rhumatismales systémiques au cours d'une période de suivi de deux ans.⁷ Le système de test immunoenzymatique (EIA) constitue une excellente alternative au système de test IFA pour dépister la présence d'ANA en nombre cliniquement significatif dans le sérum d'un patient. Le système de test EIA dépiste efficacement un grand nombre d'échantillons et réduit le risque d'erreurs.

Le test Immulisa™ Enhanced ANA Screen détecte collectivement, dans un seul puits, tous les ANA anti- ADN bicaténaire (ADNdb, ADNn), histones, SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 et centromères, ainsi que des sérums ANA positifs sur cellules HEp-2 par IFA. Les échantillons sériques positifs au test de dépistage des ANA-EIA doivent être testés pour détecter des autoanticorps spécifiques indiquant diverses maladies rhumatismales systémiques.

PRINCIPE DE LA METHODE

Les antigènes purifiés (ADNdb, histones, SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromères et autres antigènes extraits du noyau des cellules HEp-2) sont fixés sur des micropuits. Les anticorps dirigés contre ces antigènes, s'ils sont présents dans le sérum dilué, se lient aux micropuits. Le lavage des micropuits élimine les anticorps sériques non liés. Des IgG anti-humaines conjuguées à de la peroxydase de raifort (Horseradish peroxidase/ HRP) se lient immunologiquement aux anticorps liés du patient, formant ainsi un sandwich " conjugué – anticorps – antigène ". Le lavage des micropuits élimine le conjugué non lié. Un substrat enzymatique en présence du conjugué lié s'hydrolyse en formant une coloration bleue. L'ajout d'un acide arrête la réaction, formant un produit final jaune. L'intensité de la couleur est mesurée par photométrie à 450 nm.

COMPOSANTS DE LA TROUSSE

MATERIEL FOURNI

La trousse du test de dépistage d'ANA-EIA contient le matériel nécessaire pour 96 tests:

12 x 8	MICROPLATE ANA	Micro-plaque du test de dépistage d'ANA ; 96 puits, puits recouverts d'antigènes nucléaires, dans une pochette hermétiquement refermable avec dessiccant.
1 x		Support microplaque: Conserver pour usage ultérieur.
2 x 30 mL	DIL	Diluant d'échantillon: Prêt à l'emploi. Tampon phosphate, pH 7,3 +/- 0,2, avec < 0,1 % d'azide de sodium comme conservateur. Utiliser pour diluer les échantillons des patients, les Contrôles Positif et Négatif et le Calibrateur Seuil. Utiliser pour le Contrôle à blanc. (2 X 30 mL)
1 x 0.4 mL	CONTROL + ANA	Contrôle Positif du test de dépistage d'ANA: Sérum humain positif pour la présence d'anticorps anti-ANA. (0,40 mL)*
1 x 0.4 mL	CONTROL -	Contrôle Négatif: Sérum humain négatif pour la présence d'anticorps anti-ANA. (0,40 mL) *
1 x 0.4 mL	CALIBRATOR ANA	Contrôle Seuil du test de dépistage d'ANA: Sérum humain contenant des anticorps anti-ANA. Utiliser pour calculer le coefficient d'absorption de l'échantillon. (0,40 mL)*
1 x 15 mL	IgG-CONJ HRP	Conjugué: IgG de chèvre anti-humaine peroxydase de raifort en tampon, pH entre 6,2 et 6,7: Prêt à l'emploi. (15 mL)
1 x 15 mL	SUBSTRATE TMB	Substrat: Tétraméthylbenzidine (TMB) dans un tampon de peroxyde d'hydrogène dilué: Prêt à l'emploi. (15 mL)
1 x 15 mL	STOP	Solution d'arrêt: Prêt à l'emploi. Contient de l'acide sulfurique (1,5 %) et de l'acide chlorhydrique (1,5 %), pH < 3,0. Utiliser pour arrêter le développement de la couleur. (15 mL)

1 x 60 mL

BUFWASH

Solution de lavage concentrée (16,7X): Prêt à l'emploi. Tampon phosphate, pH 7,3 +/- 0,2 (lorsqu'il est dilué au niveau d'une solution de travail), avec Tween-20 comme détergent. Utiliser pour laver les puits. (60 mL)

***Remarque: Ne pas échanger des réactifs provenant de différents lots de trousse.**

Solution d'arrêt, Substrat, Solution de lavage concentrée, et Diluant d'échantillon sont indépendants du numéro de lot de la trousse, mais peuvent seulement être employés pour l'analyse ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen. Veuillez vérifier que le type approprié de réactif est employé pour l'analyse.

Symboles utilisés



Lot



Numéro produit

Diagnostic *in vitro*

A Utiliser avant le



Température de stockage



Attention! Voir documents ci-joints



Attention! Voir documents ci-joints



Nombre de tests



Fabriquée par



Danger. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aerosols. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. 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. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans l'élimination des déchets approuvée.

AUTRE MATERIEL NECESSAIRE

- Pipette à répétition à 8 canaux (pour le lavage) ou appareil de lavage automatique.
- Micropipettes (10 µL et 100 µL). Micropipette à 8 canaux de 100 µL (pour la distribution des réactifs). Pipettes (1 mL et 10 mL).
- Cuve graduée (≥ 120 mL).
- Serviettes de papier.
- Mini tubes de 1 mL (pour les dilutions d'échantillon).
- Eau déminéralisée.
- Minuteur.

- Lecteur EIA (réglé à 450 nm).

CONSERVATION ET STABILITE

La trousse est stabilisée pour permettre son expédition à température ambiante. Tous les composants de la trousse doivent être conservés entre 2 et 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur leur étiquette. Après l'ouverture de la pochette en aluminium, les puits restent stables pendant 30 jours s'ils sont remis immédiatement dans la pochette en aluminium contenant un dessiccant et si celle-ci est refermée hermétiquement.

MISES EN GARDE/AVERTISSEMENTS

SÉCURITÉ

1. Pour usage diagnostique *in vitro*.
2. Ne pas prélever à la pipette avec la bouche.
3. Le Calibrateur Seuil et les autres Contrôles sont fabriqués avec du sérum humain. Chaque unité a été testée par des méthodes acceptées par la FDA et trouvée négative pour HIV-1, HIV-2, le virus de l'hépatite B (HBV), de l'hépatite C (HCV) et de la syphilis. Aucune méthode de test ne peut garantir à 100 % que des produits contenant du matériel d'origine humaine sont exempts de ces micro-organismes et d'autres agents infectieux. Selon les bonnes pratiques de laboratoire, tout matériel d'origine humaine doit être considéré comme étant potentiellement infectieux; il convient donc de manipuler le Calibrateur Seuil et les autres Contrôles avec les mêmes précautions que s'ils étaient des échantillons patients.
4. Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium qui peut réagir avec les conduites en plomb ou en cuivre pour former des azides métalliques explosifs. Éliminer ces réactifs avec prudence. S'ils sont jetés dans un évier, rincer à grande eau afin d'éviter l'accumulation d'azides.
5. La Solution d'arrêt contient une solution acide diluée. L'utiliser avec précaution pour éviter tout contact avec la peau et les yeux. Éviter une exposition aux bases, aux métaux ou autres composés susceptibles de réagir aux acides. Nettoyer immédiatement tout renversement.
6. Porter des protections corporelles lors de la manipulation de tous les réactifs et échantillons, ainsi que pendant l'utilisation de l'appareil de lavage et du lecteur.
7. Éliminer tous les déchets selon les règlements en vigueur dans le pays aux niveaux national et local.
8. Les déchets contenant des échantillons de patients ou des produits biologiques doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux lors de leur élimination ou de leur traitement.
9. Manipuler les réactifs chimiques conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
10. Nettoyer immédiatement et soigneusement tout renversement. En cas de renversement impliquant du matériel infectieux, désinfecter la zone. Jeter tout matériel contaminé conformément aux règlements.

COMMENTAIRES SUR LA METHODE

1. Tous les produits doivent être à température ambiante (entre 18 et 27 °C) avant de démarrer le test.
2. Ne pas utiliser un Calibrateur Seuil ou d'autres Contrôles provenant de différents lots de trousse. Ne pas utiliser des réactifs périmés.

FR

3. Éviter la contamination des réactifs, des pipettes de distribution et des puits de microtitration. Utiliser des pipettes de distribution neuves pour tous les échantillons. Ne pas échanger les bouchons. Conserver toujours les flacons bouchés lorsqu'ils ne sont pas utilisés. Ne pas réutiliser les puits de microtitration ni les pipettes. Éviter les pipettes contaminées par de la peroxydase.
4. Tous les puits doivent être manipulés dans le même ordre et de la même manière au cours du test. Le test doit être réalisé sans interruption.
5. Faire tourner doucement et complètement le contenu de chaque flacon de réactif liquide et d'échantillons avant de les utiliser.
6. Effectuer des dilutions précises de 1:40.
7. Effectuer toutes les dilutions dans du Diluant d'échantillon non contaminé. Préparer toutes les dilutions avant de démarrer le test. Toujours utiliser des dilutions d'échantillon préparées extemporanément.
8. Toujours analyser un Contrôle Positif ANA, un Calibrateur Seuil ANA et un Contrôle Négatif. Effectuer toujours un blanc avec du Diluant d'échantillon.
9. L'humidité a un effet sur les puits recouverts d'antigènes ; ne pas ouvrir la pochette avant qu'elle n'ait atteint la température ambiante. Calculer le nombre de puits nécessaires au dosage présent, les sortir de leur pochette en aluminium à température ambiante, les aligner sur le support microplaque, puis ajouter immédiatement les échantillons. Remettre immédiatement les puits non utilisés dans la pochette en aluminium contenant un dessiccant et la refermer hermétiquement.
10. La durée d'incubation a un effet sur les résultats EIA. Ne pas laisser incuber les contrôles, le Calibrateur Seuil, les échantillons ni le conjugué dans les puits de la barrette pendant plus de 40 minutes. Pour obtenir les meilleurs résultats, utiliser des mini tubes de 1 mL pour préparer les dilutions d'échantillon. Transvaser toutes les solutions dans les puits à l'aide d'une micropipette à 8 canaux.
11. Après chaque incubation, nettoyer soigneusement les puits de microtitration avec environ 200 µL de Solution de lavage par puits. Veiller à éliminer tout liquide avant de procéder à l'étape suivante. Remplir les puits, les retourner et les tapoter rapidement pour éliminer le liquide. Après un lavage complet, laisser égoutter la plaque sur un papier absorbant.
12. Transvaser 1 mL de Conjugué dans un tube à essai gradué pour chaque barrette à analyser. Éliminer l'excédent de Conjugué transvasé.
13. Transvaser 1 mL de Substrat dans un tube à essai gradué pour chaque barrette à analyser. Éliminer l'excédent de Substrat transvasé.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

1. Recueillir du sang de manière aseptisée dans des tubes non traités.
2. Laisser le sang se coaguler. Séparer immédiatement le sérum.
3. Conserver les sérums entre 2 et 8 °C. S'il n'est pas possible de tester les sérums dans les 24 heures suivantes, les congeler à -20 °C ; éviter plusieurs congélations.
4. Éviter d'utiliser des sérums lipémiques, hémolysés ou contaminés.
5. **MISE EN GARDE : Les échantillons sériques ne doivent pas être inactivés à la chaleur sous risque de produire des faux positifs.**

MODE D'EMPLOI

PREPARATION ET CONSERVATION DES REACTIFS

1. Collecter tous les réactifs, échantillons et dilutions nécessaires avant de commencer le dosage.

2. Solution de lavage

- La Solution de lavage concentrée contenant des sels, il est possible que des cristaux se forment dans la solution concentrée. Pour préparer correctement la Solution de lavage, procéder aux étapes suivantes :
 - Vider le contenu d'une bouteille de la Solution de lavage concentrée, y compris les cristaux, dans une bouteille de 1 L.
 - Si des cristaux restent dans la bouteille de la Solution de lavage concentrée, les éliminer en ajoutant de l'eau déminéralisée dans la bouteille ; mélanger et verser tout le contenu dans la bouteille de 1 L.
 - Ajouter suffisamment d'eau déminéralisée dans la bouteille de 1 L pour obtenir un volume de solution final de 1 litre.
 - Placer une tige d'agitateur dans la bouteille de 1 L et mettre cette dernière sur un agitateur. Agiter la Solution de lavage diluée pendant quelques minutes jusqu'à ce que tous les cristaux soient dissous. Si un agitateur n'est pas disponible, boucher la bouteille de Solution de lavage et la renverser doucement plusieurs fois jusqu'à ce que les cristaux soient dissous. Éviter un excédent de bulles.
- La Solution de lavage diluée reste stable pendant 14 jours entre 2 et 8 °C.
- Conserver pour usage ultérieur.

3. Laisser le Diluant d'échantillon revenir à température ambiante avant de l'utiliser.

4. Attribuer des puits aux contrôles et aux échantillons et les noter. Mélanger complètement. Éviter tous risques de contamination.

5. Préparer de la façon suivante :

- Diluer 10 µL d'échantillon sérique dans 0,4 mL de Diluant d'échantillon.
- Diluer 10 µL de Contrôle Positif ANA dans 0,4 mL de Diluant d'échantillon.
- Diluer 10 µL de Calibrateur Seuil ANA dans 0,4 mL de Diluant d'échantillon.
- Diluer 10 µL de Contrôle Négatif dans 0,4 mL de Diluant d'échantillon.
- Jeter l'excédent des solutions de travail après leur utilisation.

6. Ne pas utiliser de réactifs dont le flacon semble fuir.

PROTOCOLE OPERATOIRE

1. Placez le nombre voulu de barrettes sur un support de micropuits. Prévoyez cinq (5) positions pour l'étalon et les contrôles (un contrôle négatif, trois étalons et un contrôle positif) par épreuve. Un blanc réactif (BR) doit être prévu pour chaque test. Vérifiez le logiciel et le lecteur pour vous assurer de la bonne configuration des contrôles et de l'étalon. Placez les barrettes non utilisées dans un sac refermable avec dessiccateur: refermez immédiatement et mettez au réfrigérateur.

Exemple de configuration:

Emplacement de la plaque	Description de l'échantillon	Emplacement de la plaque	Description de l'échantillon
1A	BR	2A	Patient #3
1B	CN	2B	Patient #4
1C	étal.	2C	Patient #5
1D	étal.	2D	Patient #6
1E	étal.	2E	Patient #7
1F	CP	2F	Patient #8
1G	Patient #1	2G	Patient #9
1H	Patient #2	2H	Patient #10

FR

BR = Blanc réactif-puits sans sérum avec tous les réactifs. Permet d'étalonner le lecteur.

CN = Contrôle négatif

étal = Étalon

CP = Contrôle positif

- Diluez les sérums à analyser, l'étalon et les sérums de contrôle à 1:41 (par ex. 10 µl + 400 µl) dans le diluant Serum Diluent Plus. Pour les dilutions manuelles, il est conseillé de verser le diluant avant le sérum du patient dans le tube de dosage.
- Verser 100 µl de sérum dilué de patient, d'étalon et de sérum de contrôle dans les puits individuels. Ajoutez 100 µl de diluant Serum Diluent Plus dans le puits du blanc réactif. Vérifiez le logiciel et le lecteur pour vous assurer de la bonne configuration du puits du blanc réactif.
- Laissez incuber chaque puits à température ambiante (21-25°C) pendant **30 minutes**. N'incubez pas les sérums dilués dans les puits pendant plus de 40 minutes.
- Videz les puits par aspiration ou en secouant. Si vous utilisez un appareil semi-automatique ou automatique de lavage, versez 200-300 µl de tampon de lavage dilué dans chaque puits. Aspirer ou secouer pour éliminer le liquide. Répétez l'opération de lavage quatre fois (soit cinq passages en tout). Après le dernier lavage, essuyez la plaque avec un essuie-tout pour absorber tout le liquide des puits.

****IMPORTANT:** Remarque sur les étapes 5 et 8 – un lavage insuffisant ou excessif peut entraîner des variations dans les analyses et pourrait donc affecter la validité des résultats. Aussi recommandons-nous, pour de meilleurs résultats, l'utilisation d'un équipement semi-automatique ou automatique réglé pour distribuer un volume fixe remplissant complètement chaque puits (200-300 µl). Un total de cinq (5) lavages peut être nécessaire avec les équipements automatiques. **L'élimination complète du tampon de lavage à l'issue du dernier lavage est essentielle pour une précision optimale des analyses. Assurez-vous également, de visu, qu'aucune bulle ne persiste dans les puits.**

- Verser 100 µl de conjugué dans chaque puits, y compris celui du blanc réactif. Au moment de verser, évitez la formation de bulles qui fausseraient les résultats.
- Laissez incuber chaque puits à température ambiante (21 – 25 °C) pendant **30 minutes**.
- Répétez le lavage comme décrit dans l'étape 5**.
- Ajoutez 100 µl de solution chromogène/substrat (TMB) à chaque puits, y compris celui du blanc réactif, l'ajout devant se faire à vitesse constante sur tous les puits.
- Laissez incuber chaque puits à température ambiante (21 - 25 °C) pendant **30 minutes**.
- Arrêtez la réaction en versant 100 µl de solution d'arrêt (1N H₂SO₄) dans le même ordre que pour la solution chromogène/substrat, y compris dans le puits du blanc réactif. Tapotez la plaque délicatement le long des bords extérieurs pour mélanger le contenu des puits. La plaque se conserve pendant une (1) heure après ajout de la solution d'arrêt pour lecture.
- La couleur qui apparaît doit être mesurée sur un lecteur de plaques ELISA muni d'un filtre de 450 nm. Si vous utilisez une longueur d'onde double, réglez le filtre de référence sur 600-650 nm. L'instrument doit être étalonné sur l'air. Le blanc réactif doit avoir une absorbance de moins de 0,150 à 450 nm. Si le blanc réactif a une absorbance supérieure ou égale à 0,150, le test doit être répété. étalonnez le lecteur

FR

sur le puits du blanc réactif, puis procédez à la lecture de la plaque. Éliminez les plaques utilisées après lecture.

CONTROLE QUALITE

Pour qu'un test soit valide, il doit répondre aux critères suivants:

1. Chaque série analytique doit inclure un Contrôle Positif ANA, un Calibrateur Seuil ANA, un Contrôle Négatif ANA et un blanc de Diluant d'échantillon.
2. Les valeurs de chaque contrôle doivent se situer dans les limites spécifiées, imprimées sur la carte de contrôle qualité incluse avec chaque numéro de lot de trousses.
3. La DO du Diluant d'échantillon doit être $\leq 0,200$ lorsque le réglage du zéro se base sur l'air.
4. **Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, les résultats ne sont pas valides et il faut recommencer le test.**

DIRECTIVES SUR L'INTERPRETATION DES RESULTATS

CALCUL DES RESULTATS

Déterminer le coefficient d'absorption* pour chaque échantillon patient (ou contrôle) à l'aide de la formule suivante:

**Les coefficients d'absorption sont qualitatifs.*

$$\frac{\text{DO de l'échantillon testé}}{\text{DO du Calibrateur Seuil}} = \text{coefficient d'absorption de l'échantillon testé}$$

ANALYSE

Les données suivantes sont destinées à guider l'interprétation des résultats du test de dépistage des ANA-EIA; il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres critères quant à l'interprétation des tests en fonction des types d'échantillons qu'il rencontre.

ANA#	Interprétation
< 1,0	Négatif
>1,0	Positif

RESULTATS

Examiner les puits de la barrette de microtitration avec un lecteur EIA réglé sur 450 nm. Examiner les résultats après avoir ajouté la Solution d'arrêt (Étape 11 du dosage) et les relater de la façon suivante:

Positif : Une réaction positive est indiquée par une couleur jaune; le coefficient d'absorption de l'échantillon est $\geq 1,0$.

Négatif : Une réaction négative est indiquée par une absence de couleur ou une couleur jaune pâle; le coefficient d'absorption de l'échantillon est $< 1,0$.

VALEURS ATTENDUES

Les valeurs attendues du test ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen et la distribution positif pour les sérums positif divers pour des anticorps de signification clinique sont récapitulés ci-dessous :⁹

ImmuliSa™ Enhanced ANA Screen ELISA

Anticorps	Nombre d'échantillons	ANA Bas #	ANA Haute #
Spécificité			
SS-A	18	3,6	8,1
SS-B	2	1,3	8,8
SS-A/B	9	2,1	11,2
Sm	18	3,5	12,0
RNP	13	2,3	9,2
Scl-70	16	7,7	15,1
Jo-1	13	1,4	7,8
dsDNA	13	1,4	7,8
Histones	7	9,0	17,1
Centromere	13	1,3	4,8

LIMITES DE TEST

Comme avec d'autres tests de dépistage d'ANA, les résultats doivent être utilisés comme une aide au diagnostic. Si le test donne un résultat positif, on devra réaliser des tests complémentaires pour détecter des anticorps spécifiques. Un résultat positif sous-entend la présence de certaines maladies et doit être confirmé par des observations cliniques.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE
SENSIBILITE

La sensibilité peut être définie comme la capacité d'un test à donner un résultat positif pour des échantillons sériques qui devraient être positifs. L'évaluation de la sensibilité du test ImmuliSa™ Enhanced ANA Screen a été établie de la façon suivante:

Des sérums contenant des anticorps monospécifiques ayant une signification clinique (n = 59) provenant de diverses sources cliniques ont été soumis au test de dépistage d'ANA-EIA. 100 % de ces sérums monospécifiques ANA ont donné des résultats positifs au test de dépistage d'ANA-EIA.⁹

ImmuliSa™ Enhanced ANA Screen - Spécificité des Anticorps

Spécificité des Anticorps	Nombre de positifs (%)	SS-A	SS-B	Sm	SmRNP	Scl-70	Jo-1	dsDNA	Histones	Centro
SS-A/Ro	9 of 9 (100%)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SS-B/La	1 of 1 (100%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SS-A/B	7 of 7 (100%)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sm	9 of 9 (100%)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RNP	6 of 6 (100%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Scl-70	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Jo-1	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
dsDNA	8 of 8 (100%)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Histones	3 of 3 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Centromere	6 of 6 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Des sérums ANA-IFA positifs sur HEp-2 (n = 371) provenant de diverses sources cliniques ont été soumis au test de dépistage d'ANA-EIA. Les résultats sont récapitulés ci-dessous.

9

Titre d'ANA IFA sur HEp-2	Résultats du dépistage des ANA-EIA	Nombre d'échantillons	%
≥ 1:160	Positif	220	91
≥ 1:160	Négatif	22	9
1:40 – 1:80	Positif	72	56
1:40 – 1:80	Négatif	57	44 ⁸

Des sérums de patients atteints de lupus (n = 38) provenant de diverses sources cliniques ont été soumis au test de dépistage d'ANA-EIA. 100 % des sérums de patients atteints de lupus ont donné des résultats positifs au test de dépistage d'ANA-EIA.⁹

SPECIFICITE

La spécificité d'un test peut être définie comme la capacité de ce test à donner un résultat négatif pour des sérums "normaux". L'évaluation de la spécificité du test Immulisa™ Enhanced ANA Screen a été établie en utilisant 70 sérums "normaux" provenant d'un centre d'analyses de donneurs de sang volontaires. L'un des donneurs possédait des anticorps dirigés contre l'ADNdb et n'a donc pas été considéré "normal". Sur les 69 autres sérums, 64 d'entre eux ont donné des résultats négatifs au test de dépistage d'ANA-EIA, aboutissant donc à une spécificité de 92,8 %.⁹

EXACTITUDE

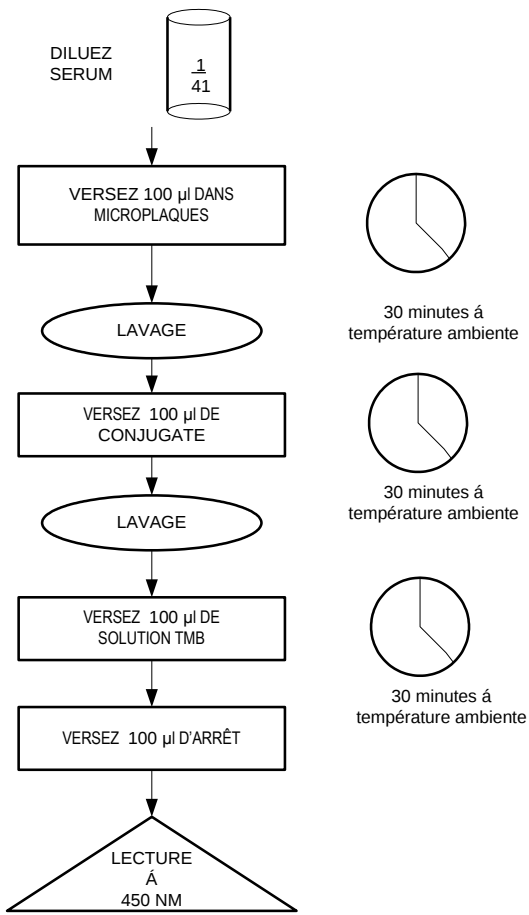
À des fins de comparaison, des sérums (n = 180) provenant de diverses sources cliniques ont été soumis à quatre techniques pronostiques et au test de dépistage d'ANA-EIA. Ces techniques pronostiques étaient : 1) Test de dépistage d'ENA-Plus-EIA (pour la détection d'anticorps anti-SS-A, SS-B, Sm, SmRNP, Scl-70 ou Jo-1), 2) d'anticorps anti-ADNdb par EIA, 3) d'anticorps antihistones par EIA, et 4) d'ANA-IFA sur HEp-2 visant à détecter des anticorps anti-centromères. Sur les sérums testés, 110 étaient positifs sur un ou plusieurs de ces techniques pronostiques et 70 d'entre eux étaient des sérums "normaux" négatifs sur les quatre techniques pronostiques.⁹

À des fins de comparaison, des sérums (n = 469) provenant de diverses sources cliniques ont été soumis aux tests de dépistage d'ANA-IFA sur HEp-2 et d'ANA-EIA. La concordance générale était de 86,1 %.⁹

PRECISION

La précision intra-dosage a été déterminée en testant un contrôle positif fort et un contrôle positif faible en 18 réplicats; les coefficients de variation étaient respectivement de 6,6 % et de 9,5 %. La précision inter-dosage a été déterminée en testant un contrôle positif fort et un contrôle positif faible au cours de 24 analyses ; les coefficients de variation étaient respectivement de 6,8 % et de 8,3 %.⁹

SYNTHESE DE LA PROCEDURE DE DOSAGE POUR ANA SCREEN



ImmuLisa™ Enhanced Antinuclear Antibody (ANA) Screen ELISA

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

[IVD]

Per uso diagnostico *in vitro*

[REF]

5175

ANA Screen ELISA

96 Determinations

INDICAZIONI D'USO

Il dosaggio immunoenzimatico (EIA) qualitativo ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA è previsto per la determinazione della presenza degli anticorpi antinucleari (ANA) nel siero umano e costituisce uno strumento ausiliario nella diagnosi di determinate malattie reumatiche sistemiche. Questa analisi rileva complessivamente, in un singolo pozzetto, gli ANA totali anti-DNA a doppia elica (dsDNA, nDNA), anti-istoni, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Scl-70, anti-Jo-1 e anti-antigeni centromerici, unitamente ai sieri positivi per ANA Hep-2 mediante IFA (immunofluorescenza indiretta).

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'incidenza degli anticorpi antinucleari (ANA) contro una vasta gamma di macromolecole è straordinariamente elevata in presenza di malattie reumatiche sistemiche.¹ Sebbene questi anticorpi fossero inizialmente associati al lupus eritematoso sistemico (LES), l'elenco delle malattie ad essi correlati è progressivamente aumentato e comprende ora molte malattie reumatiche caratterizzate dalla presenza di uno o più di questi ANA. Ad esempio, gli anticorpi anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La sono associati al LES e alla Sindrome di Sjögren (SS); gli anticorpi anti-dsDNA e anti-Sm al LES; gli anticorpi anti-istoni al LES e al lupus farmacoindotto; gli anticorpi anti-RNP alla connettivite mista (MCTD) e al LES; gli anticorpi anti-Scl-70 alla sclerodermia (sclerosi sistemica progressiva [SSP]); gli anticorpi anti-Jo-1 alla polimiosite e alla dermatomiosite; e gli anticorpi anti-centromeri alla sindrome CREST.^{2,3,4}

L'analisi mediante immunofluorescenza indiretta (IFA) ha finora costituito il metodo standard per il rilevamento degli ANA.⁵ Sebbene l'IFA sia un'analisi sensibile, risulta laboriosa nel caso di un elevato numero di campioni di pazienti ed è soggetta ad errori di interpretazione e ad errori imputabili alla variabilità dei microscopi a fluorescenza.¹ L'analisi IFA per gli ANA Hep-2 è inoltre soggetta ai seguenti problemi: risulta talvolta insensibile ad alcuni sieri contenenti anticorpi anti-SS-A, anti-SS-B, anti-Sm o anti-dsDNA⁶ e tende a indicare la positività del siero in un vasto numero di pazienti che successivamente non sviluppano malattie reumatiche sistemiche entro un periodo biennale di follow-up.⁷ Il sistema di analisi a dosaggio immunoenzimatico (EIA) costituisce un'eccellente alternativa al sistema di analisi IFA per lo screening del siero del paziente alla ricerca di una presenza clinicamente rilevante di ANA. Il sistema di analisi

IT

EIA consente di analizzare inoltre in modo efficiente un elevato numero di campioni di pazienti e limita l'errore umano.

Il dosaggio ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA rileva complessivamente, in un singolo pozzetto, gli ANA totali anti-DNA a doppia elica (dsDNA, nDNA), anti-istoni, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Scl-70, anti-Jo-1 e anti-antigeni centromerici, unitamente ai sieri positivi per ANA HEP-2 mediante IFA. I sieri risultati positivi mediante l'analisi EIA per lo screening degli ANA devono successivamente essere analizzati per la presenza di autoanticorpi specifici indicativi delle varie malattie reumatiche sistemiche.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Antigeni purificati (dsDNA, istoni, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centromeri e altri antigeni estratti dal nucleo della cellula HEP-2) sono legati ai micropozzetti. Gli anticorpi contro questi antigeni, se presenti nel siero diluito, si legano ai micropozzetti. Il lavaggio dei micropozzetti rimuove gli anticorpi sierici non legati. Anticorpi anti-IgG umane coniugati con perossidasi di rafano (HRP) si legano a loro volta immunologicamente agli anticorpi del paziente legati formando un composto stratificato "a sandwich" di coniugato - anticorpo - antigene. Il lavaggio dei micropozzetti rimuove il coniugato non legato. Un substrato enzimatico, in presenza del coniugato legato, si idrolizza generando una colorazione azzurra. L'aggiunta di un acido arresta la reazione, generando una colorazione finale gialla. L'intensità di tale colorazione viene misurata fotometricamente a 450 nm.

COMPONENTI DEL KIT

MATERIALI IN DOTAZIONE

I kit di analisi EIA per lo screening degli ANA contengono componenti sufficienti per 96 esami:

12 x 8	MICROPLATE ANA	Micropiastra per il dosaggio di screening degli ANA: 96 pozzetti. Pozzetti rivestiti di antigeni nucleari, ermeticamente confezionati in busta in alluminio risigillabile contenente sostanza igroscopica.
1 x		Telaio per EIA: Conservare per l'uso futuro.
2 x 30 mL	DIL	Diluyente per campione: Pronto per l'uso. Tampone fosfato, pH 7,3 +/- 0,2, con < 0,1% di sodio azide come conservante. Da usarsi per diluire i campioni dei pazienti e i controlli cut off, positivo e negativo. Da usarsi come controllo bianco. (2 x 30 mL)
1 x 0.4 mL	CONTROL+ ANA	Controllo positivo per il dosaggio di screening degli ANA: Siero umano positivo per ANA. (0,40 mL) *
1 x 0.4 mL	CONTROL-	Controllo negativo: Siero umano negativo per ANA. (0,40 mL) *
1 x 0.4 mL	CALIBRATOR ANA	Controllo cut off per il dosaggio di screening degli ANA: Siero umano con ANA. Da usarsi per calcolare il valore ANA del campione. (0,40 mL) *
1 x 15 mL	IgG-CONJ HRP	Coniugato: Anticorpi di capra anti-IgG umane con perossidasi di rafano in tampone, pH 6,2-6,7. Pronta per l'uso. (15 mL)
1 x 15 mL	SUBSTRATE TMB	Substrato: Tetrametilbenzidina (TMB) in tampone di perossido

IT

di idrogeno diluito. Pronta per l'uso. (15 mL)

1 x 15 mL **STOP**

Soluzione bloccante: Pronta per l'uso. Contiene acido solforico (1,5%) e acido cloridrico (1,5%), pH < 3,0. Da usarsi per arrestare la reazione colorimetrica. (15 mL)

1 x 60 mL **BUF|WASH**

Soluzione di lavaggio concentrata (16,7X): Tampone fosfato, pH 7,3 +/-0,2 (quando diluito alla soluzione di lavoro), con Tween-20 come detergente. Da usarsi per il lavaggio dei pozzetti. (60 mL)

*** NOTA: Non scambiare tra loro reagenti di lotti diversi.**

Soluzione bloccante, Substrato, Soluzione di lavaggio concentrate e Diluente per campione non è dipendente di numero di lotto del corredo, ma può essere usato soltanto per l'analisi dello ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen ELISA. Si prega di controllare che il tipo adatto del reagente di ImmuLISA™ ELISA sia usato per l'analisi.

Simboli utilizzati



Lotto



Numero prodotto



Per uso diagnostico *in vitro*



Usar entro



Temperatura di conservazione



Attenzione: vedi documenti allegati



Attenzione: vedi documenti allegati



Numero di prove



Fabbrikatore



Pericolo. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE** (o con i capelli): Togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. **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. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/recipiente nello smaltimento dei rifiuti approvato.

ULTERIORI MATERIALI NECESSARI

- Pipettatore a ripetizione a 8 canali (per il lavaggio) o lavatore automatico.
- Micropipette (da 10 µL e 100 µL). Micropipetta a 8 canali da 100 µL (per il dosaggio dei reagenti). Pipette (da 1 mL e 10 mL).
- Cilindro graduato (≥ 120 mL).
- Tovaglioli di carta.

IT

- Miniprovette da 1 mL (per le diluizioni dei campioni).
- Acqua deionizzata (DI).
- Timer per il conto alla rovescia.
- Lettore per EIA (impostato su 450 nm).

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

I componenti del kit sono stabilizzati per la spedizione a temperatura ambiente. Tutti i componenti dei kit vanno conservati a 2-8 °C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sulle relative etichette. Dopo l'apertura della busta in alluminio, i pozzetti rimangono stabili per 30 giorni se conservati nella busta sigillata contenente una sostanza igroscopica.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

SICUREZZA

1. Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Questo prodotto utilizza siero umano per la produzione di tutti i controlli, incluso quello cut off. Ciascuna unità è stata analizzata mediante metodi approvati dalla FDA ed è risultata non reattiva per HIV-1, HIV-2, epatite B (HBV), epatite C (HCV) e sifilide. Nessun metodo di analisi è in grado di offrire la totale garanzia relativa all'assenza di questi ed altri agenti infettivi dai prodotti contenenti materiali di origine umana. Ai sensi delle corrette prassi di laboratorio, tutti i materiali di origine umana devono essere ritenuti potenzialmente infettivi per quanto riguarda tutti gli agenti infettivi; i controlli, incluso quello cut off, vanno quindi manipolati adottando le medesime precauzioni usate con i campioni dei pazienti.
4. Alcuni reagenti contengono sodio azide, che può reagire con il rame o il piombo delle tubature di scarico generando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Eliminare tali reagenti con l'opportuna cautela. Per lo smaltimento dei reagenti attraverso i sistemi di scarico, usare abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche.
5. La soluzione bloccante contiene una sostanza acida diluita. Usarla con attenzione per evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. Evitarne l'esposizione a sostanze basiche, metalli o altri composti che possano reagire con gli acidi. Eventuali versamenti vanno tempestivamente puliti.
6. Smaltire tutti i materiali di rifiuto in conformità alle normative vigenti.
7. I materiali di rifiuto contenenti campioni di pazienti o sostanze di origine umana vanno considerati, ai fini della manipolazione e dello smaltimento, pericolosi dal punto di vista biologico.
8. I reagenti chimici vanno manipolati in base alle corrette prassi di laboratorio.
9. Eventuali versamenti vanno puliti tempestivamente e a fondo. Nel caso di versamenti di sostanze biologicamente pericolose, disinfettare le aree interessate. Eliminare opportunamente tutti i materiali contaminati.
10. Non usare i kit dopo la data di scadenza indicata. La data è stampata sulle confezioni dei kit.

NOTE PROCEDURALI

1. Prima di iniziare l'analisi, è necessario consentire la stabilizzazione di tutti i materiali a temperatura ambiente (18 - 27 °C).

IT

2. Non utilizzare controlli, incluso quello cut off, appartenenti a lotti diversi. Non utilizzare reagenti scaduti.
3. Evitare la contaminazione dei reagenti, delle pipette e dei pozzetti per microtitolazione. Utilizzare puntali nuovi per tutti i campioni. Non scambiare tra loro i tappi dei flaconi. Quando inutilizzati, tenere sempre tappati i flaconi. Non riutilizzare i pozzetti per microtitolazione o i puntali. Non usare pipette contaminate con perossidasi.
4. Tutti i pozzetti vanno trattati nella stessa sequenza e in modo uniforme nel corso dell'analisi. L'analisi va eseguita senza interruzioni.
5. Prima dell'uso, agitare delicatamente e a fondo ciascun flacone di reagente liquido e di campione.
6. Eseguire diluizioni precise in rapporto 1:40.
7. Eseguire tutte le diluizioni con diluente per campione non contaminato. Preparare tutte le diluizioni prima di iniziare l'analisi. Usare sempre diluizioni di campione fresche.
8. Analizzare sempre un controllo positivo per ANA, un controllo cut off ANA e un controllo negativo. Eseguire sempre un bianco con il diluente per campione.
9. I pozzetti rivestiti di antigene sono sensibili all'umidità; non aprire la busta se non dopo aver stabilizzato i pozzetti a temperatura ambiente. Calcolare il numero di pozzetti necessario per l'analisi in corso, estrarre i pozzetti dalla confezione in alluminio stabilizzata a temperatura ambiente, allinearli sul telaio per EIA e aggiungervi immediatamente i campioni. I pozzetti inutilizzati vanno reinseriti nella busta in alluminio contenente una sostanza igroscopica, che va quindi risigillata.
10. I tempi di incubazione influiscono sui risultati dell'analisi EIA. Non consentire l'incubazione nei pozzetti di alcuno dei controlli, dei campioni o del coniugato per più di 40 minuti. Per ottenere risultati ottimali, usare miniprovette da 1 mL per preparare le diluizioni dei campioni. Trasferire tutte le soluzioni nei pozzetti mediante una micropipetta a 8-canali.
11. Dopo ciascuna incubazione, lavare a fondo i pozzetti per microtitolazione con circa 200 µL di soluzione di lavaggio per pozzetto. Prima di passare alla fase successiva, accertarsi di aver rimosso tutto il liquido. Riempire i pozzetti, quindi capovolgerli ed eliminare rapidamente il liquido picchiettando opportunamente. Dopo il lavaggio completo, tamponare la piastra su una salvietta di carta.
12. Trasferire in una provetta graduata 1 mL di coniugato per ciascuna striscia da analizzare. Eliminare il coniugato trasferito in eccesso.
13. Trasferire in una provetta graduata 1 mL di substrato per ciascuna striscia da analizzare. Eliminare il substrato trasferito in eccesso.

RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

1. Prelevare il sangue in modo asettico in provette non trattate.¹¹
2. Lasciare coagulare il sangue. Separare immediatamente il siero.
3. Conservare i sieri a 2 - 8 °C. Se non analizzati entro 24 ore, congelare i sieri a -20 °C; evitare cicli di congelamento ripetuti.
4. Evitare l'uso di sieri lipemici, emolizzati o contaminati.
5. **ATTENZIONE: Per evitare risultati falsamente positivi, i campioni di siero non devono essere inattivati termicamente.**

METODI D'USO

PREPARAZIONE PER IL TESTAZIONE PER IL TEST

IT

1. Predisporre tutti i reagenti, i campioni e le diluizioni necessarie prima di iniziare l'analisi.
2. Soluzione di lavaggio
 - La soluzione di lavaggio concentrata contiene sale: è quindi possibile assistere alla formazione di cristalli nella soluzione concentrata. Per la corretta preparazione della soluzione di lavaggio, eseguire le seguenti operazioni.
 - Trasferire l'intero contenuto del flacone di soluzione di lavaggio, inclusi gli eventuali cristalli, in un contenitore da 1 litro.
 - Gli eventuali cristalli rimasti nel flacone della soluzione di lavaggio vanno rimossi versando una piccola quantità di acqua deionizzata nel flacone, agitando il flacone e versandone il contenuto nel contenitore da 1 litro.
 - Versare una quantità sufficiente di acqua deionizzata nel contenitore da 1 L in modo da portare il volume complessivo della soluzione a 1 litro.
 - Inserire un'ancoretta magnetica nel contenitore da 1 L e collocarlo su un agitatore magnetico. Agitare la soluzione di lavaggio diluita per alcuni minuti, fino al completo dissolvimento dei cristalli. In assenza di un agitatore magnetico,appare il contenitore della soluzione di lavaggio e capovolgerlo più volte fino al dissolvimento dei cristalli. Evitare l'eccessiva formazione di bollicine.
 - La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 14 giorni a 2 - 8 °C.
 - Conservare per l'uso futuro.
3. Lasciare stabilizzare il diluente per campione a temperatura ambiente prima dell'uso. Mescolarlo accuratamente. Evitare inutili contaminazioni.
4. Assegnare i pozzetti ai controlli e ai campioni e prendere nota di tali assegnazioni.
5. Per la preparazione, eseguire le seguenti operazioni.
 - Diluire 10 µL di siero del paziente in 0,4 mL di diluente per campione.
 - Diluire 10 µL di controllo positivo per ANA in 0,4 mL di diluente per campione.
 - Diluire 10 µL di controllo cut off ANA in 0,4 mL di diluente per campione.
 - Diluire 10 µL di controllo negativo in 0,4 mL di diluente per campione.
 - Dopo l'uso, gettare le soluzioni di lavoro residue.
6. Non usare alcun reagente con evidenza di perditedura del test

PROCEDURA DEL TEST

1. Mettere il numero desiderato di strisce su una griglia dei micropozzetti. Per ogni test eseguire cinque (5) determinazioni del controllo/calibratore di cutoff (un controllo negativo, tre calibratori di cutoff ed uno per ognuno dei controlli positivi per valori). In ogni kit di dosaggio occorre inserire anche un bianco del reagente (RB). Verificare i requisiti del software e del lettore per la corretta configurazione del controllo/calibratore. Rimettere le strisce non utilizzate nel sacchetto sigillato con l'essiccante, sigillare e refrigerare immediatamente.

IT

Esempio di configurazione:

Posizione della piastra	Descrizione del campione	Posizione della piastra	Descrizione del campione
1A	RB	2A	Paziente n. 3
1B	NC	2B	Paziente n. 4
1C	Cal	2C	Paziente n. 5
1D	Cal	2D	Paziente n. 6
1E	Cal	2E	Paziente n. 7
1F	PC	2F	Paziente n. 8
1G	Paziente n. 1	2G	Paziente n. 9
1H	Paziente n. 2	2H	Paziente n.10

RB = Bianco - Pozzetto senza aggiunta di siero ma con l'aggiunta di tutti i reagenti.

Utilizzato come bianco per il lettore.

NC = Controllo negativo

Cal = Calibratore di cutoff

PC = Controllo positivo

2. Diluire i sieri da analizzare, il calibratore di cutoff ed i sieri di controllo 1:41 (cioè 10 µl + 400 µl) con il diluente per siero. Miscelare accuratamente. Per diluizioni manuali si raccomanda di dispensare nella provetta prima il diluente per siero, quindi aggiungere il siero del paziente.
3. Nei singoli pozzetti aggiungere 100 µl di calibratore di cutoff, controlli e sieri di pazienti adeguatamente diluiti. Aggiungere 100 µl di diluente per siero nel pozzetto del bianco. Verificare i requisiti di software e lettore per correggere la configurazione del pozzetto del bianco.
4. Incubare ogni pozzetto a temperatura ambiente (21 - 25 °C) per **30 minuti**. (Non incubi il coniugato in pozzi per più di 40 minuti.)
5. Aspirare o rimuovere il liquido dai pozzetti. Se si sta utilizzando un'apparecchiatura di lavaggio automatica o semiautomatica, aggiungere 200-300 µl di tampone di lavaggio in ogni pozzetto. Aspirare o scrollare per rimuovere il liquido. Ripetere due volte la procedura di lavaggio (per un totale di (5) cinque lavaggi). Dopo l'ultimo lavaggio, asciugare la piastra con un fazzolettino di carta per rimuovere tutto il liquido dai pozzetti.

****NOTA IMPORTANTE:** punti 5 ed 8: un lavaggio eccessivo o insufficiente può dar luogo a variazioni del test ed influire negativamente sulla validità dei risultati. Pertanto si raccomanda l'utilizzo di apparecchiatura automatica o semiautomatica per dispensare un volume di liquido che riempia completamente il pozzetto (200-300 µl). Con l'apparecchiatura automatica potrebbe essere necessario effettuare fino a cinque (5) lavaggi. **La rimozione completa del tampone di lavaggio dopo l'ultimo lavaggio è di fondamentale importanza per la corretta esecuzione del test. Inoltre, verificare visivamente che nei pozzetti non rimangano bolle.**

6. Aggiungere 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto, compreso quello del bianco. Durante la dispensazione, evitare la formazione di bolle perché queste possono comportare risultati errati.
7. Incubare ogni pozzetto a temperatura ambiente (21 - 25 °C) per **30 minuti**.
8. Ripetere il lavaggio come descritto al Punto 5.

IT

9. Aggiungere 100 µl di soluzione di cromogeno/substrato (TMB) in ogni pozzetto, compreso il pozzetto del bianco, mantenendo una velocità di aggiunta costante per tutta la piastra.
10. Incubare ogni pozzetto a temperatura ambiente (21 - 25°C) per **30 minuti**.
11. Bloccare la reazione aggiungendo 100 µl di soluzione di bloccaggio (H₂SO₄ 1N) in ogni pozzetto seguendo lo stesso ordine utilizzato per l'aggiunta del cromogeno/substrato, compreso il pozzetto del bianco. Battere delicatamente la piastra lungo i lati esterni per miscelare il contenuto dei pozzetti. Dopo l'aggiunta della soluzione di bloccaggio, la piastra rimane stabile per un massimo di un'ora.
12. Il colore sviluppato deve essere valutato con un lettore per piastre ELISA dotato di filtro a 450 nm. Quando si utilizza la doppia lunghezza d'onda, impostare il filtro di riferimento a 600-650 nm. Occorre azzerare lo strumento sul bianco contro aria. Il bianco reagente deve presentare un'assorbanza inferiore a 0,150 a 450 nm. Se il valore del bianco è ≥ 0,150, occorre ripetere il test. Calibrare lo strumento rispetto al pozzetto del bianco, quindi proseguire con la lettura dell'intera piastra. Una volta ottenuti i valori delle letture, la piastra può essere smaltita.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ai fini della validità dell'analisi, devono essere soddisfatti tutti i seguenti criteri.

1. Un controllo positivo per ANA, un controllo cut off ANA, un controllo negativo per ANA e un controllo bianco (diluente per campione) devono essere inclusi in ciascuna analisi.
2. I valori di ciascun controllo devono rientrare nel range specificato riportato sulla scheda di controllo della qualità allegata a ciascun numero di lotto del kit.
3. La densità ottica del diluente per campione deve essere ≤ 0,200 quando il lettore viene azzerato contro l'aria.
4. **Se uno qualsiasi di questi criteri non è soddisfatto, i risultati dell'analisi non sono validi ed essa va quindi ripetuta.**

INDICAZIONI PER L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

CALCOLO DEI RISULTATI

Determinare i valori ANA* per ciascun campione del paziente (o controllo) mediante la seguente formula:

**I valori ANA sono qualitativi.*

$$\frac{\text{densità ottica del campione di analisi}}{\text{densità ottica del controllo cut off}} = \text{valore ANA del campione di analisi}$$

VALORE ANA INTERPRETAZIONE

La seguente è una guida all'interpretazione dei risultati dell'analisi ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA; si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire i propri criteri per l'interpretazione dei risultati di analisi in base alle proprie popolazioni campione.

ANA#	Interpretation
< 1,0	Negativo
≥ 1,0	Positivo

IT

RISULTATI

I pozzetti delle strisce per microtitolazione vanno letti mediante un lettore per EIA impostato su 450 nm. I risultati vanno letti dopo l'aggiunta della soluzione bloccante (fase di analisi 11) e refertati come segue.

Positivi: una risposta positiva è indicata da una colorazione gialla; i valori calcolati di ANA sono $\geq 1,0$.

Negativi: una risposta negativa è indicata da una colorazione inesistente o giallo pallido; i valori calcolati di ANA sono $< 1,0$.

RANGE DI VALORI ATTESI

La prova dello ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA espede i valori e la distribuzione positiva per i vari sieri positivi per gli anticorpi di importanza clinica è ricapitolata sotto.⁹

ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA

Anticorpi	Numero di		
Specificità	campioni	ANA bassi #	ANA alti #
SS-A	18	3,6	8,1
SS-B	2	1,3	8,8
SS-A/B	9	2,1	11,2
Sm	18	3,5	12,0
RNP	13	2,3	9,2
Scl-70	16	7,7	15,1
Jo-I	13	1,4	7,8
dsDNA	13	1,4	7,8
Histones	7	9,0	17,1
Centromere	13	1,3	4,8

LIMITI DELLA PROCEDURA

Come nel caso di altre analisi diagnostiche per lo screening degli ANA, i risultati vanno usati come strumento ausiliario nella diagnosi del paziente. In caso di un risultato positivo, è necessario eseguire le analisi di conferma per gli anticorpi specifici. Un risultato positivo può essere indicativo della presenza di determinate patologie e va quindi confermato clinicamente.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI DE TEST

SENSIBILITÀ

Per sensibilità si intende la capacità dell'analisi di fornire un risultato positivo nel caso dei campioni di siero effettivamente positivi. Le prestazioni dell' ImmuLisa™ Enhanced ANA Screen ELISA in termini di sensibilità sono state determinate come segue.⁹

Sieri contenenti anticorpi monospecifici clinicamente significativi (n = 59) ottenuti da una vasta gamma di fonti cliniche sono stati analizzati mediante l'analisi EIA per lo screening degli ANA. Il 100% dei sieri contenenti ANA a singola specificità è risultato positivo con l'analisi EIA per lo screening degli ANA.⁹

ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen ELISA - Specificità di anticorpi

Specificità di anticorpi	# di positive (%)	SS-A	SS-B	Sm	SmRNP	Scl-70	Jo-1	dsDNA	Histones	Centro
SS-A/Ro	9 of 9 (100%)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SS-B/La	1 of 1 (100%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SS-A/B	7 of 7 (100%)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sm	9 of 9 (100%)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RNP	6 of 6 (100%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Scl-70	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Jo-1	5 of 5 (100%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
dsDNA	8 of 8 (100%)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Histones	3 of 3 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Centromere	6 of 6 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Sieri positivi per ANA mediante analisi IFA su HEp-2 (n = 371) ottenuti da una vasta gamma di fonti cliniche sono stati analizzati mediante l'analisi EIA per lo screening degli ANA. I risultati sono riassunti di seguito.⁹

Analisi per titolazione di ANA in IFA su HEp-2	Risultati EIA di screening degli ANA	Numero di campioni	%
≥ 1:160	Positivo	220	91
≥ 1:160	Negativo	22	9
1:40 – 1:80	Positivo	72	56
1:40 – 1:80	Negativo	57	44 ⁸

Sieri di pazienti affetti da lupus (n = 38) ottenuti da una vasta gamma di fonti cliniche sono stati analizzati mediante l'analisi EIA per lo screening degli ANA. Il 100% dei sieri dei donatori volontari. In uno dei campioni si è riscontrata la presenza di anticorpi anti-dsDNA; questo campione è stato quindi escluso dal pool di campioni "normali". Dei restanti 69 sieri, 64 sono risultati negativi mediante l'analisi EIA per lo screening degli ANA, generando così una specificità pari al 92,8%.⁹

SPECIFICITÀ

Per specificità si intende la capacità dell'analisi di fornire un risultato negativo nel caso dei campioni di siero effettivamente "normali". Le prestazioni dell' ImmuLISA™ Enhanced ANA Screen ELISA in termini di specificità sono state determinate usando 70 sieri "normali" ottenuti presso una struttura preposta all'analisi dei campioni di sangue provenienti da donatori volontari. In uno dei campioni si è riscontrata la presenza di anticorpi anti-dsDNA; questo campione è stato quindi escluso dal pool di campioni "normali". Dei restanti 69 sieri, 64 sono risultati negativi mediante l'analisi EIA per lo screening degli ANA, generando così una specificità pari al 92,8%.⁹

ACCURATEZZA

Sieri (n = 180) ottenuti da una vasta gamma di fonti cliniche sono stati analizzati, a scopo di confronto, mediante 4 diverse metodiche omologate e mediante l'analisi EIA per lo screening degli ANA. Sono state utilizzate le seguenti metodiche omologate: 1) analisi di screening EIA ENA Plus (per il rilevamento degli anticorpi anti-SS-A, anti-SS-B, anti-Sm, anti-SmRNP, anti-Scl-70 o anti-Jo-1); 2) analisi EIA per gli anticorpi anti-dsDNA; 3) analisi EIA per gli anticorpi anti-istoni e 4) analisi IFA per gli ANA su HEp-2 usata per il rilevamento degli anticorpi anti-centromeri. Dei sieri analizzati, 110 sono risultati positivi

IT

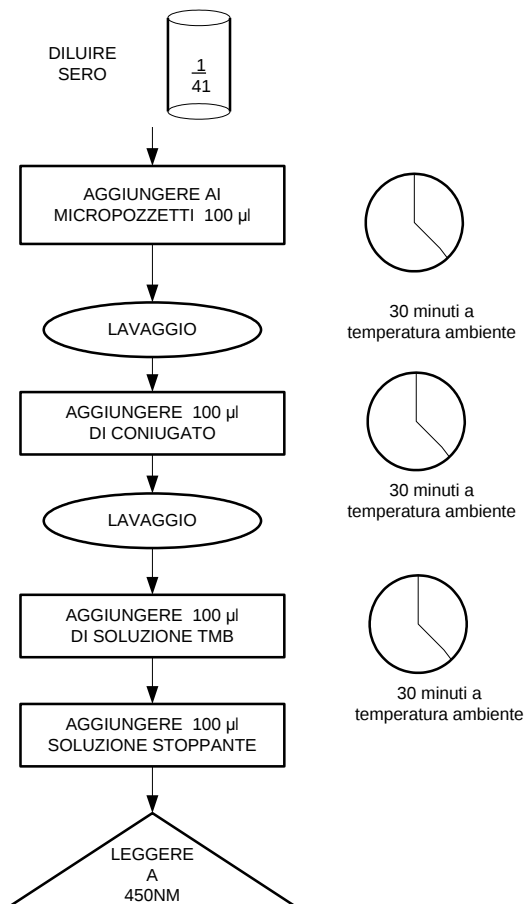
mediante una o più delle metodiche omologate, mentre 70 sono risultati sieri “normali” negativi mediante tutte e quattro le metodiche omologate.⁹

Sieri (n = 469) ottenuti da una vasta gamma di fonti cliniche sono stati analizzati, a scopo di confronto, mediante l'analisi IFA per ANA su HEp-2 e l'analisi EIA per lo screening degli ANA. La corrispondenza complessiva è stata dell'86,1%.⁹

PRECISIONE

La precisione intra-saggio è stata determinata analizzando un controllo fortemente positivo e un controllo debolmente positivo in 18 replicati; i coefficienti di variazione (CV) sono stati rispettivamente del 6,6% e del 9,5%. La precisione inter-saggi è stata determinata analizzando un controllo fortemente positivo e un controllo debolmente positivo in un totale di 24 analisi; i CV sono stati rispettivamente del 6,8% e dell'8,3%.⁹

ANA SCREEN-RIASSUNTO DELLA PROCEDURA DEL TEST



REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Nakamura, R. M.; Greenwald, C. A.; Peebles, C. L.; Tan, E. M. Progress in Laboratory Tests for ANA. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA); American Society of Clinical Pathologists: Chicago, IL, 1978; pp 3-30.
2. Barnett, E. V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. Calif. Med. 1966, 104 (6), 463-469.
3. Whaley, K. Auto-immunity and Systemic Lupus Erythematosus. Med. Lab. Technol. 1972, 29, 133-142.
4. Tan, E. M. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Their Immunobiology and Medicine. Adv. Immunol. 1982, 33, 167-240.
5. Friou, G. J. Clinical Application of Lupus Serum – Nucleoprotein Reaction Using the Fluorescent Antibody Technique. J. Clin. Invest. 1957, 36, 890.
6. Bridges, A. J.; Anderson, J. D.; McKay, J.; Wang, G.; Johnson, J.; Sharp, G. C. Antinuclear Antibody Testing in a Referral Laboratory. Lab. Med. 1993, 24 (6), 345-349.
7. Talbert, M. G.; Moore, S. E. Clinical Significance of a Positive ANA: Contrast Initial with 2 Year Follow-up Data. In Arthritis & Rheumatism, Abstracts of Scientific Presentations, Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 1994, 37 (9), Abstract #342.
8. Venanzi, W. E.; Arroyo, R. A. The Positive ANA by HEp-2 Cell Line Assay in a Normal Population. In Arthritis & Rheumatism, Abstracts of Scientific Presentations, 1994 Regional Meetings of the American College of Rheumatology, 1994, 37 (6), Abstract #6FP.
9. Data on file. HD-0043-797-F.
10. CDC-NIH Manual. 2009. In: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition. U. S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service. pp 9-21.
11. CLSI. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Fourth Edition GP44-A4.
12. CLSI. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute. Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Third Edition C24-A3

For technical assistance and ordering please contact:

Trinity Biotech USA

Jamestown, NY 14701

Tel. 1 800-325-3424

Fax: 716-488-1990

or your local product distributor



Trinity Biotech USA Jamestown, NY 14701 Tel. 1 800-325-3424 Fax: 716-488-1990



Trinity Biotech plc
Bray Co. Wicklow, Ireland
Tel. 353 1 2769800
Fax 343 1 2769888
www.trinitybiotech.com

REV. AUG2016

Document No. PI415175 CE